

DEPARTAMENT DE CIRURGIA

UNIVERSITAT DE LLEIDA



Universitat de Lleida
Registre General

28 GEN. 1999

Es 398

S:

**ESTUDIO DE LA FUNCION INMUNOLOGICA
EN EL TRASPLANTE ESPLENICO.
NUEVO MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS.**



LUIS GOMEZ QUILES

Noviembre 1998

**Directores: Dr. LUIS PEREZ RUIZ.
Dr. XAVIER GOMEZ ARBONES.**

RESUMEN: ESTUDIO DE LA FUNCION INMUNOLOGICA EN EL TRASPLANTE ESPLENICO. NUEVO MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS.

INTRODUCCION. La posibilidad de complicaciones graves en pacientes con indicación de esplenectomía debido a la alteración de la función inmunológica, ha justificado el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas como el trasplante esplénico. Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un nuevo modelo experimental de trasplante esplénico en ratas con el objetivo de estudiar la función inmunológica.

MATERIAL Y METODOS. Distribución aleatoria de 100 ratas isogénicas tipo Lewis en 4 grupos de 25 ratas cada uno: Grupo control con laparotomía y preservación del bazo, grupo de esplenectomía, grupo de autotrasplante esplénico en epiplón y grupo de trasplante esplénico heterotópico. Nuestra técnica quirúrgica de trasplante esplénico cervical, se basa en la tutorización temporal de la anastómosis venosa.

El estudio de la función inmunológica del bazo se basa en los siguientes puntos: Realización y comparación de los resultados obtenidos del hemograma (leucocitos totales, linfocitos, monocitos, PMN y plaquetas) y citometría de flujo (linfocitos CD4, CD8 Y CD19) al inicio del estudio y a las 16 semanas de la cirugía. Estudio del aclaramiento bacteriano mediante la determinación del número de colonias por ml de sangre tras provocar una infección por neumococos a una dosis de 1×10^7 y determinación de la mortalidad postinfección a las 24 horas de la infección. Además, se realiza el estudio histológico de los bazos de los grupos de autotrasplante y trasplante.

RESULTADOS. Los resultados del hemograma y CMF del grupo de trasplante esplénico, solo presentan diferencias significativas en el aumento del número de monocitos ($p=0,017$) y descenso del porcentaje de linfocitos CD19 ($p=0,000$).

En el estudio del aclaramiento bacteriano, las ratas del grupo de trasplante esplénico presentan un efecto protector frente a la bacteriemia superior al grupo de autotrasplante y esplenectomía; aunque inferior al grupo control. Estas diferencias entre los cuatro grupos de estudio son estadísticamente significativas ($p<0,05$).

La mortalidad postinfección en el grupo de trasplante esplénico (36%), es inferior al grupo de autotrasplante (52%) e inferior al grupo de esplenectomía (64%); aunque superior al grupo control (16%).

La estructura histológica del bazo en las ratas trasplantadas es normal.

CONCLUSIONES. Nuestro modelo experimental de trasplante esplénico es una técnica quirúrgica viable, que consigue preservar la función inmunológica con valores próximos a la normalidad y superiores al autotrasplante esplénico.

INDICE GENERAL

	<u>Página</u>
Resumen ficha mecanizada.	1
Indice general.	2
Indice de tablas, figuras y fotografías.	6
Indice de abreviaturas.	13
<u>Introducción.</u>	14
1. El bazo.	14
1.1. Antecedentes históricos.	14
1.2. Anatomía del bazo.	17
1.3. Fisiología del bazo.	20
1.4. Fisiopatología en la esplenectomía.	23
2. Esplenectomía.	24
2.1. Indicaciones de la esplenectomía.	24
2.2. Técnica quirúrgica de la esplenectomía.. . . .	34
2.3. Cirugía conservadora del bazo.	36
3. Autotrasplante esplénico.	39
3.1. Antecedentes históricos.	39
3.2. Métodos y complicaciones.	40
3.3. Evaluación del autotrasplante esplénico.	41
3.4. Autotrasplante esplénico en humanos.	42
3.5. Autotrasplante esplénico experimental.	43
4. Complicaciones postesplenectomía.	44
4.1. Complicaciones inmediatas.	44
4.2. Complicaciones tardía.	45
4.3. Patogénia de las infecciones postesplenectomía.	49

4.4.	Prevención de las infecciones postesplenectomía.	52
5.	Citometría de flujo (CMF).	53
5.1.	Concepto y principios básicos de la CMF.	53
5.2.	Citómetros de flujo. Componentes y características Generales.	55
5.3.	Fluorocromos utilizados en CMF.	58
5.4.	Reproducibilidad y comparación de resultados.	59
5.5.	Aplicaciones de la citometría de flujo.	60
6.	Inmunología del trasplante.	61
6.1.	Concepto y nomenclatura del trasplante.	61
6.2.	Mecanismos efectores en el rechazo de aloinjertos.	62
6.3.	Reacciones injerto contra receptor.	64
6.4.	Prevención y tratamiento del rechazo.	65
7.	Trasplante esplénico experimental en ratas.	67
8.	Estado actual y aplicación en clínica humana del Trasplante esplénico.	68
9.	Justificación del trabajo.	69
10.	Hipótesis.	71
11.	Objetivos.	73
	<u>Material y métodos.</u>	75
1.	Planteamiento metodológico.	75
2.	Animales de experimentación.	77
2.1.	Características generales.	77
2.2.	Grupos de estudio.	79
3.	Material de microcirugía.	81
4.	Técnica quirúrgica.	82
4.1.	Laparotomía en el grupo control.	82
4.2.	Esplenectomía total.	83
4.3.	Autotrasplante esplénico.	84

4.4. Trasplante esplénico cervical.	85
5. Diseño del estudio.	91
6. Citometría de flujo.	95
6.1. Inmunofenotipo de sangre periférica de rata.	95
7. Aclaramiento bacteriano.	97
7.1. Streptococcus pneumoniae.	97
7.2. Siembra de las colonias en placas.	97
7.3. Obtención del número de bacterias a inocular.	99
7.4. Procedimiento y variables a estudiar.	100
8. Estudio histológico. Procesamiento de las muestras.	101
8.1. Fijación de las muestras.	101
8.2. Protocolo de inclusión de las muestras en parafina.	102
8.3. Tinción con Hematoxilina-eosina.	103
9. Estudio histológico.	105
10. Método estadístico.	106
<u>Resultados.</u>	107
1. Estudio estadístico.	107
1.1. Descripción de las características de los grupos de estudio.	107
1.1.1. Sexo.	107
1.1.2. Hemograma. Determinación de leucocitos totales, PMN, monocitos, linfocitos y plaquetas.	108
1.1.3. CMF. Determinación de las subpoblaciones linfocitarias.	111
1.2. Comparabilidad inicial de los grupos de estudio.	113
2.2.1. Hemograma. Estudio del número de leucocitos totales, PMN, linfocitos y monocitos.	113
2.2.2. Hemograma. Estudio del número de plaquetas.	115
2.2.3. CMF. Cuantificación del porcentaje de las sub-	

poblaciones linfocitarias (CD4, CD8 y CD19).	117
1.3. Descripción del grupo de estudio tras el experimento.	119
1.3.1. Hemograma y CMF.	119
1.4. Aclaramiento bacteriano.	122
1.5. Comparación de los resultados antes y después de la cirugía.	124
1.5.1. Hemograma y CMF.	124
1.6. Comparación entre grupos después del experimento.	133
1.6.1. Hemograma y CMF.	133
1.6.2. Aclaramiento bacteriano.	137
1.7. Estudio de la mortalidad.	145
2. Resultados de la técnica quirúrgica del trasplante.	147
3. Resultados del estudio histológico.	148
<u>Discusión.</u>	151
1. Técnica quirúrgica.	151
1.1. Trasplante esplénico cervical.	151
1.2. Técnica quirúrgica del autotrasplante esplénico.	155
2. Estudio de la función inmunológica.	160
2.1. Hemograma. Determinación de leucocitos totales, PMN, linfocitos, monocitos, plaquetas.	160
2.2. CMF. Determinación de los linfocitos CD4, CD8 y CD19..	164
2.3. Aclaramiento bacteriano.	167
2.4. Mortalidad postinfección.	170
3. Estudio histológico.	172
<u>Conclusiones.</u>	174
<u>Bibliografía.</u>	176

INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y FOTOGRAFIAS

	<u>Pagina</u>
Tabla 1. Distribución del sexo por grupos de estudio.	108
Tabla 2. Descriptiva del número de leucocitos totales, PMN, linfocitos, monocitos y plaquetas en el grupo control.	108
Tabla 3. Descriptiva del número de leucocitos totales, PMN, linfocitos, monocitos y plaquetas en el grupo de Esplenectomía.	109
Tabla 4. Descriptiva del número de leucocitos totales, PMN, linfocitos, monocitos y plaquetas en el grupo de Autotrasplante.	109
Tabla 5. Descriptiva del número de leucocitos totales, PMN, linfocitos, monocitos y plaquetas en el grupo de Trasplante.	110
Tabla 6. Descriptiva de las subpoblaciones linfocitarias por CMF en el grupo control.	111
Tabla 7. Descriptiva de las subpoblaciones linfocitarias por CMF en el grupo de esplenectomía.	111
Tabla 8. Descriptiva de las subpoblaciones linfocitarias por CMF en el grupo de autotrasplante.	112
Tabla 9. Descriptiva de las subpoblaciones linfocitarias por CMF en el grupo de trasplante.	112
Tabla 10. Media, error típico e intervalo de confianza de los valores obtenidos en el hemograma en los cuatro grupos de estudio.	113
Tabla 11. Comparabilidad de los resultados del hemograma	

entre los grupos, antes de la cirugía.	114
Tabla 12. Prueba de Kruskal-Wallis. Comparación entre los valores del hemograma y los grupos de estudio.	115
Tabla 13. Media e intervalo de confianza del número de plaquetas en los grupos de estudio, previo a la cirugía.	115
Tabla 14. Cálculo de las diferencias del valor medio en el número de plaquetas entre los grupos al inicio del estudio.	116
Tabla 15. Prueba de Kruskal-Wallis. Comparación entre las cifra de plaquetas y los grupos de estudio.	116
Tabla 16. Valor de la media e IC 95% de las sub-poblaciones linfocitarias en los grupos de estudio.	117
Tabla 17. Cálculo de las diferencias del valor medio en las sub-poblaciones linfocitarias entre los grupos al inicio del estudio.	118
Tabla 18. Prueba de Kruskal-Wallis. Comparabilidad de los valores de las subpoblaciones linfocitarias entre los grupos de estudio.	118
Tabla 19. Valor de la media de los variables del hemograma y CMF en el grupo control, después de la cirugía.	119
Tabla 20. Valor de la media de los variables del hemograma y CMF en el grupo de esplenectomía, después de la cirugía.	120
Tabla 21. Valor de la media de los variables del hemograma y CMF en el grupo de autotrasplante, después de la cirugía.	120
Tabla 22. Valor de la media de los variables del hemograma y CMF en el grupo de trasplante, después de la cirugía.	121
Tabla 23. Cálculo de la media, valor máximo y mínimo del número de colonias obtenidas por ml de sangre (UFC/ml); a los 30, 60,120 y 180 minutos, en los grupos de estudio.	122
Tabla 24. Cálculo de la media, intervalo de confianza (95%),	

t de Student y significación estadística (p), de las variables estudiadas del hemograma y CMF en el grupo control, antes y después de la cirugía.	124
Tabla 25. Prueba de Wilcoxon. Calculo de las diferencias de medias en los datos de las variables del hemograma y CMF, antes y después de la cirugía en el grupo control.	125
Tabla 26. Media, intervalo de confianza, t de Student y significación estadística de las variables obtenidas del hemograma y CMF en el grupo de esplenectomía, antes y después de la cirugía.	125
Tabla 27. Prueba de Wilcoxon. Cálculo de las diferencias de medias en los datos de las variables del hemograma y CMF, antes y después de la cirugía en el grupo de esplenectomía.	126
Tabla 28. Media, intervalo de confianza, t de Student y significación estadística de las variables del hemograma en el grupo de auto-trasplante, antes y después de la cirugía.	126
Tabla 29. Prueba de Wilcoxon. Cálculo de las diferencias de medias en los datos de las variables del hemograma y CMF, antes y después de la cirugía en el grupo de autotrasplante.	127
Tabla 30. Media, intervalo de confianza, t de Student y significación estadística de las variables del hemograma y CMF en el grupo de trasplante, antes y después de la cirugía.	127
Tabla 31. Prueba de Wilcoxon. Comparación de los valores del hemograma y citometría de flujo antes y después de la cirugía en el grupo de trasplante.	128
Tabla 32. Comparación entre los grupos de estudio, de los valores medios de las variables del hemograma y CMF.	134
Tabla 33. Cálculo de la media y la significación estadística	

entre los grupos, de las variables del hemograma y CMF.	135
Tabla 34. Prueba de Kruskal-Wallis.	136
Tabla 35. Cálculo del valor medio del aclaramiento en los grupos de estudio en función del tiempo.	137
Tabla 36. Determinación de la media y su significación estadística entre los grupos de estudio, del aclaramiento bacteriano a los 30 minutos.	138
Tabla 37. Comparación entre los grupos de estudio de la diferencia de medias e IC 95%, a los 30 minutos del aclaramiento bacteriano.	138
Tabla 38. Determinación de la media y su significación estadística entre los grupos de estudio, del aclaramiento bacteriano a los 60 minutos.	139
Tabla 39. Comparación entre los grupos de estudio de la diferencia de medias e IC 95%, a los 60 minutos del aclaramiento bacteriano.	139
Tabla 40. Determinación de la media y su significación estadística entre los grupos de estudio, del aclaramiento bacteriano a los 120 minutos.	140
Tabla 41. Comparación entre los grupos de estudio de la diferencia de medias e IC 95%, a los 120 minutos del aclaramiento bacteriano.	140
Tabla 42. Determinación de la media y su significación estadística entre los grupos de estudio, del aclaramiento bacteriano a los 180 minutos.	141
Tabla 43. Comparación entre los grupos de estudio de la diferencia de medias e IC 95%, a los 180 minutos del aclaramiento bacteriano.	141
Tabla 44. Prueba de Kruskal-Wallis entre los grupos	

de estudio en función del tiempo.	144
Tabla 45. Supervivencia a las 24 horas en los grupos	
de estudio.	145
Tabla 46. Prueba de Chi-cuadrado de Pearson.	146

Figura 1. Diagrama de cajas del número de leucocitos y linfocitos, <i>antes y después de la cirugía</i> en los grupos de estudio.	129
Figura 2. Diagrama de cajas del número de PMN y monocitos, <i>antes y después de la cirugía</i> en los grupos de estudio.	130
Figura 3. Diagrama de cajas del número de plaquetas <i>antes y después de la cirugía</i> , en los grupos de estudio.	131
Figura 4. Diagrama de cajas de las subpoblaciones linfocitarias en los grupos de estudio.	132
Figura 5. Diagrama de cajas del aclaramiento bacteriano en los grupos de estudio, en función del tiempo.	142
Figura 6. Cinética del aclaramiento bacteriano en los grupos de estudio, en función de las unidades de tiempo (30, 60, 120 y 180 minutos).	143
Figura 7. Gráfica de barras de la supervivencia a las 24 horas, en los grupos de estudio.	146

Fotografía 1. Imagen del bazo de la rata donante después de la extracción; tutorización del cuff de arteria aorta y vena porta.	86
Fotografía 2. Detalle ampliado de la región vascular del bazo donante; visualización del cuff de la arteria aorta y vena porta (tutorizada).	87
Fotografía 3. Preparación del receptor con cervicotomía y disección de la arteria carótida y vena yugular externa.	89
Fotografía 4. Anastómosis terminolateral del cuff de aorta del donante con la carótida del receptor mediante sutura continua con Ethicon 10/0.	89
Fotografía 5. Anastómosis venosa tutorizada termino-terminal del cuff de porta del donante con la vena yugular externa del receptor mediante la utilización del catéter endoluminal (Abbocath nº24).	90
Fotografía 6. Se retira el catéter parcialmente y por inyección de suero salino se comprueba la estanqueidad de la anastómosis y la permeabilidad de la misma.	90
Fotografía 7. Preparación histológica con Hematoxilina-eosina del bazo trasplantado. Visualización de la pulpa blanca (x25 aumentos).	149
Fotografía 8. Detalle ampliado de la pulpa blanca. Distribución normal de agregados linfoides perioarteriolares con normal arquitectura (x100 aumentos).	150
Fotografía 9. Detalle ampliado de la arteriola con la distribución normal de los agregados linfoides (x250 aumentos).	150

INDICE DE ABREVIATURAS

CMF.	Citometría de flujo.
UFC.	Unidad formadora de colonias.
ml.	Mililitros.
Ig.	Inmunoglobulina.
AHAI.	Anemia hemolítica autoinmune.
PTI.	Púrpura trombocitopénica idiopática.
PTT.	Púrpura trombopénica trombótica.
FMM.	Fibrosis con metaplasia mieloide.
OPSI.	Infección fulminante postesplenectomía.
PMN.	Polimorfonucleares.
GVH.	Reacción injerto contra receptor (graft versus host).
CD4+.	Subpoblación linfocitaria de linfocitos T inductores.
CD8+.	Subpoblación linfocitaria de linfocitos T supresores.
CD19+.	Subpoblación linfocitaria de linfocitos B.
H-E.	Hematoxilina-eosina.

INTRODUCCION

1. EL BAZO.

1.1. ANTECEDENTES HISTORICOS.

Durante mas de 2500 años no se conocieron las funciones biológicas del bazo. Sin embargo, desde hace tiempo se sabe que su extirpación es compatible con la vida.

Aristóteles (384-322 a.C.) supuso que el bazo no era necesario para la vida. Galeno (131-200 a.C.) describió el bazo como un "órgano lleno de misterios". Plinio, en el primer siglo, pensó que el peso del bazo dificultaría la rapidez de los corredores y "podría extraerse del cuerpo por una incisión", pero con una complicación: la pérdida de la facultad para reír.

En el Talmud Babilónico (siglos II a VI) y en los escritos judíos antiguos de Judah Halevi (1086-1145), se postuló que el bazo "limpiaba la sangre y el espíritu de sustancias no claras y oscuras". Maimónides, en sus "Aforismos de Moisés" (siglo XII), insistió nuevamente en el concepto de la función hemopurificadora (Rosner). Durante los siglos XVIII y XIX, los experimentos en animales apoyaron el concepto de la naturaleza no esencial del bazo, aunque se describieron alteraciones en la sangre periférica después de la esplenectomía (Morgenstern).

La primera esplenectomía registrada en la literatura médica fue realizada en 1549 por Adrián Zacarelli en un paciente con esplenomegalia por paludismo (Sherman); posteriormente la primera esplenectomía parcial exitosa fue informada por Franciscus Rossetti en 1590.

La esplenectomía parcial por traumatismo precedió a la esplenectomía total por la misma causa, efectuada por primera vez por Nicolaus Mathias en 1678. Billroth (1881), postuló que el bazo era capaz de repararse después de una lesión, conclusión basada en la necropsia de una persona que sufrió lesión esplénica contenida y que murió por traumatismo cefálico.

Durante las dos primeras décadas de este siglo comenzaron a aparecer defensores del uso de un taponamiento del órgano lesionado y se informó que la reparación con suturas era posible. Se atribuye a Zikoff la primera reparación con éxito de un bazo lacerado en 1895. William Mayo (1910) hizo una esplenorrafia por lesión del bazo por arma de fuego.

