

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Cirugía y sus Especialidades**



**SUSTITUCION DEL CONDUCTO BILIAR  
MEDIANTE TUBOS  
TRIDIMENSIONALES DE  
BIOMATERIAL DE  
COLAGENO/AGAROSA. ESTUDIO  
FUNCIONAL EXPERIMENTAL.**

Alejandro José Pérez Alonso

Granada, 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Alejandro José Pérez Alonso  
D.L.: GR 1977-2014  
ISBN: 978-84-9083-177-9

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**



**SUSTITUCION DEL CONDUCTO BILIAR  
MEDIANTE TUBOS  
TRIDIMENSIONALES DE  
BIOMATERIAL DE  
COLAGENO/AGAROSA. ESTUDIO  
FUNCIONAL EXPERIMENTAL.**

**Memoria que presenta para aspirar al grado de Doctor en  
Medicina y Cirugía D. ALEJANDRO JOSÉ PÉREZ ALONSO**

# Agradecimientos

---

Cuando comenzó mi periplo para poder realizar esta tesis doctoral, parecía que el momento de escribir este importante y agradable apartado nunca llegaría, puesto que lo veía muy lejano en el tiempo.

Como no podía ser de otra manera, en primer lugar debo agradecer la gran ayuda del Prof. Dr. Pablo Juan Torné Poyatos, jamás encontrare palabras que puedan expresar todo el agradecimiento que eternamente tendré hacia él, puesto que sin su ayuda y colaboración nada de esto hubiera sido posible. Gracias por permitirme la realización de la tesis doctoral bajo tu dirección, tus consejos tanto laborales como personales son los que me han ayudado a avanzar en estos años de residencia, y a relizar un sacrificio diario durante estos dos últimos años para llevar adelante este trabajo. De nuevo, gracias por haber confiado en mí y darme esta oportunidad.

Agradecer a todos mis compañeros del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario San Cecilio: Dr. Jose María de la Maza Inza, Dr. Jose Antonio Pérez Ramón, Dr. Francisco Pérez Benítez, Dr. Benito Mirón Pozo, Dr. Carlos Garde Lecumberri, Dr. Iván Morales Valentín, Dr. Jose Luis Tovar Martínez, Dr. Bravo Bravo, Dra. Ana Lucia Romera, Dra. Beatriz Pérez Cabrera, Dr. Navarro Freire, etc, y todos mis compañeros residentes de cirugía; por apoyarme en el duro trabajo de cada día, y animarme en las horas de mayor agotamiento a seguir con el trabajo complementario que requería esta tesis doctoral. Gracias por preocuparos por mi formación como cirujano, por ser mi familia en Granada durante estos años de residencia. Gracias al Dr. Jose Antonio Jiménez Ríos, Jefe de Servicio, por ser mas horizontal que vertical en la relación interpersonal, por esa puerta siempre abierta para escuchar todos nuestros problemas.

En especial lugar debo agradecer al Dr. Carlos Del Olmo Rivas, al Dr. Ignacio Machado Romero, y al Dr. Alejandro Ortega Carrasco, por su ayuda en horas intempestivas de la tarde o incluso la madrugada a intervenir los animales de experimentación en los estabularios, así como ayudarme a la realización de las múltiples colangiografías que se llevaron a cabo. Gracias Carlos por tus ideas, por tu preocupación y por tu apoyo, tu amistad es uno de los tesoros que mejor conservo.

Gracias Ignacio por tu colaboración incondicional, por pasarte esas madrugadas de verano conmigo sujetando las cobayas mientras le insertábamos el contraste para poder realizar las colangiografías. Cuando nos conocimos pasaste a ser uno de mis referentes quirúrgicos por tu calidad humana y conocimientos, seguramente mantendré este recuerdo durante toda la vida. Nunca podré agradecerte suficientemente todo lo que me has ayudado, tanto en el ámbito laboral como en el personal. Has sido uno de mis pilares de apoyo durante estos años de residencia.

Gracias a Serafín por el cuidado de los animales, por tener siempre preparado el quirófano experimental del departamento, tu predisposición para ayudarme en todo aquello que estuviera en tu mano. Gracias por todos tus consejos para poder manejar los animales de experimentación, por la confianza que has depositado en mí, aunque “alguna vez nos invadieran las cucarachas”. A Carmen, por tu ayuda en la realización y conservación de los especímenes histológicos, y la preparación de las tinciones. Gracias por tener siempre abierta a mi disposición la puerta de tu laboratorio y por ofrecerme un sitio en ese antiguo pero a la par, entrañable y efectivo microscopio. Gracias a Marcelo por su alegría cada mañana y su colaboración.

Gracias a mi familia, a mis padres, a Lucia, y todos mis amigos (Jacobo, Ángel, David, Jorge, Jorgito, Javier, Luis, Manu, etc) porque gracias a ellos estoy hoy en este lugar, y con su apoyo he podido realizar todo aquello que me he propuesto. Gracias por animarme cada día, por estar siempre pendientes de mí, de mis necesidades, de mis curiosidades, de mis tareas y trabajos. Gracias por estar siempre a mi lado y por tantos momentos de felicidad.

A mis profesores del Colegio Virgen de Atocha y de la Universidad Complutense de Madrid y San Pablo CEU. Su vocación y dedicación para conmigo son los que me han empujado a trabajar por aquello que siempre ha sido mi mayor afición, la Medicina. En una ocasión, me dijeron, “un alumno es como un barco, al despedirte lo ves marchar, pero llevará tu bandera a puertos en los que jamás hemos estado...”. Espero que el estandarte que llevo latente en mi forma de ser y conocimientos llegue aún más lejos. Gracias por vuestro trato humano y afable.

A todos y a cada uno de ellos, gracias por vuestro grano de arena, la unión de todos ellos ha conseguido levantar esta pequeña montaña.

*“Valor es lo que se necesita para levantarse y hablar;  
pero también es lo que se requiere para sentarse y escuchar”*

**Winston Churchill**

# Índice

---

<b>SUMMARY</b> .....	10
<b>1. INTRODUCCION</b> .....	17
1.1. Hígado y Vías Biliares.....	18
<i>Hígado</i> .....	18
<i>Via Biliar Intrahepática</i> .....	23
<i>Via Biliar Extrahepática</i> .....	26
<i>Vesícula Biliar</i> .....	29
1.2. Fisiología exocrina del hígado y de la via biliar.....	31
1.3. Lesiones de la via biliar.....	32
<i>Incidencia e importancia del problema</i> .....	32
<i>Clasificación</i> .....	33
1.4. Trasplante Hepático.....	36
<i>Complicaciones del trasplante</i> .....	37
<i>Retrasplante hepático</i> .....	38
1.5. Tratamiento actual de la patología y lesiones de la via biliar.	
Anastomosis bilioenterica en el trasplante hepático en la	
actualidad.....	39
<i>Tratamiento actual de la patología de la via biliar</i> .....	39
<i>Tratamiento actual de las lesiones iatrogénicas de la via biliar</i> ...	41
<i>Tratamiento intraoperatorio</i> .....	42
<i>Tratamiento precoz</i> .....	43
<i>Tratamiento tardio</i> .....	44

<i>Tratamiento a largo plazo</i> .....	46
<i>Anastomosis biliar en el trasplante hepático en la actualidad</i> .....	48
<i>Anastomosis coledococoledociana terminoterminal</i> .....	48
<i>Anastomosis coledococoledociana laterolateral</i> .....	50
<i>Anastomosis Biliodigestiva</i> .....	50

## **MEDICINA REGENERATIVA. BIOMATERIALES**

1.6. Conceptos. Introducción.....	52
1.7. Células madre.....	53
1.8. Biomateriales.....	54
<i>Biomateriales fibrosos</i> .....	56
<i>Biomateriales poliméricos</i> .....	57
<i>Biomateriales mixtos</i> .....	58
1.9. Factores de Crecimiento.....	58
1.10. La medicina regenerativa en las lesiones de la via biliar y su reparación en la actualidad.....	59
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	64
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	65
3 (b). <b>OBJETIVES</b> .....	67
<b>4. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	69
4.1. Animales de Experimentación.....	69
4.2. Modelo de lesión de la via biliar principal.....	70
4.3. Grupos de estudio.....	74
4.4. Prótesis biocompatible de colágeno/agarosa tridimensional.....	75
4.5. Reparación microquirúrgica del defecto biliar mediante interposición de prótesis colágeno/agarosa.....	68

4.6.	Sacrificio de los animales y obtención de muestras.....	70
4.7.	Variables de estudio.....	71
	<i>Procesamiento de muestras.....</i>	<i>76</i>
	<i>Tinción de hematoxilina-eosina.....</i>	<i>77</i>
	<i>Parámetros histológicos estudiados.....</i>	<i>77</i>
4.8.	Análisis estadístico.....	78
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	81
5.1.	Modelo experimental de lesión de la vía biliar.....	81
5.2.	Parámetros clínicos.....	81
5.3.	Parámetros de recuperación fisiológica. Estudio bioquímico.....	85
5.4.	Parámetros de recuperación anatómica. Estudio radiológico: Colangiografía.....	101
5.5.	Resultados histológicos. Biopsia hepática.....	108
	<i>Estudio histológico del parénquima hepático.....</i>	<i>108</i>
6.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	112
	<i>Modelo Experimental.....</i>	<i>115</i>
	<i>Parámetros bioquímicos y clínicos.....</i>	<i>120</i>
	<i>Parámetros fisiológicos.....</i>	<i>122</i>
	<i>Parámetros histológicos. Biopsia hepática.....</i>	<i>125</i>
7.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	127
7 (b).	<b>CONCLUSIONS</b> .....	129
8.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	130
9.	<b>ANEXOS</b> .....	147

# Summary

---

## **REPAIRMENT OF EXTRAHEPATIC BILE DUCTS USING THREE DIMENSIONAL COLLAGEN/AGAROSE TUBES**

### **Introduction**

Currently the surgical treatment of extrahepatic bile ducts affected by different conditions such as cancer, stenosis, iatrogenic injuries and other diseases is based in the excision, and in severe cases, the anastomosis of biliary hilar plate to the small intestine is necessary. This technique may have a difficult course due to the retrograde infections of the gallbladder through the intestinal pathogens, or due to complications such as stenosis of the anastomotic area requiring reoperation. In other cases, the block of bile secretions, or the presence of a difficult flow of bile will require liver transplantation even in those cases where the affected portion is only extrahepatic. Patients receiving liver grafts may suffer a stenosis of the bladder anastomosis within the context of a chronic rejection, requiring retransplantation.

The design of an artificial tube morphologically and histologically similar to the native bile duct would be interesting to be used as a substitute for pathologic biliary tract, thus avoiding complex surgical techniques that may block the flow of bile, and hipotetically avoiding liver transplantation in those diseases in which the liver parenchyma is undamaged. Based on this idea and supported by new biotechnologies, our research group is developing a tube graft that maintains the morphological, histological and functional characteristics of native bile duct.

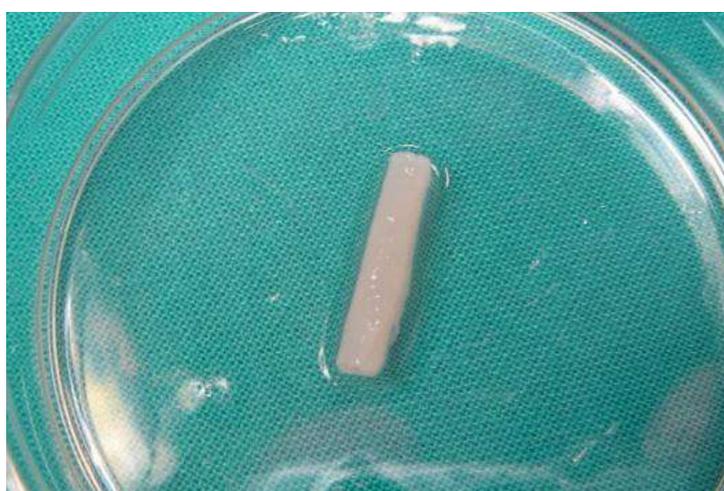
In the current literature few works about artificial canals to replace pathologic bile ducts, some of them based on biopolymers, and others based on other histological structures have been published. Issues associated with

the artificial canals developed included the presence of insufficient biocompatibility to permit the flow of bile (biopolymers) and the inadequate histological integration in the environment (intestine, blood vessels) (*Miyazawa M, Aikawa M, Okada K, Toshimitsu Y, Okamoto K, Koyama I, Ikada Y. Regeneration of extrahepatic bile ducts by tissue engineering with a bioabsorbable polymer. J Artif Organs, 2012 Mar; 15 (1): 26-31. // Li Q, Tao L, Chen B, Ren H, Hou X, Zhou S, Sun X, Dai J, Ding Y. Extrahepatic bile duct regeneration in pigs using collagen scaffolds loaded with human collagen-binding bFGF. Biomaterials 2012 Jun; 33(17): 4298-308.*)

The current work presents the results of a modified tubular three-dimensional structure of bovine collagen, covered by biocompatible hydrogels, designed by our team. These new constructs were transplanted into experimental animals (guinea pigs) replacing the native bile duct. Histological and physiological functionalities were assessed.

### **Material and methods**

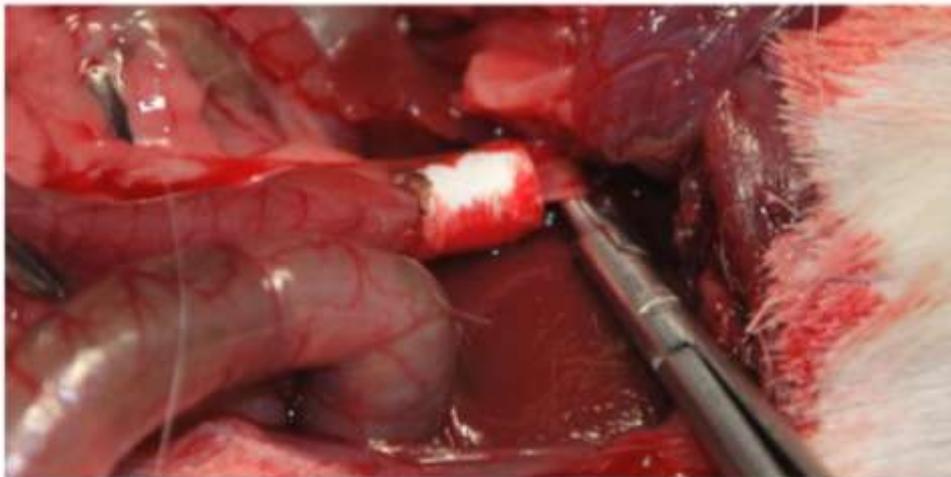
*Substitute biliary tubes:* Three-dimensional collagen tubes were constructed measured 4 mm in diameter and 1 mm wall thickness (Figure 1). The size of the pores was 200 nm. Subsequently all surfaces were coated with 2% agarose hydrogel, in order to avoid bile leaks through the pores. Heaters at 37 ° C were used for storage.



