

11209  
2 ej 78



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

POST GRADO

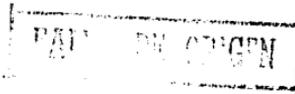
Hospital Regional "20 de Noviembre"

I. S. S. S. T. E.

**EFFECTOS DEL MENTOL SOBRE EL HIGADO Y LAS  
VIAS BILIARES ESTUDIO EXPERIMENTAL**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
E S P E C I A L I S T A E N  
C I R U G I A G E N E R A L  
P R E S E N T A :  
DR. ALFONSO RODRIGUEZ CIPRES

ASESOR: DR. HUMBERTO HURTADO A.



MEXICO, D. F.

1987





## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

Introducción	. . . . .	1
Hipótesis	. . . . .	9
Objetivos	. . . . .	10
Justificación	. . . . .	11
Material y Método	. . . . .	13
Resultados	. . . . .	19
Discusión	. . . . .	39
Conclusiones	. . . . .	47
Referencias	. . . . .	48

## INTRODUCCION

La prevención de la litiasis biliar residual y recurrente constituye uno de los objetivos fundamentales de la cirugía de vías biliares por cálculos (1), en la que juega un papel primordial el conocimiento de cuándo y cómo explorar el colédoco durante operaciones por cálculos vesiculares (2), así como el empleo adecuado de recursos transoperatorios tales como la colangiografía (3), la manometría de vías biliares (4) y la colangioscopia transoperatoria (5). Con éste último procedimiento, hemos logrado abatir la incidencia de la litiasis residual en nuestro Servicio a 2.6 % (6).

A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento de la litiasis biliar, la coledocolitiasis residual y recurrente después de colecistectomía sin exploración del colédoco sigue ocurriendo en 1 a 4 % de los pacientes (1, 4, 7, 8,); cuando la exploración del colédoco ha sido positiva, la frecuencia varía del 5 al 10 % (7, 9) y cuando los pacientes se reoperan por ésta complicación, hasta un 20% pueden desarrollar nuevamente coledocolitiasis (1).

El tratamiento de los cálculos biliares residuales puede ser por extracción mecánica no quirúrgica (10,11), disolución química (12,13), esfinterotomía endoscópica (14,15) y reintervención quirúrgica (16,17). En los últimos diez años, los tres primeros métodos son los que han tenido mayor aceptación debido a que sus resultados han sido muy buenos, su morbilidad y mortalidad son bajas y las reintervenciones quirúrgicas, que se realizan cada vez con menor frecuencia, implican una mayor morbilidad (1).

El avance terapéutico más importante en los pacientes en que se hace el diagnóstico de litiasis residual en el postoperatorio inmediato mediante una colangiografía por sonda en T, es la extracción mecánica no quirúrgica (10,11). En éste procedimiento se requiere de la permanencia de la sonda en T durante un período de por lo menos seis semanas para que se forme un tracto fistuloso firme y, en ocasiones, son necesarias varias sesiones a lo largo de algunas semanas (hasta en 30 % de los pacientes) para lograr extraer todos los cálculos (11). Con ésta técnica se han logrado resultados exitosos en -

un 95 % de los casos, con morbilidad de 5 % (1) y los pacientes pueden ser tratados como externos. Las fallas pueden ocurrir si el tracto fistuloso de la sonda en T es delgado y tortuoso, si el cálculo es grande y no triturable o si está impactado en el muñón del cístico o en el ámpula de Vater.

Desde hace algunos años se ha recomendado la esfinterotomía endoscópica como tratamiento de la litiasis residual o recurrente cuando los métodos señalados anteriormente han fracasado o cuando el diagnóstico se ha establecido más tardíamente y el paciente ya no tiene la sonda en T. Este procedimiento es razonablemente seguro y está desplazando cada vez más a la cirugía como tratamiento de la coledocolitiasis en centros en que se cuenta con el equipo necesario y con endoscopistas expertos. Al realizar una esfinterotomía adecuada, los cálculos pueden pasar al duodeno espontáneamente o extraerse con un catéter con canastilla de Dormia (14); sin embargo, alrededor del 10 % de los pacientes tienen litiasis residual o recurrente después de dicho procedimiento (14,18), cifra que es superior a la frecuencia de cálculos resi -

duales de 4.3 % después de exploración quirúrgica del colédoco en manos de cirujanos expertos (19), pero comparable a la publicada de 9.7 % en un estudio multicéntrico de 3,046 pacientes que tuvieron coledocolitiasis después de colecistectomía (9). La hemorragia, colangitis, pancreatitis, perforación e impactación del cálculo son algunas de las complicaciones graves de la esfinterotomía endoscópica que requirieron cirugía en 32 % de los 254 pacientes publicados por Safrany (14).

La reintervención quirúrgica sigue teniendo indicación en algunos pacientes con coledocolitiasis residual que tienen aún sonda en T y en la mayoría de aquellos en los que ya se ha retirado (1). Mc Sherrey y Glenn (16) publicaron una mortalidad de 2.1 % en 341 pacientes en que se realizó coledocolitotomía, pero al excluir los que murieron de pancreatitis o colangitis (como se ha hecho en algunos trabajos publicados sobre esfinterotomía endoscópica), su mortalidad hubiera sido de sólo 1.2 %. Girard (1) informó una mortalidad quirúrgica de 1.8 % en 49 reoperaciones, la que es comparable con la de la esfinterotomía endoscópica, por lo que la aceptación de -

este último procedimiento como consecuencia de menor mortalidad parece injustificada y, aunque las complicaciones de la esfinterotomía endoscópica son menos frecuentes, cuando se presentan son más graves.

Por las razones mencionadas con anterioridad, se considera que cuando no se dispone de la extracción instrumental o ha fallado ésta en el paciente que tiene litiasis retenida y conserva aún la sonda en T, la disolución química constituye una buena alternativa y que solamente cuando este último procedimiento falla, debe intentarse la esfinterotomía endoscópica o la reintervención quirúrgica.

Se han descrito múltiples sustancias para la disolución química de los cálculos retenidos del colédoco mediante la infusión directa a través de la sonda en T. - Gardner (20) publicó en 1975 un 72 % de éxitos con infusión de solución salina heparinizada con la que logró la disolución de los cálculos en dos semanas y en la mayoría en cinco días; sin embargo, otros estudios "in vitro" han demostrado que la solución salina heparinizada no disuelve los cálculos y que su desaparición es más bien atribuible al efecto de lavado mecánico (21). El colato

sódico ha sido un solvente efectivo de los cálculos (12) y se ha encontrado éxito en 65 % de los pacientes en 10 a 14 días de la infusión. Recientemente Pitt y Cameron (22) han informado que las posibles complicaciones con este tratamiento pueden ser fiebre, elevación de enzimas hepáticas, colangitis y pancreatitis. Thistle (23) logró la disolución de cálculos biliares "in vitro" con mono-octanoína (monoglicérido de cadena media) y en un estudio de siete pacientes (24), logró la disolución en tres, en uno se redujo suficientemente para permitir la extracción con canagilla y en dos disminuyó el número de cálculos y fueron sometidos a cirugía. Recientemente García-Romero y cols (25, 26) publicaron el primer caso clínico tratado exitosamente con la infusión de clofibrato a través de la sonda en T. Allen y cols (27) demostraron la capacidad litolítica del éter butil metil terciario en el animal experimental con discretas repercusiones clínicas, bioquímicas e histológicas.