Durante muchos años se ha considerado el papel del bazo en relación con las infecciones. Contradiendo experimentos iniciales que no mostraron efectos adversos de la esplenectomía sobre las infecciones; Morris y Bullock, por medio de experimentos controlados con bacilo de peste de ratas en 1919, llegaron a la conclusión de que la resección del bazo "roba al cuerpo su resistencia". Sin embargo, hasta hace relativamente poco tiempo, muchos clínicos y cirujanos no creían que la esplenectomía podía comprometer las defensas del huésped contra las infecciones.

El primero de los informes recientes donde se pone de manifiesto la relación de la esplenectomía con la presencia de complicaciones infecciosas, fue el de King y Shumacker en 1952, registrando una mayor susceptibilidad a infecciones en niños tras esplenectomía por enfermedades hematológicas, debido a la observación de 5 casos de sepsis mortal aparecidas tardíamente en niños esplenectomizados por una microesferocitosis hereditaria. Posteriormente, Singer en 1973, tras una completa revisión de 2975 esplenectomías infantiles, llega a la conclusión que las posibilidades de una sepsis en el niño esplenectomizado son 60 veces superiores a la del niño normal.

Desde entonces, numerosos trabajos han puesto de manifiesto la mayor incidencia de complicaciones infecciosas en pacientes

esplenectomizados, justificando la mayor tendencia actual por parte del cirujano a realizar cirugía conservadora del bazo.

La introducción en los últimos años de nuevos métodos diagnósticos y el desarrollo de técnicas quirúrgicas han hecho posible diversas intervenciones y enfoques terapéuticos para las enfermedades y lesiones esplénicas, con el fin de reducir lo máximo posible la realización de esplenectomías.

Debido al mejor conocimiento de la función inmunológica del bazo y a la aparición de numerosos trabajos poniendo de manifiesto el mayor índice de complicaciones graves en pacientes esplenectomizados, el cirujano se ha esforzado en desarrollar técnicas quirúrgicas que mantengan la función inmunológica del bazo en los pacientes donde resulta inevitable la práctica de esplenectomías. Estas nuevas técnicas desarrolladas por el cirujano han sido el autotrasplante y el trasplante. La primera opción ha puesto de manifiesto limitaciones funcionales, como más adelante comentaremos; y la segunda opción, motivo de esta tesis, se encuentra en estos momentos en fase de experimentación y de iniciación en clínica humana.

1.2. ANATOMIA DEL BAZO.

El bazo se origina por diferenciación mesenquimática a lo largo del lado izquierdo del mesogastrio dorsal en el embrión de 8 mm (5ª semana de gestación); los remanentes mesenquimatosos que no se fusionan con la masa esplénica principal explican la alta incidencia (15-30 %) de bazos accesorios (Fleming, 1976).

El bazo normal de un adulto es de color rojo oscuro, sólido, ligeramente cóncavo hacia el hilio; mide unos 3 - 8 - 14 cm, pesa entre 100 y 175 gramos y con frecuencia tiene lobulaciones fetales en su cara anterior.

Es el segundo órgano más grande del sistema reticulo-endotelial después del hígado. Se ubica en la porción posterior del cuadrante superior izquierdo profundo con relación a la 9ª, 10ª y 11ª costillas. Sus caras superior y lateral convexas están inmediatamente adyacentes a la cara inferior de la hoja izquierda del diafragma. La configuración de la cara interna cóncava es consecuencia de las impresiones hechas por el estómago, páncreas, riñón y ángulo cólico izquierdo.

La posición del bazo se mantiene, en parte, por diversos ligamentos suspensorios: ligamento gastroesplénico, esplenofrénico, esplenocólico y esplenorrenal. La falta de estos elementos de anclaje, puede dar origen a "bazos flotantes", con la consiguiente posibilidad de torsión esplénica.

El bazo recibe su irrigación del tronco celiaco a través de la arteria esplénica y las arterias gástricas cortas, que suelen ser ramas de las arterias gastro-epiploica o esplénica. Existe un grado variable de ramificación próxima al hilio; con frecuencia una rama para el polo inferior se origina centralmente. El drenaje venoso mayor fluye a través de la vena esplénica, que por lo general recibe a la vena mesentérica inferior centralmente y después se une a la vena mesentérica superior para formar la vena porta.

Los bazos accesorios, formados por sangre, senos y cuerpos de Malpighi, se han encontrado en un 14 a 35% de los pacientes, aumentando su incidencia en los casos con enfermedades hematológicas (Cameron, 1959).

El bazo esta formado por una cápsula que normalmente tiene 1 a 2 mm de espesor y trabéculas que rodean e invaginan la pulpa. El parenquima esta formado por la "pulpa blanca" que funciona como un órgano inmunológico, la "pulpa roja" que fagocita materia particulada de la sangre y una zona marginal.

La pulpa blanca, que es central y rodea una arteria central, está formada por nódulos linfáticos con centros germinales y vainas linfáticas periarteriales que constituyen una red llena de linfocitos y macrófagos. Periféricamente a la pulpa blanca se sitúa la zona marginal que contiene arterias terminales que se originan en la arteria central y en arterias penicilares periféricas. La zona marginal contiene linfocitos y macrófagos y algunos eritrocitos que han salido de las arterias terminales. La zona marginal también contiene el seno marginal que filtra material de la pulpa blanca centralmente ubicada. La pulpa roja se ubica periférica con relación a la zona marginal; esta pulpa consiste en cordones y senos que contienen elementos celulares de la sangre en tránsito.

La circulación intraesplénica ha sido un tema muy discutido, abogando algunos autores a favor de una circulación de tipo "cerrado", y otros a favor de una circulación de tipo "abierto" (Weiss, 1988). Actualmente se admite la existencia de ambos tipos, sí bien la abierta sería la predominante. Se entiende por circulación abierta la terminación de una arteriola en el centro de un cordón de Billroth, de tal forma que las células sanguíneas quedan libres y tienen que avanzar activamente, sorteando los obstáculos mencionados, para poder llegar a la luz sinusoidal y a las venas colectoras. Por el contrario, en el esquema de la circulación cerrada, la arteriola desembocaría directamente en un sinusoides. La teoría de la circulación abierta ha permitido comprender

fácilmente la gran capacidad de aclaramiento del bazo de sustancias particuladas, parásitos y otros elementos anómalos (Eichner, 1979).

1.3. FISIOLOGIA DEL BAZO.

Las funciones del bazo se pueden agrupar en:

- 1) aquellas relacionadas con elementos celulares en la sangre circulante; y
- 2) aquellas de naturaleza inmunológica.

Las funciones celulares incluyen hematopoyesis, almacenamiento, "corrosión" y "selección".

La hematopoyesis, que aporta células eritroides, mieloides, linfoides y plaquetas en la vida fetal, esencialmente cesa hacia el 7º mes intrauterino. En el hombre, el bazo no sirve como un reservorio importante de células sanguíneas, excepto de plaquetas.

La "corrosión" se refiere a la remoción de estructuras rígidas como cuerpos de Heinz, cuerpos de Howell-Jolly y gránulos de hemosiderina de los eritrocitos; el proceso involucra la remoción de sustancias intracelulares no deformables de células deformables. El cuerpo rígido es fagocitado, mientras que la masa citoplasmática deformable pasa hacia el seno, y retorna a la circulación general. El frotis de sangre postesplenectomía se caracteriza por la presencia de eritrocitos circulantes con cuerpos de Howell-Jolly y Papenheimer (gránulos sideróticos). También las células nucleadas pierden sus núcleos de la misma forma.

Selección es el término aplicado a la capacidad del bazo de remover eritrocitos viejos o anormales. Normalmente, a medida que el eritrocito envejece con una expectativa de vida de alrededor de 120 días, pierde el equilibrio osmótico y la integridad de la membrana, y por consiguiente la deformidad, siendo fagocitados por macrófagos nativos. En el adulto normal, el bazo es el sitio más importante de secuestro eritrocitario selectivo y durante su ciclo de vida el eritrocito pasa un mínimo estimado

de 2 días dentro del bazo, el cual contiene aproximadamente 25 ml de eritrocitos.

El neutrófilo tiene una vida media de aproximadamente 6 horas; aunque el papel del bazo en la destrucción de neutrófilos en condiciones normales no se ha cuantificado bien, en algunos estados hiperesplénicos el papel del bazo está aumentado, con una neutropenia resultante. Normalmente, alrededor de un tercio de la masa de plaquetas está acumulado en el bazo y este "pool" se intercambia libremente con las plaquetas circulantes que tienen una expectativa de vida aproximada de 10 días.

Las funciones inmunológicas del bazo son (Lockwood, 1983):

1. Vigilancia inmunológica: procesamiento de la información antigénica y regulación del tráfico linfocitario.
2. Aclaramiento inmune:
 - opsonización: iniciación de la producción de anticuerpos específicos y producción de factores séricos potenciadores de la fagocitosis.
 - Fagocitosis: atrapamiento de microorganismos.
 - eliminación de inmunocomplejos y captación de hematíes.
3. Regulación inmune:
 - desarrollo de la memoria celular.
 - maduración de los linfocitos T superiores.
 - control de la autoinmunidad.

El hígado es el órgano de mayor aclaramiento de sustancias extrañas a causa del gran flujo sanguíneo que recibe, y en condiciones normales, el bazo elimina los organismos que no son captados por el hígado. No obstante, el bazo desempeña un papel más importante en la captación de organismos virulentos, como las bacterias capsuladas (Traub, 1987). Es también el principal responsable del atrapamiento y la posterior eliminación de las partículas recubiertas con IgG

(microorganismos, hematíes, leucocitos, plaquetas), mientras que el hígado capta y elimina mejor las partículas recubiertas con C3b. Posee una gran capacidad para procesar rápidamente la información antigénica que recibe, gracias a la estrecha proximidad que mantiene estructuralmente las células fagocitarias y los linfocitos B y T en el bazo (Charles, 1988).

La opsonización de partículas extrañas se realiza a través de la producción de IgM específica, estimuladores de la fagocitosis como el tetrapéptido tufsina, la properdina y el complemento (Morris, 1919).

1.3. FISIOPATOLOGIA EN LA ESPLENECTOMIA.

En ausencia del bazo se producen diversos defectos inmunológicos (Sans-Sabrafen, 1976):

1. pérdida de la capacidad de filtración mecánica.
2. disminución de la actividad fagocítica.
3. disminución de concentración de factores opsonizantes.
4. disminución de la concentración de IgM sérica.
5. reducción de la concentración de properdina y tuftsin.
6. alteración de la actividad de los linfocitos colaboradores y supresores.
7. alteración de la producción de anticuerpos después de la vacunación neumocócica y meningocócica.

La alteración en la producción de anticuerpos específicos se detecta incluso muchos años después de la esplenectomía y no depende de las circunstancias patológicas por las que esta se practicó, pues se observa también en los esplenectomizados por traumatismos esplénicos (Strauch, 1979).

Fundamentalmente, el defecto radica en los linfocitos B, es decir, su función no mejora con la acción de los linfocitos T colaboradores y se manifiesta por una incapacidad general de los linfocitos B para diferenciarse en células productoras de anticuerpos (imposibilidad de pasar de la síntesis de IgM a IgG después de la inmunización intravenosa) (Baker, 1979).

2. ESPLENECTOMIA.

2. 1. INDICACIONES DE LA ESPLENECTOMIA.

En los últimos años, el conocimiento progresivo de la función del bazo y la presencia de complicaciones postesplenectomía, ha conducido a una consideración de las indicaciones de la esplenectomía, sobre todo en los casos de esplenectomía incidental o en los traumatismos abdominales (García Valdecasas, 1980).

Las afecciones que con mayor frecuencia precisan de la indicación de esplenectomía se pueden clasificar según Mitchel y Morris en: enfermedades hematológicas, enfermedades propias del bazo, traumatismos esplénicos, cirugía oncológica y una miscelánea que engloba otras afecciones.

2.1.1. ENFERMEDADES HEMATOLOGICAS.

Las enfermedades hematológicas comprenden hoy día el grupo más amplio de indicaciones de esplenectomía. Según Damesheck se pueden agrupar en procesos autoinmunes, hemofilia, púrpura trombocitopénica trombótica y neoplasias hematológicas. Las enfermedades hematológicas con indicación de esplenectomía son las siguientes:

1. Anemia hemolítica autoinmune (AHAI). Enfermedad que puede tener un origen idiopático, o bien aparecer de forma secundaria a otros procesos, como síndromes linfo/mieloproliferativos o enfermedades de base inmune. Según el mecanismo etiopatogénico se distinguen tres tipos

de AHAI: por crioaglutininas, por aglutininas bifásicas (hemoglobinuria paroxística a frígore) y por anticuerpos calientes; siendo esta última la de mayor interés para el cirujano por ser la forma en la que con más frecuencia se indica la esplenectomía. Las indicaciones fundamentales son:

1. Pacientes cuya anemia no puede ser controlada con el tratamiento corticoideo en la fase aguda de la enfermedad.
2. Pacientes que requieren altas dosis de corticoides durante el periodo de mantenimiento.
3. Aquellos pacientes que han desarrollado serias complicaciones consecuencia del tratamiento corticoideo.

En las formas idiopáticas el tratamiento con corticoides obtiene efectos beneficiosos en un 75% de los pacientes, pero si éste fracasa la práctica de la esplenectomía conduce a una mejoría en el 50-80%. En las formas secundarias, la práctica de la esplenectomía puede ayudar además a establecer el diagnóstico de la enfermedad primaria (Dacie, 1970).

2. Púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) o enfermedad de Werlhof.

Es la indicación hematológica más común de esplenectomía. En esta entidad el bazo cumple una función doble: produce los anticuerpos antiplaquetares (asociados en el 90% de los casos de PTI), y a su vez, es el órgano en el que se produce la destrucción de las plaquetas recubiertas por el anticuerpo por parte del sistema mononuclear fagocítico. La esplenectomía se reserva para los pacientes que no responden a los diferentes tratamientos de primera línea (como corticoides o inmunoglobulinas) o bien que necesitan un tratamiento continuado para alcanzar un recuento plaquetario que no produzca fenómenos hemorrágicos. La exéresis esplénica produce remisiones permanentes en el 70-80% de los pacientes refractarios al tratamiento corticoideo. El 30% de los pacientes esplenectomizados por enfermedad de Werlhof recidivan en los siguientes 12 meses. En los niños se debe retrasar la

esplenectomía hasta después de los 6 años, para reducir el riesgo de infecciones graves por gérmenes capsulados.

Tan pronto como parezca indicado realizar la esplenectomía, debe hacerse una inmunización con la vacuna polivalente neumocócica.

La mortalidad por esplenectomía en la PTI es menor del 2%, y es debida principalmente a hemorragia intracraneal. En el 80 % de los casos, la cifra de plaquetas se normaliza en el transcurso de las primeras 6 semanas postoperatorias. Aproximadamente el 5% de pacientes, continúan con trombocitopenia grave después de la esplenectomía (Doan, 1961).

3. Síndrome de Evans. Es la asociación de púrpura trombocitopénica idiopática con anemia hemolítica autoinmune (Dameshek, 1975).

4. Esferocitosis hereditaria. Proceso hemolítico en que los hematíes intrínsecamente anormales son destruidos en el bazo. El tratamiento es la esplenectomía, a la cual responden un porcentaje elevado de pacientes (Weed, 1970).

5. Eliptocitosis hereditaria. La esplenectomía está indicada en las formas graves, con un alto índice de respuestas (Geerdink, 1966).

6. Púrpura trombocitopénica trombótica (PTT). Descrita en 1925 por Mosckowitz, consiste en la formación de agregados plaquetarios a nivel de las arteriolas terminales y capilares, con la consiguiente lesión de los hematíes a su paso por estos vasos. El tratamiento de primera línea, se basa fundamentalmente en la plasmaféresis y el tratamiento corticoideo. Si no se obtiene respuesta se indica el tratamiento inmunosupresor (ciclofosfamida, azatioprina, vincristina). La esplenectomía está indicada en los casos de refractariedad al resto de opciones terapéuticas disponibles. Su efecto beneficioso se basa en la reducción de la formación

de anticuerpos, así como en un mecanismo de inmunomodulación (Cutner, 1974).

7. Enfermedad de Hodgkin. La indicación de la esplenectomía en esta enfermedad está justificada por la necesidad de un conocimiento exacto de la extensión de la misma, ya que en ello se basa la actitud terapéutica a seguir. De hecho entre el 30% y el 40% de los enfermos a los que se realiza una laparotomía exploradora con esplenectomía, se produce una modificación en su estadio clínico previo. Hoy día se acepta la realización de la laparotomía exploradora con esplenectomía en los estadios I y II de Ann-Arbor; se considera no necesaria en el estadio IV, y sujeta a valoración en el estadio III (Sadunsky, 1978).

8. Linfomas no hodgkinianos. El riesgo quirúrgico y las complicaciones aumentan en los pacientes con estos linfomas, probablemente debido a que se presentan en edades más avanzadas, a su estado general más debilitado, y a la mayor extensión del proceso en el momento del diagnóstico (Goffinet, 1973).

9. Leucemia mieloide crónica. La esplenectomía no estaba indicada en su tratamiento hasta los trabajos de Idhe y Morgenstern, en los que se ha podido demostrar una mejoría en la calidad de vida de estos pacientes; no obstante, no existe diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la supervivencia.

10. Tricoleucemia. La leucemia de células piliformes es un proceso linfoproliferativo crónico caracterizado por pancitopenia, esplenomegalia sin linfadenopatía importante y la presencia de células mononucleares características en sangre y médula ósea. El bazo es el órgano más frecuentemente afectado. El tratamiento de elección está basado en fármacos como el alfa-interferón y la Deoxicoformicina. La esplenectomía

está indicada en casos de rotura o infarto esplénico, esplenomegalia masiva y/o hiperesplenismo (Golomb, 1978).

11. Fibrosis con metaplasia mieloide (FMM). Proceso mieloproliferativo crónico caracterizado por una intensa fibrosis de la médula ósea que conlleva la aparición de focos de hematopoyesis extramedular, fundamentalmente en bazo e hígado. La esplenectomía se reserva para casos de infarto esplénico, esplenomegalia sintomática que no ha respondido al tratamiento médico y para pacientes con esplenomegalia moderada y asintomática pero con requerimientos transfusionales muy elevados. De todas formas, y aunque la esplenectomía puede reducir los requerimientos transfusionales y corregir parcialmente la trombopenia, la mortalidad es muy alta, debido a que la mayoría de pacientes son de edad avanzada. Además, no parece que la esplenectomía aumente la supervivencia, y del 12 al 15% de los pacientes presentan coagulación intravascular diseminada inaparente, responsable de una alta mortalidad postoperatoria.

12. Anemia aplásica. Cuadro caracterizado por una pancitopenia asociada a un déficit en la producción hemopoyética medular, de causa desconocida o secundaria a un agente tóxico (fármacos, virus, radiaciones). En 1975, Damesheck ha sugerido el efecto beneficioso de la esplenectomía, si existe evidencia de esplenomegalia o de secuestro esplénico.

13. Síndrome de Wiskott-Aldrich y trombocitopenia hereditaria. Consiste en una trombocitopenia crónica con vida media plaquetaria normal. Algunos autores han demostrado la eficacia de la esplenectomía (Cooper, 1984).

14. Hiperesplenismo. Este concepto, utilizado por primera vez por Chauffard en 1907, se refiere a diversidad de efectos perjudiciales que

resultan del aumento de la función esplénica y que pueden mejorar con la esplenectomía.

