

Evaluación histológica de la fibrosis hepática en pacientes con lesión posquirúrgica de vías biliares

José M. Hermosillo-Sandoval,¹
Vicente Ramírez-Casillas,¹
Sebastián Hernández-Hoyos,¹
Jacqueline Osuna-Rubio,¹
Carlos M. Nuño-Guzmán,¹
Francisco J. Gálvez-Gastélum,²
Alejandra G. Miranda-Díaz³

RESUMEN

Introducción: la lesión de vías biliares por colecistectomía puede producir depósito excesivo de colágena y tejido fibroso en el espacio extracelular hepático. El objetivo de esta investigación fue evaluar la fibrosis hepática en pacientes con lesión de vías biliares por colecistectomía.

Material y métodos: se estudiaron mediante cuantificación digital, tres sujetos con biopsia hepática normal y 21 con lesión de vías biliares. Se tomaron fotografías de 20 campos al azar de cada laminilla teñida con tricrómico de Masson y rojo sirio. Se incluyeron en el grupo I, tres biopsias de hígado sano; en el II, seis pacientes con fístula biliar externa sin obstrucción biliar; en el III, 15 pacientes con obstrucción biliar completa. La reconstrucción bilioentérica de los grupos II y III se realizó a las ocho semanas de la lesión. Resultados: el grupo I mostró 2 % de tejido fibroso y 1 % de colágena. El grupo II aumentó una vez el tejido fibroso y nueve el depósito de colágena ($p < 0.05$ Anova) versus el grupo I. El III incrementó 43 veces el tejido fibroso y 14 la colágena ($p < 0.001$ post hoc de Bonferroni) versus grupo I.

Conclusiones: los pacientes de los grupos II y III presentaron fibrosis hepática, siendo más importante en el grupo III.

SUMMARY

Background: bile duct injuries after cholecystectomy can produce fibrous and collagen deposit tissue. Our objective was to evaluate the liver fibrosis measured in histological tissue in patients with bile duct injury after cholecystectomy.

Methods: three normal liver biopsies and 21 from patients with bile duct injuries were studied. Group I: with three normal liver biopsies. Group II: with external abdominal fistula alone in six patients. Group III with complete bile duct obstruction in 15 patients. The surgical biliary enteric reconstructions were performed 8 weeks after bile duct injury in all cases. The fibrosis and collagen deposits were studied by Masson's trichrome and Sirius red stains and they were measured by a digital program. Results: group I showed 2 % of fibrosis tissue and 1 % of collagen deposit and was considered as normal. Group II showed unexpected 1 fold more liver fibrosis and 9 fold more collagen deposit in extracellular matrix macromolecule ($p < 0.05$, Anova) against group I. Patients in group III, had fibrous tissue increase 43 folds more and 14 collagen folds more ($p < 0.0001$, Bonferroni's post hoc) versus group I.

Conclusions: the patients in groups II and III showed liver fibrosis, being this more important in group III.

Recibido: 19 de febrero de 2007

Aceptado: 23 de julio de 2007

Introducción

La colecistectomía es el procedimiento electivo abdominal más común en Estados Unidos¹ y México. La lesión de vías biliares se presenta en una de cada 200 colecistectomías, y aunque ha habido importante desarrollo en el diagnóstico y tratamiento de la cirugía biliar, la estenosis biliar

secundaria a colecistectomía es un problema clínico importante, debido a que los pacientes con lesión de vías biliares presentan casi tres veces más riesgo de muerte prematura.^{2,3}

El manejo de la lesión de vías biliares se enfoca a la descripción de la lesión y control de la infección, con especial énfasis en el drenaje biliar temprano en pacientes con inflamación o infección;

¹Departamento de Cirugía General, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social (CMNO IMSS)

²Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara

³Departamento de Cirugía General, Hospital de Especialidades, CMNO IMSS. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara

Guadalajara, Jalisco, México

Comunicación con:
Alejandra G.
Miranda-Díaz.

Tel: (33) 3630 1355.

Fax: (33) 3617 3499.