**Figure 1:** *Three-Dimensional collagen bile duct modified with agarose hidrogel.*

*Transplantation in experimental animals:* the construct was transplanted to 40 guinea pigs weighing approximately 1 kg + / - 200 gr. In all of the experimental animals, the common bile duct was replaced in the portion between the insertion of the cystic duct and ampulla of Vater. For the intervention a right subcostal incision was performed for direct access to the biliary tract, with an anesthetic induction (20 mg / kg of ketamine) and a maintenance phase (continuous infusion of propofol at 0.2 mg / kg / min). After identifying the common hepatic duct inside the hepatoduodenal ligament, a circumferential section was performed below of the insertion of the cystic duct. At this level the collagen prosthesis was interposed using a slow-resorption poly-lactic acid suture (Figure 2).

All the experimental animals survived up to their sacrifices at 7 days (Group 1, 13 guinea pigs), 15 days (Group 2, 13 guinea pigs) or 45 days (Group 3, 14 guinea pigs) after transplantation.



**Figure 2:** *Interposed collagen prosthesis using slow-resorption poly-lactic acid suture.*

*Morphologic and functional study:* the experimental animals were sacrificed at 7, 15 and 45 days after replacement of the bile duct. A histological study was performed with hematoxylin/eosin stain. Furthermore, the histological specimens were exposed to epithelial membrane antigens and low-molecular-weight keratin. All these data were compared with specimens of the native bile duct obtained from 10 control guinea pigs.

## **Results**

After implantation of the artificial canal all experimental animals survived until the time of sacrifice (7 days, 15 days, 45 days). All the experimental animals were similar to control animals regarding physiological development, weight gain and size. A measurement of blood levels of bilirubin and liver enzymes were performed after sacrifice and normal levels were obtained in the 40 animals and in the 10 controls (Table 1).

	<b>7 days after Tx</b>	<b>15 days after Tx</b>	<b>45 days after Tx</b>	<b>Controls</b>
	(n=13)	(n=13)	(n=14)	(n=10)
<b>Total Bil (mg/dL)</b>	0.12 (± 0.02)	0.11 (± 0.02)	0,10 (± 0.02)	0,10 (± 0.02)
<b>ALP (IU/L)</b>	27 (± 5)	24 (± 5)	20 (± 5)	20 (± 5)
<b>ALT (IU/L)</b>	90 (± 5)	82 (± 5)	80 (± 5)	78 (± 5)

**Table 1:** *Changes in biliary enzymes in transplanted guinea pigs over the time and control guinea pigs. Results are presented as median (range).*

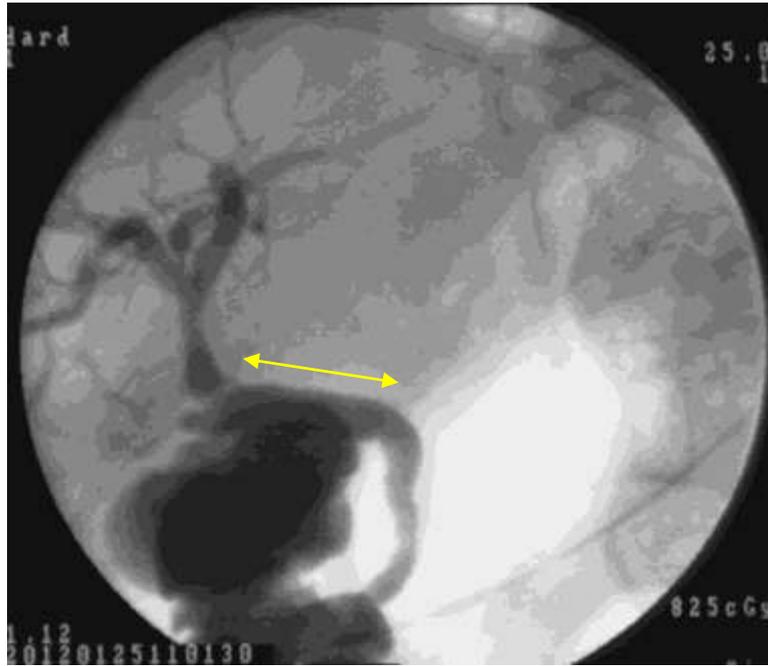
*Macroscopic study of the neo-bile duct:* In 4 weeks, all implanted artificial constructs appeared completely degraded, but persistent adhesions and slight inflammation of adjacent tissues were observed. At 3 months, specimens were completely resorbed, and the appearance was comparable to the native bile duct, persisting slight adhesions of the surrounding tissues. The gross appearance of the liver was completely normal, without signs of cirrhosis.

*H & E microscopic study:* In all cases, the liver tissue did not suffer any alteration, with no presence of stasis or biliary cirrhosis.

## **Discussion**

Our transplanted three-dimensional construct integrates into the bile duct morphologically and physiologically, maintaining the functions of bile and avoiding high morbidity techniques as well as high health costs. The tissue integration that occurs after 4 weeks, suggests that the construct serves as a structure for regeneration from distal and proximal native bladder tissues. Multiple applications can be developed using these constructs: In the presence of stenosis or extrahepatic bile duct cancers, these segments can be removed and replaced by this artificial duct through anastomotic sutures. Thus, the papilla of Vater may be preserved, keeping the biological functions of this valve and preventing retrograde infections which are common in biliodigestive anastomosis. If our project proves to be feasible, availability of a neo-conduct may avoid biliary derivations with high risks and morbidity. Furthermore it may be used in multiple techniques in which multiple removals of bile duct segments are required, avoiding complications and finally transplantation.

We think that our prosthesis is integrated properly as long as no complications after implantation are observed. Signs or symptoms resulting from obstruction of bile flow produced by a stenosis, signs that suggest the presence of intra-abdominal bile leak due to dehiscence or leaks in the anastomosis may indicate that the technique has not been performed properly. None of these complications was present in our cases. The positive outcomes that we observed in the artificial duct during the study period, suggest that these grafts could be applicable to clinical practice (Figure 3).



**Figure 3:** *Cholangiography 4 weeks after transplantation of the collagen bile-duct. There was no presence of stenosis or leakage.*

Some authors have recently published the successful results in the formation of artificial organs such as blood vessels (Teebken OE, Haverich A. *Tissue engineering of small diameter vascular grafts. Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002;23: 475-485) and small intestine (Kaihara S, Kim S, Benvenuto M et al. *end-to-end anastomosis between tissue-engineered intestine and native small bowel. Tissue Eng* 1999; 5:339-356), using cell cultures. This principle has been used by some authors such as Rosen et al. to facilitate reconstruction of parts of the circumference of the bile duct through the use of intestinal submucosa, from which the reepithelialization is produced. In our cases the re-epithelialization occurs from the ends of artificial duct, extending all the way along through the cell migration which it is allowed by the pores of the three dimensional structure forming collagen. The rate of re-epithelialization was similar in both ends. This fact allows their use in a greater number of clinical indications and makes the technique easier. Broadly speaking, we could say that the presence of bile pluripotent cells are viable and they may differentiate into epithelial cells uniformly, migrating through the implanted construct. However, more histological studies are warranted to confirm our results.

Gross examination showed that after 4 weeks, our construct was completely biocompatible and morphologically similar to the native bile duct. The histological test and immunohistochemical techniques showed that the new tissue was histologically similar to the native one, with a similar antigen expression. In the new created environment, the bile flowed through into the duodenum with no blocking. Through our research we were not able to determine what factors stimulate cell differentiation and reepithelialization, and whether these factors are from components in the bile or they reach the area by chemotaxis.

Our three-dimensional collagen tube transplanted into experimental animals developed a similar structure and functions to the native bile duct from the 4 weeks after grafting. The creation of a biliary neo-conduct opens new therapeutic avenues for the treatment of disease confined to the extrahepatic bile duct, avoiding complex surgical techniques with high socioeconomic costs and mortality. If future studies confirm the long-term viability of this prosthesis, our construct will certainly be of great clinical application. These could be focalized in the identification of the biliary tract progenitor cells; or even using porcine models or other experimental animals of bigger size and human-like anatomy in order to study long-term effects.

# 1. Introducción.

---

Actualmente, dado que la colecistectomía laparoscópica es el procedimiento estándar en el tratamiento de la patología benigna de la vía biliar y el aumento de las donaciones de órganos, sobre todo el hígado, las complicaciones biliares postoperatorias siguen siendo un problema para los cirujanos. Ninguna de las técnicas invasivas y no invasivas disponibles para el enfoque diagnóstico-terapéutico de estas complicaciones postoperatorias está libre de complicaciones en sí mismo. Tanto las técnicas no invasivas endoscópicas como aquellas dedicadas a tratar la estenosis biliar, de manera habitual no producen unos resultados satisfactorios y pueden dar lugar a colangitis y estenosis recurrentes. Los procedimientos invasivos como la implantación de tubos en T y los *bypass* bilioentéricos, generalmente tienen complicaciones postoperatorias tempranas y mal pronóstico a largo plazo. Estudios tras periodos de tiempo de un año o más de evolución de la anastomosis bilioenterica, demuestran una alta incidencia de estenosis de la anastomosis así como neoproliferaciones malignas en el remanente de la vía biliar extrahepática.

Por otra parte, las lesiones que afectan específicamente a las vías biliares extrahepáticas siguen siendo una asignatura pendiente puesto que no existe un tratamiento eficaz para las mismas. Las vías biliares tienen una morfoestructura y funciones muy específicas conduciendo la bilis hacia el tracto digestivo y evitando la colonización bacteriana procedente del intestino al parénquima hepático. Cualquier modificación en su disposición altera estas funciones desencadenando graves afecciones hepáticas y digestivas. Los tratamientos quirúrgicos de los que disponemos actualmente frente a estenosis o neoplasias cancerígenas de los conductos biliares consisten básicamente en la resección del tramo afectado y posterior realización de una anastomosis biliodigestiva, produciéndose en la gran mayoría de los casos una mala recuperación funcional. Estos tratamientos son muy limitados y en general tienen asociada una gran morbimortalidad. En los casos más graves o recurrentes el tratamiento definitivo será el trasplante hepático -técnica con

grandes riesgos para el paciente-, que requiere alta especialización y que, naturalmente, está sujeta a la disponibilidad del órgano. Del mismo modo estas técnicas terapéuticas acarrearán un gran costo socioeconómico para que los pacientes mantengan un nivel de vida similar al previo a la intervención.

Por tanto es necesario plantear nuevos retos terapéuticos y soluciones a estos problemas originados por diferentes patologías o bien de forma iatrogénica, para poder ofrecer soluciones viables y orientadas a reparar los defectos de la vía biliar que permitan mejorar el mal pronóstico de los mismos. Gracias al avance técnico y del conocimiento en los últimos años de nuestra década, los biomateriales y la disponibilidad de moldear sustancias endógenas a nuestro deseo, se abren nuevas perspectivas para desarrollar terapias avanzadas que nos permitan resolver lesiones producidas en el seno de un tejido, donde la capacidad de recuperación completa (anatómica y funcional) se ve mermada y en algunas ocasiones, es imposible.

## 1.1 HIGADO Y VIAS BILIARES

### **Hígado**

Es la glándula más grande del organismo. Pesa aproximadamente 1.500 g. Se localiza principalmente en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal, aunque en parte se puede extender hacia el hipocondrio izquierdo. Está revestido por una capsula de conjuntivo fibroso, llamada cápsula de Glisson, externamente a la cual se encuentra una cubierta de hoja visceral de peritoneo. La zona del hilio no está recubierta por la hoja visceral de éste. Como ya es conocido, interviene en el metabolismo de sustancias absorbidas en el tracto gastrointestinal.

El hígado tiene una doble irrigación, por un lado de la arteria hepática (25% que llega al hígado) y por otro la vena porta (75%) que viene del tracto gastrointestinal.

Entre los componentes estructurales del hígado se encuentran los siguientes: parénquima, estroma, capilares sinusoidales y espacios perisinusoidales.

El parénquima consiste en trabéculas de hepatocitos bien organizadas que en el adulto normalmente tienen una sola capa celular y están separadas por capilares sinusoidales. El estroma de tejido conjuntivo se continúa con la cápsula fibrosa de Glisson. En el estroma conjuntivo hay vasos sanguíneos, nervios, vasos linfáticos y conductos biliares. Los capilares sinusoidales son los vasos que hay entre las trabéculas hepatocíticas. Finalmente los espacios perisinusoidales (espacios de Disse), se encuentran entre el endotelio sinusoidal y los hepatocitos.

Sobre esta base, hay tres formas de describir la estructura del hígado en términos de una unidad funcional: el lobulillo clásico, el lobulillo portal y el acino hepático (figura 1).

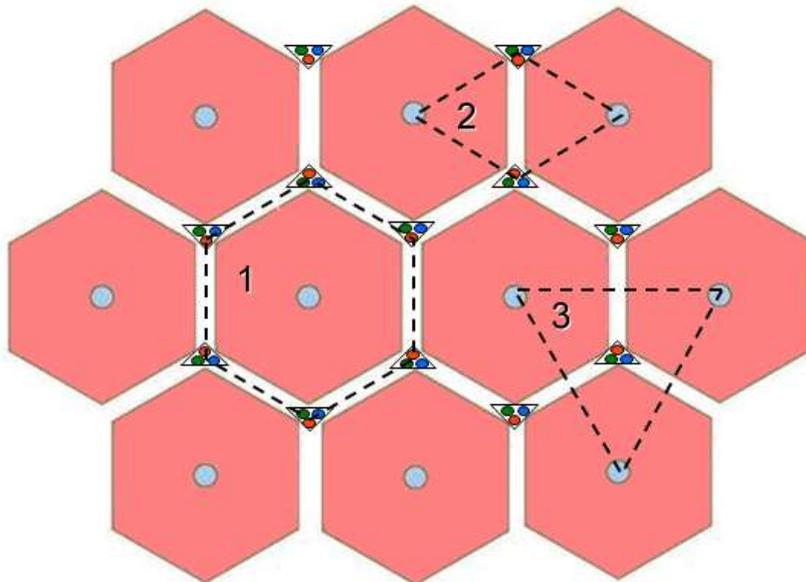
El **lobulillo clásico** es el modo tradicional de considerar la organización del parénquima hepático y puede verse con relativa facilidad. Tiene su fundamento en la distribución de las ramas de la vena porta y de la arteria hepática dentro del órgano y en el trayecto que sigue la sangre proveniente de estos vasos al irrigar finalmente los hepatocitos. El lobulillo clásico consiste en pilas de trabéculas hepatocíticas anastomosadas, de una célula de espesor separadas por un sistema interconectado de sinusoides que irriga las células con una mezcla de sangre venosa (portal) y arterial. Cada lobulillo mide alrededor de 2,0 x 0,7 mm. En el centro hay una vénula relativamente grande llamada vena central o vena centrolobulillar (vénula hepática terminal, vénula hepática postsinusoidal), en la cual desembocan los sinusoides. Las trabéculas de hepatocitos, al igual que los sinusoides, adoptan una disposición radial desde la vena centrolobulillar hacia la periferia del lobulillo. En los ángulos del hexágono están los espacios portales o espacios de Kiernan, que consisten en tejido conjuntivo laxo del estroma caracterizado por la presencia de las triadas portales. Este tejido conjuntivo en última instancia es continuo con la cápsula fibrosa que rodea el hígado. El espacio portal está limitado por los hepatocitos más periféricos del lobulillo. En los bordes del espacio portal, entre la estroma de tejido conjuntivo y los hepatocitos, hay un intersticio pequeño denominado espacio periportal (espacio de Mall).