El hiperesplenismo se clasifica según Bowdler como:

- **Primario:** cuando no es posible identificar una enfermedad subyacente que explique la función esplénica exagerada. El hiperesplenismo primario fue descrito en 1939 por Doan y Wiseman como una enfermedad que consiste en neutropenia y esplenomegalia y que curaba con la esplenectomía; posteriormente se amplió el síndrome para incluir a pacientes con grados variables de anemia, trombocitopenia o pancitopenia.
- **Secundario:** se refiere a los casos en que se ha diagnosticado un trastorno específico más o menos bien definido. El hiperesplenismo secundario se refería de manera clásica a un síndrome de pancitopenia acompañado de hipertensión portal por obstrucción intrahepática o extrahepática de la vena porta o esplénica. Sin embargo, actualmente incluye varias enfermedades que comparten la característica común de la esplenomegalia, cuya clasificación según la etiología es la siguiente:
 1. Hipertrofia funcional por respuesta inmunitaria: endocarditis bacteriana, mononucleosis infecciosa y síndrome de Felty.
 2. Hipertrofia funcional por destrucción de eritrocitos: esferocitosis, talasemia y déficit de piruvato kinasa.
 3. Congestivo: cirrosis y trombosis de vena esplénica.
 4. Mieloproliferativo: leucemia mieloide crónica y fibrosis con metaplasia mieloide.
 5. Infiltrativo: sarcoidosis, amiloidosis y enfermedad de Gaucher.
 6. Neoplásico: linfoma, tricoleucemia, leucemia linfática crónica y cáncer metastásico.

2.1.2. TRAUMATISMOS ESPLÉNICOS.

El bazo es el órgano intraabdominal que más frecuentemente se lesiona en traumatismos contusos (Ratner, 1977; Grosfeld, 1980). Las lesiones esplénicas comprenden del 5 al 30% de los traumatismos toracoabdominales (Weinstein, 1979). La mortalidad de la esplenectomía, cuando existen lesiones abdominales asociadas, puede alcanzar el 18%, mientras que si el bazo es el único órgano lesionado es inferior al 10% (Liebermann y Fabri, 1974).

El diagnóstico y evolución de una lesión esplénica aislada es variable. El bazo recibe un 5% del gasto cardiaco, y un desgarró con afectación del hilio esplénico ocasiona hemorragia intensa y continua (Green, 1986). Si la lesión no incluye los principales vasos esplénicos y se limita a la pulpa o a la cápsula, el paciente puede permanecer estable hemodinamicamente. Sin embargo, es posible que se formen hematomas subcapsulares, que se romperán después de la lesión y originarán el fenómeno de "*rotura tardía o diferida del bazo*", término introducido por Evans en 1886. Dicho concepto se utilizaba como premisa para justificar la esplenectomía como único tratamiento eficaz en la lesión esplénica; actualmente, con las técnicas diagnósticas por imagen y las posibilidades terapéuticas de los traumatismos esplénicos, se sabe que la rotura tardía esplénica correspondía a un diagnóstico y manifestación tardía de la lesión.

Un dato a tener en cuenta en los traumatismos esplénicos, es la presencia en un porcentaje elevado (30-66%) de esplenosis tras la esplenectomía (Ludtke, 1989); este es uno de los motivos que justifica la menor incidencia de complicaciones en pacientes esplenectomizados por traumatismo, respecto a otras causas (Muller, 1984).

2.1.3. ESPLENECTOMIA INCIDENTAL

Se define como aquella que se realiza a lo largo de una intervención en la que la extirpación del bazo no estaba programada y se produce una lesión yatrógena del bazo que nos obliga a practicar la esplenectomía. La incidencia varia de unas series a otras, entre el 19 y el 31% (Danforth y Thorbjarnarson, 1976). Aproximadamente el 50% de las indicaciones de la esplenectomía se deben a lesión del bazo, ya sea traumática o intraoperatoria (lesiones incidentales) (Rich y col. , 1965).

El tipo de cirugía que más frecuentemente se asocia a la esplenectomía incidental es la cirugía gástrica, le siguen la cirugía renal, la cirugía de la hernia de hiato y la cirugía del colon (Devlin y col. 1969).

En principio, la extirpación del bazo aumenta la morbilidad de la intervención realizada, y deja al paciente con una capacidad inmunitaria disminuida (Fabri y col. 1974).

2.1. 4. CIRUGIA ONCOLOGICA

En este apartado hay que diferenciar entre la esplenectomía realizadas cuando el tumor primario se localiza en el bazo, y aquellas en las que el bazo o bien, las adenopatias hiliares esplénicas, se afecta por proximidad del tumor primario, principalmente en el cáncer gástrico.

Los tumores primarios benignos y malignos son excepcionales. Los tumores esplénicos benignos incluyen hamartomas, linfangiomas y hemangiomas. La mayor parte de los malignos primarios son angiosarcomas (Aranha y col. 1976), aunque puede haber linfoma esplénico primario

El empleo de la gastrectomía total, o subtotal ampliada, es decir, incluyendo el bazo o el epiplón mayor, se ve justificada por la notable frecuencia de metástasis ganglionares en el hilio esplénico, sobre todo

cuando la neoplasia gástrica está localizada en el tercio superior (Yamada, 1975).

En la cirugía oncológica del páncreas y del colon (ángulo esplénico) el bazo puede estar afecto por extensión precisando en estos casos la esplenectomía del paciente.

2.1.5. MISCELANEA.

Existe un grupo heterogéneo donde la esplenectomía puede estar indicada. Destacamos los siguientes:

1. Abscesos esplénicos. Antiguamente era consecuencia de enfermedades infecciosas (fiebre tifoidea, paludismo). Hoy día las etiologías más frecuentes son infecciones abdominales o respiratorias, administración endovenosa en drogadictos, endocarditis bacteriana y una lesión esplénica quirúrgica desapercibida (Gadacz, 1974).
2. Tumoraciones quísticas del bazo. Las lesiones quísticas del bazo incluyen quistes parasitarios (75%) y no parasitarios (25%). Los primeros son causados casi de forma exclusiva por equinococos. Los quistes verdaderos del bazo son muy raros, e incluyen epidermoides y dermoides, hemangiomas quísticos y linfangiomas quísticos (Cohen y Ahmad, 1976).
3. Rotura espontánea del bazo. Entidad poco frecuente que se presenta como complicación de otro proceso (paludismo, mononucleosis infecciosa) (Lee, 1976), aunque se ha descrito la rotura de bazos aparentemente normales (Foley, 1969; Pérez, 1976).
4. Torsión del bazo. Eventualidad excepcional, relacionada con una anomalía congénita del mesogastrio posterior (Pollack, 1977; Dealbert, 1986).

5. Cirugía del trasplante renal. Al parecer, la extirpación del bazo reduce la capacidad inmunitaria del receptor y mejora la tolerancia a la quimioterapia, aunque no alarga la supervivencia del trasplante renal (Cerilli y Jones, 1977).

6. Hipertensión portal segmentaria. Es aquella que deriva de la dificultad de retorno venoso del bazo, debido a un proceso que provoca la trombosis de la vena esplénica.

2.2. TECNICA QUIRURGICA DE LA ESPLENECTOMIA.

En 1725 Richard Blackmore escribió un interesante trabajo titulado "A clinical dissertation upon the spleen" en el que se valora la importancia del bazo. Este autor llega a la conclusión de que dicho órgano no era vital y que por lo tanto su extirpación no comportaba ninguna consecuencia. Más tarde, a partir de las primeras esplenectomías realizadas por Riegues en 1893, la esplenectomía se convirtió progresivamente en el tratamiento electivo de las lesiones esplénicas.

En la esplenectomía pueden utilizarse una variedad de incisiones, dependiendo de la naturaleza de la enfermedad y de la preferencia personal del cirujano. Esta variedad incluye: incisión mediana paraumbilical, paramediana izquierda, subcostal oblicua izquierda y abordaje combinado toraco-abdominal. En general se prefiere la incisión en línea media, debido a su rapidez de realización, importante en los casos de traumatismo, además de permitir un acceso satisfactorio al bazo y otras vísceras que pudieran estar lesionadas.

En caso de una esplenectomía electiva el primer paso es el corte de las inserciones ligamentosas: ligamento esplenofrénico en el polo superior y los ligamentos esplenocólico y esplenorrenal en el polo inferior. Una vez se ha cortado totalmente el ligamento esplenofrénico, puede movilizarse suficientemente el bazo (maniobra de Gómez y Gómez), como para identificar e interrumpir dos o tres venas cortas gástricas, teniendo en cuenta no provocar lesiones en la pared gástrica. Posteriormente la disección se dirige hacia el hilio esplénico, donde deben ser ligados individualmente la arteria esplénica y vena esplénica, respectivamente; siendo aconsejable utilizar doble ligadura en la arteria. Durante la disección hiliar debe cuidarse de no lesionar la cola del páncreas, debido a la posibilidad de provocar fístulas pancreáticas.

Después de la esplenectomía es aconsejable realizar un control exhaustivo de la hemostasia en la cara inferior del diafragma, curvatura mayor gástrica y región del hilio. En caso de lesión gástrica o pancreática y esplenectomía traumática es conveniente dejar drenaje (Nora, 1972).

En la cirugía esplénica electiva ante grandes esplenomegalias es aconsejable realizar un abordaje anterior, es decir, a través del epiplón mayor se realiza la ligadura de los vasos esplénicos antes de practicar la movilización del bazo y la esplenectomía (Goldstone, 1978).

Debe realizarse una exploración completa de toda la cavidad abdominal ante la posible presencia de bazos accesorios que serán resecaos en caso de esplenectomía por enfermedad hematológica. Se encuentran en el 18-30% de las enfermedades hematológicas; siendo el sitio más común la región del hilio.

2.3. CIRUGIA CONSERVADORA DEL BAZO.

La idea de la conservación parcial o total del bazo ha estado periódicamente aceptada y rechazada. "En cualquier lesión esplénica la esplenectomía es la intervención de elección, excepto en algunas heridas en las que están justificadas las medidas conservadoras" (Turner, 1955), "La sutura del bazo no tiene defensores" (Patel, 1955), "Es imperativa la extirpación del bazo frente a sus lesiones" (Hunt, 1968), "El único tratamiento posible en los traumatismos esplénicos es la esplenectomía. Las lesiones no sangrantes de la cápsula esplénica pueden provocar tardíamente hemorragias mortales" (Shires, 1969).

Desde la década de los años 70 los nuevos conocimientos obtenidos sobre las funciones inmunológicas esplénicas y las complicaciones postesplenectomía descritas en numerosos trabajos (Millikan, 1987; Shakford, 1990), además del desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas y quirúrgicas han determinado la puesta en marcha de métodos conservadores en la cirugía del bazo (Artigas, 1991).

Actualmente cerca del 90% de lesiones esplénicas no precisan cirugía, siendo la abstención quirúrgica el método mas frecuentemente utilizado en la conservación del bazo (Artigas, 1980; Aznar, 1986).

Métodos de reparación de las lesiones esplénicas (Pachter, 1981):

1. Hemostasia directa mediante la utilización de sustancias hemostáticas (colágeno, adhesivo de fibrina). Se emplean en las lesiones capsulares superficiales y como complemento de las suturas esplénicas.
2. La sutura esplénica o esplenorrafia. Puede ser efectuada de diferentes formas (Keramidas, 1979; Conti, 1980) y con distintos materiales (Villareal Rios, 1974; Burrington, 1977; La Mura, 1977). Según las circunstancias

puede practicarse un capitonaje con o sin interposición de substancia hemostáticas reabsorbibles o de epiplón (Olsen, 1966; Petrousky, 1980). Los puntos pueden apoyarse sobre laminas de silicona o reabsorbiere a fin de evitar el desgarr capsular y asegurar la solidez de los puntos hemostáticos.

3. Electrocoagulación. Se ha utilizado en la hemostasia de fisuras capsulares. La utilización del coagulador de superficie con infrarrojos (ICC) ha supuesto un avance en este tipo de cirugía.

4. Embolización arterial esplénica. Sistema poco empleado debido a su complejidad y alto índice de fracasos (Leonard, 1980).

5. Utilización de mallas de diferentes materiales para envolver el bazo, a nivel de la lesión esplénica.

6. Esplenectomía parcial. A nivel del hilio esplénico, la arteria esplénica se divide en dos ramas lobares superior e inferior en el 84% de los casos y en tres ramas en el 16%. La distribución arterial intraparemqumatososa es segmentaria, terminal y sin anastómosis; la circulación venosa sigue la misma distribución.

La primera esplenectomía parcial con éxito en traumatismo esplénico fue realizada por Morgenstein en 1966. Las experiencias de Campos, Christo, Burrington, Schermann y Arch son lo suficiente demostrativas para aceptar la posibilidad de resección parcial del bazo en los traumatismos esplénicos con rotura paremqumatososa.

Desde un punto de vista técnico, el control e identificación del hilio esplénico es fundamental para realizar una correcta esplenectomía parcial. La ligadura de los vasos correspondientes al segmento interesado, con o sin clampaje del hilio esplénico, produce una isquemia del mismo con cambios muy evidentes en su coloración, por lo que queda bien delimitada la línea de resección. En ocasiones, la esplenectomía parcial, al igual que

los traumatismos hepáticos, debe efectuarse a la demanda (Stiegnmann, 1979).

3. AUTOTRASPLANTE ESPLENICO.

3.1. ANTECEDENTES HISTORICOS DEL AUTOTRASPLANTE ESPLENICO.

En Cirugía experimental el primer trabajo es realizado por Stubenrauh en 1912, utilizando fragmentos de bazo implantados en el epiplón; los injertos eran viables a los 2 meses. En 1916, Manley y Marine, realizan un autotrasplante de tejido esplénico en 6 conejos, a nivel del tejido subcutáneo abdominal, siendo todos ellos reabsorbidos a los 12 días. En 1917, los mismos autores autotrasplantan el bazo a 49 conejos de diferentes edades, un pequeño fragmento de bazo (2 - 3 mm) a nivel del tejido de la fascia abdominal; los injertos de los conejos jóvenes crecieron rápidamente, sin embargo, los conejos mas adultos presentaron reabsorción del injerto; el examen histológico de los injertos viables presentó una estructura normal ricamente vascularizada.

En clínica humana, Patel en 1981 recoge 4 casos de autotrasplante esplénico de 2 fragmentos de 3 mm de grosor a nivel del epiplón. El trabajo más numeroso lo publica Moore en 1984, recogiendo 43 casos de autotrasplante esplénico en el epiplón.

3.2. METODOS Y COMPLICACIONES DEL AUTO-TRASPLANTE ESPLENICO.

En el autotrasplante esplénico se han utilizado diferentes métodos según el lugar de implantación del injerto y el tamaño del mismo.

Las diferentes localizaciones de implante son:

- epiplón mayor.
- fascia preperitoneal.
- mesenterio de intestino delgado.
- transportal intrahepático.
- transhepático intrahepático.
- peritoneal libre ("esplenosis").
- retroperitoneal.
- subcutáneo.
- intramuscular.

El lugar más empleado en clínica humana y cirugía experimental es el epiplón por varios motivos: técnica sencilla, rica vascularización y fácil manejo para evaluar su viabilidad (Kusminsky, 1982). La técnica más empleada es la del "*pouch*", que consiste en la realización de bolsas para el alojamiento del injerto a nivel del epiplón (Tesluk, 1979). Los tamaños de los injertos también son diversos, no existiendo consenso respecto a la forma y el peso del implante ideal (Steely, 1988).

En la literatura médica solo se recogen 5 casos de complicaciones: 2 casos de oclusión intestinal y 3 casos de absceso focal.

3.9 EVALUACIÓN DEL AUTOTRASPLANTE ESPLÉNICO

El diseño de los trabajos experimentales para comprobar la funcionalidad del autotrasplante se basa en tres aspectos:

- 1) Aclaramiento bacteriano.
- 2) Porcentaje de mortalidad tras infección.
- 3) Estudio inmunológico.

Obviamente las dos primeras características no pueden ser medidas en humanos, por consiguiente, el estudio del autotrasplante esplénico en clínica humana basado en el estudio histológico y la Scintografía (Winkelstein, 1975; Ramchandram, 1980), para medir la captación de contraste isotópico, no es valorable para determinar la capacidad inmunológica del autotrasplante esplénico (Browder, 1983; Timens, 1992).

3.4. AUTOTRASPLANTE ESPLÉNICO EN HUMANOS.

Existen pocos trabajos documentando la experiencia clínica con autotrasplante esplénico. Todos los trabajos, excepto el de Traub son retrospectivos. En dicho trabajo la función reticulo-endotelial estaba mejor preservada en los casos de esplenectomía parcial y esplenorrafia que en los autotrasplantados.

El primer trabajo de autotrasplante esplénico en humanos donde se realiza un estudio inmunológico y una scintigrafía fue el de Patel en 1981.

Desde entonces, se han realizado diversos estudios acerca del funcionamiento del bazo trasplantado (Nielsen, 1984; Nicholson, 1986; Buyukunal, 1987; Mizrahi, 1989...), basados en la Scintigrafía y el hemograma, obteniéndose resultados muy diversos.

Varias publicaciones han mostrado una reducción gradual de la trombocitosis y un incremento de las inmunoglobulinas hasta niveles normales (Velcek, 1982; Durig, 1984; Patel, 1986; Traub, 1987; Iglesias, 1992...). Además, en sangre periférica se observan reducción de hallazgos típicos de los pacientes esplenectomizados, como los cuerpos de Howell-Jolly (Pisters, 1994) y las células diana o dianocitos (Rice, 1980).

Las complicaciones registradas tras la práctica de autotrasplante son escasas, dos casos de oclusión intestinal (Buyukunal, 1987; Bem, 1991) y tres casos de absceso (Nielsen, 1984).

Moore recoge en 1984 un caso de OPSI (Overwhelming post-splenectomy infección) en un paciente previamente autotrasplantado con una captación en la Scintigrafía normal. Al menos, 14 casos de sepsis postesplenectomía han sido registrados en pacientes con autotrasplante esplénico (Holdsworth, 1991). Estos datos, ponen de manifiesto, la duda acerca del verdadero restablecimiento de la función esplénica con el autotrasplante esplénico.

3.5. AUTOTRASPLANTE ESPLÉNICO EXPERIMENTAL.

El autotrasplante esplénico experimental ha sido realizado en diferentes especies animales y en diversas localizaciones. El animal más utilizado ha sido la rata, aunque también se han utilizado conejos, perros y cerdos. Los sitios utilizados en el injerto han sido el epiplón, la fascia subcutánea, peritoneo libre y retroperitoneo, sin embargo, los mejores resultados han sido obtenidos en el epiplón.

Tampoco existe unidad de criterio respecto al método utilizado. Es decir, existe diferente número de secciones a implantar, a la vez que el tamaño y el peso de los trozos de bazo son diversos.

El estudio de la función inmunológica del bazo autotrasplantado se basa en dos puntos: Aclaramiento bacteriano sanguíneo del animal de experimentación tras provocar una infección grave (normalmente con neumococos) y la determinación de la mortalidad tras dicha infección.

4. COMPLICACIONES POSTESPLENECTOMIA.

4.1. COMPLICACIONES INMEDIATAS.

Son aquellas que aparecen en el periodo postoperatorio precoz, que en gran parte son comunes a otros procedimientos quirúrgicos del abdomen. Sin embargo, existen numerosas publicaciones que constatan un incremento en el número de complicaciones en comparación con una población quirúrgica de la misma edad, patología y procedimiento quirúrgico, pero sin esplenectomía asociada.