Correo electrónico:
alexmiranda1@hotmail.com

Se recibió apoyo de
CONACYT (folio 13801)

Palabras clave

- ✓ lesiones de la vía biliar
- ✓ fibrosis hepática
- ✓ colágena

Key words

- ✓ bile duct diseases
- ✓ liver cirrhosis
- ✓ collagen

se recomienda esperar de tres a seis meses antes de la reconstrucción definitiva considerando que la obstrucción podría ser temporal y mejorará con drenaje externo y de esta forma limitar el daño. Sin embargo, de tres a seis meses podría ser mucho tiempo, debido a que se podría perpetuar el daño hepático. La lesión de vías bilíares produce fibrosis hepática difusa, con alteración de la estructura normal del hígado. Cuando se produce la lesión se activan mecanismos celulares con proliferación de células estelares hepáticas que al transformarse en miofibroblastos se convierten en matriz extracelular tipo membrana basal y se depositan en el hígado formando matriz extracelular tipo fibrilar.⁴ La colestasis por obstrucción biliar puede ocasionar necrosis o apoptosis de los hepatocitos,⁵ incluso provocar desarreglos inmunológicos por activación y expansión de células dendríticas mieloides como se ha reportado en estudios experimentales e *in vitro*.⁶

La presentación clínica de la lesión de vías bilíares más frecuente es la obstrucción biliar completa que produce estancamiento progresivo de bilis. Otras menos comunes son la sección total y la parcial del conducto biliar con fístula biliar externa.

En un modelo experimental realizado por nuestro grupo, la lesión de vías bilíares se caracterizó por obstrucción biliar completa y el depósito de tejido fibroso en el hígado fue tiempo-dependiente: entre mayor tiempo de obstrucción biliar, mayor daño hepático. Las enzimas hepáticas y la fibrosis mejoraron con la reconstrucción bilioentérica, pero la reversión de la fibrosis se presentó solo posterior al manejo con terapia génica.⁷

La reconstrucción quirúrgica se basa primordialmente en aspectos técnicos, sin considerar ampliamente las repercusiones sistémicas y hepáticas que se desarrollan a mediano y largo plazo en el paciente.

Los métodos para evaluar la fibrosis en biopsias hepáticas son diversos. Si bien el semicuantitativo se considera la técnica estándar, es poco preciso en comparación con el método cuantitativo.⁸ Por lo tanto, el propósito del trabajo fue evaluar cuantitativamente el daño histopatológico hepático mediante un programa digital en pacientes con lesión de vías bilíares después de colecistectomía.

Material y métodos

Se realizó un estudio transversal analítico en el que se incluyeron 21 pacientes con lesión de vías bilíares por colecistectomía, enviados al Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social. Se identificaron las características clínicas individuales y se realizó el procedimiento de reconstrucción más conveniente para el paciente de acuerdo con los métodos diagnósticos practicados y al tipo de lesión que presentaron. El manejo preoperatorio incluyó antimicrobianos y nutrición artificial.

Se realizó biopsia hepática intencionada a todos los pacientes durante la reconstrucción quirúrgica y se envió para análisis histopatológico. Unas laminillas se tiñeron con tricómico de Masson y otras con rojo sirio. Se cuantificó el tejido fibroso y el depósito de colágena en 20 fotografías de campos al azar. Entre miles de biopsias hepáticas archivadas en el Departamento de Patología durante 10 años, se encontraron tres reportadas normales; estas laminillas se tiñeron con los mismos colorantes y sirvieron como control normal.

Se formaron tres grupos: el grupo I o control se integró con las laminillas de los sujetos sanos; el grupo II incluyó seis pacientes con lesión de vías bilíares manifestada solamente como fístula biliar externa sin contaminación biliar peritoneal, manejada en el preoperatorio mediante drenaje biliar externo. Es importante considerar que la fístula biliar externa es una presentación poco habitual de lesión de vías bilíares. Los pacientes incluidos en este grupo se caracterizaron por sección completa del conducto biliar común sin obstrucción biliar ni contaminación peritoneal. El razonamiento para separar este grupo fue considerar que el tejido fibroso y el depósito de colágena deberían ser prácticamente normales.