Otras substancias empleadas en la disolución química de los cálculos han sido las preparaciones de monoterpénos cíclicos derivados de aceites esenciales vegetales purificados, que tienen efectos coleréticos. Doran y cols

(28) emplearon en Inglaterra una preparación comercial - (Rowachol. Rowa Ltd., Bantry, Co. Eire) a base de seis mo noterpenos cíclicos (mentol, mentona, pirene, broneol, ci neol y camfene) y encontraron que a dosis de dos cápsulas (cada cápsula contiene 0.1 ml) por vía oral tres veces al día durante sólo 48 horas facilitó significativamente la solubilización del colesterol de la bilis vesicular y de la obtenida por sonda en T, con buena tolerancia de los - pacientes y sin evidencia de hepatotoxicidad (29). Al pa recer algunos terpenos son potentes inductores de la actiu vidad enzimática de los microsomas hepáticos y de ellos, - el mentol y el broneol tienen los mayores efectos colerg- ticos (28).

Asimismo, algunos de los terpenos como el mentol, la mentona y el pirene han sido excelentes solventes del colesterol "in vitro" (28). En 1981 Méndez y cols (30) - encontraron que el mentol (p-mentan-3- 1;2-isopropil-5-me tilciclohexanol.  $C_{10}H_{20}O=156.3$ )(Fig.1) es capaz de disolu ver los cálculos biliares "in vitro" en 48 horas a una - concentración del 100 % y en 96 horas al 50 %, probable -

mente por solubilización del colesterol. Más recientemente, Lagarriga y Méndez (31) encontraron en un estudio "in vitro" que el mentol y el ácido mono-octanoico fueron los mejores solventes de los cálculos biliares.

Los resultados de éstos trabajos dan lugar a la posibilidad de que la litiasis residual en pacientes que aún tienen una sonda en T o una sonda de colecistostomía, puedan ser tratados mediante la infusión directa de mentol a la luz de las vías biliares; sin embargo, en la literatura revisada no se encontró ningún trabajo en el que el mentol se hubiera aplicado directamente por sonda en T o de colecistostomía, por lo que se desconocen sus posibles efectos tóxicos sobre las vías biliares y el hígado, motivo por el cual se decidió realizar este trabajo de investigación experimental, antes de intentar emplearlo en el humano.

### HIPOTESIS

Es factible que el mentol al 20 % en aceite de girasol aplicado directamente a las vías biliares a través de catéter de colecistostomía o de sonda en T no tenga repercusiones funcionales hepáticas ni alteraciones morfológicas del hígado, vesícula biliar y colédoco del cánido.

## OBJETIVOS

- 1.- Investigar en el animal de experimentación las alteraciones funcionales hepáticas que pueda provocar el mentol al 20 % en aceite de girasol al ser aplicado directamente a la vesícula y vías biliares.
- 2.- Investigar los efectos del mentol (administrado por colecistostomía) sobre la morfología del hígado, vesícula y vías biliares.
- 3.- En caso de que se produzcan alteraciones funcionales y/o morfológicas en el hígado, vesícula biliar o colédoco con la aplicación del aceite mentolado, comprobar si las alteraciones producidas son debidas al mentol, al aceite, a las infusiones, la manipulación quirúrgica o el posible factor infeccioso por la presencia del catéter de colecistostomía.

## JUSTIFICACION

La litiasis residual sigue siendo un grave problema en nuestro hospital; en un trabajo recientemente realizado en el Servicio de Cirugía General del Hospital Regional "20 de Noviembre" del I.S.S.S.T.E. (6) se reporta un grupo de 50 - pacientes con coledocolitiasis sometidos a exploración quirúrgica de las vías biliares en los que la incidencia de litiasis residual fué de 18 % y en un grupo comparable de 50 pacientes en que se utilizó la colangioscopia transoperato - ria fué de 2.6 % .

En diversos trabajos referidos previamente se ha demostrado que el mentol "in vitro" ha sido un excelente solvente de los cálculos de colesterol y ha sido útil también en la práctica clínica administrado por vía oral. Cabe la posibilidad de que el mentol administrado por catéter de colicistostomía o por sonda en T pueda disolver los cálculos biliares residuales o recurrentes sin producir efectos adversos funcionales o estructurales en el hígado, vesícula y vías biliares.

Como paso inicial para comprobar lo anterior, se requiere de un trabajo experimental que demuestre la ing-cuidad del mentol administrado en infusión en la vesícula y vías biliares del animal de experimentación.

## MATERIAL Y METODO

Durante un período de tiempo comprendido de marzo a junio de 1986, en el Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Regional "20 de Noviembre" I.S.S.S.T.E., se estudiaron 26 cánidos mestizos de ambos sexos con peso aproximado de 15 a 20 Kg cada uno, se excluyeron cuatro (uno por pruebas de función hepática anormales al iniciar el estudio, dos por no completar el período de infusión y uno por crisis convulsivas) y se eliminaron cuatro (fallecimientos por circunstancias técnicas). Los 18 animales restantes se distribuyeron de acuerdo a números aleatorios en dos Grupos.

Grupo I (control).- Constituido por siete cánidos a los que después de un período de ayuno de por lo menos 12 horas, se administró medicación preanestésica consistente en clorhidrato de clorpromazina (Largactil<sup>®</sup> Labs Rhodia, México.) a dosis de 0.5 a 2.0 mg por Kg corporal y pentobarbital sódico (Anestesal<sup>®</sup> Labs Hoechst, México.) 25 mg. por Kg de peso corporal, administrados ambos medicamentos por vía intravenosa; después de esto se administró solución glucosada al 5 % 500 ml para seis horas y se tomaron los -

siguientes exámenes: bilirrubina total, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, transaminasa glutámico oxaloacética, fosfatasa alcalina, proteínas totales, albúmina, colesterol y tiempo de protrombina. Enseguida, previa intubación orotraqueal con cánula de Rush calibre 30 a 34 Fr se conectaron a un ventilador de volumen Harvard Aparatus, con control de velocidad a 12-15 ciclos por minuto y con volumen corriente de 400-500 ml. Con técnica estéril se realizó incisión media infraxifoidea de 12 a 15 cm de longitud, toma de cinco ml de bilis por punción directa del fondo vesicular para cultivo de aerobios y anaerobios y biopsia hepática en cuña y biopsia de fondo vesicular, dividiéndose cada una en dos fragmentos los que se incluyeron de inmediato, uno en formaldehído al 37 % y el otro en gluteraldehído al 2% (para microscopía de luz y electrónica respectivamente), se colocó un catéter Malecot de caucho 20 Fr que se fijó y se extrajo tunelizado por contrabertura.