Las complicaciones inmediatas infecciosas locales ocurren en aproximadamente el 16% de pacientes que se someten a esplenectomía. En una tercera parte de los casos se trata de abscesos subfrenicos y en el resto de infecciones de la herida quirúrgica (Chaimoff, 1978).

4.2. COMPLICACIONES TARDIAS.

1) COMPLICACIONES TROMBOEMBOLICAS.

El número elevado de plaquetas (trombocitosis) y el aumento de hematíes lesionados circulantes, provoca una mayor incidencia de complicaciones tromboembólicas en los pacientes esplenectomizados (Laufer, 1978).

Fabri en su trabajo de 1944 esplenectomías realizadas, encuentra una incidencia de trombosis en extremidades inferiores del 5%. En una revisión de 202 fallecimientos en pacientes adultos esplenectomizados (Pimpl y col. 1989), se observó un aumento significativo en la incidencia de embolismo pulmonar, siendo esta entidad la responsable del 35% de las muertes. Ziernski y col. publican una incidencia de embolismo pulmonar del 3% en el postoperatorio precoz de pacientes esplenectomizados. Sin embargo, Robinette y Fraumeni (1977) no encuentran diferencias significativas en la incidencia de estas complicaciones en pacientes esplenectomizados.

2) COMPLICACIONES RESPIRATORIAS.

Existen dos entidades clínicas respiratorias no infecciosas que en los pacientes esplenectomizados se presentan con mayor frecuencia respecto a los pacientes operados sin esplenectomía (Lau, 1983):

- Atelectasias.
- Síndrome de distres respiratorio agudo (SDRA).

3) TRASTORNOS HEMATOLOGICOS.

La alteración más frecuente es la presencia de trombocitosis, es decir, que el número de plaquetas es superior a $400 \times 10^3/\mu\text{l}$. La esplenectomía ocasiona un número elevado de plaquetas durante los dos primeros meses tras la cirugía. Posteriormente pueden normalizarse, o permanecer elevados (40% de los esplenectomizados) o incluso ser superiores a $1000 \times 10^3/\mu\text{l}$.

4) COMPLICACIONES INFECCIOSAS.

Las infecciones en los pacientes esplenectomizados suponen el grupo de complicaciones más frecuentes y de mayor gravedad. Según el agente etiológico las dividimos en tres grupos, siendo las infecciones bacterianas las más numerosas y de peor pronóstico.

1. INFECCIONES BACTERIANAS.

En los pacientes esplenectomizados, la incidencia de infecciones bacterianas graves se ha estimado entre el 4 y el 12% (Eraklis y Filler, 1972). Los estudios que aportaron información clínica detallada señalaron que las infecciones más frecuentes eran meningitis, neumonía, pielonefritis y bacteriemia. De estos estudios se estima que estas infecciones aparecen con una frecuencia de 6 a 9 veces mayor en niños esplenectomizados que en adultos.

La incidencia descrita de infecciones bacterianas fatales es relativamente constante y oscila de 2,1 a 3,5%. Se ha estimado que dichas infecciones ocurren con una frecuencia 200-300 veces mayor en pacientes esplenectomizados que en la población general.

Las infecciones graves son más frecuentes durante el periodo inmediato que sigue a la esplenectomía. Horan y Colebath observaron

que el 61% de las infecciones graves ocurrieron dentro del primer año postoperatorio, además el 96% de los episodios aparecieron en los 5 primeros años. En el 20% de los pacientes que sobrevivieron a la infección inicial, presentaron posteriormente dos o más episodios de infecciones graves.

El riesgo de infección grave postesplenectomía es más alto cuanto más joven es el paciente (Anderson, 1975). En lactantes el riesgo de infección alcanza el 50% (Aigner, 1980), siendo del 5% en menores de 15 años. Los niños esplenectomizados tienen un riesgo de sepsis 58 veces superior al niño normal, con una mortalidad media del 75% de estos casos (Lucas, 1960). Según los trabajos de Lowden y Eraklis (1972), la mortalidad por sepsis postesplenectomía fue tres veces mayor en pacientes menores de 4 años, respecto a los niños de edad más avanzada.

Además de la edad, otro factor importante en la incidencia y gravedad de las infecciones en pacientes esplenectomizados, es el tipo de indicación. Es decir, la esplenectomía consecutiva a un traumatismo y a cirugía incidental presenta menos incidencia de infecciones respecto a la esplenectomía por enfermedades hematológicas. Singer, autor de la revisión más extensa de pacientes esplenectomizados (2795 pacientes), encuentra una incidencia de infecciones graves del 1,5% en pacientes esplenectomizados por traumatismo; 2,1% en la esplenectomía incidental y del 2,1 al 24% según el tipo de enfermedad hematológica.

Respecto a la bacteriología, el *streptococcus pneumoniae* es la bacteria responsable del mayor número de infecciones en pacientes esplenectomizados, aproximadamente en el 50% de los casos (Lund, 1973; Wara, 1981). Le siguen por orden de frecuencia: *neisseria meningitidis*, *haemophilus influenzae*, *escherichia coli* y otros estreptococos.

Merece especial atención la infección fulminante postesplenectomía, entidad clínica descrita por Diamond en 1969 (O.P.S.I.), que se caracteriza por clínica de náuseas, vómitos y confusión de comienzo súbito, que da

lugar a coma y a menudo precede a la muerte que aparece en unas horas. La tasa de mortalidad oscila entre el 50 y 75% (Balfanz, 1976). Aproximadamente la mitad de los casos se deben al neumococo. En la autopsia se observan los signos típicos de septicemia y con frecuencia también hemorragia suprarrenal en un número elevado de casos (síndrome de Waterhouse-Friderichsen).

2. INFECCIONES VIRICAS.

La incidencia y gravedad de infecciones víricas no aumenta apreciablemente por la esplenectomía.

3. INFECCIONES PROTOZOARIAS.

La gravedad de la enfermedad clínica producida por los protozoos Babesia y Plasmodium aumenta con la esplenectomía.

4.3. PATOGENIA DE LAS INFECCIONES POST-ESPLENECTOMIA.

Los trabajos realizados hasta la actualidad sugieren que los pacientes esplenectomizados presentan disminución de la inmunidad, y sobre todo se han descrito también deficiencias de inmunoglobulinas y del complemento (Christensen, 1978; Airó, 1985). El defecto más importante resultante de la esplenectomía parece ser la alteración en la producción de anticuerpos en respuesta e los antígenos administrados por vía endovenosa. Después de la esplenectomía, la aparición de anticuerpos antígeno-específicos circulantes se retrasa por espacio de 2 a 4 días (Rowley, 1950).

Los individuos sin bazo no pueden pasar de la producción de IgM a IgG. El nivel promedio de IgM en suero de los pacientes esplenectomizados se halla reducido de forma significativa (Graffner, 1982). Las inmunoglobulinas IgA e IgG se elevan con frecuencia en sujetos normales esplenectomizados y no se conocen datos fiables sobre la IgD e IgG (Chaimoff, 1978). Algunos trabajos presentan variaciones en la cifra de Ig E (Chelazzi, 1985).

La deficiencia de IgM en los pacientes esplenectomizados no explica totalmente la incapacidad para eliminar las bacterias circulantes (Basile, 1985; Kelemen, 1986). Las defensas del huésped ante la mayoría de las bacterias implican la opsonización por parte del anticuerpo (IgG) o del complemento. Las bacterias opsonizadas pueden entonces eliminarse por el bazo y con menos eficacia por el hígado. Sin embargo, en ausencia de opsoninas, los neumococos se eliminan casi exclusivamente por el bazo (Ek, 1950; Drew, 1984). Experimentalmente se ha demostrado la eficacia superior del bazo en 18 veces respecto al hígado, en la eliminación de neumococos marcados (Gopal, 1977).

Diversos estudios sugieren que la esplenectomía no compromete significativamente la eliminación de partículas opsonizadas por el sistema mononuclear-fagocítico (Millard, 1979). Sin embargo, la pérdida de la función fagocítica esplénica podría ser de mayor significado en pacientes esplenectomizados con enfermedades que comprometan el hígado y los órganos del sistema reticulo-endotelial, es decir, existe un mayor riesgo de infección grave en los pacientes esplenectomizados con cirrosis hepática, hemocromatosis y enfermedades de depósito de lípidos (Melamed, 1982; Pabst, 1991).

Los neumococos son opsonizados de forma óptima por el anticuerpo específico, aunque, también pueden ser opsonizados por el complemento siguiendo la vía alternativa (Claret, 1975). A este respecto, la actividad de la properdina, un factor de la vía alterna del complemento, se halla reducida en el individuo sin bazo, pero no es una reducción absoluta (Carlisle, 1959).

Constantopoulos (1972) ha sugerido en su estudio que en pacientes esplenectomizados la función fagocítica está también comprometida por la carencia de tufsina, péptido favorecedor de la fagocitosis. Se considera que el bazo es donde tiene lugar la síntesis o activación de la tufsina. Existen trabajos (Jones, 1976; Richter, 1986) donde se describe la deficiencia de tufsina en individuos sanos con bazos normales, por consiguiente la relación entre tufsina, función esplénica e infección esta por determinar.

La esplenectomía altera, así mismo, el número de linfocitos. Los linfocitos T circulantes se encuentran discretamente reducidos tras la esplenectomía; iniciada la respuesta de proliferación mitogénica linfocitaria disminuye, pero después retorna a la normalidad (Sullivan, 1978). Las funciones de los leucocitos polimorfonucleares y los niveles de C3 no se modifican en los pacientes sin bazo.

En resumen, aunque existen numerosos defectos de la respuesta inmunológica después de la esplenectomía, ninguno de ellos puede explicar totalmente la incapacidad para eliminar adecuadamente los

gérmenes encapsulados circulantes. Es probable que el mismo efecto de filtración del bazo sea importante para eliminar estos gérmenes, y en este sentido, el hígado no es tan eficiente como el bazo.



4.4. PREVENCIÓN DE LAS INFECCIONES POST-ESPLENECTOMIA.

La incidencia elevada de infecciones bacterianas fulminantes, y a menudo fatales en pacientes esplenectomizados, ha conducido a la investigación de medidas preventivas eficaces. Para los pacientes de riesgo elevado se ha recomendado el uso convencional de vacunas bacterianas y de antibióticos profilácticos (Bouza, 1986).

La vacuna de polisacáridos neumocócicos debe administrarse a todos los pacientes mayores de 2 años de edad, incluido los adultos. Esta vacuna comprende 14 serotipos de neumococos, que ocasionan al menos el 80% de las infecciones neumocócicas bacterianas (Scher y Caplan, 1983).

Se ha preconizado la profilaxis prolongada con penicilina por vía oral para los pacientes esplenectomizados, pero no se han realizado estudios sobre el tema. Los antibióticos deben administrarse durante al menos 5 años después de la esplenectomía y quizás durante toda la vida en pacientes de riesgo más elevado (Di Padova, 1983).

5. CITOMETRIA DE FLUJO (CMF). PRINCIPIOS BASICOS Y APLICACIONES.

5.1. CONCEPTO Y PRINCIPIOS BASICOS DE LA CMF.

La técnica de la citometría de flujo fue desarrollada en la década de los años sesenta, en los Estados Unidos y Alemania, como un avance importante en la investigación de la biología celular (Shapiro, 1988). Pero es desde hace aproximadamente diez años, en que los avances en inmunología, oncología y hemopatología, así como el desarrollo de la tecnología de los anticuerpos monoclonales (Köhler y col. 1975) y fluorocromos, han permitido la aplicación de la citometría de flujo en la investigación biomédica y en la práctica clínica.

Se define como citómetro de flujo al aparato que es capaz de medir componentes y propiedades celulares (partículas biológicas) que fluyen en suspensión. Existen citómetros que poseen, además, la capacidad de separar partículas de forma selectiva, a partir de la suspensión líquida, denominándose "sorters".

Los principios básicos de la citometría de flujo son sencillos (Gomez-Arbonés, 1990). Es esencial disponer de una suspensión de células o partículas individuales, de modo que la dificultad para obtenerla es un factor limitante para el empleo de la técnica. Las células o partículas (núcleos, organelas, cromosomas...) son marcadas por colorantes fluorescentes que son capaces de excitarse con una fuente luminosa de alta energía.

La suspensión celular convenientemente procesada y teñida, se inyecta en la cámara de flujo del citómetro, que está hidrodinámicamente enfocada para que las células pasen individualmente, una detrás de otra, a través de un punto en que éstas interaccionan físicamente con un haz

de luz monocromática, dispersando la luz en todas las direcciones. La luz dispersada hacia adelante (llamada forward scatter a 0 grados) está relacionada con el tamaño de la célula. La luz dispersada a 90 grados del eje del haz lumínico (light scatter a 90 grados) está relacionada con la estructura interna y la complejidad citoplasmática.

La excitación de los fluorocromos ocurre en el punto de interacción de la célula y el haz lumínico, dando como resultado la emisión de una luz de longitud de onda superior a la incidente. Esta luz es recogida a 90 grados, siendo dirigidas las longitudes de onda seleccionadas mediante espejos (dicróicos) adecuados a detectores fotomultiplicadores. Las longitudes de onda no deseadas son bloqueadas por filtros ópticos. Si se dispone de múltiples fluorocromos, excitables con la fuente de luz única, pueden unirse a las células permitiendo, de este modo, medidas fluorescentes simultáneas de varios parámetros de una sola célula.

Las señales eléctricas analógicas son convertidas en señales digitales y son procesadas por un ordenador, con el fin de generar histogramas correlacionados con los parámetros deseados y efectuar el análisis de los mismos.

Las ventajas que proporciona la citometría de flujo frente a otros métodos que emplean fluorocromos incluyen la objetividad, elevada sensibilidad y velocidad de análisis, posibilidad de realizar mediciones simultáneas sobre una sola célula y separación celular en los sorters. Las desventajas y limitaciones son los altos costes de instrumentación y la incapacidad de visualizar las células que estamos analizando.

5.2. CITOMETROS DE FLUJO. COMPONENTES Y CARACTERISTICAS GENERALES.

A diferencia de otras técnicas, el citómetro de flujo mide características celulares individuales de un gran número de células y además, permite medir características de poblaciones concretas en muestras heterogéneas.

En todo citómetro de flujo existen unos componentes básicos:

5.3.1. Sistema óptico: El sistema óptico está constituido por la fuente de iluminación, los filtros necesarios para discriminar la señal lumínica y llevarla al detector adecuado y, por último, los fotodetectores que se encargan de recoger la luz.

Como fuente de iluminación se puede usar lámparas de arco voltaico o láseres, siendo éstos últimos más utilizados por sus ventajas: mejor rendimiento para FITC, posibilidad de iluminación con varios láseres y posibilidad de separación celular. Los láseres más utilizados son los de argón de baja intensidad (10-15mW), refrigerados por aire. Los citómetros que utilizan luz de láser deben tener una configuración ortogonal.

La luz producida por la fuente de iluminación, después de interaccionar con las partículas en la cámara de flujo, excita la fluorescencia de los fluorocromos y es dispersada. Existe también dispersión de luz según las características morfológicas de las partículas. La luz dispersada es recogida por la lente colectora y mediante los filtros ópticos de la bancada óptica es llevada a los fotodetectores.

Los filtros ópticos son los que seleccionan la longitud de onda que llega a cada fotodetector y le confieren la especificidad de lectura de una u otra fluorescencia. Existen filtros coloreados o de absorción, que absorben la luz de una determinada longitud de onda. Los filtros de

interferencia o difracción reflejan la luz que tiene una longitud de onda superior o inferior a la que dejan pasar.

Los fotodetectores pueden ser de dos tipos. Los fotomultiplicadores detectan la señal de fluorescencia y luz dispersada a 90 grados. Los fotodetectores diodos detectan la dispersión frontal de la luz.

5.3.2. Sistema hidráulico: Está compuesto por la cámara de flujo y el sistema de presión y de inyección de la muestra. Las cámaras de flujo son diferentes según sea la fuente de iluminación del citómetro. Los aparatos equipados con láser utilizan cámaras similares a la descrita por Crosland y Taylor. Las cámaras pueden ser cerradas o abiertas, teniendo, éstas últimas, velocidades de flujo superiores y fácil limpieza.

El sistema de presión y de inyección de la muestra se encarga de adquirir la muestra e inyectarla junto con el fluido de arrastre en la cámara de flujo. Es fundamental que la velocidad de inyección de la suspensión celular sea constante y que las presiones se mantengan estables durante toda la lectura. Existen dos sistemas principales: por presión, en la que se crea una presión en el tubo de la muestra que obliga a que ésta fluya hacia la cámara de flujo, y por inyección isovolumétrica por jeringa, en la que la muestra es aspirada por una jeringa que después la inyecta en la cámara de flujo.

5.3.3. Componente electrónico: Cuando la luz incide en los fotodetectores se produce una respuesta de los mismos en forma de señal eléctrica. Los pulsos detectados por los fotodetectores pasan a un amplificador y, después, son convertidos de señal analógica a digital. Se pueden efectuar amplificaciones lineales a 256 canales (8bits), 1024 canales (10bits) o logarítmicas (3 ó 4 décadas).

Existe la posibilidad de seleccionar un umbral de señal, así como crear regiones selectivas de adquisición. Después del procesamiento informático de la señal se obtienen histogramas mono, biparamétricos o multiparamétricos. Los datos obtenidos con la lectura por citometría de

flujo pueden ser almacenados en forma de histograma o como base de datos en la que se registra en forma de lista para cada evento, la señal producida por cada parámetro evaluado (list mode).

5.3. FLUOROCROMOS UTILIZADOS EN CITOMETRIA DE FLUJO.

Los fluorocromos ofrecen un método sensible para obtener información acerca de la estructura, función y vitalidad de las células. En citometría, el fluorocromo ideal debería tener un alto coeficiente de extinción a la longitud de onda de excitación (probabilidad de absorber la luz), un alto rendimiento cuántico (emisión de luz), una elevada fotoestabilidad y un corto estado de excitación. Si el fluorocromo va unido a otra molécula, por ejemplo un anticuerpo monoclonal que le confiera especificidad de marcaje, debe ser insensible a cambios de pH, polaridad y microambiente.

5.4.1. Marcadores fluorescentes de unión covalente: Se utilizan para marcaje de proteínas, lípidos o bien otras moléculas biológicas. El más empleado es el isotiocianato de fluoresceína (FITC). Otros que se han descrito son rodamina, rojo texas, cianinas y ficoeritrina.

5.4.2. Marcadores fluorescentes de unión no covalente:

a.- Marcadores del contenido en ADN y ARN: Hoechst, DAPI, DIPI, cromomicina A3, mitramicina, naranja de acridina, yoduro de propidio, y otros.

b.- Marcadores de potencial de membrana: cianinas y rodamina 123.

5.4.3. - Marcadores fluorescentes sensibles al microambiente: Se emplean para determinar diferentes estados funcionales: pH, calcio, potencial red-ox, actividad enzimática, etc.

5.4. REPRODUCIBILIDAD Y COMPARACION DE RESULTADOS.

Los citómetros de flujo ofrecen una información relativa, no absoluta. Para cuantificar hay que correlacionar los canales con resultados de muestras conocidas, es decir, calibrar y ajustar las escalas. Para ello se utilizan estandars de alineación, que son materiales estables que tienen unos valores determinados de fluorescencia o dispersión de la luz, válidos para detectar cambios y problemas en la configuración óptica y señal con el tiempo.