En el grupo III se incluyeron 15 pacientes con obstrucción biliar completa. Estos pacientes se manejaron con drenaje biliar externo mediante drenaje transhepático percutáneo. La obstrucción biliar completa es la presentación más común de lesión de vías bilíares y produce estancamiento biliar severo con daño hepático por diversas causas, entre ellas daño directo por acumulación biliar progresiva y toxicidad por las sales bilíares

con activación y expresión de moléculas que llevan a apoptosis.

La reconstrucción bilioentérica se realizó en forma electiva en todos los casos ocho semanas después de la lesión de vías bilíares. Ningún paciente tuvo antecedentes previos de enfermedad hepática, (hepatitis B o C, coledocolitiasis) abuso de alcohol o drogas.

La evaluación de las enzimas hepáticas se llevó a cabo al ingreso y egreso del hospital. De 2 mL de sangre periférica obtenida en tubo seco, se separó el suero y se midió aspartato aminotransferasa, alanino aminotransferasa, bilirrubina directa, bilirrubina total y tiempo de protrombina mediante método automatizado con el analizador Sincron-7.

Evaluación histológica de las biopsias hepáticas

De los bloques de parafina de los tres grupos se cortaron secciones de 5 μm , se colocaron en laminillas precubiertas con silano para evitar el despegamiento. Se tiñeron con tricrómico de Masson o con rojo sirio. La cuantificación del tejido fibroso y el depósito de colágenas se llevó a cabo mediante programa computacional automatizado analizador de imágenes (Image Pro plus 4.0) por dos patólogo independientes. De las 20 fotografías digitales tomadas al azar, se midió el área total en pixeles y posteriormente se cuantificó la cantidad de matriz extracelular teñida en azul (trícromo de Masson) o de colágena en rojo (rojo sirio) y se sacó el porcentaje de la extensión del tejido fibroso teñido en azul o de colágena teñida en rojo. El cálculo se realizó a 40x de magnificación.⁹ La tinción con rojo sirio se caracteriza por alta afinidad a las proteínas de colágena, tiñe la colágena y contraíñe en verde el resto de las proteínas.¹⁰

El estudio y los procedimientos quirúrgicos se apegaron a las leyes locales y a la Declaración de Helsinki de 1975, de acuerdo con lo publicado en el Diario Oficial de la Federación en 1982 emitido por la Secretaría de Salud de México. La confidencialidad se aseguró usando números clave como identificación. El estudio se revisó y aceptó por el Comité de Ética y de Investigación, se firmó el consentimiento bajo información.

Se utilizó el programa SPSS para Windows (versión 10, Chicago, IL), los datos se expresaron en media y desviación estándar; se realizaron pruebas *t* de Student, Anova, *post hoc* de Tukey o Bonferroni. Se aceptó como significativo el valor de $p \leq 0.05$ a intervalo de confianza de 95 %.

Resultados

Se incluyeron 19 mujeres y dos hombres. La edad media fue de 44.3 años. Se realizaron 12 colestectomías abiertas y nueve laparoscópicas. Sirvieron como auxiliar diagnóstico el ultrasonido, la colangiografía endoscópica retrógrada, la colangiografía percutánea, el gammagrama de flujo biliar o la colangiorresonancia. La reconstrucción bilioentérica incluyó 10 intervenciones en Y de Roux y siete Hepp-Couinaud; la media de tiempo quirúrgico fue seis horas. Murieron cuatro pacientes: dos por sepsis abdominal, uno por cirrosis biliar y uno por insuficiencia respiratoria aguda.

Las enzimas hepáticas entre el ingreso y el egreso hospitalario en los grupos II y III mostraron mejoría después de la reconstrucción bilioentérica. Sin embargo, persistieron elevadas en relación a los valores normales con amplia desviación estándar. Consideramos que no fueron de utilidad para valorar el estado general del hígado. Las causas de la amplia variabilidad de los rangos podrían ser diversas, entre ellas la respuesta individual de cada paciente, el corto tiempo entre el ingreso y el egreso hospitalario o que las enzimas no sean tan específicas para mostrar adecuadamente la función de los hepatocitos y del espacio extracelular del hígado.