El **lobulillo portal** pone de relieve las funciones exocrinas del hígado siendo la principal la secreción de bilis. En consecuencia, el eje morfológico del lobulillo portal es el conducto biliar interlobulillar de la triada portal del lobulillo clásico. Sus bordes externos son líneas imaginarias trazadas entre las tres venas centrolobulillares más cercanas a esa triada portal. Estas líneas definen un bloque de tejido más o menos triangular que incluye aquellas porciones de los tres lobulillos clásicos que secretan la bilis drenada al conducto biliar axial. Este concepto permite una descripción de la estructura parenquimatosa hepática comparable a la de otras glándulas exocrinas.

El **acino hepático** es la unidad estructural que provee la mejor concordancia entre perfusión sanguínea, actividad metabólica y patología hepática. Tiene forma romboidal y es la unidad funcional más pequeña del parénquima hepático. El eje menor del acino está definido por las ramas terminales de la triada portal que siguen el límite entre dos lobulillos clásicos. El eje mayor del acino es una línea perpendicular trazada entre las dos venas centrolobulillares más cercanas al eje menor. Por consiguiente, en una vista bidimensional, el acino hepático ocupa partes de dos lobulillos clásicos contiguos. Este concepto permite una descripción de la función secretora exocrina del hígado comparable a la del lobulillo portal. Los hepatocitos en cada acino hepático se describen dispuestos en tres zonas elípticas concéntricas que rodean el eje menor.

- La zona 1 es la más cercana al eje menor y a la irrigación proveniente de las ramas penetrantes de la vena porta y de la arteria hepática. Se corresponde a la periferia de los lobulillos clásicos.
- La zona 3 es la más lejana al eje menor y la más cercana a la vena centrolobulillar (vénula hepática terminal o postsinusoidal). Se corresponde al centro del lobulillo clásico cuyos hepatocitos rodean la vena centrolobulillar.
- La zona 2 está entre las zonas 1 y 3 pero no tiene límites nítidos.

La división en zonas es importante en la descripción y la interpretación de los patrones de degeneración, regeneración y efectos tóxicos específicos del parénquima hepático en relación con el grado o la calidad de la perfusión vascular de los hepatocitos. Como resultado del flujo sanguíneo sinusoidal, en las tres zonas varía el gradiente de oxígeno, la actividad metabólica de los hepatocitos y la distribución de las enzimas hepáticas. La distribución de las lesiones hepáticas por isquemia y exposición a sustancias tóxicas puede explicarse mediante el uso de esta interpretación en zonas<sup>4,5</sup>.



**Fig. 1:** Organización arquitectural del hígado: 1) Lobulillo hepático clásico, 2) Acino Hepático y 3) Lobulillo portal.

En los sinusoides la sangre fluye en forma centrípeta hacia la vena centrolobulillar. Ésta vena transcurre a lo largo del eje central del lobulillo hepático clásico, aumenta su calibre conforme avanza a través de éste y desemboca en una vena sublobulillar. Es un vaso de pared delgada que recibe la sangre de los sinusoides hepáticos. Su revestimiento endotelial está rodeado por cantidades pequeñas de fibras de tejido conjuntivo dispuestas en espiral. La vena centrolobulillar, denominada así por su posición central en el lobulillo

clásico, en realidad es la vénula que sigue a los capilares sinusoidales en el circuito de la sangre a través del hígado y, por ende, sería más correcto llamarla vénula hepática postsinusoidal aunque es válida la denominación vénula hepática terminal.

La vena sublobulillar -que es el vaso que recibe la sangre de las vénulas hepáticas postsinusoidales o terminales-, posee una capa bien definida de fibras de tejido conjuntivo tanto colágenas como elásticas, justo por fuera del endotelio. Los sinusoides hepáticos difieren de otros sinusoides porque un segundo tipo celular -el llamado macrófago sinusoidal estrellado (más conocido como célula de *Küpf*fer)-, es un componente habitual del revestimiento vascular. El espacio perisinusoidal (espacio de Disse) está entre las superficies basales de los hepatocitos, de las células endoteliales y de las células de *Küpf*fer que tapizan los sinusoides. Desde la superficie de los hepatocitos se proyectan pequeñas microvellosidades irregulares. El otro tipo celular que hay en el espacio perisinusoidal es la célula estrellada hepática o lipocito perisinusoidal la que comúnmente se llama célula de *Ito*. Estas células de origen mesenquimal, son el sitio principal de depósito de la vitamina A hepática en la forma de ésteres <sup>4,5</sup>.

Los **hepatocitos** forman las trabéculas celulares anastomosadas del lobulillo hepático. Son células poliédricas grandes que miden entre 20 y 30  $\mu\text{m}$  en cada dimensión. Constituyen alrededor del 80% de la población celular del hígado. Son células asociadas con el aparato digestivo que viven por un tiempo bastante prolongado; su vida media es de alrededor de 5 meses. Además, estas células del hígado tienen una capacidad de regeneración considerable tras la pérdida de parénquima hepático por procesos tóxicos, enfermedades o cirugía. Dos de sus superficies dan a espacios perisinusoidales mientras que la membrana plasmática de sus otras dos superficies está enfrentada a la membrana de un hepatocito vecino y a un canalículo biliar respectivamente. Si suponemos que la célula es cuboide, las dos superficies restantes también darían a hepatocitos contiguos y a canalículos biliares. Las superficies que miran al espacio perisinusoidal son el equivalente de la superficie basal de otras células epiteliales; las superficies que dan hacia hepatocitos vecinos y canalículos biliares equivalen a las superficies lateral y apical, respectivamente, de otras células epiteliales.

## **Via biliar intrahepática**

Las vías biliares (también conocidas como árbol biliar) están formadas por un sistema de conductos de calibre cada vez mayor por los que fluye la bilis desde los hepatocitos hacia la vesícula biliar y desde esta última hacia el intestino. En el hígado humano adulto hay más de 2 km de conductillos y conductos biliares interconectados de formas y tamaños diferentes. Estas estructuras no son sólo conductos pasivos sino que tienen capacidad de modificar el flujo biliar y cambiar su composición en respuesta a estímulos hormonales y nerviosos.

Las vías biliares tienen un revestimiento de colangiocitos que verifican el flujo de la bilis y regulan su contenido. Los colangiocitos son células epiteliales que forman el revestimiento interno de las vías biliares. Cuando se examinan con el microscopio electrónico de transmisión (MET), los colangiocitos se identifican por: a) su citoplasma con orgánulos escasos, b) las *zonulae occludens* que hay entre las células contiguas y c) la presencia de una lámina basal completa. La región apical de los colangiocitos tiene un aspecto semejante a la apical de los hepatocitos por las microvellosidades que se proyectan dentro de la luz. Además, cada colangiocito posee un cilio primario que detecta los cambios de flujo luminal, siendo los responsables en la modificación de la secreción de los colangiocitos. Los conductillos biliares pequeños tienen un revestimiento de colangiocitos de menor tamaño, sobre todo de forma cúbica, pero conforme aumenta el diámetro de la vía biliar los colangiocitos se tornan cada vez más grandes y adquieren una forma más cilíndrica.

El canalículo biliar es un conducto pequeño formado por surcos opuestos en la superficie de hepatocitos contiguos. Las ramas más pequeñas de toda la vía biliar son los canalículos biliares hacia los cuales los hepatocitos secretan la bilis. Los canalículos biliares forman un anillo completo alrededor de las cuatro caras de los hepatocitos hexaédricos idealizados. El diámetro de su luz es de más o menos 0,5µm y están aislados del resto del compartimento intercelular por uniones estrechas (*zonulae occludens*), que son parte de los complejos de unión que también comprenden *zonulae adherens* y desmosomas. En la luz del canalículo hay microvellosidades que se extienden desde la superficie de los hepatocitos contiguos y en la membrana plasmática

que las forma se detectan adenosina trifosfatasa (ATPasa) y otras fosfatasas alcalinas, lo cual indica que la secreción de bilis hacia este espacio es un proceso activo. El flujo biliar es centrífugo, desde la región de la vena centrolobulillar hacia el espacio portal (en sentido opuesto al del flujo sanguíneo). Cerca del espacio portal pero todavía dentro del lobulillo, los canalículos biliares se transforman en los conductos de Hering de trayecto corto.

Una característica distintiva del conducto de Hering es un revestimiento compuesto por dos tipos de células: hepatocitos y colangiocitos de forma cúbica. Al igual que los hepatocitos, los colangiocitos poseen microvellosidades en su superficie apical y *zonulae occludens* y, su región basal está apoyada sobre una lámina basal como el resto del epitelio biliar distal. Desde el punto de vista funcional, según se ha demostrado mediante videomicroscopia, el conducto de Hering tiene una actividad contráctil que contribuye al flujo biliar unidireccional hacia el espacio portal. Dado que el conducto de Hering es el tributario más pequeño y más proximal de las vías biliares que contiene colangiocitos, con frecuencia participa en las mismas enfermedades que afectan a la vía biliar de pequeño calibre. El trastorno funcional de la actividad contráctil así como la lesión o la destrucción de los conductos de Hering, contribuiría a la colestasis intrahepática (obstrucción del flujo biliar). El conducto de Hering actúa como reservorio de células progenitoras hepáticas.

Debido a su ubicación en la interfaz decisiva entre los hepatocitos y los colangiocitos, se ha esgrimido que el nicho de células madre hepáticas se encuentra en los conductos de Hering o sus cercanías. Esta hipótesis ha sido sustentada por la aparición de precursores hepatocíticos cerca de los conductos de Hering en la mayor parte de los trastornos patológicos caracterizados por daño extenso de los hepatocitos. Estas células podrían migrar y diferenciarse en hepatocitos o en células de las vías biliares. Recientemente, la reconstrucción tridimensional de las reacciones canaliculares en la necrosis hepática indica que los colangiocitos pequeños que forman los conductos de Hering proliferan profusamente y migran hacia el parénquima hepático. En las técnicas inmunocitoquímicas estas células expresan marcadores dobles, es decir, antígenos tanto de hepatocitos como de células de las vías biliares y según parece, intervienen en la reparación del tejido hepático lesionado por enfermedades crónicas. Por consiguiente, se ha

llegado a la conclusión de que el conducto de Hering está compuesto por células madre hepáticas específicas o las alberga. Los estudios de laboratorio indican que en el futuro las células madre hepáticas podrían ser de utilidad en el tratamiento de las enfermedades de dicho órgano <sup>6</sup>.

El conductillo biliar corresponde a una parte de las vías biliares que está revestida en su totalidad por colangiocitos. La bilis fluye desde el conducto de Hering hacia el conductillo biliar intrahepático que tiene un revestimiento completo de colangiocitos. El análisis tridimensional de cortes seriados de hígado sometidos a inmunocitoquímica permite comprobar que el conducto de Hering a menudo cruza el límite del lobulillo y se convierte en conductillo biliar en el espacio periportal de Mall. La diferencia principal entre el conducto de Hering y el conductillo biliar no es su ubicación dentro del lobulillo sino que la estructura tenga un revestimiento de colangiocitos parcial o un revestimiento completo.

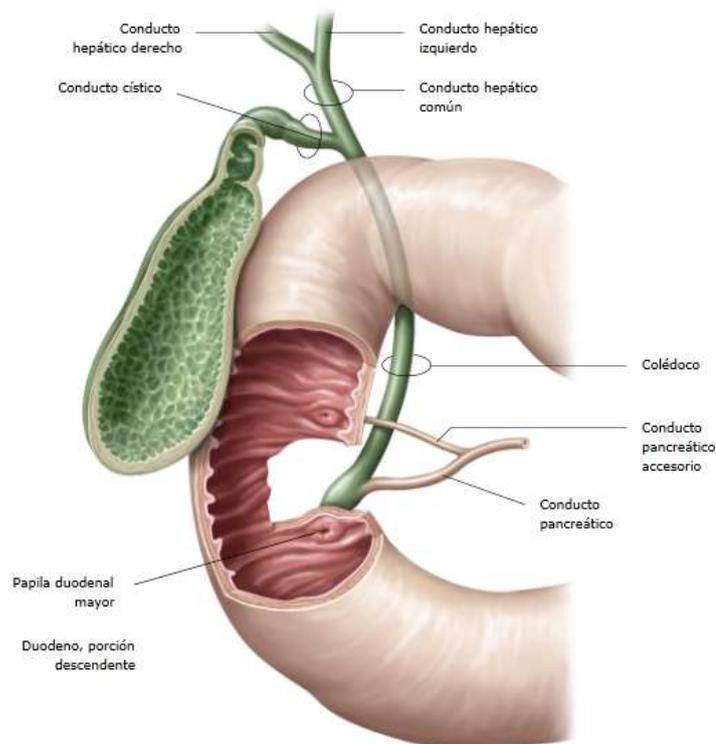
Los conductillos biliares intrahepáticos llevan la bilis hasta los conductos hepáticos. Los conductillos tienen un diámetro aproximado de 1,0 a 1,5  $\mu\text{m}$  y conducen la bilis a través de los límites del lobulillo hacia los conductos biliares interlobulillares que forman parte de la tríada portal. El diámetro de estos conductos oscila entre 5 y 10  $\mu\text{m}$  y los colangiocitos que los forman son cúbicos, cerca de los lobulillos y gradualmente se tornan cilíndricos conforme los conductos se acercan al hilio hepático. Las células cilíndricas tienen microvellosidades bien desarrolladas al igual que las células de las vías biliares extrahepáticas y de la vesícula biliar. A medida que los conductos aumentan de calibre se rodean en forma progresiva de una cubierta de tejido conjuntivo denso con fibras elásticas abundantes. Cuando el conducto se aproxima al hilio en este tejido conjuntivo, aparecen células musculares lisas. Los conductos interlobulillares se reúnen para formar los conductos hepáticos derecho e izquierdo, que a su vez se unen para formar el conducto hepático común a la altura del hilio.

En algunas personas, en el tejido conjuntivo que hay entre el hígado y la vesícula biliar cerca del cuello vesicular, se han descrito los conductos de *Luschka*. Estos conductos se comunican con el cístico y no con la luz de la vesícula. Desde el punto de vista histológico son semejantes a los conductos

biliares intrahepáticos y serían restos de conductos biliares embrionarios aberrantes <sup>4,5,6</sup>.

### Vía biliar extrahepática

Está conformada por la unión de los conductos hepáticos derecho e izquierdo a nivel de la base del lóbulo derecho, denominándose conducto hepático común (figura 2). Su longitud varía entre 1 y 2,5 cm con un diámetro de 4 a 5 mm. El trayecto que sigue es descendente en la parte superior del ligamento hepatoduodenal. El conducto hepático común, el hígado y la arteria cística forman el triángulo de *Calot*.



**Fig. 2.** Vía biliar extrahepática. (Tomado de Prometeus. Atlas de Anatomía)

El conducto hepático se continúa luego con el colédoco (o conducto biliar común) que adquiere este nombre al unirse al conducto cístico; dependiendo del nivel de esta unión varía la longitud del colédoco que

aproximadamente es de 5,5 cm y 7,5 mm de diámetro. Éste se dirige caudal y medial para terminar en la pared posterior de la segunda porción del duodeno, uniéndose previamente con el conducto pancreático o de Wirsung antes de terminar a nivel de la ampolla de Vater. Ambos conductos tienen sus respectivos esfínteres aunque las variaciones anatómicas son frecuentes (Según L. Testud) <sup>3</sup>.