Para asegurarse de que el citómetro funciona correctamente de modo continuado, por lo que es fundamental ajustar diariamente el voltaje del fotodetector y/o las ganancias para conseguir picos de intensidad determinada de un estándar y hacer curvas de seguimiento.

Para monitorizar las prestaciones o reproducibilidad de los reactivos y la calidad de los métodos de preparación celular se utilizan controles, que son un material que produce unos resultados esperados o conocidos. Los controles son importantes en los análisis de ADN (se utilizan controles de ploidía) y en las técnicas de inmunofluorescencia (se utilizan controles negativos para descartar unión específica del fluorocromo y seleccionar el umbral de autofluorescencia, y controles positivos, para comprobar el buen funcionamiento de la técnica).

5.5. APLICACIONES DE LA CITOMETRIA DE FLUJO.

La citometría de flujo se puede emplear para estudiar características estructurales y funcionales de células o partículas en suspensión. Las aplicaciones fundamentales de esta técnica se dan en biología y medicina y son la identificación de antígenos celulares mediante técnicas de inmunofluorescencia y el estudio del contenido de ADN y fases del ciclo celular.

La citometría de flujo se ha utilizado en medicina con diferentes objetivos:

1. En hematología: contaje celular, fórmula leucocitaria, contaje reticulocitario, análisis de médula ósea.
2. En farmacología: estudios de cinética celular.
3. En inmunología: subpoblaciones T, tipaje tisular, estimulación linfocitaria.
4. En oncología: diagnóstico/pronóstico, monitorizar tratamiento.
5. En microbiología: diagnóstico bacteriano y vírico, sensibilidad a antibióticos.
6. En genética: cariotipo, diagnóstico de portador, diagnóstico prenatal.

6. INMUNOLOGIA DEL TRASPLANTE.

6.1. CONCEPTO Y NOMENCLATURA DEL TRASPLANTE.

El trasplante es el proceso por el que se toman células, tejidos u órganos, llamados injertos, de un individuo y se insertan en un individuo diferente. El individuo que proporciona el injerto se denomina donante, y el que lo recibe receptor o huésped. Si el injerto se coloca en su localización anatómica normal, el procedimiento se le llama trasplante ortotópico; si el injerto se coloca en un lugar diferente, el procedimiento se le llama trasplante heterotópico.

Los inmunólogos del trasplante han desarrollado un vocabulario para describir los tipos de células y de tejidos que se encuentran en el marco del trasplante. Un injerto que se trasplanta de un individuo al mismo individuo se denomina injerto autólogo (abreviado autoinjerto). Un injerto trasplante entre dos individuos genéticamente idénticos o singénicos se llama injerto singénico (o sininjerto). Un injerto trasplantado entre dos individuos genéticamente diferentes de la misma especie se llama injerto alogénico (o aloinjerto). Un injerto trasplantado entre individuos de especies diferentes se llama injerto xenogénico (o xenoinjerto).

6.2. MECANISMOS EFECTORES EN EL RECHAZO DE ALOINJERTOS.

En diferentes modelos experimentales, tanto las células T CD4+ o CD8+ alorreactivas como los aloinjertos específicos son capaces de mediar el rechazo de aloinjertos tras su transferencia.

Estos efectores inmunitarios diferentes producen el rechazo del injerto por diferentes mecanismos:

1. Las células T alorreactivas pueden reclutar y activar a los macrófagos, iniciando la lesión del injerto mediante una respuesta de hipersensibilidad retardada.
2. Los aloanticuerpos se unen al endotelio, activan el sistema del complemento y lesionan los vasos sanguíneos del injerto.

Por razones históricas, el rechazo del injerto se clasifica habitualmente en función de criterios histopatológicos en lugar de basarse en mecanismos efectores inmunitarios. Los nombres de las diferentes formas de rechazo implican una secuencia temporal de acontecimientos, aunque esto no es estrictamente cierto. Aunque el rechazo hiperagudo es siempre un proceso muy rápido que sucede inmediatamente después del trasplante, el rechazo agudo o crónico pueden producirse casi en cualquier momento después del trasplante.

Las formas de rechazo son las siguientes:

- RECHAZO HIPERAGUDO:

Se caracteriza por una rápida obstrucción trombotica de la vasculatura del injerto que comienza minutos después de que los vasos del huésped se anastomosaron a los del injerto.

El rechazo hiperagudo es mediado por anticuerpos preexistentes que se unen al endotelio y activan el complemento.

- RECHAZO AGUDO:

1) Rechazo vascular agudo: se caracteriza por la necrosis de células individuales de los vasos sanguíneos del injerto. El patrón histológico es el de una vasculitis.

El rechazo vascular agudo suele estar mediado por anticuerpos IgG dirigidos contra los aloantígenos de la célula endotelial (moléculas del MHC y otras moléculas) e implica la activación del complemento.

2) Rechazo celular agudo: se caracteriza por la necrosis de células parenquimatosas y suele acompañarse de infiltrados de linfocitos y macrófagos. En el rechazo celular agudo pueden estar implicados varios mecanismos efectoros diferentes, como la lisis mediada por los LTC, la lisis mediada por macrófagos activados (como en la hipersensibilidad retardada), y la lisis mediada por las células agresoras naturales (NK).

- RECHAZO CRONICO:

Se caracteriza por fibrosis con pérdida de las estructuras normales. La mayor parte de las veces la obstrucción vascular se debe a la proliferación de las células musculares lisas de la íntima, lo que se denomina arteriosclerosis del injerto o acelerada, que puede aparecer sin una lesión vascular evidente; siendo la principal causa de pérdida tardía del injerto.

El riesgo de desarrollo de arteriosclerosis del injerto aumenta en pacientes infectados por el citomegalovirus, lo que sugiere que los antígenos virales pueden contribuir también a la reacción inmunitaria.

6.3. REACCIONES INJERTO CONTRA RECEPTOR (GVH).

Cuando se trasplanta tejido de un individuo a otro, ocurren dos procesos de rechazo. El primero, es el rechazo del receptor al tejido injertado, pero también existe la posibilidad de que suceda lo contrario y este fenómeno se llama reacción injerto contra receptor (graft-versus-host, GVH).

Estas reacciones pueden presentarse cuando se injertan tejidos inmunocompetentes a un receptor cuyo sistema inmune es deficiente. Tal forma de inmunización adoptiva tiene por consecuencia un proceso de rechazo dirigido contra el receptor. Esto ocurre en circunstancias naturales cuando hay paso de tejido linfoide materno al feto durante el embarazo. La misma reacción se presenta por medios artificiales cuando se inyectan tejidos adultos en animales neonatos o recién nacidos, o bien cuando se trasplantan tejidos linfoides a individuos adultos irradiados o inmunosuprimidos con agentes químicos.

Las reacciones GVH leves y reversibles son más frecuentes cuando el donador y el receptor comparten cierto grado de histocompatibilidad, pero no son singénicos.

6.4. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL RECHAZO.

Si el receptor de un aloinjerto tiene un sistema inmunitario totalmente funcional, el trasplante producirá de forma casi invariable alguna forma de rechazo, salvo que exista histocompatibilidad absoluta. En la práctica clínica y en los modelos experimentales, se han utilizado dos métodos para evitar o retrasar el rechazo:

1) Puede inhibirse el sistema inmunitario del receptor:

Habitualmente se utilizan varios métodos de inmunosupresión:

1. Las células T pueden inhibirse o lisarse mediante varios tratamientos inmunosupresores. Los inmunosupresores son el principal régimen de tratamiento para el rechazo del injerto. Los tratamientos inmunosupresores que se utilizan habitualmente son:

- corticoides.
- toxinas metabólicas: azatioprina, ciclofosfamida.
- irradiación de órganos linfoides.
- fármacos inmunosupresores específicos: ciclosporina A.
- anticuerpos reactivos con moléculas de superficie de la célula T.

El agente inmunosupresor más importante en la actualidad es la ciclosporina A. Su acción se basa en el bloqueo de la proliferación y diferenciación de las células T dependientes de la IL-2. En el trasplante esplénico experimental también ha sido utilizada (Gray, 1996).

2. Pueden inhibirse las células B, y así como los anticuerpos preformados, como los que median el rechazo hiperagudo: rapamicina, brequinar y la 15-desoxispergualina.

3. Se puede hacer tolerante al receptor del aloinjerto. Se pueden tratar a los receptores con dosis elevadas de peptidos derivados de regiones polimorficas de las moléculas del MHC del donante, o con moléculas solubles del MHC del donante para inducir la tolerancia especifica de la célula T.

2) Puede hacerse al injerto menos inmunogénico:

En el trasplante humano, el principal método para reducir la inmunogenicidad del injerto ha sido minimizar las diferencias aloantigenicas entre el donante y el receptor mediante una selección. Se tienen en cuenta las diferencias alélicas de las moléculas del MHC de los loci de la clase I y II.

En los roedores, los injertos pueden hacerse menos inmunogénicos eliminando los leucocitos pasajeros.

7. TRASPLANTE ESPLÉNICO EXPERIMENTAL EN RATAS.

El primer modelo experimental de trasplante esplénico experimental en ratas fue descrito por Lee, Orloff y Coburn en 1969. Este modelo consiste en la realización de una anastómosis vascular T-L en el segmento de la arteria aorta y vena porta del donante con la arteria aorta y vena cava del receptor. Muller y Wunderlich describen una variante del modelo clásico, basado en la anastómosis vascular a nivel de la arteria y vena renal del receptor tras la nefrectomía izquierda.

La región cervical es utilizada por primera vez en cirugía experimental del trasplante cardiaco por Heron en 1971.

Olausson realiza un modelo experimental de trasplante esplénico en región cervical utilizando una técnica sin sutura, es decir, mediante el uso de una prótesis endoluminal a nivel de la anastómosis vascular.

Todos los trabajos experimentales de trasplante esplénico experimental utilizan ratas singénicas, con la intención de disminuir la incidencia de rechazos. En los primeros trabajos el índice de mortalidad causadas por rechazo (GVH) fue del 19%, posteriormente disminuyo progresivamente hasta ser actualmente, inferior al 5% debido al mayor grado de histocompatibilidad alcanzado en los animales de experimentación (Li, 1994).

Otras posibilidades encaminadas a evitar el rechazo son la irradiación de la rata (Gómez Vilanova, 1984; Acreció, 1991) y la utilización de drogas inmunosupresoras tales como la ciclosporina (Gengozian, 1961) o el FK506 (Suzuki, 1997), aunque, estas técnicas son más complejas y obtienen peores resultados que el método anterior (Mouri, 1994).

8. ESTADO ACTUAL Y APLICACION EN CLINICA HUMANA DEL TRASPLANTE ESPLENICO.

Desde la aparición en la década de los 60 de trabajos experimentales donde se demostraba que el factor VIII es sintetizado en el bazo, hígado y células vasculares endoteliales (Weaver, 1964; Norman, 1967); diferentes grupos de investigación en trasplante han iniciado y desarrollado el trasplante esplénico y su aplicación en clínica humana para tratamiento de la Hemofilia A (Hathaway, 1969; Shumakov, 1976; Matas, 1978). Los resultados obtenidos desde el punto de vista funcional son satisfactorios, debido a la recuperación en la síntesis del Factor VIII superior al 35% (Liu, 1994). Sin embargo, la función esplénica solo se mantiene durante 4 meses, debido al rechazo agudo y GVH (Liu, 1994).

Como alternativa, se introduce la infusión de células esplénicas (Norman, 1968; Desai, 1969; Pegg, 1971; Mehta, 1973). Liu publica en 1994 los resultados satisfactorios del trasplante de células esplénicas en 20 pacientes con hemofilia severa, presentando 18 casos una elevación significativa de la actividad plasmática del factor VIII, con ausencia de rechazo en un año de seguimiento.

En 1992, Xia publica el primer caso de trasplante esplénico heterotópico vascularizado por Hemofilia A con resultado satisfactorio, tras un seguimiento de 2 años. Recientes trabajos del mismo autor desarrollados en el Instituto de trasplante de Tongji (China), han puesto de manifiesto los buenos resultados del trasplante esplénico y su aplicación en Hemofilia y cirugía oncológica hepática.

9. JUSTIFICACION DEL TRABAJO.

El bazo es el mayor órgano linfoide secundario; realiza funciones no inmunológicas (pulpa roja) e inmunológicas (pulpa blanca); destacando entre éstas, la producción de anticuerpos (IgM), síntesis de sustancias que potencian la fagocitosis (properdina y tuftsin) y depósito y maduración de células TH.

En humanos, la ausencia de bazo ocasiona un déficit en la función inmunológica, provocando un aumento en la incidencia de complicaciones, especialmente infecciosas.

En 1919, Morris y Bullock, publicaron por primera vez un incremento en la incidencia de infecciones en pacientes esplenectomizados. Estos resultados han sido también constatados por numerosos autores en diferentes revisiones de la literatura médica.

El tipo de esplenectomía según la indicación (hematológica, traumática, incidental y oncológica) y la edad del paciente esplenectomizado, son factores que pueden determinar la incidencia de infecciones postesplenectomía. Sin embargo, la gran heterogeneidad de la población esplenectomizada y la ausencia de estudios prospectivos con seguimiento a largo plazo, han dado lugar a la publicación de numerosos resultados contradictorios en cirugía humana.

La posibilidad de complicaciones graves en pacientes esplenectomizados ha justificado el desarrollo en los últimos años de la cirugía conservadora del bazo. Las diferentes opciones terapéuticas con la intención de preservación del bazo, tales como la esplenectomía parcial o incluso el autotrasplante esplénico, han abierto la puerta a la esperanza. Aunque, la publicación de complicaciones graves infecciosas en pacientes esplenectomizados con autotrasplante, ha puesto de manifiesto el posible déficit en la función inmunológica del autotrasplante.

El cirujano debe ofrecer una opción terapéutica válida a los pacientes con indicación de esplenectomía y elevado riesgo de complicaciones, que asegure una función inmunológica dentro de la normalidad. Considerando que el trasplante esplénico puede ofrecernos la solución al problema planteado, nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un modelo experimental con el objetivo de estudiar la función inmunológica del trasplante esplénico en ratas.

Aplicando este modelo, en este trabajo se quiere estudiar la viabilidad del trasplante esplénico y la inmunocompetencia del bazo trasplantado.

La función y estructura del bazo trasplantado se determinará mediante la cuantificación de las subpoblaciones linfocitarias, el aclaramiento bacteriano de neumococos, la mortalidad postinfección y la estructura anatomo-patológica del bazo.

Estos datos se compararan entre un grupo control de ratas intervenidas quirúrgicamente pero no esplectomizadas (*"sham operated"*), ratas esplenectomizadas, ratas autotrasplantadas y ratas trasplantadas.

La necesidad de esplenectomía en algunas enfermedades hematológicas, cirugía oncológica y cirugía traumática, y la posible aparición de complicaciones graves en pacientes esplenectomizados tras la alteración de la función inmunológica, justifican el interés de los trabajos sobre el trasplante esplénico experimental y su posible desarrollo y aplicación en la clínica humana. De hecho, en la literatura medica se ha publicado recientemente los buenos resultados del trasplante esplénico en clínica humana y su aplicación en enfermedades hematológicas como la hemofilia A.

10. HIPOTESIS.

Las hipótesis que se plantean en el estudio son las siguientes:

PRIMERA HIPOTESIS:

En un modelo experimental en ratas, la esplenectomía ocasiona un déficit en la función inmunológica. Las ratas esplenectomizadas presentan una alteración de las subpoblaciones linfocitarias, una disminución del aclaramiento bacteriano y una mayor mortalidad postinfección; como expresión de un estado de inmunodepresión.

SEGUNDA HIPOTESIS:

Nuestro modelo experimental de trasplante esplénico heterotópico vascularizado, basado en la microanastomosis venosa tutorizada de forma temporal según técnica de nuestro grupo, debe conseguir una técnica viable, reproducible y con baja incidencia de complicaciones.

TERCERA HIPOTESIS:

En ratas singénicas esplenectomizadas, la realización de un trasplante esplénico según nuestro modelo experimental, mantiene una función inmunológica dentro de la normalidad; con resultados similares al grupo control.

CUARTA HIPOTESIS:

El grupo de trasplante esplénico, presenta unos valores de función inmunológica superiores al grupo de ratas autotrasplantadas, y este a su vez, superiores al grupo de ratas esplenectomizadas.

QUINTA HIPOTESIS:

La estructura histológica del bazo en las ratas trasplantadas, presenta unas características similares al bazo del grupo control.

11. OBJETIVOS.

Los objetivos que se han considerado para el trabajo son:

PRIMER OBJETIVO: “Desarrollo de un nuevo modelo experimental de trasplante esplénico en ratas”.

Nuestro modelo experimental se basa en la utilización de la región cervical del receptor y en la tutorización de la microanastomosis venosa.

Esta técnica quirúrgica debe conseguir:

1. Simplificar la anastómosis vascular, especialmente, la anastómosis venosa.
2. Disminuir el tiempo quirúrgico.
3. Reducir la incidencia de complicaciones.
4. Facilitar el control postoperatorio del injerto.

SEGUNDO OBJETIVO: “Identificación y cuantificación de las subpoblaciones linfocitarias”.

Determinaciones en sangre de todas las poblaciones de ratas de los siguientes valores:

1. Hemograma: recuento y fórmula.
2. Población linfocitaria: linfocitos B (CD19+), linfocitos T inductores/cooperadores (CD4+), linfocitos T supresores /citotóxicos (CD8+).

Se compararán los resultados antes y después de la intervención, entre los diferentes grupos de animales.

TERCER OBJETIVO: “Estudio de la función inmunológica”, mediante la determinación de:

1. Aclaramiento bacteriano en los cuatro grupos de ratas, mediante la inoculación vía peritoneal de estreptococos pneumoniae y la cuantificación del número de colonias por ml de sangre (CFU/ml) a los 30, 60, 120 y 180 minutos
2. La mortalidad a las 24 horas de provocar la peritonitis neumococica.

Se compararán los resultados entre los diferentes grupos de animales.

CUARTO OBJETIVO: “Estudio histólogo del bazo trasplantado”.

Estudio anatómo-patológico del bazo de los grupos autotrasplante y trasplante. Se compararán los resultados entre los diferentes grupos de animales según un score.

MATERIAL Y METODOS

1. PLANTEAMIENTO METODOLOGICO.

La esplenectomía ocasiona un estado de deficiencia inmunológica. El trasplante esplénico debería restablecer la función inmunológica dentro de unos valores de normalidad.

Para demostrar esta hipótesis, nuestro grupo de trabajo ha diseñado un modelo experimental basado en el estudio inmunológico del trasplante esplénico experimental en ratas.

Primero se realiza la distribución aleatoria de 100 ratas isogénicas tipo Lewis en 4 grupos de 25 ratas cada uno:

1. Grupo control con laparotomía y preservación del bazo.
2. Grupo de esplenectomizadas.
3. Grupo de autotrasplante esplénico heterotópico en epiplón.
4. Grupo de trasplante esplénico heterotópico vascularizado.

El modelo experimental se basa en los siguientes puntos:

1. Desarrollo de una nueva técnica quirúrgica de trasplante esplénico heterotópico vascularizado, mediante la utilización de la micro-anastómosis venosa tutorizada a nivel de la región cervical.
2. Demostrar que las ratas trasplantadas presenta una función inmunológica dentro de la normalidad, basándose en la determinación de la población linfocitaria, el estudio del aclaramiento bacteriano tras la inoculación vía peritoneal de una concentración conocida de bacterias y la determinación de la mortalidad en las primeras 24 horas tras provocar la peritonitis.