En el reporte histopatológico de los pacientes del grupo II predominó la inflamación y la fibrosis portal crónica leve. En los integrantes del grupo III, la presencia de cambios severos por proceso obstructivo crónico de vías bilíares extrahepáticas con proliferación de conductos bilíares secundarios, reacción inflamatoria crónica moderada con zonas de necrosis y fibrosis portal de leve a moderada sin observar cirrosis.

Tinción de tricrómico de Masson

La fibrosis en el grupo I comprendió menos de 2 % y correspondió al tejido normal de sostén.

En el grupo II el tejido fibroso se incrementó una vez más en relación al grupo I ($p < 0.05$ *post hoc* de Tukey y Bonferroni). El incremento de fibrosis, aunque no fue excesivo, pudo deberse a que existió libre flujo de bilis hacia el exterior de la cavidad abdominal. Sin embargo, el grupo III presentó importante depósito de tejido fibroso en el espacio extracelular con 43 veces más fibrosis que el grupo I ($p < 0.001$ Anova). Este interesante hallazgo confirma la presencia de daño hepático con aumento del depósito de matriz extracelular en los grupos II y III siendo más importante en el grupo III, que se caracterizó por obstrucción biliar completa (figura 1).

Tinción de rojo sirio

El tejido conectivo como constituyente del tejido fibroso encontrado en la matriz extracelular en las biopsias de sujetos con hígado normal fue $< 1\%$, que sirvió como base para comparar con el resto de los grupos. La colágena en el grupo II *versus* el grupo I mostró incremento nueve veces mayor ($p < 0.004$ *post hoc* de Tukey). El grupo III presentó 14 veces más colágena que el grupo I ($p < 0.001$ *post hoc* de Bonferroni); la causa podría ser el estancamiento progresivo y tóxico de las sales biliares en los conductos biliares intra y extrahepáticos produciendo necrosis del tejido hepático (figura 2).

Discusión

Si bien la colecistectomía es un procedimiento de baja morbilidad y mortalidad, cuando se presenta lesión de vías biliares se requieren intervenciones quirúrgicas repetidas con riesgo de estenosis que impacta en aspectos económicos, sociales y familiares e incrementa la morbilidad que puede conducir a muerte prematura. La litiasis vesicular se presenta primordialmente en menores de 60 años. La media de edad de los pacientes con lesión de vías biliares incluidos en el estudio fue de 44 años, en plena vida productiva, con alto riesgo de morbilidad y muerte prematura.¹¹ La colecistectomía abierta mostró mayor frecuencia en contraste con lo reportado en la literatura, donde el estándar terapéutico es la colecistectomía laparoscópica.¹² Los procedimientos quirúrgicos realizados en los pacientes de los grupos II y III obtuvieron buenos resultados al parecer debido a que cirujanos expertos resolvieron la lesión de vías biliares.¹³

En los grupos II y III hubo incremento de las enzimas hepáticas con amplia desviación estándar entre el ingreso y egreso hospitalario, indicando que probablemente no fueron determinantes en la magnitud del depósito de la fibrosis en el hígado, situación acorde a lo reportado en la literatura que menciona que la cuantificación de las enzimas hepáticas podrían no ser útiles para correlacionar las cifras con la presencia de fibrosis en las biopsias hepáticas, como se observó en el presente estudio.¹⁴

La cuantificación de la fibrosis hepática con el apoyo de un programa computacional resultó