La irrigación del conducto hepático común y el colédoco proviene de arterias que son ramas de la arteria hepática. Las venas drenan a la porta y los linfáticos a los ganglios del hilio hepático. La inervación la realizan el vago y nervios simpáticos.

El conducto cístico tiene entre 0,5- 4 cm de largo y se inicia en el cuello de la vesícula. Este conducto cístico está irrigado por ramas de la arteria cística, sus venas drenan a la porta y los linfáticos a los ganglios del hilio. Los ramilletes posteriores del plexo solar realizan la inervación.

Los conductos biliares extrahepáticos sirven como conductores para el flujo de la bilis encontrándose completamente recubiertos por un epitelio prismático simple muy similar al de la vesícula biliar, apoyado sobre tejido conectivo denso. El conducto hepático común está constituido por las mismas capas que el tubo digestivo excepto la muscular de la mucosa. La superficie del epitelio es relativamente fina o delgada. Las células caliciformes están ausentes también en el espesor del epitelio. Éste se introduce en el estroma formando criptas o depresiones llamadas *sáculos de Beale*. En algunas secciones las criptas parecen ser independientes del epitelio de superficie pero pueden observarse en otras contiguas que se deben al corte histológico y a la orientación de las mismas. Alrededor de los sáculos existen de manera indeterminada formaciones glandulares que vierten su producto al interior de las criptas. Estas glándulas han sido denominadas indistintamente divertículos, criptas, sáculos parietales, glándulas profundas, glándulas biliares, glándulas periductales y glándulas peribiliares extrahepáticas. Cuando están localizadas de manera más periférica a luz del conducto se encuentran rodeadas por un tejido conectivo denso. Aunque podemos encontrarlas a lo largo de todo el sistema biliar extrahepático, son menos frecuentes en las porciones centrales de los conductos biliares extrahepáticos y en la porción intrapancreática. Por el contrario son más frecuentes en las

proximidades de la ampolla de Vater. Están recubiertas por un epitelio columnar bajo o cuboideo, muchas de cuyas células están repletas de mucina.

Las células epiteliales superficiales poseen mínimas cantidades de mucina en comparación con las presentes en la vesícula. Desde el punto de vista inmunohistoquímico, todas ellas poseen una expresión similar para el antígeno de membrana epitelial y para la citoqueratina de bajo peso molecular (CAM 5.2 anticuerpo). El CEA suele estar ausente o aparece de manera focal débil a lo largo de los ápices de algunas células. La inmunoreactividad para la lisozima se ha encontrado en el citoplasma de las células presentes en las glándulas, no estando presente en las del epitelio. Cabe mencionar también la presencia de reactividad en las células de las glándulas peribiliares para la alfa-amilasa salival y pancreática así como la tripsina y la lipasa. En algunos casos puede encontrarse una reactividad focal en las células del epitelio biliar del sistema extrahepático.

El estroma que se encuentra directamente bajo el epitelio es denso y contiene abundantes fibras colágenas y elásticas así como pequeños vasos sanguíneos. Los linfocitos se encuentran de manera dispersa y en pequeño número. Pueden verse acinos pancreáticos en el espesor de la pared en las porciones intrapancreáticas del conducto biliar extrahepático. En algunos casos se han descrito pequeños conductos pancreáticos que drenan directamente a la luz del sistema biliar. El estroma periférico del conducto biliar común es menos denso y contiene vasos sanguíneos de mayor tamaño así como vasos linfáticos, nervios, células ganglionares, fibras elásticas y tejido muscular liso. Este estroma se fusiona con el tejido conectivo del ligamento hepatoduodenal. La cantidad y calidad del tejido muscular liso en la pared del conducto biliar común (excluyendo la porción cercana a la unión coledocoduodenal) difiere en las diferentes series publicadas<sup>6</sup>. Cuando se hayan estas fibras musculares, tienen una disposición circular y de manera más frecuente, de forma longitudinal. Suelen ser discontinuas e intercaladas con fibras elásticas y colágenas. Bajo el epitelio y las fibras musculares lisas podemos encontrar fibras nerviosas con inmunoreactividad positiva para el péptido VIP<sup>4,5,6</sup>.

## **Vesícula Biliar**

Es un receptáculo músculo-membranoso en forma de pera que mide aproximadamente de 8 a 10 cm de longitud por 3,5 a 4 cm de diámetro. La vesícula se aloja en la fosilla cística ubicada en la cara inferior del hígado por fuera del lóbulo cuadrado y en contacto con la pared abdominal. Normalmente la vesícula almacena de 30-60 cc de bilis siendo su capacidad máxima de 200 a 250 cc. Para su estudio la vesícula se divide en tres porciones: a) el fondo que es redondeado y romo y se corresponde con el borde anterior del hígado; b) el cuerpo que posee dos caras: una superior en contacto con la fosilla cística (a la cual se halla unido por tejido conjuntivo y vasos) y otra la cara inferior que es libre y convexa recubierta por peritoneo; y c) el cuello que tiene una apariencia tortuosa e irregular y que en su interior tiene válvulas que delimitan el bacinete vesicular. Éste se continúa inmediatamente con el conducto cístico.

La arteria cística, rama de la arteria hepática derecha, es la encargada de irrigar la vesícula. Hay que recordar que es una arteria terminal; por lo tanto, cualquier proceso inflamatorio que interrumpa el flujo hepático puede producir isquemia y necrosis de la vesícula. Ocasionalmente, pueden haber variaciones en la anatomía de la arteria cística, presentándose como una doble arteria cística u originarse de otras arterias como la arteria hepática izquierda, la arteria gastroduodenal, la arteria hepática común o del tronco celíaco. Las venas tanto superficiales como profundas drenan hacia la vena porta mientras que los linfáticos desembocan en el ganglio cístico y en los ganglios del surco transversal. La inervación está dada por el simpático y por los nervios vagos<sup>1,2,3</sup>.

La mucosa de la vesícula biliar tiene varias características distintivas. La vesícula biliar vacía o con llenado parcial tiene muchos pliegues profundos de la mucosa. La superficie de la mucosa consiste en un epitelio simple cilíndrico. Las células epiteliales altas poseen abundantes microvellosidades apicales cortas y poco desarrolladas. Se encuentran cohesionadas por complejos de unión apicales que unen células contiguas y forman una barrera entre la luz y el compartimento intercelular. Cabe mencionar que, además, poseen concentraciones de mitocondrias ubicadas en el citoplasma basal y

apical junto con pliegues laterales complejos que las diferencian de otros grupos celulares. Estas células se parecen mucho a las células absortivas intestinales, con las que comparten también ATPasa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en sus membranas plasmáticas laterales y vesículas de secreción con contenido de glucoproteínas en su citoplasma apical.

La lámina propia de la mucosa está particularmente bien provista de capilares fenestrados y vénulas pequeñas pero no tiene vasos linfáticos. Esta capa es muy celular y contiene una gran cantidad de linfocitos y plasmocitos. Las características de la lámina propia la hacen semejante a la del colon, otro órgano especializado en la absorción de electrolitos y agua. En la lámina propia de la vesícula biliar humana normal a veces hay glándulas mucosecretoras, en especial cerca del cuello del órgano, pero son más comunes en las vesículas inflamadas. En estas glándulas también hay células de aspecto idéntico al de las células entero-endorinas del intestino.

Por fuera de la lámina propia está la muscular externa que posee fibras colágenas y elásticas abundantes entre los haces de células musculares lisas. A pesar de su origen en un divertículo derivado del intestino anterior, la vesícula biliar no posee mucosa ni submucosa. Los haces de células musculares lisas están orientados un poco al azar a diferencia de lo que ocurre en el intestino, donde se organizan en capas. La contracción del músculo liso reduce el volumen vesicular que fuerza la expulsión de su contenido hacia el conducto cístico. Por fuera de la muscular externa hay una capa gruesa de tejido conjuntivo denso. Esta capa contiene vasos sanguíneos de gran calibre, una red linfática extensa y nervios autónomos que inervan la muscular externa y los vasos sanguíneos (en la pared del conducto cístico hay somas de neuronas parasimpáticas). Éste tejido conjuntivo también hay muchas fibras elásticas y adipocitos abundantes. En los sitios en los que la vesícula está adherida al hígado, esta capa recibe el nombre de adventicia. La superficie vesicular que no está en contacto con el parénquima hepático está cubierta por una serosa (peritoneo visceral) que consiste en un mesotelio apoyado sobre una fina capa de tejido conjuntivo laxo.

Además, invaginaciones o divertículos profundos del revestimiento epitelial de la mucosa (los llamados senos de Rokitansky-Aschoff) a veces se extienden a través de todo el espesor de la muscular externa. Se cree que son un

presagio de alteraciones patológicas futuras y se originan como consecuencia de hiperplasia y herniación de las células epiteliales a través de la muscular externa. Asimismo, en estos senos pueden acumularse bacterias causantes de inflamación crónica, lo cual es un factor de riesgo para la formación de cálculos biliares <sup>4,5</sup>.

## 1.2 FISILOGIA EXOCRINA DEL HIGADO Y DE LA VIA BILIAR

La bilis es secretada por el hígado en cantidades de 600 a 1200 ml/día. La secreción biliar cumple las funciones de permitir la digestión y absorción de las grasas así como eliminar productos de desecho como la bilirrubina o el exceso de colesterol.

La bilis es secretada en dos fases hepáticas: la secretada por los hepatocitos que es rica en ácidos biliares y colesterol y una secreción adicional de bilis de las células epiteliales que recubren los conductillos y conductos hepáticos, constituida por una solución acuosa de iones de sodio y bicarbonato.

La secreción hepática de bilis es estimulada principalmente por la secretina liberada por estímulo de las células epiteliales de los conductos biliares que aumentan la secreción de agua y bicarbonato. Otro estímulo importante son los ácidos biliares sanguíneos.

Luego, la bilis es conducida hacia el duodeno o almacenada en la vesícula, donde se concentra entre 5 y 20 veces debido a la absorción de agua, sodio y cloro incrementando las concentraciones de colesterol, fosfolípidos, ácidos biliares y bilirrubina <sup>4,7</sup>.

Componente	Bilis Hepática gr/dl	Bilis Vesicular gr/dl
Agua	97.5	92
Sales Biliares	1.1	6
Fosfolípidos (Lecitina)	0.04	0.3
Colesterol no esterificado	0.1	0.3-0.9
Ac. Biliares (Bilirrubina)	0.04	0.3
Sodio	145 mEq	130 mEq
Calcio	5	23
Cloro	100	25
HCO <sub>3</sub>	28	10

**Tabla 1:** Composición de los elementos principales que componen la secreción biliar.

### 1.3 LESIONES DE LA VIA BILIAR

Desde la generalización de la colecistectomía laparoscópica a principios de los años noventa, se ha producido un importante aumento en el número de colecistectomías, dada la mejoría sustancial en la calidad de vida asociada a la resección laparoscópica. Sin embargo esta cirugía no está exenta de complicaciones, aunque tiene una morbilidad pequeña (0-8%) y una mínima mortalidad (0,03%). Dentro de estas complicaciones, la lesión de la vía biliar es una de las más graves y de mayor trascendencia.

#### **Incidencia e Importancia del problema**

Su incidencia, aunque baja (0,2-0,7%), duplica o triplica la asociada a la cirugía abierta (0,1-0,3%), pero además, su complejidad es mayor. Estas lesiones se asocian a una significativa mortalidad (0-6%) e importante morbilidad, con afectación de la calidad de vida de los pacientes y un coste

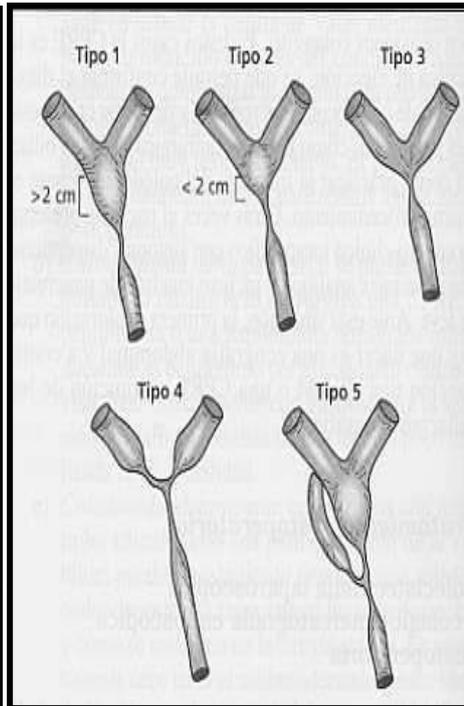
económico considerable, además de ser una fuente creciente de demandas judiciales. La mayor parte de las lesiones de la vía biliar ocurren en colecistectomías laparoscópicas consideradas *sencillas o fáciles*. Inicialmente se pensó que el aumento de estas lesiones estaba relacionado con la curva de aprendizaje pero estudios posteriores han demostrado que no es solo la inexperiencia la causa de las mismas, puesto que se siguen produciendo incluso después de haber realizado más de 100 colecistectomías laparoscópicas y considerar al cirujano como *experto*.

En la mayoría de los casos las lesiones son debidas a mala identificación-visualización de la anatomía, por anomalías anatómicas, por procesos inflamatorios locales, o por errores técnicos generalmente asociados a falta de experiencia; pero según Hugh, un factor casual muy importante de estas lesiones es la desorientación espacial del cirujano. La lesión más frecuente es confundir el colédoco con el cístico, ligarlo y cortarlo con pérdida de una parte de la vía biliar principal, no siendo raro que se asocie con lesión de la arteria hepática <sup>8</sup> (*Changing the culture of cholecystectomy*. Strasberg. J Am Coll Surg 2000;201: 604-11).

### **Clasificación**

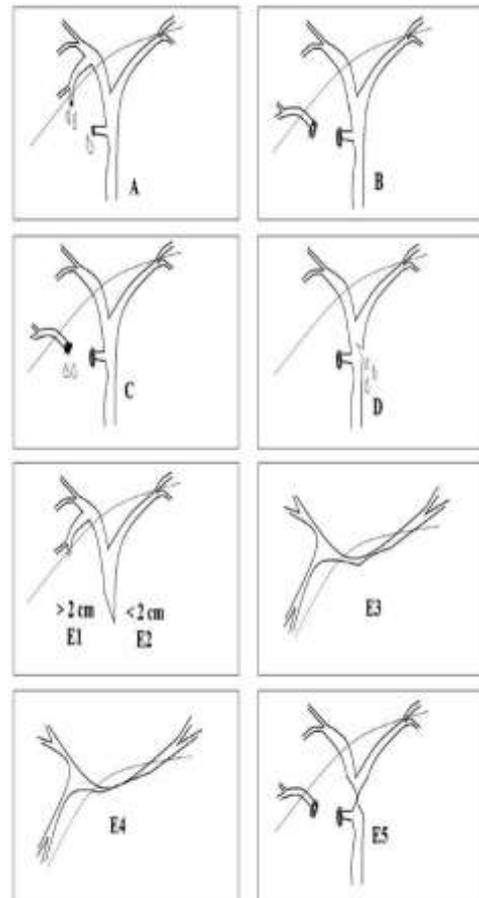
Hay varias clasificaciones de las lesiones de las vías biliares (ninguna aceptada como estándar por todos), siendo las más utilizadas las de Bismuth y Strasberg. La primera data de 1982 y las clasifica según el nivel de la localización anatómica de la lesión pero no hace referencia a las fistulas de la vía biliar. Esta clasificación es útil para valorar la reconstrucción quirúrgica, la técnica y la dificultad de la misma (tabla 2, figura 8). Como la clasificación de Bismuth no cubría todas las posibilidades de la iatrogenia por laparoscopia, Strasberg en 1995, la adaptó a las lesiones laparoscópicas (tabla 3, figura 9). Por otro lado, la lesión vascular asociada no está contemplada salvo en una clasificación reciente de Stewart.