Grupo II (estudio).- Formado por 11 animales en los que al igual que en los del Grupo I, se tomaron exámenes de laboratorio, cultivos biliares y biopsias de hígado y

vesícula biliar siguiendo estrictamente el mismo procedimiento.

Al día siguiente de la cirugía, se instilaron por - las sondas de colecistostomía a los animales del Grupo I 10 ml de aceite de girasol puro cada ocho horas durante dos semanas. A los cánidos del Grupo II se instilaron -- 10 ml de aceite de girasol con 20 % de mentol puro cada ocho horas por el mismo tiempo que en el Grupo I; debido a las propiedades coligativas de la suspensión de mentol utilizando el aceite de girasol, a temperatura ambiente se produce solidificación por cristalización a concentraciones mayores del 20 %, al completar el período de infusión, en los animales de ambos Grupos y bajo las mismas condiciones operatorias que en la primera cirugía, se tomaron pruebas de funcionamiento hepático (PFH), cultivos biliares y biopsias de vesícula biliar e hígado, además de - colédoco, procesandose de la misma manera que en la primera intervención.

Consideramos como cifras normales de la PFH las siguientes: bilirrubina total: 0.01 a 1 mg/100 ml; transaminasa glutámico oxaloacética: 100 a 200 mU/ml; fosfatasa-

alcalina: 100 a 500 mU/ml; proteínas totales: 5.5 a -  
7.5 gr/100 ml; albúmina 2 a 4 gr/100 ml; colesterol: -  
141 a 300 mg/100 ml y tiempo de protrombina de 100 % -  
(32).

Los cultivos biliares fueron procesados para microrganismos aerobios con gelosa sangre y agar chocolate, - recuperados para anaerobios con agar McConkey y tioglicolato con hemina menodiona e incubados y res sembrados - en gelosa sangre y sangre con hemina menodiona.

La biopsias de hígado, vesícula biliar y colédoco se tñieron con hematoxilina-eosina y fueron analizadas por un patólogo que desconocía el Grupo de procedencia de cada una de las muestras. En las biopsias de hígado se investigó la presencia de degeneración, necrosis, inflamación aguda, inflamación crónica, retención de bilis y hemorragia; en las de vesícula y colédoco se investigó la presencia de inflamación, hemorragia o necrosis - de la mucosa, muscular y serosa. En cada biopsia y en cada uno de los parámetros por estudiar se estableció - una graduación de severidad de las alteraciones morfológicas de 0 a III, considerando como grados 0 la auseng -

cia de alteraciones, grado I la presencia de alteraciones en menos del 25 % del campo microscópico, grado II con alteraciones entre 25 y 50 % y grado III cuando se observaron alteraciones en más del 50 % del campo microscópico.

Una vez establecida la severidad de las alteraciones en las biopsias, se compararon los resultados con los de las biopsias obtenidas en la segunda intervención quirúrgica en cada uno de los Grupos; finalmente se compararon los resultados de las biopsias obtenidas durante la segunda cirugía entre ambos Grupos.

Se utilizó la prueba de t de Student para muestras pequeñas para comparar los promedios de las PFH de ambos Grupos al iniciar el estudio, al finalizarlo y entre Grupos.

Sólo se estudiaron por microscopía electrónica las biopsias de cinco cánidos debido a que no pudo disponerse de más de este recurso.

Finalmente, de acuerdo a los procedimientos éticos vigentes en nuestro país (33), después de la toma de -- biopsia de colédoco se realizó ligadura de este y re - construcción biliodigestiva con las siguientes técnicas quirúrgicas: Colecistoduodenoanastomosis en 16 cánidos- y colédocoyeyunoanastomosis en Y de Roux en dos. Tres- de los cánidos analizados se reintervinieron en una oca - sión y uno se reintervino en dos ocasiones debido a la- salida accidental de la sonda de colecistostomía.

## RESULTADOS

Todas las PFH al iniciar el estudio en el Grupo I fueron normales (Cuadro I). En el Grupo II las únicas anormalidades observadas fueron elevación de la bilirrubina - total a 1.7 mg/100 ml en un animal, elevación de la transaminasa glutámico oxaloacética en uno y elevación del colesterol total en otro (Cuadro II).

El análisis de las biopsias por microscopía de luz al iniciar el estudio demostró normalidad en los siete - animales del Grupo I (Figs. 2 y 3 ) y en 10 de los 11 del Grupo II; el restante mostró inflamación crónica grado I en la mucosa vesicular (Fig. 4).

Los cultivos de bilis al iniciar el estudio fueron negativos en cinco animales del Grupo I y positivos en dos (uno con *P. aeruginosa* y uno con *E. coli*), en el Grupo II nueve fueron negativos y dos positivos (uno con *K. ozaenae* y uno con *P. aeruginosa*).

Al comparar el resultado de las PFH tomadas durante la segunda intervención quirúrgica con el de las tomadas al iniciar el estudio en el Grupo I, se observó que

sólo en un animal se elevó la bilirrubina total a 1.4 mg/100 ml, aunque el promedio de la misma se mantuvo dentro de límites normales ( $\bar{X}$  0.61  $\pm$  DE 0.50) y aunque la fosfatasa alcalina se elevó en seis de los siete animales, se mantuvo dentro de límites normales en cinco de ellos ( $\bar{X}$  207.2  $\pm$  DE 209.4 -  $p > 0.05$ ) (Cuadro III). Al comparar los promedios de las PFH en el Grupo I al iniciar el estudio con los obtenidos al finalizarlo, no se observó diferencia estadísticamente significativa en ninguno de ellos (Cuadro IV).

La comparación de los resultados de las PFH al iniciar y al finalizar el estudio en el Grupo II mostró que en dos de los 11 animales se elevó la bilirrubina total a 1.4 mg/100 ml y el resultado más sobre saliente fué la elevación de la fosfatasa alcalina en los 11 animales, en cinco de los cuales la elevación fué por arriba de los límites normales (Cuadro V). La comparación de los promedios de las PFH de los 11 animales entre el inicio y el final del estudio no mostró diferencia ( $p > 0.05$ ) y aunque la elevación de la fosfatasa alcalina fué importante, tampoco existió diferencia estadísticamente significativa (Cuadro VI). La comparación-

de los promedios de las PFH al finalizar el estudio entre los Grupos I y II tampoco mostró diferencia estadística - mente significativa (Cuadro VII).

Al iniciar el estudio todas las biopsias de hígado y vesícula biliar fueron normales en ambos Grupos, excepto una de vesícula en el Grupo II que mostró inflamación crónica grado I en la mucosa.