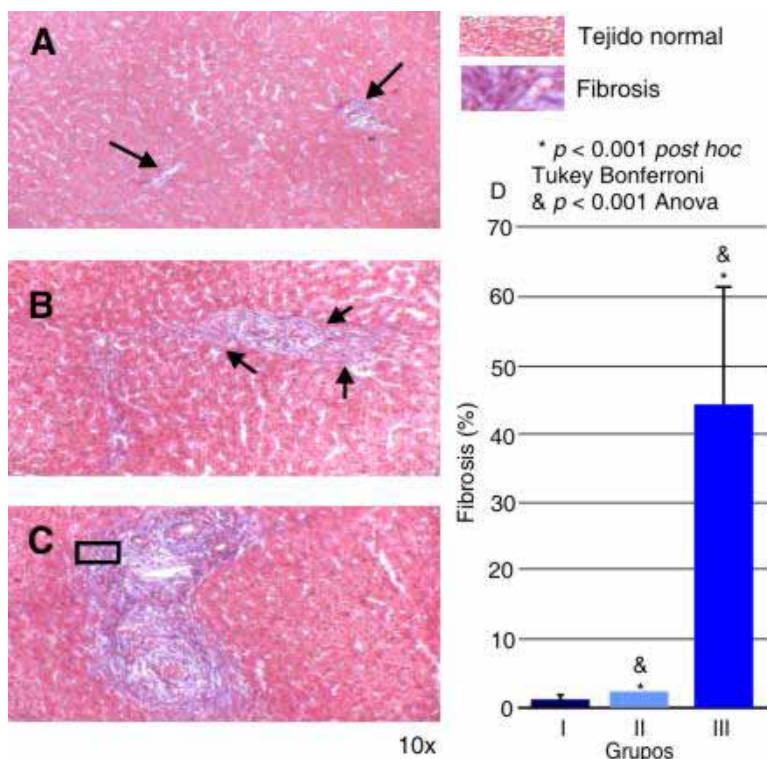


Figura 1. Evaluación del tejido fibroso (tinción de tricrómico de Masson). Las flechas muestran el tejido fibroso depositado en el espacio extracelular hepático. A) El grupo control presentó 2 % de tejido fibroso y se consideró normal. B) El grupo II con sección completa del conducto biliar común y fistula biliar externa sin peritonitis. El tejido fibroso presentó incremento inesperado, mostrando una vez más tejido que los controles. C) El grupo III mostró importante aumento del tejido fibroso en el espacio extracelular con 43 veces más que el grupo I. Los pacientes se caracterizaron por obstrucción biliar completa con dilatación del árbol biliar. D) Expresión del tejido fibroso dependiendo de las diferentes presentaciones clínicas de la lesión de vías biliares

ser un método auxiliar útil, factible y preciso para evaluar la progresión de la fibrosis en pacientes con lesión de vías biliares después de colecistectomía. El propósito de la evaluación cuantitativa mediante el analizador de imagen es hacer más objetiva la interpretación de los hallazgos en las biopsias hepáticas. Este método es ampliamente reportado en la literatura universal, tanto en publicaciones experimentales^{15,16} como en humanos.¹⁷ La tinción con tricrómico de Masson es considerada en la literatura como el método más acucioso para determinar la cantidad de fibrosis.

En el presente estudio, en el grupo I la cantidad de tejido fibroso y de colágena fue mínima. Los grupos II y III mostraron incremento de tejido fibroso y depósito de colágena en el espacio extracelular, predominando en el grupo III con obstrucción biliar completa. Existen reportes recientes *in vitro* y en animales de experimentación que apoyan el hecho de que la necrosis, la apoptosis y los desajustes inmunológicos podrían desempeñar un importante papel, incluso el efecto tóxico producido por el estancamiento de las sales biliares.¹⁸ Hay que considerar que los pacientes con lesión de vías biliares presentan cuadros repetidos de colangitis que podrían desencadenar inflamación, infección y conducir a necrosis o apoptosis. En el grupo II con sección biliar completa y fístula biliar externa sin peritonitis, el incremento del tejido fibroso fue de una vez más y nueve veces más depósito de colágena, demostrando aumento de la fibrosis hepática. La razón del daño no es clara, pero podría deberse a la súbita interrupción vascular con inflamación o a eventos repetidos de colangitis.¹⁹