CLASIFICACION DE BISMUTH	
Tipo I	Estenosis de colédoco o hepático >2 cm de la unión de los hepáticos.
Tipo II	Estenosis hepática común a <2 cm de la unión de los hepáticos.
Tipo III	Lesión del hepático común hasta la unión de los hepáticos con la unión sana.
Tipo IV	Lesión que afecta la unión de los hepáticos, estando separados o unidos por cicatriz.
Tipo V	Lesión de un conducto hepático derecho aberrante en el triangulo de Calot + lesión de la vía biliar principal.



**Tabla 2:** Clasificación de Bismuth. **Figura 8:** Tomado de Bismuth.

CLASIFICACION DE STRASBERG	
Tipo A	Lesión del cístico o de conducto aberrante, segmentario, del lecho vesicular.
Tipo B	Sección y clipaje del conducto hepático derecho aberrante importante en el triangulo de Calot.
Tipo C	Igual que el B pero con fistula Biliar.
Tipo D	Laceración del hepático o del colédoco.
Tipo E	Sección o estenosis de la vía biliar extrahepatica: <ul style="list-style-type: none"> <li>- E1: a &gt; 2cm de la unión de los hepáticos</li> <li>- E2: a &lt;2 cm de la unión de los hepáticos</li> <li>- E3: estenosis que llega hasta la unión de los hepáticos, permaneciendo estos unidos sin afectación.</li> <li>- E4: estenosis que afecta la unión de los hepáticos estando estos separados o unidos por tejido cicatricial.</li> <li>- E5: lesión de conducto hepático derecho extrahepatico en el triangulo de Calot y de la vía biliar principal por debajo de la unión de los hepáticos.</li> </ul>



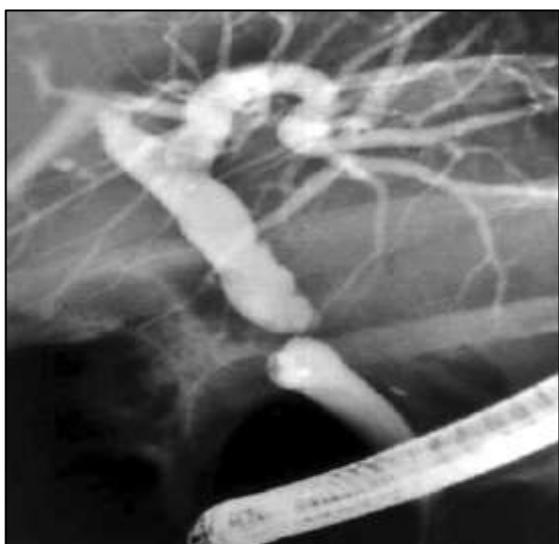
**Tabla 3:** Clasificación de Strasberg. **Figura 9:** Tomado de Strasberg.

Las lesiones menores se manejan de forma conservadora mediante esfinterotomía, drenaje percutáneo o prótesis endoscópica temporal, teniendo buenos resultados en más del 90% de los casos. Si se deja catéter, se aconseja retirarlo a las 4-6 semanas siempre que no persista la fistula <sup>9</sup>.

Lo ideal es reconocer la existencia de la lesión en el mismo acto quirúrgico porque la reparación precoz se asocia con disminución significativa de la morbilidad y mortalidad.

Sin embargo, un porcentaje de lesiones muy variable (20-80% según la experiencia del cirujano y del centro) son diagnosticadas en el postoperatorio inmediato o tardío. A veces, los síntomas son muy poco significativos, similares a los de una colecistectomía normal, como ligero dolor y distensión abdominal postoperatoria, leucocitosis, febrícula, o ingreso superior a 48-72 horas porque el paciente no se encuentra bien.

El diagnóstico tardío, meses o años después, se debe a una estenosis de la vía biliar y se pone de manifiesto por la aparición de ictericia y/o colangitis, o alteraciones analíticas hepáticas de daño hepatocelular <sup>9,10</sup>.



**Figura 10:** estenosis de la vía biliar principal Tipo I según clasificación de Bismuth detectada mediante ColangioTAC. Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo (Hospital universitario San Cecilio).

#### 1.4 TRASPANTE HEPÁTICO

Como norma general, el trasplante hepático es el tratamiento de elección para las enfermedades hepáticas crónicas en estadio terminal que desarrollan complicaciones evolutivas y tengan una expectativa de vida inferior a 1 ó 2 años sin el trasplante o para la insuficiencia hepática aguda grave cuando no se disponga de otra opción terapéutica eficaz. Sin embargo, como el número de donaciones es limitada se hace necesaria una reactualización permanente de las indicaciones y contraindicaciones en función de los resultados obtenidos y de los nuevos tratamientos disponibles.

Para poder elegir el momento idóneo del trasplante la mayor parte de los grupos de trabajo se basan en una clasificación clínico-histológica de Child-Pugh (grados A,B,C), existiendo indicación de trasplante cuando el paciente alcanza 7 o más puntos (grados B o C) ya que la esperanza de vida al año es inferior al 20% al presentarse complicaciones cada vez más frecuentes y graves (ascitis, hemorragia digestiva por varices, coagulopatías, encefalopatía, etc.). Recientemente se ha desarrollado una clasificación pronóstica que considera la bilirrubina, el INR, y la función renal -denominada MELD (*Model for End-Stage Liver Disease*)-, estableciéndose la indicación del trasplante a partir de los 15 puntos.

La lista de enfermedades susceptibles de trasplante hepático es muy extensa. Si bien la gran mayoría de los pacientes corresponden a tres grupos de patologías: hepatopatías crónicas, carcinoma hepatocelular e insuficiencia hepática fulminante.

La mayoría de las hepatopatías infantiles no disponen de un tratamiento específico que mejore su pronóstico por lo que el trasplante hepático es su principal terapia.

La atresia de la vía biliar extrahepática es la hepatopatía grave pediátrica más frecuente y, por tanto, la indicación más común de trasplante (hasta un 50%). El tratamiento de la atresia biliar es quirúrgico mediante una derivación biliar a un asa yeyunal (*porto-enterostomía de Kasai*).

## **Complicaciones del trasplante**

La evolución postoperatoria de un trasplante hepático está condicionada por aspectos relacionados con la calidad del injerto (dependientes de la intervención quirúrgica y cuidados postoperatorios) así como condicionados por la adaptación inmunológica del injerto al receptor hepático.

Dejando a un lado las complicaciones inmunológicas y vasculares a continuación haremos una breve mención de las complicaciones que implican a la vía biliar extrahepática, su tratamiento y evolución, en relación al tema que atañe el aspecto principal de este trabajo de investigación.

Las complicaciones biliares continúan siendo el *talón de Aquiles* del trasplante hepático por su frecuencia (10-34%) y la alta tasa de morbilidad que conllevan. Durante el postoperatorio inmediato los problemas relacionados con la vía biliar son la estenosis de la anastomosis así como la dehiscencia anastomótica o fístula biliar. Pasado el postoperatorio inmediato, las alteraciones principales que dificultan el flujo de la bilis son la estenosis de la vía biliar extrahepática (anastomosis, compresión extrínseca) y la coledocolitiasis/barro biliar.

- La fístula y/o estenosis biliar es una de las complicaciones relativamente frecuentes. La ausencia de salida de bilis por el drenaje o la existencia de colecciones intra-abdominales serían debidas a alteraciones de la anastomosis.
- La peritonitis biliar tras la retirada del tubo de Kehr: el tratamiento inmunosupresor con corticoides inhibe la formación del trayecto fistuloso entre el colédoco y el exterior. Ello condiciona que al retirar el tubo de Kehr (3-4 meses postrasplante) sea frecuente el escape de la bilis a la cavidad peritoneal a través de la coledocotomía.
- La estenosis de la anastomosis: se manifiesta clínicamente como un síndrome colestásico. El tratamiento mediante dilataciones o colocación de endoprótesis presenta un índice de reestenosis superior al 50% antes del año por lo que la mayoría de grupos prefieren la cirugía (hepatoyeyunostomía).

- Complicaciones biliares por trombosis de la arteria hepática: la trombosis arterial se puede manifestar como una complicación biliar, ya sea como una fistula o como una obstrucción biliar. Estas complicaciones biliares son graves con necrosis de la vía biliar y la formación de cloacas en el hilio hepático e intrahepáticas, asociándose con frecuencia a infecciones y alteración grave de la función del órgano. En la mayoría de casos hay que recurrir al retrasplante.

### **Retrasplante Hepático**

El retrasplante consiste en la sustitución del injerto fallido por otro nuevo. Su incidencia alcanza el 10-20% (sobre el total de trasplantes realizados por un grupo).

La decisión de retrasplantar a un paciente conlleva matices éticos indudables ya que con ella se impide el acceso al trasplante a pacientes de la lista que todavía no han obtenido un órgano dada la escasez de los mismos.

El análisis de la literatura ofrece supervivencias al cabo del año que varían de forma global entre el 34-74%. Mientras la supervivencia obtenida con un injerto hepático trasplantado por primera vez en un paciente de la lista se estima en un 80% al cabo del primer año; el mismo injerto en un retrasplante, proporciona una supervivencia del 60%. Esta diferencia se mantiene a los cinco años (72 vs 54%). La elevada morbi-mortalidad, sobre todo del urgente, se debe a las complicaciones sépticas <sup>9,10</sup>.

## 1.5 TRATAMIENTO ACTUAL DE LA PATOLOGÍA Y LESIONES DE LA VÍA BILIAR. ANASTOMOSIS BILIOENTERICA EN EL TRASPLANTE HEPÁTICO EN LA ACTUALIDAD.

### **Tratamiento actual de la patología de la vía biliar**

La patología benigna de las vías biliares extrahepáticas (anomalías estructurales, tumores benignos, seudotumores) tiene un tratamiento quirúrgico cuando produce cualquier tipo de sintomatología que no puede aliviarse de manera conservadora. Éste consiste en la extirpación de la lesión y realización posterior de una coledocoyunostomía en Y de Roux.

En relación a la patología maligna que afecta a las vías biliares extrahepáticas, por norma general la resección curativa es inhabitual sobre todo en los colangiocarcinomas, pero existe mayor posibilidad de paliación que en los cánceres de vesícula. En los carcinomas periampulares relativamente localizados puede intentarse la pancreatoduodenectomía radical (*operación de Whipple*); se trata de una intervención notablemente agresiva y que se acompaña de una considerable mortalidad por lo que solo es aconsejable en casos seleccionados y con intención curativa. En los tumores irresecables de esta zona -que son la mayoría-, tradicionalmente el cirujano se ha limitado a restablecer el flujo de la bilis al intestino mediante una coledocoenterostomía y a prevenir o paliar la obstrucción duodenal con una gastroenterostomía. También es infrecuente la resección curativa en los tumores de los segmentos medio y superior de la vía biliar, donde la técnica quirúrgica de drenaje es la anastomosis de la bifurcación de los conductos hepáticos al intestino (hepaticoyunostomía) en el primer caso y la colangioyunostomía intrahepática o canulación con una endoprotesis en el segundo. El trasplante hepático es inútil en la mayoría de los casos por recidiva tumoral, pero se han descrito curaciones en pacientes seleccionados con tumor hiliar.

En la mayoría de pacientes con colangiocarcinoma tiene una clara indicación el tratamiento paliativo dirigido a descomprimir el árbol biliar y restablecer el flujo de la bilis al intestino. La rápida resolución de la ictericia y del prurito que sigue a la institución del drenaje biliar suele acompañarse de una notable mejoría clínica durante los pocos meses de vida que le quede al

paciente. La experiencia de los últimos 25 años en el empleo de técnicas no quirúrgicas para descomprimir las vías biliares mediante prótesis de drenaje externo o interno introducidas por vía transhepática, o de drenaje interno colocadas por vía transendoscópica, ha llevado a la conclusión de que éstas últimas (figura 11) son el tratamiento paliativo de elección. La canulación endoscópica de la vía biliar tumoral tiene una mortalidad nula y una morbilidad inmediata mínima en comparación con las prótesis transhepática y la derivación quirúrgica.



**Figura 11:** *Imagen radiológica de un catéter insertado en la vía biliar por vía endoscópica para tratamiento paliativo de una obstrucción tumoral de la vía biliar por ampuloma. La vía biliar dilatada contiene contraste de la Colangiografía endoscópica previa (Tomado de Cirugía Biliopancreática, Guías de la AEC).*

Sin embargo, su morbilidad tardía es considerable porque los catéteres de plástico tienden a obstruirse y con frecuencia tienen que extraerse para colocar uno nuevo más de una vez en la corta sobrevida que tienen estos pacientes (de 1 a 6 meses en general). Este problema se obvia con las prótesis metálicas autoexpandibles, pero su coste es mucho mayor, por lo que solo suelen insertarse cuando se espera una supervivencia de más de 3 meses.

No existen datos concluyentes de que la radioterapia paliativa externa o interna con iridio intraductal o la quimioterapia intraarterial prolonguen la supervivencia. Recientemente se han presentado evidencias de que un tratamiento paliativo mínimamente invasivo, la terapia fotodinámica (inyección intravenosa de un fotosensibilizador que se fija al tumor y es activado localmente mediante luz laser dirigida por un coledocoscopia causando necrosis del tejido tumoral, es muy eficaz para recanalizar una estenosis biliar maligna y se asocia a una supervivencia de hasta el 90% a los 6 meses. Asociado o no a una endoprotesis, la terapia fotodinámica parece una buena opción futura en la paliación del colangiocarcinoma porque consigue el doble objetivo de repermeabilizar la vía biliar y reducir la masa tumoral.

El pronóstico del carcinoma de las vías biliares es malo con una supervivencia global a los 5 años que no supera el 5%. Solo algunos tumores bien diferenciados como el carcinoma esclerosante, pueden asociarse a supervivencia prolongada en ausencia de resección quirúrgica <sup>9,10,11</sup>.

### **Tratamiento Actual de las lesiones Iatrogénicas de la vía biliar**

El tratamiento adecuado depende del momento del diagnóstico, del tipo, localización e importancia de la lesión. La finalidad del tratamiento no solamente es recomponer la integridad de la vía biliar sino también evitar las complicaciones a corto y largo plazo. El reconocimiento precoz de la lesión no es suficiente ya que lo importante es el tratamiento que se realice porque de ello dependerá el resultado a largo plazo. Éste puede ser:

- Medicorradiológico: drenaje de las colecciones, antibióticos y nutrición adecuada.
- Drenaje biliar, radiológico o endoscópico.
- Quirúrgico: fundamentalmente hepaticoyeyunostomía en Y de Roux.