3. Comprobar que el bazo trasplantado presenta unas características histológicas similares al bazo normal.

2. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

2.1. CARACTERISTICAS GENERALES.

Para el estudio se han utilizado ratas tipo Lewis (LETICA S.A.) de la misma línea genética (isogénicas) y consanguíneas de 10 semanas de edad, criadas en nuestro estabulario de la Facultad de Medicina de Lleida.

Características específicas de las ratas empleadas:

1. Denominación: LEW / Rj.
2. Origen: Obtenidas en 1954 por el doctor Lewis a partir del cruce de ratas Wistar Aptekman y Bodgen. Proviene de CSEAL, Orleans (1987).
3. Descripción: ratas albinas de talla media fáciles de manipular.
4. Edad de acoplamiento a las 10 semanas, con un índice de esterilidad del 45 %. El número medio de crías por camada es de 7, con un intervalo medio entre camadas de 49 días.
5. Características Genéticas. Los genes de histocompatibilidad son los siguientes:

RT1	RT2	RT3	PT6	RT7	RT8
IX	V			I	
I	a	a	a	a	b

6. Particularidades: Ratitas especialmente utilizadas en trabajos experimentales de Inmunología y Trasplante de órganos.

7. Evolución ponderal: A las 10 semanas el peso medio de los machos es de 300gr, mientras el de las hembras es de 200gr. Los machos adultos pueden alcanzar el peso máximo a partir de la semana 20ª (500gr), sin embargo, las hembras alcanzan un peso medio máximo de 300 gramos.
8. Alimentación: pienso compuesto a un ritmo de 2 comidas diarias (formula raton-raton, cría ITC-R 10 y mantenimiento ITM-R 20) y agua ad libitum.

2.2. GRUPOS DE ESTUDIO.

Se han utilizado 100 ratas, 50 machos y 50 hembras, distribuidas aleatoriamente en cuatro grupos de 25 ratas cada uno.

Los grupos son los siguientes:

- GRUPO A: CONTROL. En este grupo de 13 machos y 12 hembras, se realiza laparotomía media con manipulación del intestino ("*sham operated*"), dejando el bazo íntegro, sin realizar ninguna maniobra sobre el mismo.
- GRUPO B: ESPLENECTOMIZADAS. Grupo de 12 machos y 13 hembras, donde se realiza esplenectomía según técnica descrita más adelante.
- GRUPO C: AUTOTRASPLANTADAS. Grupo de 13 machos y 12 hembras, donde se practica a todas las ratas esplenectomía y autotrasplante de tejido esplénico en epiplón, técnica descrita posteriormente.
- GRUPO D: TRASPLANTADAS. 25 trasplantes esplénicos heterólogos, 12 machos y 13 hembras, según un nuevo modelo experimental de trasplante esplénico en región cervical, basado en anastomosis venosa tutorizada. Se utilizan como donantes, 25 ratas tipo Lewis consanguíneas.

3. MATERIAL DE MICROCIRUGIA.

Las intervenciones quirúrgicas se han realizado en la Unidad de investigación del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de Lérida, utilizando el siguiente material:

1. Microscopio quirúrgico binocular Zeiss OPM 1 con aumentos de cilindro 0,4x - 0,6x- 1x- 1,6x- 2,5x.

2. Instrumental microquirúrgico:
 - Tijeras de Mayo, microtijera de tamaño medio en forma de bayoneta.
 - Porta agujas con sistema de abertura y cierre mediante fuelle terminal.
 - Pinzas de Adson con y sin puntas, pinzas de "relojero".
 - Bisturí N° 11.
 - Microclips y aproximadores vasculares de Acland.
 - Suturas: seda 3 y 5/0, catgut 3/0 y nylon 10/0.

3. Anestesia: *Hidrato de Cloral* al 4,5%.

Administración mediante inoculación intraperitoneal a una dosis de 1cc por 100gr de peso. El anestésico debe mantenerse a una temperatura aproximada de 5° C. Tiempo medio de inducción de 5 minutos y tiempo medio de duración de 120 minutos.

En caso de despertar el animal se puede añadir 1 cc de Hidrato de Cloral utilizando la misma vía de administración.

Como complicaciones presentan una baja mortalidad en la inducción anestésica por insuficiencia respiratoria (0 - 5 % de los casos).

Este tipo de anestésico tiene las ventajas de su fácil administración y dosificación, inducción rápida, vida media larga y bajo índice de complicaciones.

4. TECNICA QUIRURGICA.

4.1. LAPAROTOMIA EN EL GRUPO CONTROL.

Colocación de la rata en decúbito supino, sujeción de la misma por las cuatro extremidades. Laparotomía media con manipulación de las asas de intestino delgado. No se realiza ningún gesto quirúrgico sobre el bazo, de tal forma que se conserva de forma íntegra. Cierre de laparotomía en dos capas, pared abdominal con Catgut 3/0, y cirre de piel con seda 3/0.

4.2. ESPLENECTOMIA TOTAL

Incisión tipo laparotomía media. Apertura de la cavidad abdominal con exteriorización y lateralización hacia la derecha de las asas de intestino delgado y ciego. Sección de los ligamentos esplenofrénico, esplenocólico y esplenorrenal. Ligadura de los vasos cortos gastroesplénicos con seda 5/0 y sección de los mismos. Ligadura conjunta de la arteria y vena esplénica mediante seda 5/0. Extirpación del bazo. Revisión de la hemostasia. Cierre de la pared abdominal por planos con sutura continua.

Después se realiza el peso del bazo extirpado en báscula de precisión Mettler P-162 (mg).

4.3. AUTOTRASPLANTE ESPLÉNICO.

Laparatomía media y esplenectomía según la técnica ya descrita anteriormente. Peso del bazo en la báscula de precisión.

Sección de la pieza en cortes transversales para conseguir tres fragmentos de 2 - 3 mm de espesor y un peso de aproximado de 70 mgr (60 - 80 mgr). Colocación de los fragmentos en el epiplón mayor, mediante la realización de bolsas ("*omental pouch*") con seda 5/0; con el fin de evitar la movilidad de los fragmentos por la cavidad peritoneal.

Cierre de pared en dos planos mediante sutura continua.

4.4. TRASPLANTE ESPLÉNICO CERVICAL.

Se describe un nuevo modelo experimental de trasplante esplénico utilizando la región cervical, basado en la tutorización de la anastomosis venosa.

1) Preparación del donante:

Inoculación vía peritoneal de Hidrato de Cloral al 4,5% a una dosis de 1ml por 100gr de peso.

La técnica utilizada se basa en el modelo de Bitter- Sheurmann. Laparotomía media, exteriorización y lateralización hacia la derecha del intestino delgado y el ciego para facilitar la disección. Sección de los ligamentos esplenofrénico, esplenocólico, esplenorrenal y electrocoagulación mediante bisturí bipolar o ligadura con seda 5/0 de los vasos cortos gastro-esplénicos. Disección cuidadosa del hilio esplénico, dificultada por la proximidad del páncreas. La arteria esplénica sale directamente de la arteria aorta y no del tronco celiaco, por encima de la arteria celiaca, siguiendo por la derecha en forma de asa hasta alcanzar el hilio esplénico; durante su disección es fácil provocar linforrea debido a la riqueza linfática de la zona. La vena esplénica sigue un trayecto mas corto en dirección a la vena porta.

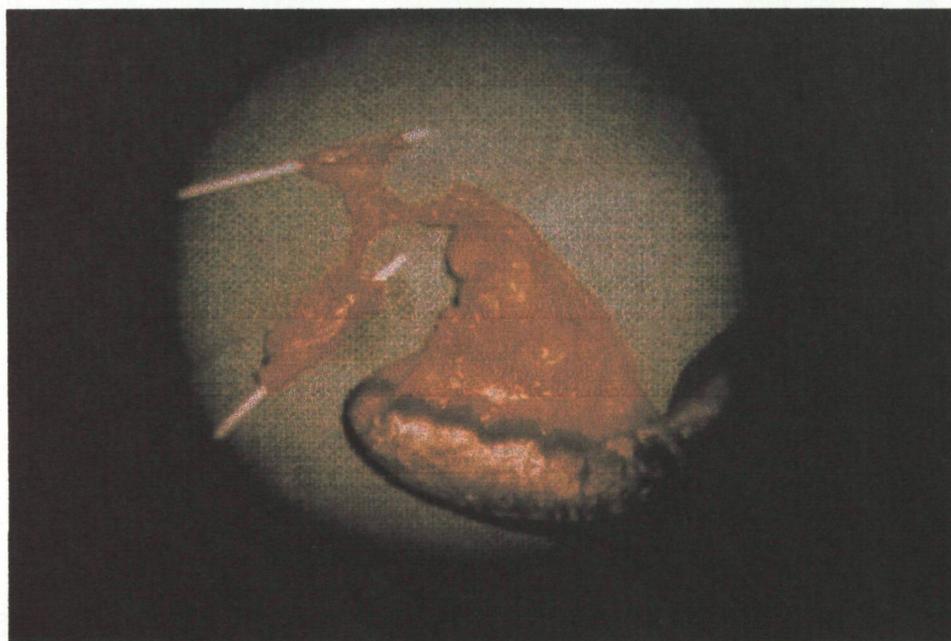
Disección de la aorta con ligadura de las colaterales lumbares en número de 2 o 3, mediante seda 5/0. Ligadura de la arteria aorta distalmente a la salida de la arteria esplénica; sección del cuff de arteria aorta proximalmente a la salida de la arteria esplénica y distalmente a la ligadura previa (Fotografía 1).

Colocación a nivel endoluminal de un catéter Abbocath N° 24 a través de la vena porta en dirección hepática, de tal forma que incluya un cuff donde desemboca la vena esplénica en la vena porta (Fotografía 2).

Es importante conseguir un cuff largo para facilitar la anastómosis posterior, debido a la elevada capacidad de retracción venosa. Sección del cuff de porta próximal y distalmente a la entrada de la vena esplénica con inclusión del tutor endoluminal. Fijación del tutor al cuff mediante una ligadura provisional de seda 5/0.

Peso del bazo y mantenimiento del mismo en suero salino frío (4° C) hasta su trasplante.

Fotografía 1. Imagen del bazo de la rata donante después de la extracción; tutorización del cuff de arteria aorta y vena porta.



Fotografía 2. Detalle ampliado de la región vascular del bazo donante; visualización del cuff de la arteria aorta y vena porta (tutorizada).



2) Preparación del receptor:

Después de la administración del Hidrato de Cloral a las dosis ya comentada, se administra por vía endovenosa 200 UI de Heparina Na al 1%.

Esplenectomía según la técnica ya descrita.

Cervicotomía en forma de " T " invertida, disección de los planos cutáneos y de la glándula submaxilar, que es de gran tamaño.

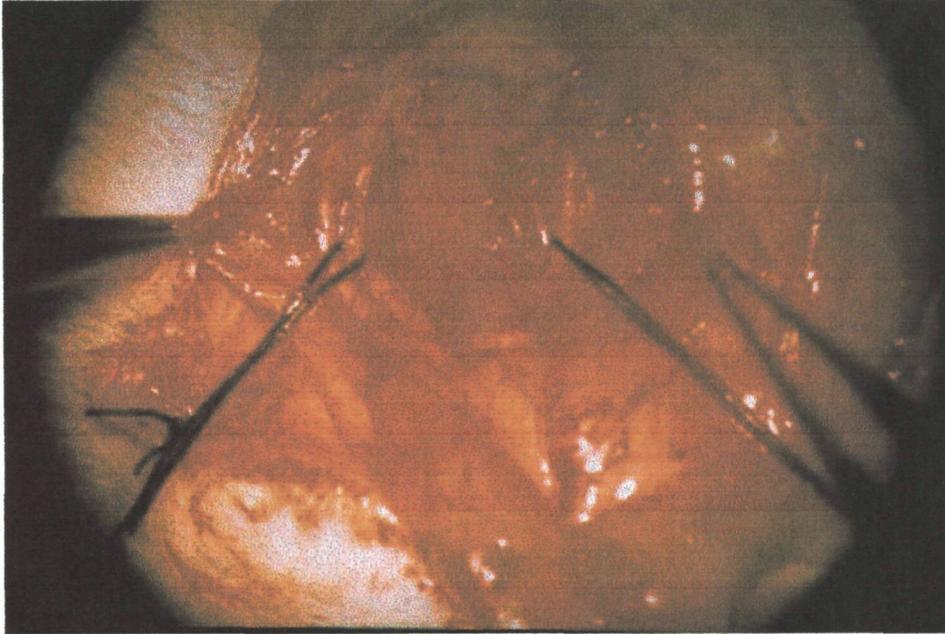
Disección de la arteria carótida después de rechazar el músculo esternocleidomastoideo, se rechaza o secciona el músculo omotiroideo para obtener mayor campo quirúrgico (Fotografía 3). Clampaje de la arteria carótida mediante doble clamp de Acland. Se realiza arteriotomía lateral con un tamaño similar al diámetro del cuff de arteria aorta del donante. Anastómosis terminolateral del cuff de aorta del donante con la carótida del receptor mediante sutura continua con Ethicon 10/0 (Fotografía 4).

Prueba de la permeabilidad de la anastómosis realizada ("*empty and refill test*").

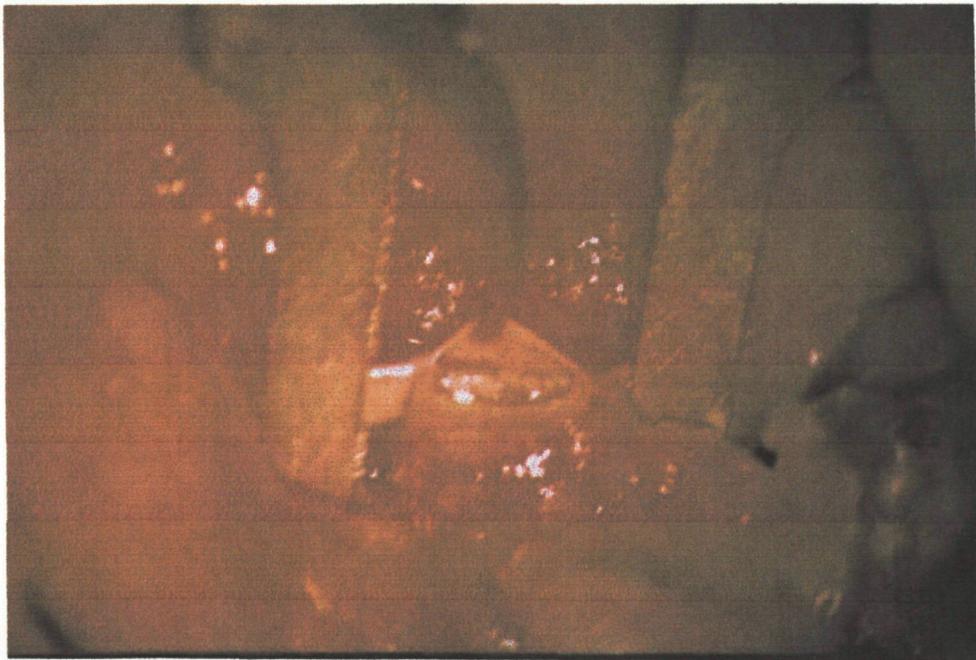
Disección de la vena yugular externa y clampaje de la misma en dirección a la clavícula, utilizando un clamp simple de Acland. Anastómosis venosa tutorizada termino-terminal del cuff de porta del donante con la vena yugular externa del receptor mediante la utilización del catéter endoluminal, con el fin de facilitar la microanastomosis, al evitar el colapso de la luz y facilitar la identificación de las paredes. Se utiliza sutura continua de Ethicon 10/0 (Fotografía 5). Se retira el catéter parcialmente y por inyección de suero salino se comprueba la estanqueidad de la anastómosis y la permeabilidad de la misma (Fotografía 6). Ligadura del extremo libre de la vena porta con seda 5/0.

Comprobación de la hemostasia y del aspecto del injerto. Cierre de la cervicotomía con sutura continua de seda 3/0 en un plano.

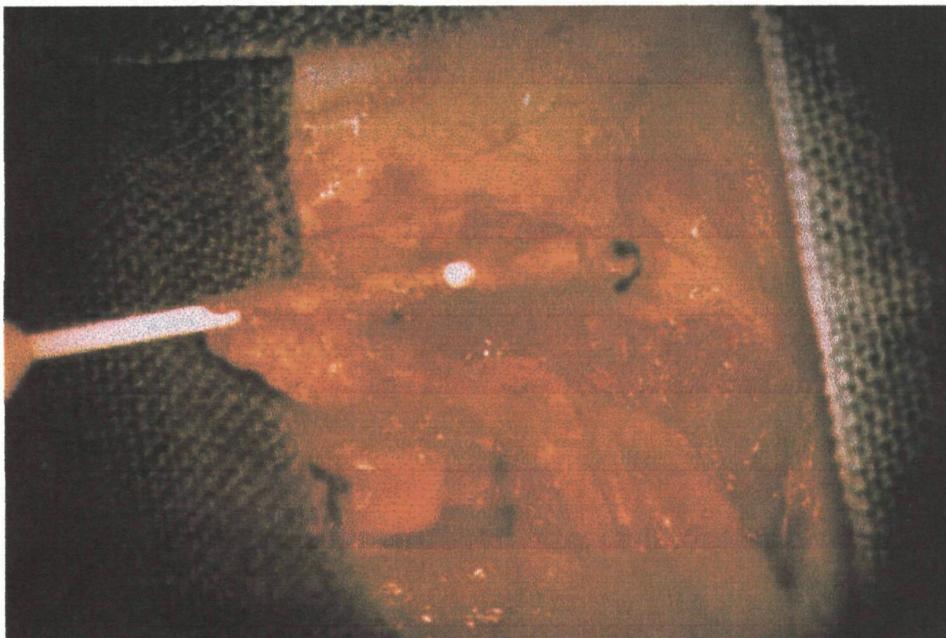
Fotografía 3. Preparación del receptor con cervicotomía y disección de la arteria carótida y vena yugular externa.



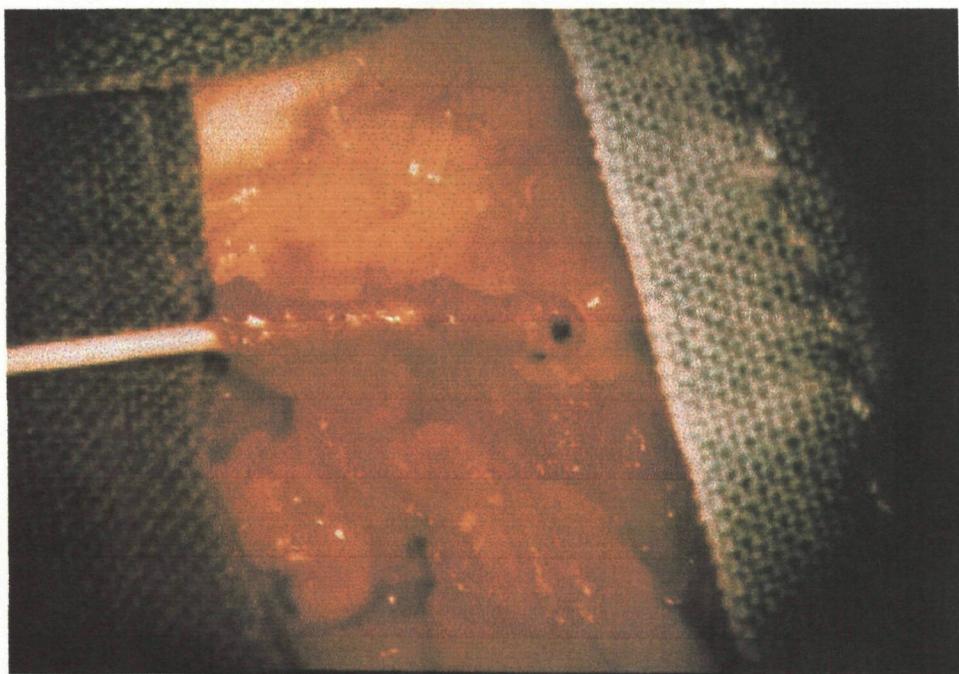
Fotografía 4. Anastómosis terminolateral del cuff de aorta del donante con la carótida del receptor mediante sutura continua con Ethicon 10/0.