Aunque ninguno de los pacientes tuvo antecedentes conocidos previos de enfermedad hepática o abuso de sustancias tóxicas como alcohol o drogas, no se descartan enfermedades concomitantes antes de la colecistectomía o antes de la reconstrucción bilioentérica, incluso la ingesta de medicamentos o la exposición a tóxicos que hayan influido en el aumento de tejido fibroso o del depósito de colágena en ambos grupos. Sin embargo, curiosamente los pacientes del grupo II en que la lesión de vías biliares fue menos severa tuvieron menos depósito de las macromoléculas de la matriz extracelular y en los del grupo III con obstrucción biliar completa durante ocho semanas, la expresión del depósito

de las macromoléculas manifestadas por fibrosis y proteínas de colágena fue mayor, por lo que consideramos que la lesión de vías biliares del grupo III fue más severa, con mayor impacto en la producción de fibrosis hepática.

La biopsia hepática resultó ser un procedimiento seguro debido a que no hubo complicaciones atribuibles al procedimiento en ninguno de los pacientes. Consideramos que la biopsia hepática fue una herramienta útil para cuantificar la magnitud del depósito de fibrosis en la matriz extracelular.

La inmediata identificación de la lesión de vías biliares es de vital importancia en el seguimiento de los pacientes en el posoperatorio, así como la vigilancia cercana y mantener alto el índice de sospecha e identificar a los pacientes sometidos a colecistectomía con evolución no ordinaria que manifiesten dolor excesivo o abun-

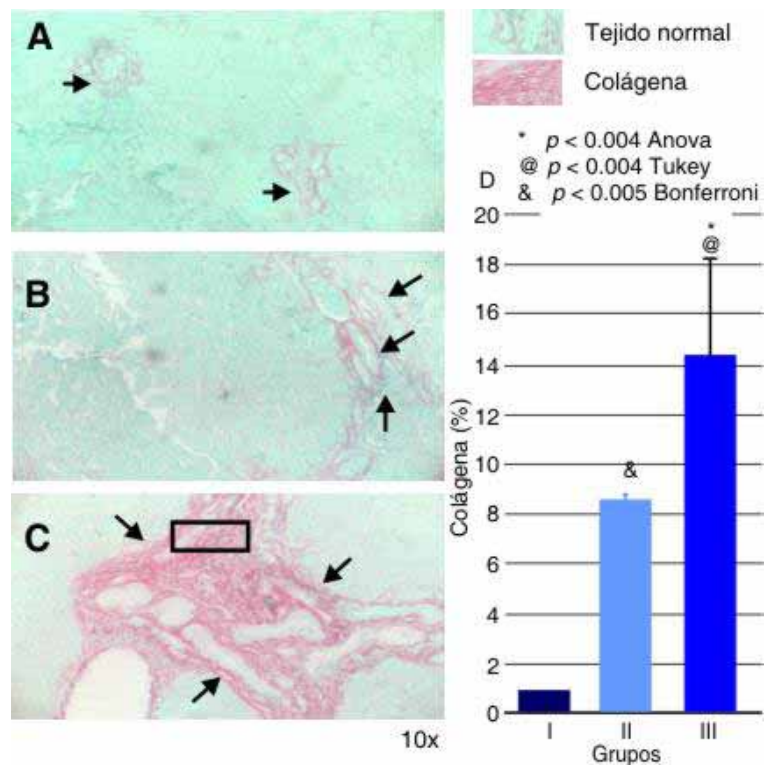


Figura 2. Evaluación del depósito de colágena (tinción de rojo sirio).

A) La cantidad de tejido conectivo en las biopsias de los sujetos normales incluidos en el grupo I fue < 1 %, correspondiendo a tejido normal.

B) En el grupo II, el depósito de colágena se incrementó nueve veces más que en el I. C) El grupo III presentó 14 veces más comparado con el grupo I.

D) El menor depósito de colágena se encontró en el grupo II, aunque fue inesperadamente alto

dante salida de bilis a través de los drenajes, quienes podrían haber sufrido una lesión inesperada.^{20,21} Sugerimos colocar drenajes externos, aunque se consideren innecesarios, y que permanezcan pocos días posteriores a la colecistectomía para identificar tempranamente la lesión de vías bilíares en caso de que exista, y evitar así otras complicaciones como peritonitis biliar y de este modo limitar el daño hepático y sistémico.