El éxito del tratamiento quirúrgico depende de la evaluación diagnóstica preoperatoria, la técnica quirúrgica y la experiencia del cirujano. Si la colangiografía dibuja todo el árbol biliar proximal, la posibilidad de éxito es del

84%, mientras que si es incompleta, es decir, si no se ve todo el árbol biliar, el éxito solo es del 31%. Nunca se debe intervenir sin una colangiografía completa que diagnostique el tipo de lesión. Los mejores resultados se obtienen en reparaciones inmediatas o precoces. No solo por el alto porcentaje de éxito (81-95%) sino porque disminuye la mortalidad y morbilidad mejorando la calidad de vida. Las reparaciones tardías tienen similar tasa de éxito pero con mayor morbimortalidad. La morbilidad y la mortalidad, se incrementan si se asocia lesión de la arteria hepática derecha.

El tratamiento definitivo va a depender también del momento en el que se diagnostica la lesión: intraoperatorio, postoperatorio precoz (1-2 semanas), postoperatorio tardío (>2 semanas), o a largo plazo (>6 meses). Los tiempos fijados para diferenciar el postoperatorio precoz y tardío son aproximados.

Tratamiento intraoperatorio. Cuando la lesión se descubre en el mismo acto quirúrgico se debe reconvertir a laparotomía porque la laparoscopia tiene hoy en día, un valor muy limitado en la reparación de estas lesiones circunscribiéndose, en el 15-25% de los casos, a sutura o inserción de tubo en "T" o drenaje. El cirujano debe decidir si reparar o si drenar en función de su experiencia, de la severidad de la lesión y de las posibilidades del hospital.

Si el cirujano no es experto, la colocación de un drenaje abdominal aspirativo, tipo Jackson-Pratt en la proximidad de la lesión (con la mínima disección posible) es suficiente hasta que el paciente sea trasladado a un centro de referencia.

Respecto a la técnica quirúrgica a realizar, la reparación primaria, directamente o sobre un tubo de Kehr, rara vez está indicada. Únicamente podría realizarse en casos de laceración pequeña, que afecte a menos del 25% con bordes no necróticos, que no haya sido por diatermia y sin pérdida de pared, completándose en el postoperatorio -si fuera necesario-, con esfinterotomía o drenaje biliar o prótesis temporal. Nunca se debe hacer si la lesión afecta a la bifurcación de los hepáticos.

La anastomosis recomendable es la hepaticoyeyunostomía en Y de Roux cuando es más que una mínima laceración, es por diatermia o hay una necrosis de los bordes por los clips. Se ha discutido sobre la posibilidad de

realizar una coledocoduodenostomía o una hepaticoduodenostomía, pero la mayoría de los autores prefieren la hepaticoyeyunostomía en Y de Roux para evitar problemas de tensión o el compromiso vascular de la anastomosis y el riesgo de colangitis <sup>9,10,11</sup>.

Tratamiento precoz (dentro de la primera semana). La posibilidad de éxito de una reparación en los primeros días es muy alta (hasta 95%), igual que en la reconstrucción inmediata.

Lo ideal es repararlo en la primera semana pero si no se puede por sepsis, conviene esperar al menos 4-6 semanas para controlar la fistula y que disminuyan los fenómenos inflamatorios asociados a la cirugía, de manera que el riesgo de complicaciones sea menor. También puede posponerse la cirugía siempre que el paciente este estable, cuando la posibilidad de fallo de la anastomosis sea alta, en caso de que la afectación de la confluencia de los hepáticos con lesión vascular asociada (para ver la necesidad de resección hepática concomitante), en caso de lesión significativa por diatermia (para que se delimite el nivel final de la lesión) o también para conseguir un conducto dilatado que mejore el resultado cuando exista una oclusión completa sin fistula (mediante clampaje intermitente del drenaje percutáneo durante 2-3 semanas).

Si hay continuidad de la vía biliar, la laceración es pequeña y la fistula de bajo débito está bien dirigida, se puede seguir con tratamiento medicorradiológico (drenaje abdominal, nutrición y antibióticos), asociado o no a somatostatina. Si no se logra disminuir el débito de la fistula o aparece infección, hay que drenar la vía biliar mediante catéter interno-externo percutáneo o prótesis temporal de plástico, por vía endoscópica. Si con ello se consigue disminuir la fistula y controlar la infección, se mantiene el catéter/prótesis hasta el cierre de la misma, normalmente entre 4-6 semanas. Cuando no se logra disminuir la fistula o aparecen complicaciones, se debe hacer tratamiento quirúrgico siendo la hepaticoyeyunostomía en Y de Roux el de elección, salvo laceraciones mínimas.

En el caso de fistula de alto débito sin continuidad de la vía biliar o en caso de estenosis con ictericia, el tratamiento quirúrgico con hepaticoyeyunostomía

en Y de Roux es de elección. En ocasiones, una estenosis debida a los clips, sin fistula, puede resolverse con dilataciones percutáneas o endoscópicas con balón.

Otro tratamiento posible en los casos con continuidad de la vía biliar, aunque con peores resultados, es la colocación de una prótesis endoscópica o percutánea como tratamiento definitivo. El porcentaje de éxito es inferior a la cirugía (entre el 50-70%) en función del tipo, tamaño y localización de la lesión. Por otro lado, el pronóstico con estas técnicas es imposible de predecir y hay muy pocos estudios a largo plazo, por lo que no se aconseja salvo contraindicación de la cirugía <sup>10</sup>.

Tratamiento tardío (más de 2 semanas). Esta descrito que los resultados son peores con las reparaciones tardías pero alguna serie presenta un 91% de éxito con 88% libre de estenosis a 5 años, igual que en la reparación inmediata o precoz, y en otras no aprecian diferencias entre los resultados de la reparación precoz y tardía <sup>9,10</sup>.

Cuando el diagnóstico es tardío se produce una respuesta inflamatoria sistémica, malnutrición y sepsis que, junto con los fenómenos inflamatorios de la cirugía previa, aconsejan retrasar la reparación entre 1 y 3 meses hasta que el paciente este bien, ya que los resultados son peores si se opera en esas condiciones <sup>8, 9, 10</sup>.

En estos casos tardíos, tanto con fistula como con estenosis, la presencia de los fenómenos inflamatorios mantenidos durante tiempo dificultan la localización de la vía biliar por tejido cicatricial y fibrosis, haciendo la disección difícil y peligrosa. Una vez identificada la lesión, se debe disecar proximalmente hasta llegar a mucosa sana. Cuando la disección completa del conducto es difícil, se puede optar por la apertura anterior longitudinal y anastomosis laterolateral que disminuye el riesgo de devascularización del conducto biliar. En ocasiones se requiere sección o resección parcial del segmento IVB-V para localizar y abordar el hilio, para acceder a la bifurcación directamente, con resultados similares. Cuando la lesión afecta la bifurcación esa resección extendida hacia la base de la vesícula permite abordar ambos hepáticos.

La hepaticoyeyunostomía alta, para que no haya inflamación ni fibrosis, es la técnica de elección con los mismos criterios ya referidos. Si los hepáticos están separados o unidos por tejido fibroso cicatricial (tipo IV de Bismuth o E4 de Strasberg) hay que hacer 2 anastomosis, salvo que se puedan suturar entre ellas, haciendo una boca única. Si hay lesión vascular de la arteria hepática derecha con atrofia hepática, y el paciente ha presentado colangitis, la mayoría de los expertos optan por asociar una hepatectomía derecha a la hepaticoyeyunostomía.

El tratamiento indicado para la sección completa, la ligadura o la estenosis de la vía biliar principal o de un conducto hepático aberrante importante, es la hepaticoyeyunostomía en Y de Roux, con una tasa de éxitos muy elevada, superior al 90%.

Los aspectos técnicos más importantes en las reparaciones de las lesiones iatrogénicas de la vía biliar son:

- Identificación de la vía biliar proximal a la lesión y movilización en sentido cefálico.
- Identificación de mucosa sana en un ambiente no infectado
- Buena vascularización. Es importante que la anastomosis sea lo más proximal posible en el conducto extrahepático.
- Calibre lo más amplio posible. En las lesiones por iatrogenia el colédoco es generalmente fino (5-7 mm) y con una pared delgada, por lo que una anastomosis es fácil que resulte en estenosis.
- Utilizar un asa larga de yeyuno aislada de 60-70 cm, a la que se practica un pequeño orificio en el borde antimesentérico a unos 3-4 cm del cierre del asa.
- Anastomosis sin tensión en un solo plano con suturas monofilamento absorbibles (evitan detritus y fibrosis) finas nº 5/0, 6/0, tipo Maxon<sup>®</sup>, PDS<sup>®</sup>, etc., con puntos sueltos o en continua.

No hay consenso sobre el uso de tutores en las anastomosis porque se ha demostrado que los propios catéteres provocan fenómenos inflamatorios que promueven cicatriz y/o sangrado. La mayoría de los autores solo los

aconsejan cuando los conductos a anastomosar son muy finos (menor a 2-3 mm), o la anastomosis es compleja o de mala calidad. Si hay que utilizar un catéter para drenar el árbol biliar, es mejor colocarlo proximalmente a la anastomosis sin atravesarla. Los que promueven su uso, generalmente externo a través del hígado, aconsejan mantenerlo durante muchos meses (entre 6 y 9), con lo que consiguen un porcentaje de estenosis bajo (9%) pero con elevada morbilidad, principalmente infección recurrente y deterioro de la calidad de vida (incomodidad, cambio de catéter, lavados frecuentes, etc). También se puede utilizar un tutor perdido dentro del asa, fijándolo con un punto de material reabsorbible a la mucosa yeyunal que se eliminara con el tiempo. Otros, en lugar de tutores, prefieren fijar el extremo ciego del asa yeyunal a la pared abdominal para tener acceso a la hepaticoyeyunostomia, si fuera necesario, a través de dicha asa <sup>12</sup>.

Las complicaciones precoces de la cirugía oscilan entre el 19 y el 42% siendo las más frecuentes colangitis (7,5%), bilioma-absceso (9%), fistula biliar (10%), infección de la herida (19%) y complicaciones pulmonares (25%), aunque en la mayoría de los casos se resuelven con tratamiento conservador. A largo plazo, entre el 19-30% de pacientes presentaran complicaciones: estenosis, colangitis, atrofia del parénquima, estenosis biliares intrahepaticas, cirrosis biliar secundaria e hipertensión portal. Las estenosis (17%) representan el 90% de estas complicaciones tardías, apareciendo generalmente en el primer año. La hipertensión portal y la cirrosis biliar secundaria (10%) también pueden aparecer a largo plazo, generalmente asociadas a varios intentos de reparación. En los casos de cirrosis biliar secundaria, sobre todo si se asocia a hipertensión portal, hay que valorar el trasplante hepático más que una reconstrucción.

Tratamiento a largo plazo. La presentación tardía más habitual es la estenosis biliar con clínica de ictericia o más frecuentemente de colangitis, que afectan de forma importante la calidad de vida. La mayoría de las estenosis, cuando la técnica ha sido adecuada, lo son por isquemia.

La estenosis necesita un buen tratamiento porque su manejo inadecuado puede llevar a graves complicaciones tales como colangitis recurrentes, atrofia hepática o cirrosis biliar secundaria. Si se ha desarrollado

ésta última, hay que valorar trasplante hepático más que la reconstrucción, especialmente si hay hipertensión portal.

El tratamiento ideal, de nuevo, es la hepaticoyeyunostomía en Y de Roux, con dificultad en la identificación y disección de la vía biliar, como se ha descrito previamente en el tratamiento tardío. La estenosis de la unión o muy próxima a ella, disminuyen las posibilidades de éxito. En lesiones muy altas podemos encontrarnos con múltiples conductos biliares pequeños en el parénquima hepático imposibles de anastomosar, por lo que es necesario hacer una portoenterostomía a la placa hiliar con tutores mantenidos hasta 18 meses. Esta intervención debe ser el último recurso, pues se acompaña de alta morbimortalidad y pobres resultados.

Si la estenosis se asocia con atrofia hepática y colangitis, se aconseja realizar resección hepática junto con la hepaticoyeyunostomía.

El tratamiento definitivo con prótesis percutáneas o endoscópicas, -nunca en estenosis de la unión-, presenta peores resultados que la cirugía con cifras de éxito entre 60-76% a largo plazo (3 años), con gran afectación de la calidad de vida e importante morbilidad (72%), incluido un 10% de perforaciones. La mayoría requiere numerosas dilataciones (1-10) y cambios de catéter cada 3-4 meses, y no está establecido cuanto tiempo deben dejarse las prótesis, aunque al menos se recomienda entre 9 y 12 meses. La recurrencia, generalmente en los dos primeros años, es la regla.

El éxito elevado de la reparación quirúrgica (>90%) no quiere decir que la lesión de la vía biliar ya no sea un problema pues la morbilidad sigue siendo muy elevada con importante afectación de la calidad de vida y el gasto económico.

Como hemos podido apreciar, las lesiones de las vías biliares transforman un problema patológico importante como es la colelitiasis en una patología muy grave de imprevisible evolución. La desproporcionada diferencia entre la expectativa de resultados que habitualmente tienen los pacientes que van a someterse a una colecistectomía laparoscópica con el desarrollo de una lesión iatrogénica, hace que debamos extremar los aspectos técnicos de estas cirugías con objeto de disminuir su incidencia.

Por último, en casos de certeza diagnóstica deberemos plantear las diversas posibilidades de reparación siempre bajo la premisa de contar para ello con las personas más expertas y capaces <sup>9,10,11</sup>.

### **Anastomosis biliar en el trasplante hepático en la actualidad**

En el inicio del trasplante hepático clínico, la anastomosis biliar fue el punto débil de esta técnica. Hoy en día sigue planteando uno de los principales aspectos técnicos que han de considerarse, teniendo especial cuidado en su realización.

Después de haber probado técnicas esotéricas (anastomosis colecistoyeyunales sobre asa en “Y”, *doble conducto de Calne*, etc.) el principio en el que se basa esta técnica quirúrgica es el de hacer una reconstrucción simple y fisiológica respetando los principios de la cirugía biliar convencional.

Primero se realiza la colecistectomía en el hígado donante y posteriormente se realiza la anastomosis biliar del injerto. Es aconsejable evitar la tensión entre los extremos de las suturas, conseguir la máxima concordancia y alineación posibles entre ambas bocas anastomóticas y asegurar una vascularización adecuada de los bordes.

La elección de la técnica de la reconstrucción biliar depende de las condiciones anatómicas. Cuando los extremos coledocianos están sanos y bien vascularizados, además de grandes y suficientemente largos para permitir una anastomosis sin tensión, entonces se puede realizar una anastomosis coledococoledociana terminoterminal. En el caso contrario se recurrirá a una anastomosis biliodigestiva.