Al terminar el estudio, de las biopsias de vesícula, hígado y colédoco de los siete animales del Grupo I, cinco fueron normales y dos mostraron inflamación crónica grado I en la mucosa vesicular. De los 11 animales del Grupo II, seis fueron normales, dos con inflamación crónica grado II en la mucosa vesicular e inflamación crónica grado I en el colédoco (Figs. 5 y 6 ), una con inflamación crónica grado I y una con grado II en la mucosa vesicular y una con inflamación crónica grado I en la mucosa del colédoco.

Se realizó microscopía electrónica en 5 animales y en todos ellos los resultados fueron normales en las biopsias de la primera cirugía (Figs. 7 y 8).

De los cultivos biliare<sup>s</sup> tomados al finalizar el estudio en el Grupo I, cuatro fueron negativos, dos con E. coli y uno con E. coli y P. aeruginosa; de los tomados en el Grupo II, seis fueron negativos, dos con E. coli, uno con E. coli y P. aeruginosa, uno con enterococo, estafilococo coagulasa negativo y C. perfringens y uno con estrep<sup>t</sup>ococo beta hemolítico y estafilococo.

Dos de los cánidos fueron reintervenidos una oca<sup>s</sup>ión y en uno no reintervenido (los tres con gran cantidad de adherencias intraperitoneales) se observó dilata<sup>c</sup>ión de los conductos biliares extrahepáticos durante la segunda cirugía.

Debemos hacer notar que después de la infusión de aceite de girasol a través de los catéteres de Malecot de caucho, se observó una notable disminución en la consistencia de las paredes por lo que posteriormente se emplearon catéteres de Silastic<sup>F</sup> del mismo tipo.

Cuadro I.- Pruebas de funcionamiento hepático al iniciar el estudio en el Grupo I.

Animal	BT	BD	BI	TGO	FA	PT	Alb	Col	TP(%)
1	0.6	0.4	0.2	59	30	5.8	2.5	142	100
2	0.4	0.1	0.3	78	14	6.9	3.3	257	100
3	0.6	0.2	0.4	68	11	9.4	2.1	198	100
4	0.5	0.2	0.3	42	22	6.4	3.1	198	100
5	0.6	0.4	0.2	32	31	8.1	2.7	203	100
6	0.5	0.2	0.3	71	75	8.2	3.3	186	100
7	0.2	0.1	0.1	36	34	6.3	3.6	200	100

BT:bilirrubina total (0.1 a 1 mg/100 ml); BD:bilirrubina - directa; BI:bilirrubina indirecta; TGO:transaminasa glutámico oxaloacética (100 a 200 mU/ml); FA:fosfatasa alcalina (100 a 500 mU/ml); PT:proteínas totales (5.5 a 7.5 gr/100 ml); Alb:albúmina (2 a 4 gr/100 ml); Col: colesterol (141- a 300 mg/100 ml); TP:tiempo de protrombina (100 %). Los - valores dentro de los parentésis registran las cifras que - se consideraron como normales en éste estudio.

Cuadro II.- Pruebas de funcionamiento hepático al iniciar  
el estudio en el Grupo II.

Animal	BT	BD	BI	TGO	FA	PT	Alb	Co1	TP (%)
1	0.5	0.3	0.2	442	55	7.9	3.3	222	100
2	0.5	0.2	0.3	122	157	7.3	3.6	251	100
3	1.7	1.5	0.2	87	43	7.5	2.5	159	100
4	0.6	0.2	0.4	85	117	8.0	2.6	225	100
5	0.5	0.4	0.1	34	30	6.5	3.1	283	100
6	0.6	0.2	0.4	52	74	7.8	3.0	320	100
7	0.8	0.7	0.1	27	58	6.8	2.9	160	100
8	0.5	0.3	0.2	22	28	7.4	3.3	144	100
9	0.6	0.4	0.2	39	32	7.5	3.3	164	100
10	0.2	0.1	0.1	28	73	7.3	3.3	292	100
11	0.4	0.3	0.1	28	76	8.0	3.4	198	100

Cuadro III.- Comparación de las PFH al inicio y al final del estudio en el Grupo I .

Animales en estudio							
PFH	1 A - B	2 A - B	3 A - B	4 A - B	5 A - B	6 A - B	7 A - B
BT	0.6-0.4	0.4-0.6	0.6-0.6	0.5-0.2	0.6-1.4	0.5-0.8	0.2-0.3
BD	0.4-0.3	0.1-0.5	0.2-0.6	0.2-0.1	0.4-1.3	0.2-0.7	0.1-0.2
BI	0.2-0.1	0.3-0.1	0.4-0.4	0.3-0.1	0.2-0.1	0.3-0.1	0.1-0.1
TGO	59- 47	78- 45	68- 68	42- 56	32- 32	71- 66	36- 30
FA	30-145	14- 12	11- 64	22-206	31-207	75-653	34-164
PT	5.8-6.6	6.9-6.3	9.4-7.4	6.4-5.9	8.1-8.1	8.2-6.8	6.3-7.0
Alb	2.5-3.3	3.3-2.5	2.1-2.7	3.1-2.3	2.7-2.7	3.3-2.9	3.6-3.5
Col	142-269	257-209	198-150	198-245	203-203	186-219	200-167
TP	100-100	100-100	100-100	100-100	100-100	100-100	100-100

A: Muestra inicial; B: Muestra final

PFH: Pruebas de funcionamiento hepático

Cuadro . IV .- Comparación de promedios de las PFH al inicio del estudio en el Grupo I .

P F H	Inicio ( $\bar{X} \pm DE$ )	Final ( $\bar{X} \pm DE$ )	P*
Bilirrubina total	0.49 <sup>±</sup> 0.15	0.61 <sup>±</sup> 0.50	NS
Bilirrubina directa	0.23 <sup>±</sup> 0.13	0.47 <sup>±</sup> 0.42	NS
Bilirrubina indirecta	0.25 <sup>±</sup> 0.09	0.14 <sup>±</sup> 0.11	NS
Transaminasa glutámico oxal.	55.14 <sup>±</sup> 18.38	49.0 <sup>±</sup> 14.9	NS
Fosfatasa alcalina	31.0 <sup>±</sup> 21.27	207.2 <sup>±</sup> 209.4	NS
Proteínas totales	7.30 <sup>±</sup> 1.29	6.87 <sup>±</sup> 0.72	NS
Albúmina	2.94 <sup>±</sup> 0.52	2.84 <sup>±</sup> 0.43	NS
Colesterol	197.70 <sup>±</sup> 33.63	209.0 <sup>±</sup> 41.38	NS

PFH: Pruebas de funcionamiento hepático.

\* t de Student; NS: no significativo.

Quadro V.- Comparación de las PFI al inicio y al final del estudio en el Grupo II.