Referencias

1. Klar RM, Kongstvedt PR. Increased cholecystectomy rate after the introduction of laparoscopic cholecystectomy. *JAMA* 1993;270:1429-1442.
2. Hines OJ, Reber HA. Invited critique: operative repair of bile duct injuries involving the hepatic duct confluence. *Arch Surg* 1999;134(7):775.
3. Gottlieb S. Injury to bile duct during cholecystectomy nearly triples risk of death. *Br Med J* 2003;327(7421):946.
4. Arnaud A, Fontana L, Angulo AJ, Gil A, López-Pedrosa JM. Proliferation, functionality and extracellular matrix production of hepatocytes and a liver stellate cell line: a comparison between single cultures and cocultures. *Dig Dis S* 2003;48(7):1406-1413.
5. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006;43:S31-S44.
6. Bleier JJ, Katz SC, Chaudhry UI, Pillarisetty VG, Kingham TP 3rd, Shah AB, et al. Biliary obstruction selectively expands and activates liver myeloid dendritic cells. *J Immunol* 2006;176:7189-7195.
7. Miranda-Díaz A, Rincón AR, Salgado S, Vera-Cruz J, Gálvez J, Islas MC, et al. Effects of viral gene delivery of human uPA plus biliodigestive anastomosis induce recovery from experimental biliary cirrhosis. *Mol Ther* 2004;9:30-37.
8. Ishak K, Baptista A, Bianchi L. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-699.
9. Salgado S, García J, Vera J, Siller F, Bueno M, Miranda A, et al. Liver cirrhosis is reverted by urokinase-type plasminogen activator gene therapy. *Mol Ther* 2000;2(6):545-551.
10. López-de León, Rojkind MA. Simple micro-method for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J Histochem Cytochem* 1985;33:737-743.
11. Melton GB, Lillemo K, Cameron JL, Sauter PA, Coleman J, Yeo CJ. Major Bile duct injuries associated with laparoscopic cholecystectomy: effect of surgical repair on quality of life. *Ann Surg* 2002;235:888-895.
12. Kologlu M, Tutuncu T, Yuksek YN, Gozalan U, Daglar G, Kama NA. Using a risk score for conversion from laparoscopic to open cholecystectomy in resident training. *Surgery* 2004;135(3):282-287.
13. Dooley JS, Dick R, Watkinson A. Multidisciplinary approach to biliary complications of laparoscopic cholecystectomy. *Br J Surg* 1998;85:627-632.
14. Hui CK, Belaye T, Montegrand K, Wright TL. A comparison in the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C between persistently normal and elevated transaminase. *J Hepatol* 2003;38:511-517.
15. García-Bañuelos J, Siller-López F, Miranda A, Aguilar LK, Aguilar-Córdova E, Armendáriz-Boruna J. Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene Ther* 2002;9(2):127-134.
16. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis. A systematic review with special emphasis on antifibrotic strategies. *J Hepatol* 2007(46):955-975.
17. Tanano H, Hasegawa T, Kimura T, Sasaki T, Kawahara H, Kubota A, et al. Proposal of fibrosis index using image analyzer as a quantitative histological evaluation of liver fibrosis in biliary atresia. *Ped Surg Int* 2003;19(1-2):52-56.
18. Sodeman T, Bronk SF, Roberts PJ. Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278:G992-G999.
19. Sokol RJ, Mack C, Narkewicz MR, Karrer FM. Pathogenesis and outcome of biliary atresia: current concepts. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;37:4-21.
20. Lloid TM, Tllett A, Gacea G, Sutton Ch. Informed consent: are basic surgical trainees meeting the standards? *Qual Primary Care* 2004;12:97-101.
21. Sultana A, Byrne C, Caneh P, Poston GJ. Iatrogenic bile duct injury: impact of delay in recognition and experience of surgeon undertaking definitive repair. *Br J Surg* 2004;91:32. 