*Anastomosis coledococoledociana terminoterminal.* Se realiza en los conductos finos con la ayuda de puntos separados de hilo reabsorbible de 5 o 6 ceros, si es posible monofilamento. Se debe proteger con un dren en “T” (Kehr), a pesar de que en un estudio controlado <sup>12</sup> haya mostrado el interés a corto plazo de no utilizar drenaje. Sin embargo la presencia de un dren en la vía biliar permite controlar la existencia de un flujo biliar en los primeros días del postoperatorio y ofrece la posibilidad de opacificar la vía biliar

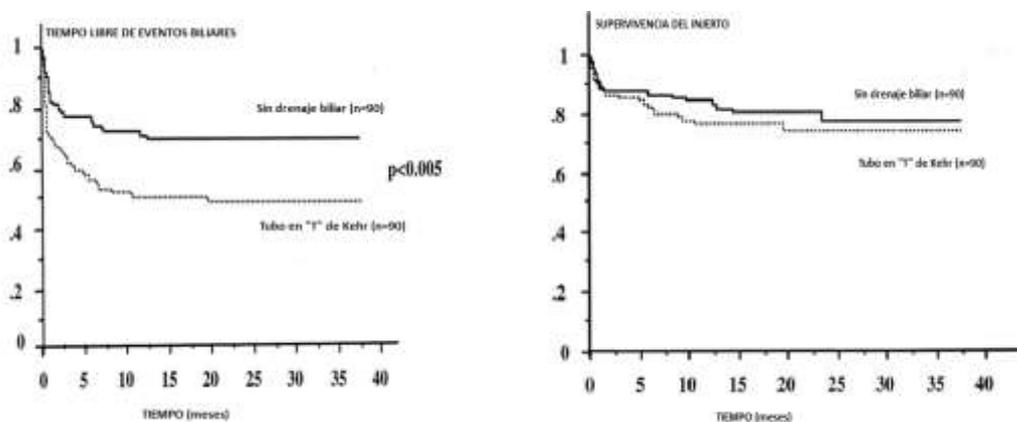
intrahepática en caso de complicación o duda sobre el estado de las anastomosis (figura 12).



**Figura 12:** *Anastomosis coledococolédociana terminoterminal. Cuando las condiciones anatómicas lo permitan, no será necesario poner un drenaje (a). Si no, es mejor proteger la anastomosis con un dren en “T” cuya rama vertical salga por el segmento distal del cóledoco (b) o a través de la anastomosis (c). (Orden a,b,c, de izquierda a derecha)(EMQ).*

En relación con esta última tendencia, autores como Boudjema et al. se decantan por no utilizar sistemáticamente un drenaje de la vía biliar, ya que comunican una mayor morbilidad asociada a este técnica frente al número de complicaciones biliares observadas en pacientes trasplantados que no portan este drenaje. Así han aparecido algunas publicaciones <sup>8, 9, 11, 12</sup> en las que se muestra una incidencia menor de complicaciones en los pacientes sin drenaje biliar con una mortalidad incluso levemente inferior, por lo cual, abogan directamente por la no realización de esta técnica <sup>12</sup>. A pesar de estos datos tan esperanzadores, otros grupos <sup>10</sup> siguen defendiendo la instauración de un drenaje biliar, puesto que este facilita la monitorización de la producción biliar diaria (importante sobre todo en los primeros días postrasplante), prevenir la estenosis de la anastomosis sobre todo en situaciones de disparidad de calibre, así como una vía de abordaje directa, para solucionar complicaciones

secundarias relacionadas o no con la técnica quirúrgica y la anastomosis biliar del mismo, como la desalineación o tensión de los cabos (figura 13).

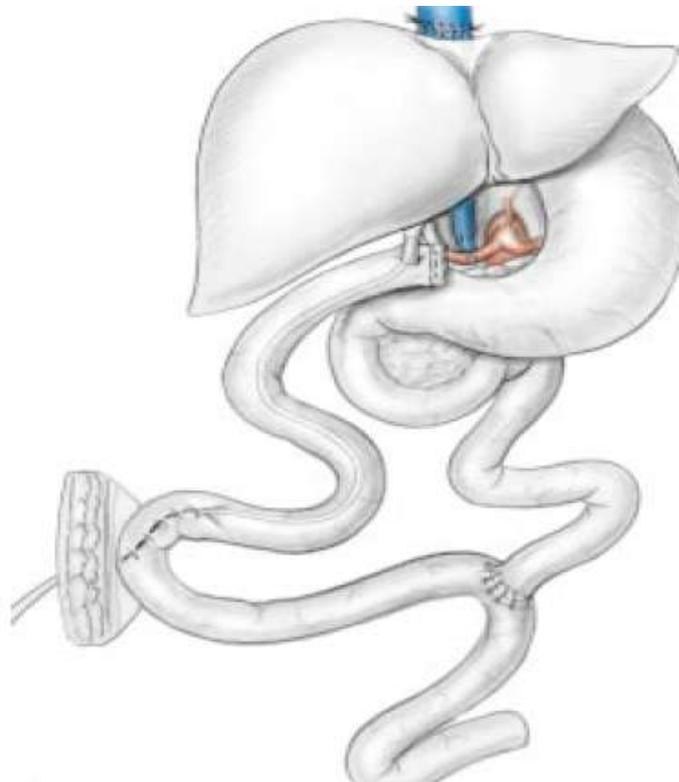


**Figura 13:** Izquierda, gráfica sobre las complicaciones biliares que aparecen en ambos grupos (pacientes con drenaje biliar, pacientes sin drenaje biliar), en el que se muestra el mayor tiempo libre de complicaciones biliares en el grupo sin tubo en “T” de Kehr. Derecha, tiempo de supervivencia del injerto hepático en función del grupo de estudio al que pertenecen <sup>12</sup> (Randomized trial of choledochocolocholeostomy with or without a T tube in orthotopic liver transplantation. Scatton O, Boudjema K, et al. Service de Chirurgie, Hôpital Cochin, Assistance Publique, Paris, France. *Annals of Surgery* 2001 Mar; 233(3):432-7).

Anastomosis coledococoledociana laterolateral. Asegura las estenosis anastomóticas. En su contra requiere un colédoco largo en el lado del injerto y, por tanto, la anastomosis acaba en una zona mal vascularizada.

Anastomosis biliodigestiva. Esta técnica se emplea sobre todo cuando la vía biliar del receptor no se puede utilizar o es patológica. Se realiza sobre un asa yeyunal montada en “Y” según la técnica de Roux. La implantación del colédoco es terminolateral con la ayuda de puntos separados de hilos reabsorbibles finos, sobre el borde antimesentérico del asa a 1 cm de su extremidad proximal. Generalmente se prefiere drenar la vía biliar según la

técnica de *Voelcker* con la ayuda de un drenaje (tipo transcístico nº 5) exteriorizado en la base del asa donde se tunelizan 2 o 3 cm (figura 14) <sup>10,11,12</sup>.



**Figura 14:** *Anastomosis biliodigestiva sobre un asa montada en “Y” y drenaje de Voelcker (Tomado de EMQ).*

# Medicina Regenerativa. Biomateriales

---

## 1.6. CONCEPTOS. INTRODUCCION.

En las últimas décadas del siglo XX se ha impulsado el desarrollo de biomateriales gracias a la alianza de la medicina con disciplinas como la ingeniería, la biología molecular y la bioquímica. Las técnicas de caracterización y el estudio del comportamiento celular han propiciado un conocimiento que ha permitido la utilización de materiales inertes para la sustitución de tejidos y el desarrollo de materiales bioactivos y biodegradables para la reparación de los mismos. En la actualidad, el uso de biomateriales con fines regenerativos está ampliamente extendido en el campo de la Biomedicina.

La pérdida de estructura o función de los tejidos y órganos ha supuesto un motivo de preocupación continua que se intenta solventar mediante trasplantes, injertos autólogos, prótesis y regeneración tisular<sup>14</sup>. La medicina regenerativa es una nueva disciplina que trabaja con una metodología propia e incluye tres campos fundamentales: la regeneración tisular guiada, la terapia celular y la ingeniería tisular <sup>15,16,17,18</sup>.

La regeneración tisular guiada consiste en la reparación de defectos tisulares utilizando la capacidad reparadora del propio tejido o de los tejidos circundantes. En general, las células que se pueden utilizar en terapia celular, son de origen autólogo (del propio individuo) o heterólogo (de un donante), pudiéndose aplicar de forma sistémica o local (*in situ*).

Por otro lado, la ingeniería tisular consiste en la creación de *equivalentes tisulares o constructos* de diseño a medida en el laboratorio. Precisa tener un conocimiento completo de todos los factores a los que van a estar sometidos los tejidos como pueden ser las fuerzas biomecánicas, el estrés y envejecimiento <sup>18</sup>. Estos tejidos, al ser colocados en el lugar del implante in vivo, encontrarán el medio ambiente adecuado para diferenciarse y constituir un tejido definitivo o adulto similar al que se pretende suplantar.

A grandes rasgos, la ingeniería tisular utiliza tres fuentes principales para generar un equivalente: las células madre, los biomateriales y los factores de crecimiento <sup>18</sup>.

### 1.7. CELULAS MADRE

En las últimas décadas, y sobre todo en los últimos años, múltiples son las aplicaciones que han intentado emplear como materia prima las células madre, pero a pesar de su probada funcionalidad, tradicionalmente han tenido fuertes restricciones debido a las numerosas connotaciones éticas y legales que conllevan, aunque en la actualidad son muchos los campos de la medicina en las que se está probando su gran utilidad <sup>15,16,18</sup>. Estas mismas son capaces de generar cualquier tipo celular dentro de un ambiente microcelular adecuado y específico, siendo capaces pues de reproducir *in vitro* tejidos humanos de idénticas cualidades a las producidas *in vivo*. La multiplicación celular que son capaces de desarrollar ha de ser minuciosamente vigilada puesto que pueden producir una expansión monoclonal autóloga que degeneraría en un proceso neoproliferativo <sup>18,19</sup>.

Así mismo, estudios precedentes de regeneración del árbol biliar mediante el empleo de constructos biocompatibles, han utilizado células madre inmersas en el espesor de la bioprótesis para favorecer el crecimiento celular dentro y fuera del mismo para, de este modo, intentar agilizar la

división celular o incluso realizar un atisbo en la creación *in vitro* de tejidos humanos artificiales <sup>19</sup>.

A pesar de las diversas clasificaciones que se han establecido para la denominación de las células madre, no debemos olvidar que todo su poder regenerativo y de división celular vendrán determinados siempre por el lugar de origen de donde son extraídas.

## 1.8. BIOMATERIALES

La mayoría de los tejidos y órganos requieren de una estructura tridimensional en la cual estén inmersas las células. En el caso de los tejidos artificiales generados en el laboratorio, esta estructura tridimensional o de soporte se denomina matriz extracelular o “*scaffold*”. La función principal de esta matriz extracelular artificial debería ser similar a la de la matriz extracelular natural, promoviendo la proliferación, la diferenciación y la biosíntesis de las células inmersas en ésta o en sus proximidades. Estas estructuras tridimensionales se consiguen de manera convencional mediante el uso de biomateriales de distintas composiciones y disposiciones.

Biomaterial se define como aquella sustancia o combinación de sustancias (excluyendo los fármacos) que pueden ser utilizadas durante un cierto periodo de tiempo en sustitución de cualquier tejido, órgano o función del cuerpo humano. Por lo tanto, éste término designa a un conjunto de materiales diseñados para interactuar con los sistemas biológicos, para aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del organismo humano <sup>13, 20</sup>.

En la bioingeniería de tejidos, la generación de tejidos artificiales de naturaleza conectiva, epitelios, dermis, tejidos derivados del endodermo, etc., requieren la utilización de algún tipo de material que actúe como sustituto de la matriz extracelular del tejido nativo <sup>21</sup>. Aunque son productos caracterizados por su gran diversidad, todos ellos presentan unas propiedades comunes para poder ser incorporados al organismo vivo <sup>20, 21</sup>:

- No ser un material **toxico** ni **carcinogénico**. Los estudios sobre citotoxicidad son realizados en fases iniciales con objeto de detectar posibles efectos negativos sobre el comportamiento celular <sup>20</sup>.
- **Bioestabilidad**. Mantenimiento de sus propiedades físicas y químicas durante el tiempo programado según la necesidad para la que ha sido diseñado. La estabilidad estructural y funcional del material debe igualmente mantenerse durante el procesado y almacenaje <sup>21</sup>.
- **Biocompatibilidad**.
- El material deber ser **esterilizable** sin que se vea afectado el producto final.
- Deben contar con **propiedades mecánicas** como la permeabilidad, estabilidad, elasticidad, flexibilidad y plasticidad que permitan fabricar diferentes formas o estructuras tridimensionales solidas <sup>22,23</sup>.
- Deben poseer una superficie química dinámica que permita promover las interacciones célula-sustrato, favoreciendo el crecimiento tisular <sup>24,25</sup>.
- Deben poseer unas propiedades mecanicas adecuadas que permitan **la adhesión celular y la activación de los diferentes factores de crecimiento** <sup>24,25</sup>.

Los biomateriales de uso en ingeniería tisular se dividen en tres grupos principalmente: biogénicos o biológicos, sintéticos y semisintéticos.

Los **materiales biogénicos** incluyen matrices acelulares como el colágeno, alginato, agarosa, glicosaminoglicanos, y fibrina <sup>26,27,28,29</sup> . Los **sintéticos** incluyen ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polietilenglicol, poli dimetil-siloxano, los de tipo aromático con base de poli-éter como el poliuretano termoplástico, polietileno tereftalato, politetrafluorado, poli vinilideno-fluorado y varios hidrogeles <sup>30,31,32</sup>. Finalmente, los materiales **semisintéticos** son una combinación de materiales biogénicos y de polímeros sintéticos <sup>33</sup>.

Además, atendiendo a su estructura, los principales biomateriales para uso en ingeniería tisular pueden clasificarse como fibrosos, poliméricos y mixtos.

### **Biomateriales fibrosos**

Los biomateriales fibrosos más conocidos son, probablemente, el colágeno y la fibrina.

El *colágeno* constituye el componente fundamental del tejido conectivo y es la proteína más abundante en los mamíferos. Está constituido por tres cadenas polipeptídicas compuestas por unidades de glicina, hidroxiprolina y prolina conformando una triple hélice que posteriormente se agrupa para formar fibrillas de diferente longitud y espesor. Presenta propiedades mecánicas, químicas y biológicas ideales para su utilización como biomaterial. Entre ellas destacan su elevada fuerza tensil, la posibilidad de formación de geles por retención de agua, es fácilmente degradado por colagenasas, favorece la adhesión tisular y es capaz de producir la activación de los componentes del sistema de coagulación. Tiene un aspecto blanco-nacarado y son flexibles pero no elásticas. Es insoluble a temperatura ambiente. Cuando son iluminadas, tienen capacidad de desviar la luz polarizada (birrefringente). El plano de la luz polarizada determinará el brillo de la fibra colágena.

Puede ser procesado para obtener diferentes formatos como esponjas, geles, y láminas. Además, cuando es sometido a entrecruzamiento con otros productos químicos, se puede variar su resistencia y su velocidad de degradación. Una de las reacciones más utilizadas es el entrecruzamiento con di-aldehídos, principalmente glutaraldehído, para conseguir sistemas

débilmente entrecruzados que pueden ser moldeados con formas y perfiles adecuados a su aplicación. Los productos de colágeno ofrecen la posibilidad de ser combinados con factores de crecimiento u otros agentes estimuladores para acelerar el proceso de cicatrización.