Animales en Estudio											
PFI	1 A - B	2 A - B	3 A - B	4 A - B	5 A - B	6 A - B	7 A - B	8 A - B	9 A - B	10 A - B	11 A - B
BT	0,5-0,7	0,5-0,5	1,7-1,3	0,6-0,6	0,5-0,2	0,6-1,4	0,8-1,0	0,5-0,8	0,6-1,4	0,2-0,5	0,4-0,6
BD	0,3-0,2	0,2-0,5	1,5-1,2	0,2-0,2	0,4-0,1	0,2-1,2	0,7-1,0	0,3-0,6	0,4-0,9	0,1-0,4	0,3-0,5
BI	0,2-0,5	0,3-0,0	0,2-0,1	0,4-0,4	0,1-0,1	0,4-0,2	0,1-0,0	0,2-0,2	0,2-0,5	0,1-0,1	0,1-0,1
TGO	442- 43	122- 38	87- 88	85- 85	34- 39	52- 46	27- 37	22- 83	39- 75	28- 48	28- 21
PA	55- 66	157-518	43-118	117-562	30-739	74-3233	58- 66	28-181	32-2910	73-395	76-180
PT	7,9-6,9	7,3-6,6	7,5-6,9	8,0-6,4	6,5-7,5	7,8-7,2	6,8-6,5	7,4-5,2	7,5-7,3	7,3-7,9	8,0-7,0
Alb	3,3-2,8	3,6-2,9	2,5-2,9	2,6-2,8	3,1-2,9	3,0-3,4	2,9-2,2	3,3-2,8	3,3-3,6	3,3-2,8	3,4-3,3
Col	222-240	251-194	159-194	225-103	283-221	320-232	160-168	144-194	164- 68	292-268	198-164
TP	100-100	100-100	100-100	100-100	100-100	100-100	100-100	100-100	100-100	100-100	100-100

A: Muestra Inicial, B: Muestra final

PFI: Pruebas de Funcionamiento Hepático.

Cuadro VI.- Comparación de promedios de las PFH al inicio y al final del estudio en el Grupo II.

P F H	Inicio		Final		p*
	$(\bar{X} \pm DE)$		$(\bar{X} \pm DE)$		
Bilirrubina total	0.63 <sup>±</sup>	0.38	0.82 <sup>±</sup>	0.40	NS
Bilirrubina directa	0.42 <sup>±</sup>	0.39	0.62 <sup>±</sup>	0.40	NS
Bilirrubina indirecta	0.21 <sup>±</sup>	0.11	0.20 <sup>±</sup>	0.18	NS
Transaminasa glutámico oxal.	49.10 <sup>±</sup>	35.10	54.80 <sup>±</sup>	23.40	NS
Fosfatasa alcalina	67.54 <sup>±</sup>	39.59	815.30 <sup>±</sup>	1139.4	NS
Proteínas totales	6.73 <sup>±</sup>	2.28	6.85 <sup>±</sup>	0.71	NS
Albúmina	3.12 <sup>±</sup>	0.34	2.92 <sup>±</sup>	0.36	NS
Colesterol	219.00 <sup>±</sup>	60.70	186.00 <sup>±</sup>	59.00	NS

PFH: Pruebas de funcionamiento hepático

\* t de Student; NS: No significativo.

Cuadro VII.- Comparación de los resultados de las pruebas de funcionamiento hepático al terminar el estudio entre - Grupos I y II

P F H	Grupo I		Grupo II		p*
	( $\bar{X} \pm$ DE )		( $\bar{X} \pm$ DE )		
Bilirrubina total	0.61 $\pm$	0.50	0.82 $\pm$	0.40	NS
Bilirrubina directa	0.47 $\pm$	0.42	0.62 $\pm$	0.40	NS
Bilirrubina indirecta	0.14 $\pm$	0.11	0.20 $\pm$	0.18	NS
Transaminasa glutámico oxal.	49.0 $\pm$ 14.9		54.8 $\pm$ 23.4		NS
Fosfatasa alcalina	207.2 $\pm$ 209.4		815.3 $\pm$ 1139.4		NS
Proteínas totales	6.87 $\pm$	0.72	6.85 $\pm$	0.71	NS
Albúmina	2.84 $\pm$	0.72	2.92 $\pm$	0.36	NS
Colesterol	209.0 $\pm$ 41.38		186.0 $\pm$ 59.0		NS

PFH: Pruebas de funcionamiento hepático.

\* t de Student; NS: No significativo.

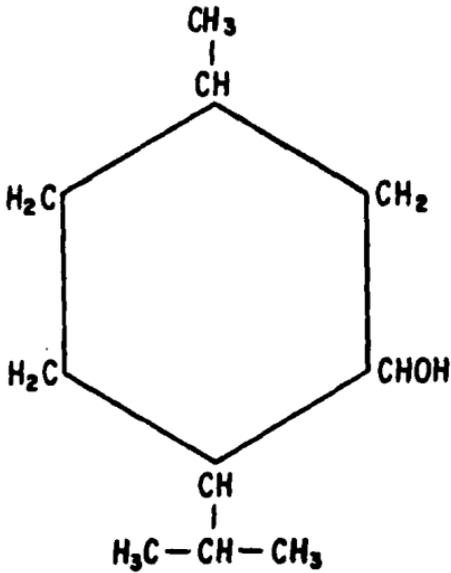


Fig. 1 Estructura química del mentol (p-mentan-3-ol; 2-isopropil-5 metilciclohexanol - (C<sub>10</sub>.H<sub>20</sub>.O)



Fig. 2 Microfotografía (160 X) H.E. Mucosa de vesícula biliar sin alteraciones. En la lámina propia se observan algunos linfocitos cuyo número y características son normales.

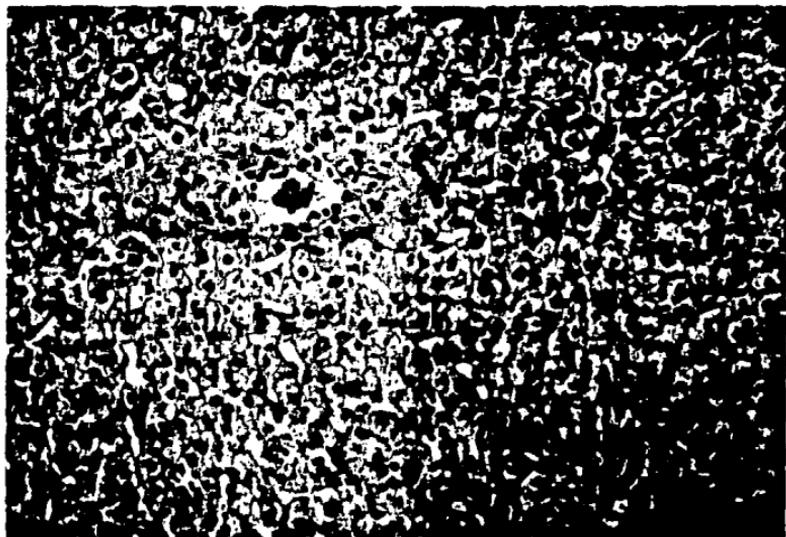


Fig. 3 Microfotografía (160 X)H.E. Corte trangular de tejido hepático normal. Se observan hepatocitos distribuidos uniformemente y un espacio porta en el que se distingue la vena, parte de la arteria y el colangiolo.