Fotografía 5. Anastómosis venosa tutorizada termino-terminal del cuff de porta del donante con la vena yugular externa del receptor mediante la utilización del catéter endoluminal (Abbecath nº24).



Fotografía 6. Se retira el catéter parcialmente y por inyección de suero salino se comprueba la estanqueidad de la anastomosis y la permeabilidad de la misma.



5. DISEÑO DEL ESTUDIO.

Se realiza un modelo experimental de trasplante esplénico en ratas, con el objetivo de determinar la función inmunológica en las ratas con trasplante esplénico; en comparación con un grupo control, grupo de ratas esplenectomizadas y grupo de ratas autotrasplantadas.

Para el diseño del estudio se necesitaron 100 ratas isogénicas tipo Lewis, distribuidas de forma aleatoria en 4 grupos de 25 ratas cada uno. La utilización de este tipo de ratas viene determinada por la menor incidencia de rechazos en los trasplantes. Los grupos de estudio son los siguientes:

Grupo 1º: Grupo control.

Grupo 2º: Esplenectomía total.

Grupo 3º: Autotrasplante heterotópico.

Grupo 4º: Trasplante esplénico heterotópico vascularizado.

El estudio de la función inmunológica del bazo se basa en la determinación de los siguientes parámetros:

1. Determinación en el hemograma de las siguientes variables: leucocitos totales, linfocitos, monocitos, PMN y plaquetas.
2. Determinación de las subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo.
3. Aclaramiento bacteriano: Determinación del número de colonias por ml de sangre tras provocar una infección.
4. Mortalidad postinfección a las 24 horas de la infección.

El trabajo experimental presenta las siguientes fases, siguiendo un orden cronológico:

A. Primero se anestesia al animal con Hidrato de Cloral a una dosis de 1ml por 100gr de peso. Una vez dormido el animal se realizan los siguientes pasos:

1. Extracción de 1ml de sangre mediante punción cardiaca, para la determinación de los siguientes valores:

1. Hemograma: recuento y formula. Cuantificación del número de leucocitos totales, monocitos, PMN, linfocitos y plaquetas.

2. Población linfocitaria (CD4, CD8, CD19) mediante Citometría de Flujo.

2. Posteriormente se realiza la intervención quirúrgica en función del grupo al que pertenece la rata.

1. Grupo control: Laparotomía con preservación íntegra del bazo ("sham operated").

2. Grupo de ratas esplenectomizadas: Esplenectomía total según la técnica clásica. Peso del bazo con balanza de microprecisión.

3. Grupo de ratas autotrasplantadas: Autotrasplante esplénico heterotópico en cavidad abdominal de 3 fragmentos de bazo en epiplón según la técnica del "pouch".

4. Grupo de ratas trasplantadas: Desarrollo de nuestra técnica quirúrgica de trasplante esplénico heterotópico vascularizado, basado en microanastomosis venosa tutorizada a nivel de la región cervical de la rata receptora.

B. A las 16 semanas de la intervención quirúrgica, se realiza nueva extracción sanguínea después de anestesiarse la rata, para determinar los siguientes valores:

1. Hemograma completo.
2. Determinación de las subpoblaciones linfocitarias por Citometría de Flujo.
3. Comparación de los resultados entre los 4 grupos de ratas y los valores obtenidos antes de la intervención quirúrgica (1ª extracción) y después de la intervención quirúrgica (2ª extracción) en cada rata.
4. Estudio y determinación del aclaramiento bacteriano: Después de la extracción de sangre, se realiza la inoculación vía peritoneal de 1×10^7 neumococos del serotipo 3 a cada rata. La determinación del número de bacterias a inocular se establece según el método de turbidez de Mc Farland.

Las fases del proceso son las siguientes:

 1. Extracción de 0,2ml de sangre periférica a los 30, 60, 120 y 180 minutos de la inoculación de neumococos.
 2. Siembra en 4 placas de Agar–Sangre por cada rata en función del tiempo transcurrido tras la inoculación.
 3. Cultivo de las colonias en estufa de CO₂.
 4. Lectura del resultado a las 48 horas mediante el conteo del número total de colonias por placa.
5. Determinación de la mortalidad postinfección a las 24 horas de provocar la peritonitis.
6. Comparación de los resultados obtenidos entre los 4 grupos de estudio.
7. Estudio anatómico-patológico del bazo en el grupo de ratas trasplantadas, y comparación de los resultados con el grupo de control y el grupo de autotrasplante.

Se establece un score para determinar las características histológicas según una clasificación preestablecida, con la intención de unificar los criterios con trabajos previos histólogos del trasplante esplénico experimental. Se comparan los resultados obtenidos entre los grupos de autotrasplante y trasplante.

6. CITOMETRIA DE FLUJO.

6.1. INMUNOFENOTIPO DE SANGRE PERIFERICA DE RATA.

A. TECNICA.

1. Se preparan tantos tubos de cristal como muestras a analizar, añadiendo un tubo para el control negativo. Se identifican con el número de muestra.
2. Se añaden 100 µl de sangre total de rata en cada tubo.
3. Se añaden 10 µl del reactivo CD4 Biotin en cada tubo.
4. Se mezcla bien con vórtex.
5. Se incuba 15 minutos a T^a ambiente, en la oscuridad.
6. Se realiza un lavado con PBS.
7. Se añaden 5 µl del reactivo Streptavidina en cada tubo.
8. Se mezcla bien con vórtex.
9. Se incuba 15 minutos a T^a ambiente, en la oscuridad.
10. Se realiza un lavado con PBS.
11. Se añaden 10 µl del reactivo CD8 y 10 µl del reactivo Pan-B en cada tubo.
12. Se incuba 15 minutos a T^a ambiente, en la oscuridad.
13. Se añaden 2 ml de solución de lisis de Becton a cada tubo.
14. Se incuba 10 minutos a T^a ambiente, en la oscuridad.
15. Se centrifuga durante 10 minutos (100 g).
16. Se decanta el sobrenadante.
17. Se añaden 0.5 ml de PBS y se resuspende el botón.
18. LECTURA CON EL CITOMETRO DE FLUJO.

De forma paralela se realiza todo el proceso en el tubo de control negativo, pero añadiendo PBS en lugar de los reactivos correspondientes y en las mismas cantidades (puntos 3, 7 y 11).

B. LECTURA POR CITOMETRIA DE FLUJO.

Se ha utilizado un citómetro de flujo adquisición continua (FACS Scalibur) con FACS Station (láser a 488 nm de 15 mW de potencia, capacidad para medir 4 canales de fluorescencia (FL1-FL4), forward scatter (FS) y side scatter (SS) (Becton-Dickinson).

En cada lectura se han valorado un mínimo de 2000 eventos a partir de cada muestra. En la región de linfocitos se han estudiado cuatro histogramas biparamétricos: SS-FS, FL1-FL2, FL3-FL2, FL3-FL1 (FL1= CD4, FL2= Pan-B, FL3 = CD8), a partir de los que se han valorado las diferentes poblaciones linfoides (linfocitos T4, linfocitos B y linfocitos T8).

Para cuantificar el porcentaje de los linfocitos B (Pan-B +, CD4 -, CD8-), linfocitos T4 (Pan-B -, CD4 +, CD8 -) y linfocitos T8 (Pan-B +, CD4 -, CD8 +), se ha utilizado un programa de análisis off line denominado ATTRACTORS cuyas características fundamentales son:

1. El usuario define unas regiones de interés para identificar las diferentes poblaciones.
2. En cada muestra se activan estas regiones que se redistribuyen automáticamente para conseguir la cuantificación de las poblaciones de linfocitos.

7. ACLARAMIENTO BACTERIANO.

7.1. STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE.

La bacteria utilizada en el aclaramiento bacteriano para evaluar la respuesta inmunológica en los cuatro grupos de ratas, ha sido el Streptococcus pneumoniae tipo 3 (Centro Nacional de Virología e Inmunología Sanitaria de Majadahonda, Madrid).

Los miembros del genero Streptococcus son cocos Gram positivos catalasa negativos que tienden a crecer desarrollando cadenas en los medios líquidos. Como producto final del metabolismo de los carbohidratos forman grandes cantidades de ácido láctico; son anaerobios facultativos.

El streptococcus pneumoniae es un estreptococo alfa hemolítico, que se encuentra en la flora nasofaríngea y orofaríngea normal en el 15% de los niños y aproximadamente en el 5% de los adultos.

El estreptococo neumonía o neumococo es el primer causante de neumonía en la comunidad, y el segundo causante de meningitis bacteriana. Además es agente etiológico de otitis media, sinusitis, peritonitis... etc. El neumococo causa enfermedad en presencia de una condición predisponente en el huésped, como pueda ser una infección vírica del tracto respiratorio, o incluso la situación de inmunodeficiencia, característica de los pacientes esplenectomizados. El neumococo es el primer causante de infecciones en pacientes esplenectomizados.

Los microorganismos están rodeados por una cápsula antifagocítica compuesta por polisacáridos antigénicos, de los cuales se han caracterizado más de 80. La protección conferida por los anticuerpos contra el polisacárido capsular es la evidencia más convincente de que esta es el principal factor de virulencia.

7. 2. SIEMBRA DE LAS COLONIAS EN PLACAS.

La mayoría de laboratorios incuban las placas con Agar-Sangre en 5-10% de CO₂, sin embargo, nosotros hemos utilizado Agar selectivo para estreptococos (SSA). Este medio es una modificación del agar sangre de oveja, conteniendo además violeta cristal, trimetroprima-sulfametoxazol y colistina en concentraciones adecuadas para inhibir a la mayoría de estreptococos.

La siembra de las colonias en las placas se realiza mediante la introducción de la ansa en la superficie de la preparación y la extensión de la muestra utilizando el patrón de estrías, con el propósito de obtener colonias aisladas para su posterior contaje.

Las colonias de bacterias se incuban a una temperatura de 37°C en estufa de CO₂ durante 24 horas, posteriormente se mantienen 48 horas a 4°C. Se realiza la resiembra de las colonias cada 3 días.

7.3. OBTENCION DEL NUMERO DE BACTERIAS A INOCULAR.

Los estreptococos se desarrollan en la superficie del agar en forma de colonias pequeñas circulares de 1 mm aproximado de diámetro, de color lechoso o transparente.

Para la obtención de la dosis de neumococos a inocular se utiliza el método de MacFarland. Este método se basa en la comparación visual de la turbidez del medio líquido problema con un estándar que representa una suspensión de un número conocido de bacterias. Estas suspensiones que emplean sulfato de bario, fueron desarrolladas por McFarland y representan un número de bacterias, para suspensiones de igual turbidez, que ha sido determinado por recuento de colonias. Es decir, el tubo con turbidez 1 corresponde a una dosis de 1×10^7 neumococos (rango de 0,9 a $1,2 \times 10^7$). Para obtener una muestra de neumococos a la dosis deseada, se añaden neumococos obtenidos de las colonias incubadas en las placas, hasta conseguir una turbidez igual a la muestra patrón (turbidez 1). La suspensión de bacterias se mantiene en 1 ml de PBS (phosphate buffer saline).

Una vez obtenida la dosis de bacterias deseada, se inoculan por vía intraperitoneal. Por consiguiente, se administra 1 ml de PBS con 1×10^7 streptococcus pneumoniae a cada una de las 100 ratas del estudio.

7.4. PROCEDIMIENTO Y VARIABLES A ESTUDIAR.

A las 16 semanas de la intervención quirúrgica, según el grupo de estudio; se inocula a todas las ratas de los cuatro grupos, 1×10^7 neumococos por vía intraperitoneal, después de anestesiar el animal mediante la inyección de 1 ml por 100 gramos de peso de Hidrato de Cloral.

Las variables a determinar son las siguientes:

- 1) Mortalidad a las 24 horas. Determinación de la mortalidad en los cuatro grupos y comparación de los resultados.
- 2) Aclaramiento bacteriano mediante el contaje del número de colonias por ml de sangre (UFC/ml):
 - 1- Se realiza extracción de 0,2 ml de sangre en cada rata mediante punción cardíaca con jeringa de insulina a los 30, 60, 120 y 180 minutos de la inoculación de neumococos.
 - 2- Inmediatamente después de cada extracción, se realiza la siembra en placas de Agar selectivo para estreptococos (SSA) de las diferentes determinaciones.
 - 3- Posteriormente, las placas se mantienen durante 24 horas en la estufa de CO₂ a 37°C.
 - 4- A las 24 horas se realiza el contaje del número total de colonias formadas por placa. El número obtenido se multiplica por cinco debido a la extracción de 0,2 ml. El resultado corresponderá al número de colonias de neumococos formadas por mililitro de sangre.

8. ESTUDIO HISTOLOGICO. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

8.1. FIJACION DE LAS MUESTRAS.

Para las muestras de microscopía óptica, los fragmentos de bazo se fijaron por inmersión en una solución de formalina al 4%.

El tiempo de fijación fue de 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la inclusión en parafina.



8.2. PROTOCOLO DE INCLUSION DE LAS MUESTRAS EN PARAFINA.

La inclusión en parafina se ha iniciado con la deshidratación de las piezas en alcoholes de graduación creciente (50, 70, 80, 90 %) y finalmente se han hecho 3 cambios en alcohol absoluto.

Una vez bien deshidratadas las muestras, se aclaran mediante pasos sucesivos en xilol para extraer el agente deshidratante.

Finalmente se hacen los bloques siguiendo el procedimiento habitual, procurando que los fragmentos queden bien orientados en los moldes.

Posteriormente se hacen secciones con el microtomo Minot-Lritz, de 5 micras de espesor, para su posterior tinción según los métodos convencionales.

8.3. TINCION CON HEMATOXILINA-EOSILINA.

La tinción de Hematoxilina-Eosilina se ha utilizado como tinción de rutina para observar el aspecto morfológico de las secciones de parafina y el estado del tejido esplénico a estudiar.

1. Preparación de los colorantes:

Hematoxilina de Harris:

- Cristales de Hematoxilina. 5,0 g.
- Alcohol 100 %. 50,0 ml.
- Alumbre potásico. 100,0 g.
- Agua destilada. 1000,0 ml
- Oxido de mercurio. 2,5 g.

Se disuelve la hematoxilina en el alcohol, el alumbre en el agua y se mezcla con la ayuda del calor. Se retira 1 minuto y se agita. A continuación se añade lentamente el oxido de mercurio. Se recalienta lentamente hasta que la solución adquiere un color púrpura oscura, retirándola rápidamente del calor y sumergiéndola en un recipiente con agua fría. La tinción estará lista para su uso tan pronto como se enfríe. Se añaden 2-4 ml de ácido acético glacial por cada 100 ml de solución a fin de mejorar la tinción de los núcleos celulares. Se filtra la hematoxilina antes de ser usada.

- Eosina alcohólica:

Se prepara la solución stock

Eosina Y, soluble en agua. 10 g.

Agua destilada. 20 ml.

Se disuelve y añade:

Alcohol 95 %. 80 ml.

La solución de trabajo se prepara como sigue:

Solución stock de eosina. 1 parte.

Alcohol 80 %. 3 partes.

Justo antes de su uso se añaden 0,5 ml de ácido acético glacial por cada 100 ml.

2. Protocolo de tinción:

Los portas se colocaron en cestillas de tinción y sé desparafinarón sumergiéndolos en xilol durante 15 minutos, repitiendo este paso por dos veces. Posteriormente las muestras son rehidratadas con concentraciones decrecientes de alcohol hasta llegar a agua destilada, procediéndose seguidamente a la tinción:

Hematoxilina Harris. 15 minutos.

Lavado con agua corriente. 5 minutos.

Aclarado con CIH (4 ml en 250 ml de alcohol).

Lavado en agua corriente. 10 minutos.

Eosina alcohólica. 5 minutos.

Se deshidrato con concentraciones crecientes de alcohol y xilol y se montaron con DPX.

9. ESTUDIO HISTOLOGICO.

Las muestras obtenidas después de la preparación ya comentada en el apartado cuatro, eran estudiadas mediante microscopio óptico (Olympus- BX 50). Los grupos estudiados eran el C y D, es decir, las ratas autotrasplantadas y trasplantadas.

En el grupo de autotrasplante, después de sacrificar el animal a las 16 semanas de la intervención quirúrgica y 24 horas del aclaramiento bacteriano, se realizaba la recogida de todo el tejido esplénico regenerado a nivel del epiplón. Las muestras eran procesadas según la técnica descrita con anterioridad, con la intención de realizar su estudio histológico, según una clasificación preestablecida.

El grupo de trasplante, de igual forma era sacrificada, para la recogida de la muestra esplénica a nivel de la región cervical y su posterior estudio histológico.

Posteriormente, las muestras recogidas y preparadas, se clasificaban según un score de 0 a 4, basado en los criterios histológicos de Moore (1986). Esta clasificación es la siguiente:

0. Ausencia de linfocitos agregados.
1. Menos de 5 linfocitos agregados a nivel subcapsular, sin evidencia de localización perioarteriolar.
2. Escasos agregados de linfocitos a nivel periarteriolar, principalmente en la periferia de la sección espectral. No confluencia de agregados linfoides.
3. Frecuentes agregados linfoides perioarteriulares, distribuidos irregularmente en la sección esplénica. Zona marginal bien establecida y confluencia de linfoides agregados.
4. Número y distribución normal de agregados linfoides con normal arquitectura.

10. METODO ESTADISTICO.

Para conseguir los objetivos planteados y la comprobación de las hipótesis del estudio se han empleado los siguientes métodos estadísticos:

1. Para la comprobación de las variables cualitativas se ha empleado la prueba de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher.
2. Para las comprobaciones entre variables cuantitativas entre grupos se ha empleado la t de Student y el análisis de la varianza (ANOVA), realizando la estimación del IC al 95% de las diferencias. También se han empleado pruebas no paramétricas para realizar estas comparaciones.
3. Para el estudio de correlación se han empleado modelos de regresión lineal simple y múltiple.

El estudio estadístico se ha efectuado con el programa SPSS 7.5 para Windows.

Todas las pruebas se han considerado bilaterales y el nivel de significación se ha establecido en 0,05.

RESULTADOS

1. ESTUDIO ESTADISTICO.

1.1. DESCRIPCION DE LAS CARACTERISTICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.

Se realiza un trabajo experimental con 100 ratas tipo Lewis, isogénicas y consanguíneas, distribuidas de forma aleatoria en cuatro grupos de 25 ratas cada uno. Además, 25 ratas de las mismas características genéticas, son utilizadas como donantes en el grupo de trasplante para la practica de 25 trasplantes heterotópicos en región cervical según la técnica quirúrgica ya descrita en el apartado anterior.