Fig. 4 Microfotografía (160 X) H.E. Porción de pared de vesícula biliar en la que se observa el - epitelio y en la capa muscular infiltrado in-flamatorio crónico grado I.

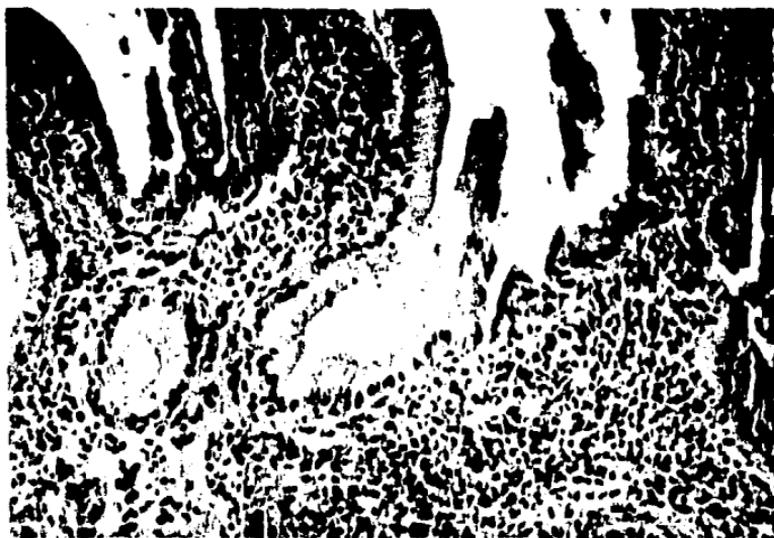


Fig. 5 Microfotografía (160 X) H.E. Porción de pared de vesícula biliar en la que se observa el - epitelio y en la lámina propia y en la capa - muscular infiltrado inflamatorio crónico gra- do II.



Fig. 6 Microfotografía (400 X) H.E. Fig.5 a mayor detalle en la que se observa el epitelio formado por células cilíndricas y en la lámina propia se encuentra infiltrado inflamatorio crónico--constituido por linfocitos con escaso citoplasma y células plasmáticas con núcleo excéntrico.



Fig.7 Micrografía (2000 X) Microscopía electrónica normal de un corte de mucosa de vesícula biliar en la que se observan cinco proporciones de células epiteliales, en la superficie se observan las microvellosidades y en las zonas laterales los complejos de unión; las mitocondrias y los núcleos son normales. Carl Zeiss EM 9 S2 .

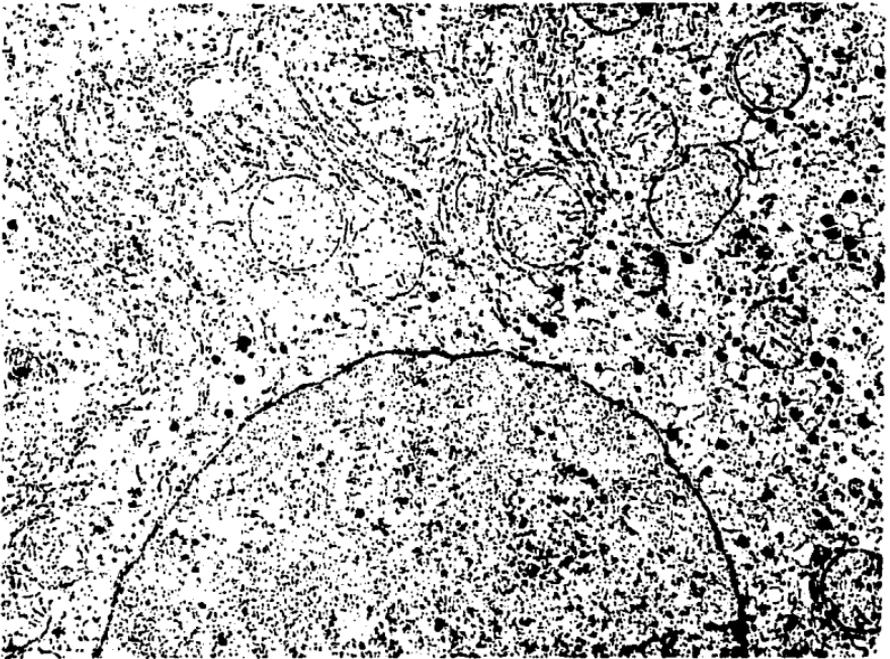


Fig.8 Micrografia (5000 X) Porción de un hepatocito - normal, se aprecia el núcleo con su doble mem - brana y en el citoplasma mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso, escaso retículo endoplásmi - co liso, microcuerpos (lisosomas) y gránulos de glucógeno, imagen normal. Carl Zeiss M 10 .

## DISCUSION

El mentol es un monoterpeno cíclico que puede obtenerse en su forma levógira de los aceites esenciales vegetales de la *Mentha* (principalmente la variedad *piperidis*) o sintetizarse en forma levógira o racémica. Se presenta como cristales incoloros o como polvo cristalino, con un olor penetrante semejante al de la menta y sabor característico seguido de una sensación local de frío. Es muy poco soluble en agua y glicerol, soluble en una relación de 1 en 0.2 en alcohol, 1 en 0.25 de cloroformo, 1 en 0.4 de éter, 1 en 4 de aceite de oliva y 1 en 6 de parafina líquida (34).

Los efectos adversos que se han descrito como consecuencia de la administración del mentol han sido reacciones de hipersensibilidad que se manifiestan como urticaria, rubor y cefalea o como dermatitis por contacto y la frecuencia de reacción positiva en personas con eczema o dermatitis que se someten a una prueba de sensibilidad con parche de mentol al 5 %, ha sido de 1 %

y la dosis letal en el humano se ha calculado en dos gramos (34).

La baja toxicidad del mentol que ha permitido su gran aplicación en la terapéutica médica, su gran capacidad solvente de los cálculos de colesterol demostrada "in vitro" por Méndez y cols (30) y Lagarriga y cols (31) y la falta de información en la literatura revisada sobre los peligros potenciales de su aplicación directa a la luz de las vías biliares, motivaron la realización de este estudio.

Otras investigaciones han comprobado que algunas combinaciones de terpenos, como la empleada por Doran y cols (28) (que contiene mentol, mentona, pinene, borneol, cineol y camfene) conocida comercialmente como Rowachol, al ser administrada por vía oral tiene utilidad a través de un efecto colerético más prolongado y sostenido que cantidades equimolares de cualquiera de sus constituyentes individuales, entre ellos el mentol. Algunos autores (35,36) han informado que con el tratamiento prolon-

gado con Rowachol se ha logrado una disolución satisfactoria de los cálculos y el único efecto colateral encontrado fué sabor a menta o a alcanfor al eructar, sin evidencia de hepatotoxicidad (29). Los estudios experimentales en ratas y perros realizados por Kodama y cols (37) demostraron que algunos terpenos cíclicos y sus metabolitos -- pueden modificar el flujo biliar y la composición de los lípidos biliares y más recientemente Doran y cols (28) -- comprobaron los efectos del Rowachol sobre las sales biliares, fosfolípidos y colesterol en la bilis obtenida por sonda en T y los cambios resultantes en la capacidad de solubilización del colesterol de la bilis vesicular. Esta forma de tratamiento, aunque atractiva, es poco útil para los pacientes que tienen litiasis residual ya que se requiere, en el mejor de los casos, de un período de administración muy prolongado; Bell y cols en un estudio realizado en 27 pacientes con cálculos vesiculares radiolúcidos tratados con dicha preparación de terpenos por vía oral durante seis a doce meses, encontraron evidencia radiológica de la disolución de los cálculos en siete enfer

mos (29).

Las investigaciones sobre la producción de enzimas - que participan en la producción de colesterol como la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMGCoAR) y en la síntesis de ácidos biliares como la 7 alfa hidroxilasa de colesterol en la fracción microsómica del hígado de pacientes con cálculos biliares, han demostrado aumento de la actividad de la HMGCoAR y disminución de la actividad de la 7 alfa hidroxilasa (38). Por otra parte, Bell y cols (29) encontraron que al administrar la preparación de seis terpenos a la rata, disminuyen significativamente los niveles de HMGCoAR, pero en la literatura revisada no encontramos la participación particular que pueda tener el mentol.

Este mecanismo bioquímico de acción de los terpenos cuando se administran por vía oral, puede jugar algún papel parcial en la disolución de los cálculos biliares cuando se administra mentol por sonda en T (al absorberse después de pasar de las vías biliares al intestino) y probablemente el mecanismo más importante sea el mismo por el-

cual se disuelven los cálculos "in vitro", aunado a su potente efecto colerético.

El análisis de los resultados de las PFH en el Grupo I al terminar el estudio mostró que las bilirrubinas fueron normales en seis de los siete animales y en el que se elevó a 1.4 mg/100 ml podría atribuirse a las repercusiones hepáticas propias de la intervención quirúrgica o al efecto farmacológico preanestésico y anestésico; pero tomando en cuenta que en seis de los siete animales se elevó la fosfatasa alcalina (aunque solo en uno rebasó los límites de la normalidad) en comparación a las cifras basales al iniciar el estudio, debe considerarse la posibilidad de la participación de cierto grado de colestasis, atribuible a la infusión del aceite en las vías biliares con una presión no controlada.

De las PFH del Grupo II el dato más sobresaliente - fué la elevación de la fosfatasa alcalina en los 11 animales, pero el hecho de que solo en cinco se elevara por -- arriba de los límites normales, nos hace pensar que éste fenómeno puede ser debido a colestasis discreta atribuible

al mentol, a pesar de que esto no se pudo corroborar histológicamente ya que las 11 biopsias de hígado fueron normales. El hecho de que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de la fosfatasa alcalina entre el inicio y el final del estudio en este Grupo tratado con mentol, puede ser atribuido al hecho de que nuestra muestra fué pequeña o a que el tiempo de infusión del mentol-aceite no fué lo suficientemente prolongado para que éste fenómeno fuera más evidente bioquímica e histológicamente.

Por otra parte, aunque la fosfatasa alcalina puede también elevarse por daño hepatocelular (39), este fenómeno como consecuencia de efecto hepatotóxico del mentol puede descartarse en nuestro estudio ya que los estudios por microscopía de luz de las biopsias de hígado de los 11 animales fueron completamente normales y aunque reconocemos que la evaluación morfológica por microscopía electrónica es de fundamental importancia, este estudio no pudo realizarse mas que en los primeros 5 animales por falta de disponibilidad subsecuente. En estudios

clínicos sobre administración de combinaciones de terpenos que incluyen mentol, aunque a dosis menores, no se ha demostrado hepatotoxicidad (29).

El hallazgo de datos de inflamación discreta en la mucosa vesicular en dos animales del Grupo I y en cuatro del Grupo II, es atribuible a la presencia de la sonda en la vesícula o a la posible distensión vesicular forzada durante la infusión y el único caso de inflamación grado I en el colédoco de un animal del Grupo II puede sugerir un efecto irritante directo del mentol.

Aunque las biopsias de hígado fueron normales y las alteraciones de vesícula y colédoco fueron discretas, consideramos que las características de nuestro estudio, fundamentalmente el corto tiempo de duración y la falta de microscopía electrónica, pudieron influir para que no fueran más evidentes las posibles alteraciones morfológicas por efectos del mentol.

Así mismo, el cambio de catéter de caucho a otro de Silastic<sup>®</sup> efectuado después de los primeros cánidos está de acuerdo con el cambio efectuado por Igimi y cols (40) -

quienes cambiaron la sonda en T por un tubo CHR resistente a la preparación utilizada (un terpeno denominado d-limonene con polisorbato y monooleato de sorbitán) en un estudio clínico llevado a cabo en cuatro pacientes con buenos resultados en tres.

Concluimos que de manera ideal, deben realizarse estudios complementarios sobre la toxicidad del mentol en períodos de administración de más larga duración, estudios farmacodinámicos, metabólicos de absorción, distribución, excreción e inducción enzimática y que la posible administración a través de la sonda en T o sonda de colecistostomía en humanos con litiasis residual, requerirá en el futuro de una vigilancia muy estrecha.

## CONCLUSIONES

- 1.- Tanto el mentol al 20 % en aceite de girasol como el aceite puro al ser infundidos directamente a las vías biliares del cánido producen mínimas alteraciones en las pruebas de funcionamiento hepático sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos -- Grupos.
- 2.- No hubo alteraciones morfológicas en el hígado y fueron mínimas en vesícula y colédoco en ambos grupos, sin diferencia estadísticamente significativa.
- 3.- El mentol no favoreció el desarrollo bacteriano al compararlo con el Grupo control.
- 4.- El aceite mentolado al 20 % a dosis de seis gramos diarios infundido directamente en la vesícula biliar durante dos semanas no produce daño significativo en higado, vesícula y vías biliares del cánido por lo que - puede emplearse en el humano.

## REFERENCIAS

- 1.- Girard RM, Legros G. Retained and recurrent bile duct stones. Surgical or non surgical removal? Ann Surg 1981; 193:150.
- 2.- Orloff MJ. Importance of surgical technique in prevention of retained and recurrent bile duct stones. World J Surg 1978; 2 : 403.
- 3.- Kakos GS, Tompkins RK, Turnipseed W, Zollinger RM, Operative cholangiography during routine Cholecystectomy: a review of 3,012 cases. Arch Surg 1972; 104:484.
- 4.- White TT, Bordley J. One per cent incidence of recurrent gallstones six to eight years after manometric cholangiography. Ann Surg 1978; 188:562.
- 5.- Berci G, Shore JM, Morgenstern L, Hamlin JA. Cholelodoscopy and operative fluorocholangiography in the prevention of retained bile duct stones. - World J Surg 1978; 2: 411 .
- 6.- Hurtado AH, Harp IL, Llamas ML. Valor de la colangioscopia transoperatoria en la prevención de litiasis residual. Rev Gastroenterol Mex 1986;51:7.
- 7.- Glenn F. Retained calculi within the biliary ductal system. Ann Surg 1974;179:528.
- 8.- Bartlett MK. Retained and recurrent common duct stones. Ann Surg 1972;38:63.
- 9.- Berk JE, Kaplann AA. Choledocholithiasis. In Bockus HL (ed) Gastroenterology, Philadelphia, W.B. Saunders 1978: pp843-864.