La edad de todas las ratas al inicio del estudio es de 12 semanas. El peso medio es de 250 gramos (+/- 50).

1.1.1. SEXO.

Con respecto al estudio de la distribución del sexo de los animales de experimentación en los grupos de estudio; se utilizan 100 ratas de tipo Lewis, de las cuales 50 son machos y 50 hembras. La distribución por grupos de estudio queda reflejada en la siguiente tabla.

Tabla 1. Distribución del sexo por grupos de estudio.

	sexo		Total
	Hembra	Macho	
A. Control	12	13	25
B. Esplenectomía	13	12	25
C. Autotransplante	13	12	25
D. Transplante	12	12	25
Total	50	50	100

1.1.2. HEMOGRAMA. DETERMINACION DE LEUCOCITOS TOTALES, PMN, MONOCITOS, LINFOCITOS y PLAQUETAS.

Se realiza extracción de 1 ml de sangre mediante punción cardiaca para determinar el número de leucocitos totales, PMN, linfocitos, monocitos y plaquetas al inicio del estudio en los cuatro grupos.

Tabla 2. Descriptiva del número de leucocitos totales, PMN, linfocitos, monocitos y plaquetas en el grupo control.

grupo de estudio A. Control

	Recuento	Media	Mínimo	Máximo	Error típico de la media
leucocitos previos	25	8156	4600	12100	437
PMN previos	25	200	100	300	16
linfocitos previos	25	7556	4100	11400	422
monocitos previos	25	400	200	700	26

Tabla 3. Descriptiva del número de leucocitos totales, PMN, linfocitos, monocitos y plaquetas en el grupo de esplenectomía.

grupo de estudio B. Esplenectomía

	Recuento	Media	Mínimo	Máximo	Error típico de la media
leucocitos previos	25	7632	2300	12100	473
PMN previos	25	188	100	500	19
linfocitos previos	25	7064	1900	11100	448
monocitos previos	25	380	200	700	31
plaquetas previas	25	552560	137000	876000	41095

Tabla 4. Descriptiva del número de leucocitos totales, PMN, linfocitos, monocitos y plaquetas en el grupo de autotrasplante.

grupo de estudio C. Autotrasplante

	Recuento	Media	Mínimo	Máximo	Error típico de la media
leucocitos previos	25	7284	3600	12100	443
PMN previos	25	204	100	300	15
linfocitos previos	25	6744	3100	11400	435
monocitos previos	25	336	200	500	22
plaquetas previas	25	644160	251000	835000	29724

Tabla 5. Descriptiva del número de leucocitos totales, PMN, linfocitos, monocitos y plaquetas en el grupo trasplante.

grupo de estudio D. Transplante

	Recuento	Media	Mínimo	Máximo	Error típico de la media
leucocitos previos	25	7552	4900	12900	376
PMN previos	25	208	100	500	23
linfocitos previos	25	7024	4700	11700	335
monocitos previos	25	320	100	700	26
plaquetas previas	25	622920	410000	873000	28040

Como podemos apreciar, el valor medio de las variables estudiadas en el hemograma de los grupos al inicio del estudio, presenta valores muy similares.

El valor medio del número de leucocitos totales en los grupos de estudio, oscila entre $7,2 \times 10^3/\mu\text{l}$ y $8,1 \times 10^3/\mu\text{l}$. El número de linfocitos presenta valores entre $6,7 \times 10^3/\mu\text{l}$ y $7,5 \times 10^3/\mu\text{l}$. Los monocitos, tienen valores entre $0,32 \times 10^3/\mu\text{l}$ y $0,4 \times 10^3/\mu\text{l}$. Los PMN, presentan valores entre $0,18 \times 10^3/\mu\text{l}$ y $0,2 \times 10^3/\mu\text{l}$.

El número de plaquetas en los grupos de estudio al inicio del trabajo, también presentan escasas diferencias. Los valores medios oscilan entre $550 \times 10^3/\mu\text{l}$ y $640 \times 10^3/\mu\text{l}$.

1.1.3. CITOMETRIA DE FLUJO (CMF). DETERMINACION DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS.

Se realiza la identificación y cuantificación mediante citometría de flujo, de las siguientes subpoblaciones en los cuatro grupos de estudio: Linfocitos T colaboradores (CD4), Linfocitos T supresores (CD8) y linfocitos B (CD19). Los resultados del calculo del valor medio valor máximo y valor mínimo quedan expresados en las siguientes tablas (tablas 6, 7, 8 y 9).

Tabla 6. Descriptiva de las subpoblaciones linfocitarias por CMF en el grupo control.

grupo de estudio A. Control

	Recuento	Media	Mínimo	Máximo	Error típico de la media
CD19 previos	25	6,45	3,61	9,79	,35
CD4 previos	25	61,23	51,78	72,74	1,22
CD8 previos	25	32,33	20,43	42,54	1,22

Tabla 7. Descriptiva de las subpoblaciones linfocitarias por CMF en el grupo de esplenectomía.

grupo de estudio B. Esplenectomía

	Recuento	Media	Mínimo	Máximo	Error típico de la media
CD19 previos	25	6,96	4,45	9,31	,27
CD4 previos	25	61,03	47,44	70,29	1,04
CD8 previos	25	32,01	23,37	45,67	1,06

Tabla 8. Descriptiva de las subpoblaciones linfocitarias por CMF en el grupo de autotrasplante.

grupo de estudio C. Autotrasplante

	Recuento	Media	Mínimo	Máximo	Error típico de la media
CD19 previos	25	7,16	2,05	11,14	,44
CD4 previos	25	59,87	47,81	69,68	1,18
CD8 previos	25	32,97	22,54	47,40	1,36

Tabla 9. Descriptiva de las subpoblaciones linfocitarias por CMF en el grupo de trasplante.

grupo de estudio D. Trasplante

	Recuento	Media	Mínimo	Máximo	Error típico de la media
CD19 previos	25	6,09	3,28	9,88	,36
CD4 previos	25	62,49	50,40	74,81	1,42
CD8 previos	25	31,42	17,67	44,23	1,57

Los valores de la media de las subpoblaciones linfocitarias en los grupos al inicio del estudio, al igual que en el hemograma, presentan resultados similares.

Las cifras son expresadas por porcentajes. Los linfocitos B, presentan en los grupos, valores del 6 al 7%. Los linfocitos T colaboradores, presentan valores entre el 59 y 62%. Por ultimo, los linfocitos T supresores, presentan valores entre el 31 y el 32%.

1.2. COMPARABILIDAD INICIAL DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.

1.2.1. HEMOGRAMA. ESTUDIO DEL NUMERO DE LEUCOCITOS TOTALES, LINFOCITOS, MONOCITOS Y PMN.

Tabla 10. Media, error típico e intervalo de confianza de los valores obtenidos en el hemograma en los cuatro grupos de estudio.

		Descriptivos				
		N	Media	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
leucocitos previos	A. Control	25	8156	436,62	7254,86	9057,14
	B. Esplenectomía	25	7632	473,07	6655,64	8608,36
	C. Autotransplante	25	7284	443,50	6368,67	8199,33
	D. Transplante	25	7552	376,04	6775,90	8328,10
	Total	100	7656	215,91	7227,59	8084,41
PMN previos	A. Control	25	200	16,33	166,30	233,70
	B. Esplenectomía	25	188	19,43	147,91	228,09
	C. Autotransplante	25	204	14,70	173,67	234,33
	D. Transplante	25	208	23,04	160,46	255,54
	Total	100	200	9,21	181,72	218,28
linfocitos previos	A. Control	25	7556	421,79	6685,48	8426,52
	B. Esplenectomía	25	7064	448,29	6138,78	7989,22
	C. Autotransplante	25	6744	434,86	5846,49	7641,51
	D. Transplante	25	7024	335,47	6331,62	7716,38
	Total	100	7097	205,20	6689,84	7504,16
monocitos previos	A. Control	25	400	26,46	345,39	454,61
	B. Esplenectomía	25	380	30,55	316,95	443,05
	C. Autotransplante	25	336	21,51	291,61	380,39
	D. Transplante	25	320	26,46	265,39	374,61
	Total	100	359	13,42	332,38	385,62

Cálculo de los parámetros del valor de la media, desviación típica e intervalos de confianza (IC 95%), en relación con el número de leucocitos totales, PMN, linfocitos y monocitos, en los grupos de estudio previos a la realización de cirugía.

Estudio de la significación estadística, respecto a las diferencias en el valor medio obtenido de las variables estudiadas en el hemograma, entre los diferentes grupos al inicio del trabajo.

Tabla 11. Comparabilidad de los resultados del hemograma entre los grupos, antes de la cirugía.

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
leucocitos previos	Inter-grupos	9994400,0	3	3331467	,708	,549
	Intra-grupos	4,52E+08	96	4703250		
	Total	4,62E+08	99			
PMN previos	Inter-grupos	5600,000	3	1866,667	,215	,886
	Intra-grupos	834400,00	96	8691,667		
	Total	840000,00	99			
linfocitos previos	Inter-grupos	8542700,0	3	2847567	,670	,573
	Intra-grupos	4,08E+08	96	4253192		
	Total	4,17E+08	99			
monocitos previos	Inter-grupos	104300,00	3	34766,667	1,990	,121
	Intra-grupos	1677600,0	96	17475,000		
	Total	1781900,0	99			

Ninguno de los resultados obtenidos, presenta diferencias significativas en el número de leucocitos, PMN, linfocitos y monocitos antes de realizarse la intervención quirúrgica correspondiente a cada grupo. Es decir, al inicio del estudio, ningún grupo presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores obtenidos del hemograma.

Tabla 12. Prueba de Kruskal-Wallis. Comparación entre los valores del hemograma y los grupos de estudio.

Estadísticos de contraste^{a,b}

	leucocitos previos	PMN previos	linfocitos previos	monocitos previos
Chi-cuadrado	2,045	1,049	1,988	5,776
gl	3	3	3	3
Sig. asintót.	,563	,790	,575	,123

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: grupo de estudio

1.2.2. HEMOGRAMA. ESTUDIO DEL NUMERO DE PLAQUETAS.

Recuento del número de plaquetas en los cuatro grupos para determinación de la media, error típico e intervalo de confianza (IC 95%).

Tabla 13. Media e intervalo de confianza del número de plaquetas en los grupos de estudio, previo a la cirugía.

		Descriptivos				
		N	Media	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
plaquetas previas	A. Control	25	629000	27167,81	572928,39	685071,61
	B. Esplenectomía	25	552560	41095,14	467743,81	637376,19
	C. Autotransplante	25	644160	29724,05	582812,58	705507,42
	D. Transplante	25	622920	28039,73	565048,84	680791,16
	Total	100	612160	16150,73	580113,45	644206,55

Tabla 14. Cálculo de las diferencias del valor medio en el número de plaquetas entre los grupos al inicio del estudio.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
plaquetas previas	Inter-grupos	1,24E+11	3	4,15E+10	1,619	,190
	Intra-grupos	2,46E+12	96	2,56E+10		
	Total	2,58E+12	99			

La diferencia del valor de la media en el número de plaquetas no es estadísticamente significativa ($p=0,180$).

Ninguna de las variables estudiadas en el hemograma en los grupos de estudio, al inicio del trabajo, presentan diferencias significativas.

Tabla 15. Prueba de Kruskal-Wallis. Comparación entre las cifra de plaquetas y los grupos de estudio.

Estadísticos de contraste	a,b
	plaquetas previas
Chi-cuadrado	2,980
gl	3
Sig. asintót.	,395

- a. Prueba de Kruskal-Wallis
- b. Variable de agrupación: grupo de estudio

1.2.3. CITOMETRIA DE FLUJO. CUANTIFICACION DE LAS SUB- POBLACIONES LINFOCITARIAS (CD4, CD8, CD19).

Cálculo de la media, desviación típica e intervalos de confianza (IC 95%), respecto a las determinaciones de las subpoblaciones linfocitarias en los cuatro grupos de estudio, al inicio del trabajo.

Tabla 16. Valor de la media e IC 95% de las subpoblaciones linfocitarias en los grupos de estudio.

		Descriptivos				
		N	Media	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CD19 previos	A. Control	25	6,4473	,3532	5,7182	7,1763
	B. Esplenectomía	25	6,9601	,2744	6,3938	7,5264
	C. Autotransplante	25	7,1575	,4408	6,2478	8,0672
	D. Transplante	25	6,0915	,3574	5,3539	6,8291
	Total	100	6,6641	,1828	6,3013	7,0269
CD4 previos	A. Control	25	61,2255	1,2193	58,7090	63,7420
	B. Esplenectomía	25	61,0256	1,0363	58,8868	63,1645
	C. Autotransplante	25	59,8724	1,1758	57,4457	62,2991
	D. Transplante	25	62,4922	1,4249	59,5514	65,4329
	Total	100	61,1539	,6089	59,9458	62,3621
CD8 previos	A. Control	25	32,3272	1,2172	29,8151	34,8394
	B. Esplenectomía	25	32,0142	1,0604	29,8256	34,2028
	C. Autotransplante	25	32,9701	1,3590	30,1652	35,7750
	D. Transplante	25	31,4164	1,5662	28,1838	34,6489
	Total	100	32,1820	,6494	30,8934	33,4705

Tabla 17. Cálculo de las diferencias del valor medio en las subpoblaciones linfocitarias entre los grupos al inicio del estudio.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
CD19 previos	Inter-grupos	17,649	3	5,883	1,803	,152
	Intra-grupos	313,239	96	3,263		
	Total	330,888	99			
CD4 previos	Inter-grupos	86,369	3	28,790	,771	,513
	Intra-grupos	3584,030	96	37,334		
	Total	3670,399	99			
CD8 previos	Inter-grupos	31,414	3	10,471	,243	,866
	Intra-grupos	4143,671	96	43,163		
	Total	4175,085	99			

Las subpoblaciones linfocitarias (CD4, CD8 y CD19) determinadas por CMF, no presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos de estudio al inicio del trabajo.

Tabla 18. Prueba de Kruskal-Wallis. Comparabilidad de los valores de las subpoblaciones linfocitarias entre los grupos de estudio.

Estadísticos de contraste ^{a,b}			
	CD19 previos	CD4 previos	CD8 previos
Chi-cuadrado	5,665	1,331	,422
gl	3	3	3
Sig. asintót.	,129	,722	,936

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: grupo de estudio

1.3. DESCRIPCION DEL GRUPO DE ESTUDIO TRAS EL EXPERIMENTO.

1.3.1. HEMOGRAMA Y CMF.

Cálculo de la media, valor máximo y mínimo de las variables estudiadas en el hemograma y CMF (leucocitos totales, PMN, monocitos, linfocitos, plaquetas, linfocitos CD4, CD8 y CD19); en los cuatro grupos de estudio, después de realizar la técnica quirúrgica correspondiente a cada grupo.

Tabla 19. Valor de la media de los variables del hemograma y CMF en el grupo control, después de la cirugía.

Grupo control

	Recuento	Media	Mínimo	Máximo	Error típico de la media
leucocitos post	25	7512	5400	9700	240
PMN post	25	188	100	400	18
linfocitos post	25	7080	5200	9100	228
monocitos post	25	244	100	400	20
plaquetas post	25	635240	311000	798000	23704
CD19 post	25	7,02	4,58	9,45	,25
CD4 post	25	64,29	56,32	73,88	,95
CD8 post	25	28,69	21,03	37,66	1,02

Tabla 20. Valor de la media de los variables del hemograma y CMF en el grupo de esplenectomía, después de la cirugía.

Grupo Esplenectomía					
	Recuento	Media	Mínimo	Máximo	Error típico de la media
leucocitos post	25	7460	3000	12800	459
PMN post	25	324	100	1300	56
linfocitos post	25	6684	2700	10800	366
monocitos post	25	452	100	1200	59
plaquetas post	25	703360	187000	1135000	43933
CD19 post	25	7,49	3,51	13,12	,50
CD4 post	25	63,09	42,42	74,62	1,71
CD8 post	25	29,42	18,92	46,89	1,44

Tabla 21. Valor de la media de los variables del hemograma y CMF en el grupo de autotrasplante, después de la cirugía.

Grupo autotrasplante					
	Recuento	Media	Mínimo	Máximo	Error típico de la media
leucocitos post	25	8696	3900	23400	778
PMN post	25	328	100	1100	50
linfocitos post	25	7904	3400	20300	659
monocitos post	25	464	100	2100	86
plaquetas post	25	749640	302000	1051000	29562
CD19 post	25	9,63	3,51	16,24	,67
CD4 post	25	57,74	45,89	66,48	1,03
CD8 post	25	32,63	22,17	44,52	1,25

Tabla 22. Valor de la media de los variables del hemograma y CMF en el grupo de trasplante, después de la cirugía.

Grupo trasplante

	Recuento	Media	Mínimo	Máximo	Error típico de la media
leucocitos post	25	8484	3000	22500	771
PMN post	25	344	100	1500	59
linfocitos post	25	7676	2700	19000	649
monocitos post	25	464	100	2000	81
plaquetas post	25	851640	121000	5100000	180435
CD19 post	25	9,49	2,50	20,40	,82
CD4 post	25	59,59	40,77	74,37	1,62
CD8 post	25	30,92	18,10	49,81	1,77

1.4. ACLARAMIENTO BACTERIANO.

Estudio de la función inmunológica mediante la determinación del aclaramiento bacteriano. Consiste en el conteo del número de colonias formadas por ml de sangre a los 30, 60, 120 y 180 minutos de la inoculación vía peritoneal de neumococos.

Tabla 23. Cálculo de la media, valor máximo y mínimo del número de colonias obtenidas por ml de sangre (UFC/ml); a los 30, 60, 120 y 180 minutos, en los grupos de estudio.

		Recuento	Media	Mínimo	Máximo	Error típico de la media
A. Control	AC30	25	97,80	60	185	5,63
	AC60	25	155,60	85	425	13,43
	AC120	25	26,20	10	140	4,97
	AC180	25	12,80	5	45	1,85
B. Esplenectomía	AC30	25	311,60	170	420	13,82
	AC60	25	610,00	325	945	33,68
	AC120	25	329,80	110	555	26,21
	AC180	25	103,60	55	210	7,41
C. Autotransplante	AC30	25	243,60	55	450	20,29
	AC60	25	436,80	225	725	25,76
	AC120	25	240,80	110	450	18,26
	AC180	25	74,20	15	125	6,84
D. Transplante	AC30	25	169,00	75	260	11,05
	AC60	25	329,80	165	480	18,12
	AC120	25	152,80	35	310	13,16
	AC180	25	35,60	10	55	2,73

A los 30 minutos de la inoculación de neumococos, el resultado del valor medio del conteo en el grupo control es de 97 UFC/ml de sangre. En el grupo de esplenectomía, el valor medio es de 311 UFC/ml. En el grupo de autotrasplante el valor es de 243 UFC/ml y en el grupo de trasplante 169 UFC/ml.

A los 60 minutos, el conteo alcanza los valores máximos. El grupo control 155 UFC/ml, el grupo esplenectomía 611UFC/ml, el grupo de autotrasplante 436 UFC/ml y el grupo de trasplante 329 UFC/ml de sangre.

A los 120 minutos, el aclaramiento presenta el mismo orden de resultados entre los grupos de estudio.

A los 180 minutos, el valor medio presenta los resultados más bajos en los cuatro grupos. El grupo control presenta un conteo de 12 UFC/ml, el grupo de esplenectomía de 103 UFC/ml, el grupo de autotrasplante de 74 UFC/ml y el grupo de trasplante de 35 UFC/ml de sangre.