- 10.- Mazzariello RM. A fourteen year experience with non operative extraction of retained bile duct stones.- World J Surg 1978; 2 : 447.
- 11.- Burhenne HJ. Complications of nonoperative extrac - tion of retained common duct stones. Am J. Surg 1976; 131:260 .
- 12.- Way LW, Motson RW. Dissolution of retained common - bile duct stones. Adv Surg 1976; 10: 99.
- 13.- Allen BL, Deveney CW, Way LW. Chemical dissolution - of bile duct stones. World J Surg 1978; 2 : 429.
- 14.- Safrany L. Endoscopic treatment of biliary tract di - seases. An international study. Lancet 1978;2:983.
- 15.- Galssen M, Ossenberg FW. Non surgical removal of - common bile duct stones. Gut 1977; 18: 760 .
- 16.- Mc Sherrey CK, Glenn F. The incidence and causes of death following surgery for nonmalignant biliary - tract disease. Ann Surg 1980; 191: 272.
- 17.- Kaminski DL, Barner HB, Codd JE, Wolfe BM. Evalua - tion of the results of external choledochoduodenog - tomy for retained, recurrent or primary common duct stones. Am J Surg 1979; 137: 162.
- 18.- Reiter JJ, Bayer HP, Mennicken C, Managold BC. Re - sults of endoscopic papillotomy: a collective expe - rience from nine endoscopic centers in West Germany World J Surg 1978; 2: 505.

- 19.- Glenn F. Retained calculi within the biliary ductal system. *Ann Surg* 1974; 179:528 .
- 20.- Gardner B, Dennis CR, Oatti J. Current status of heparin dissolution of gallstones. *Am J Surg.* - 1975; 130: 293.
- 21.- Carbajal RA, Lagarriga AJ, Méndez SN, Cohen YJ, Alcantara RM. Reevaluación de la acción de la heparina sobre los cálculos biliares. *Rev San Mil-Mex* 1979; 33: 133.
- 22.- Pitt HA, Cameron JL. Sodium cholate dissolution of retained biliary stones. Mortality rate following intrahepatic infusion. *Surgery* 1979; 85:457.
- 23.- Thistle JL, Carlson GL, Hofman AF, Babayan VK. - Medium chain glycerides rapidly dissolve cholesterol gallstones in vitro. *Gastroenterology* 1977; 72:1141 .
- 24.- Thistle JL, Carlson GL, LaRusso NF, Hofman AF. - Effective dissolution of biliary duct stones by-intraductal infusion of monoctanoin. *Gastroenterology* 1978; 74:1103.
- 25.- Garcia-Romero E, Lopez-Cantarero M, Arcellus IM. Dissolution of human gallstones with clofibrate. *J Surg Res* 1978; 24:62.
- 26.- Garcia-Romero E, Lopez-Cantarero M, Quesada A, - Arcelus IM. The nonoperative removal of retained common duct stones after biliary surgery with - clofibrate. *J Surg Res* 1979; 26: 129.

- 27.- Allen MJ, Borody TJ, Bugliosi TF, May GR, LaRusso NF, Thistle JL. Cholelitholysis using methyl tertiary butyl ether. Gastroenterology 1985; 88: 122.
- 28.- Doran J, Keighley MRB, Bell GD. Rowachol- a possible treatment for cholesterol gallstones. Gut 1979; 20:312.
- 29.- Bell GD, Doran J, Middleton A, Middleton B, Richmond CR, White DA. Rowachol, a propietyl essential oil preparation, lowers hepatic microsomal HMGCoA reductase and dissolves cholesterol gallstones -- (Abstract). Gut 1978; 19: 972.
- 30.- Méndez SN, Alvarado MBE, Lagarriga AJ, Alcántara - RM, Cohen YJ, López UG, Gil SD. Disolución de cálculos biliares humanos in vitro con terpenos. Rev Gastroenterol Mex 1981; 46: 277.
- 31.- Lagarriga AJ, Méndez SN. Disolución de cálculos biliares humanos in vitro. Una evaluación de nuevas observaciones (II). Rev. San Mil Mex 1983; 37: 61.
- 32.- Rosenstein E. Resultados normales de las pruebas de funcionamiento hepático en el cánido. Prontuario de Especialidades Veterinarias (Apéndice). 9a. ed. - Univ París, Ed. Centro Profesional de Publicaciones 1985.
- 33.- Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. Departamento del Distrito Federal. Ley de Protección a los Animales para el Distrito Federal. Diario Oficial del Martes 26 de Enero de 1982. Tomo CCCLXX, No. 17, México D.F.

- 34.- Reynolds JEF. Menthol and alcanfor. In: Martindale, The Extra Pharmacopeia, 28a. ed. London England, - Ed. Pharmaceutical Press, 1982;352.
- 35.- Kameda H. Clinical investigations of disease of - the gallblader and the biliary tract, in particu - lar of the results of infrared spectrophotometric - examination. From translation of lecture given at the 46th General Meeting of the Japanese Society - of Gastroenterology at Osaka, June 1960.
- 36.- Hordinsky EZ. Terpenes in the treatment of gallg - tones. Minnesota Medicine 1971; 54: 649.
- 37.- Kodama R, Inoue H, Noda K, Ide H. Effect of d-limo - nene and related compounds on bile flow biliary li - pid composition in rats and dogs. Life Sciences - 1976; 19: 1559.
- 38.- Salen G, Nicolau G, Shefer S, Mosbach FH. Hepatic - cholesterol metabolism in patients with gallstones. Gastroenterology 1975; 69: 676.
- 39.- Cohn EM. Pruebas funcionales hepáticas y otros mé - todos de diagnóstico En: Bockus HL (ed) Gastroente - rología, 2a. Ed. Barcelona, Salvat Editores S.A., - 1968; 133-185
- 40.- Igimi H, Hisatsugu T, Nichimura M. The use of d-li - monene preparation as a dissolving agent of gallg - tones. Digestive Diseases 1976; 21: 926.

**Nota de Agradecimiento:**

Al Dr. Manuel Jiménez Cardoso  
Médico Adscrito del Servicio-  
de Anatomía Patológica y mi-  
croscopía Electrónica por su  
colaboración con el material-  
de histopatología de éste eg-  
tudio.