Al microscopio óptico sin teñir se ven con cierta dificultad. Son estructuras alargadas, con alguna ondulación y una estriación longitudinal. Con hematoxilina-eosina se tiñe con eosina. También se utilizan técnicas selectivas como Van Giesen (rojo), tricromico de Mallory (azul), tricromico de Masson (verde), tricromico de Gallego (Azul-Verdoso) y, a veces, adquieren una discreta PAS positividad. Las fibras colagenas se disponen formando haces de 20 a 30  $\mu$ . Las estriaciones longitudinales nos indican que los haces están constituidos por una unidad menor, las fibras. Éstas varían entre 1 y 10  $\mu$  de diámetro y están formadas a su vez por fibrillas que poseen un diámetro oscilante entre 0,2-0,5  $\mu$ . La disposición puede ser aisladas o formando redes. En otras ocasiones estas fibras se agrupan formando haces los cuales se pueden disponer de forma ordenada en paralelo (tendones) o de forma ordenada en láminas (fascias musculares, cornea, anillos fibrosos). En las láminas, los haces están paralelos entre sí, pero con respecto a la lamina vecina, se encuentran formando entre sí casi 90°. Los haces pueden formar redes de forma desordenada como en el caso de la dermis.

Al microscopio electrónico podemos observar que las fibrillas (0,2-0,5  $\mu$  de diámetro) están compuestas a su vez por microfibrillas que son siempre extracelulares y solamente pueden ser visualizadas al microscopio electrónico. Tienen un diámetro de gran variabilidad, 200-1000 Å y poseen una estriación transversal. En función de los porcentajes de aminoácidos que lo conforman (tropocolageno, lisina, prolina y glicina) se distinguen siete tipos de cadena  $\alpha$ , según las cuales se han descrito 13 tipos de colágeno <sup>4, 34</sup>.

### **Biomateriales poliméricos**

Los más conocidos son aquellos que constan de largas cadenas de monómeros de hidrato de carbono como la glucosa. Algunos de ellos son:

La *agarosa*, obtenida a partir de la pared de ciertas algas marinas del grupo *Rhodophyceae*, sobre todo *Gracillaria* sp. y *Gellidium* sp.<sup>37</sup>.

El *quitosán* o *chitosán*, en la actualidad es uno de los biomateriales más utilizados en la biomedicina. Se presenta en forma de quitina, la cual se considera la segunda forma más abundante de carbono que se encuentra en la naturaleza tras la celulosa. Constituye el componente orgánico del esqueleto de los invertebrados y en menor cantidad se encuentra en la pared celular de hongos, bacterias, levaduras y en las cutículas de insectos. La capacidad del chitosán para formar películas o soportes, así como sus propiedades mecánicas, su actividad antibacteriana intrínseca<sup>36, 37</sup> y su baja tasa de biodegradación ha permitido su extensa aplicación. Es un material abundante, renovable y su producción es de bajo coste. Ha sido utilizado en la encapsulación de fármacos, como inhibidor de la coagulación de la sangre, en sustitutos artificiales de la piel, como apósito en el tratamiento de las quemaduras y en la fabricación de lentes de contacto<sup>37</sup>.

### **Biomateriales Mixtos**

La combinación de diferentes tipos de biomateriales permite controlar algunos de los problemas asociados a cada uno de ellos. Entre las diferentes combinaciones existentes, los biomateriales mixtos de fibrina/colágeno y agarosa han demostrado su utilidad en la generación de tejidos humanos artificiales para su posible uso clínico en medicina<sup>38,39,40</sup>.

#### 1.9. FACTORES DE CRECIMIENTO

Múltiples proteínas juegan un papel importante en la proliferación y diferenciación de las células. Estas proteínas son secretadas de forma endógena por las células o bien son el resultado de señales paracrinas con células vecinas. Estas proteínas son llamadas factores de crecimiento. Los factores de crecimiento que han sido frecuentemente usados son,

fundamentalmente, la proteína morfogenética ósea (BMP), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF ó FGF-2), el factor de crecimiento vascular epitelial y el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>39, 40</sup>.

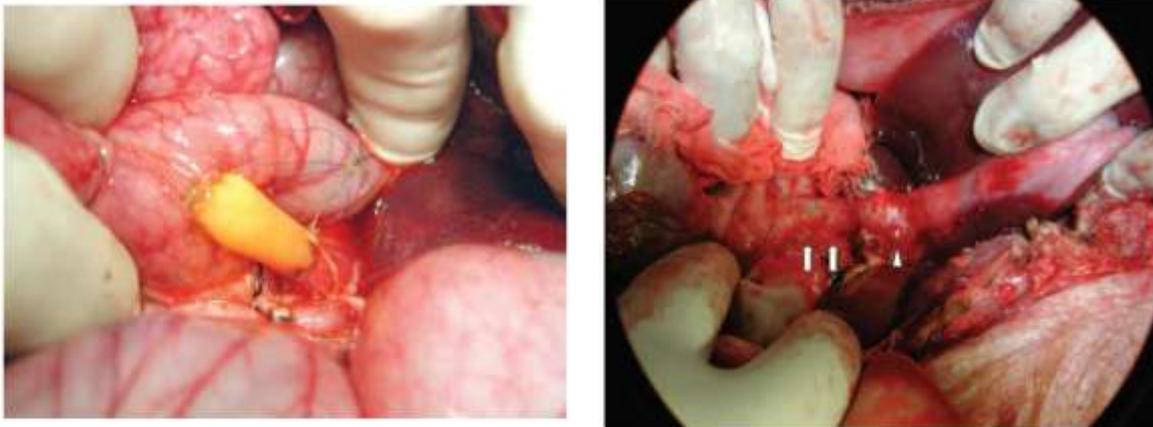
Por otra parte, la adición de los factores de crecimiento adecuados a las células y a la matriz extracelular artificial, promueve la regeneración de los tejidos en comparación con aquéllos en los que no existen estos factores de crecimiento <sup>40, 41, 42</sup>.

#### 1.10. LA MEDICINA REGENERATIVA EN LAS LESIONES DE LA VIA BILIAR Y SU REPARACION EN LA ACTUALIDAD.

En los últimos años poco se ha publicado y pocos han sido los intentos de crear conductos artificiales biliares <sup>39, 43, 44</sup> (*Shimono K, Nose Y. The need to develop artificial bile ducts. Artif Organs 1995; 19: 115-116. // Xu , Sun Z, Zhang Q et al. Experiment for a polyurethane replacement of the common bile duct. Chin Med J 1998; 11: 86-87. // Rosen M, Ponsky J. Small intestinal submucosa as a bioscaffold for biliary tract regeneration. Surgery 2002; 132: 480-487*). Sin embargo en algunas aéreas de investigación determinados grupos han conseguido utilizar con buenos resultados polímeros biocompatibles para crear vasos sanguíneos <sup>40</sup> (*Teebken OE, Haverich a. Tissue engineering os small diameter vascular grafts. Eur J Vas Endovasc Surg 2002; 23: 475-485*) e incluso intestino delgado <sup>45</sup> (*Kahaira S, Kim S. End-to-end anastomosis between tissue-engineered intestine and native small bowel. Tissue Eng 1999; 5: 339-346*).

Las últimas publicaciones aparecieron tras el uso bioclínico de las células madres. Mitsuo Miyazawa<sup>19</sup> publicó una serie de resultados obtenidos al interponer en la vía biliar nativa de 12 cerdos un tubo de caprolactona/ácido poliláctico sembrados con células madre de médula ósea (BMC) (figura 15) (*A Tissue-Engineered Artificial bile duct grown to resemble the native bile duct. Am J Transplant 2005; 5: 1541-1547*). Realizó además un

defecto en la vía biliar reparándolo con el constructo formado <sup>46</sup>. Comparó los resultados con 6 animales control, en los cuales se utilizó el mismo constructo pero sin siembra de células madre.



**Figura 15:** Izquierda, constructo de caprolactona/polilactico empleado en el estudio, interpuesto entre la vía biliar principal y el duodeno. Derecha, mismo constructo con células madre de médula ósea (Miyazawa M.A Tissue-Engineered Artificial bile duct grown to resemble the native bile duct. *Am J Transplant* 2005; 5: 1541-1547).

Miyazawa estudió parámetros bioquímicos como los niveles séricos de bilirrubina y enzimas hepáticas (tabla 4); así mismo realizó un estudio histológico de los especímenes para valorar la integración tisular. No se estudio radiológicamente la funcionalidad de la prótesis así como tampoco se llevo a cabo el estudio de posibles repercusiones histológicas a nivel hepático.

	Six weeks after Tx		Ten weeks after Tx		Six months after Tx	
	BMC(+) (n = 2)	BMC(-) (n = 2)	BMC(+) (n = 5)	BMC(-) (n = 2)	BMC(+) (n = 5)	BMC(-) (n = 2)
ALT (IU/L)	36.0 (34.0-38.0)	34.4 (33.5-35.2)	33.0 (26.5-36.5)	31.4 (26.5-36.2)	22.0 (19.6-28.0)	23.0 (19.3-26.6)
ALP (IU/L)	326 (298-354)	348 (326-370)	310 (269-345)	273 (266-280)	243 (198-290)	179 (165-192)
T-Bil (mg/dL)	0.9 (0.8-1.0)	0.8 (0.7-0.9)	0.9 (0.7-1.1)	0.9 (0.8-0.9)	0.9 (0.6-1.0)	0.8 (0.7-0.8)

Tx = transplantation.

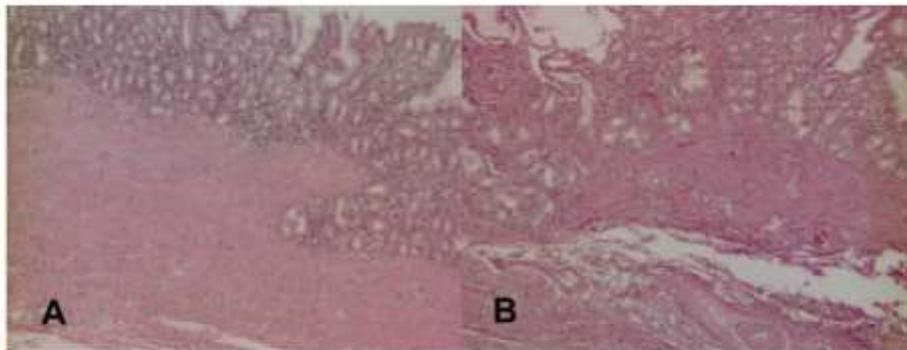
\*Results are presented as median (range).

**Tabla 4:** Cambios en las enzimas hepáticas y bilirrubina sérica presentes en ambos grupos de estudio. (Miyazawa M.A *Tissue-Engineered Artificial bile duct grown to resemble the native bile duct. Am J Transplant* 2005; 5: 1541-1547).

En este estudio, todos los cerdos sobrevivieron hasta el momento de su sacrificio planteado al inicio del estudio (6 semanas). Todos ellos tuvieron una ganancia ponderal de peso similar a aquellos animales que no sufrieron ningún tipo de lesión. La determinación de los niveles séricos en el momento del sacrificio (tabla 4) no mostró ningún tipo de diferencia, encontrándose todos los valores en los límites normales de la especie en los 18 sujetos del estudio.

En cuanto al análisis histológico, se observó que el constructo estaba completamente degradado a las 6 semanas y que la nueva vía biliar formada era muy delgada. El epitelio que lo recubría era similar al nativo aunque la presencia de los *sáculos de Beale* no estaba presente, así como tampoco un tejido conjuntivo organizado bajo éste epitelio. A las 6 semanas persistían hallazgos de un gran componente inflamatorio en los tejidos adyacentes. Estas circunstancias fueron similares en los dos grupos (figura 16 y 17).

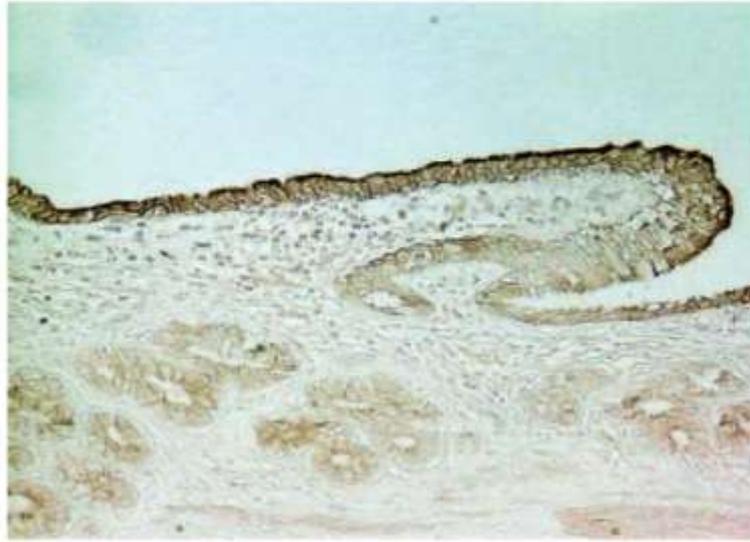
Las técnicas inmunohistoquímicas únicamente mostraron cierta positividad para la citoqueratina CK19 en las porciones recién formadas del epitelio biliar (figura 18) con mayor intensidad que la encontrada en la vía biliar nativa. Ambos hallazgos son similares a ambos grupos: al que se implantó el constructo con BMC, como aquel que no tenía siembra de BMC.



**Figura 16:** *a*, Constructo/BMC. *b*, Solamente constructo. En ambos grupos no se observa la presencia del biopolímeros. Se observa un epitelio cúbico simple con vellosidades. Bajo él, no se observa la presencia de tejido glandular. Nótese la irregularidad del epitelio. Hematoxilina-Eosina, MO. (Miyazawa M.A Tissue-Engineered Artificial bile duct grown to resemble the native bile duct. *Am J Transplant* 2005; 5: 1541-1547).



**Figura 17:** Corte longitudinal de la vía biliar extrahepática. Se observa la delgadez del epitelio neoformado (flecha) en comparación con el epitelio nativo (punta de flecha). Hematoxilina-Eosina, MO. (Miyazawa M.A Tissue-Engineered Artificial bile duct grown to resemble the native bile duct. *Am J Transplant* 2005; 5: 1541-1547).



**Figura 18:** Positividad para técnica inmunohistoquímica CK19. Se observa la mayor positividad de la técnica en el neopitelio (izquierda) frente al epitelio biliar nativo (extremo derecho). CK19-staining, MO. (Miyazawa M.A Tissue-Engineered Artificial bile duct grown to resemble the native bile duct. *Am J Transplant* 2005; 5: 1541-1547).

Este primer estudio abrió nuevas vías para poder desarrollar una alternativa terapéutica a las patologías que afectan la vía biliar. Los constructos desarrollados mediante ingeniería tisular adquirieron morfología y funcionalidad al igual que la vía biliar nativa a partir de las 6 semanas de implantación. Aunque no se realizaron estudios morfológicos-funcionales (Colangiografía, colangioRM, ColangioTAC), podemos inferenciar que se alcanzó una biocompatibilidad suficiente puesto que las enzimas séricas de bilirrubina y hepáticas, no mostraron ninguna diferencia.

## 2. Hipótesis.

---

El fin de la medicina es procurar curación y alivio, salvaguardar la salud y la dignidad. Trabajando en el campo de la patología de la vía biliar y de la medicina regenerativa, nuestro grupo abordó la pregunta: *¿Es posible la sustitución de la vía biliar principal por algún tipo de material?*

Desarrollar un conducto biliar artificial para emplearlo como conducto alternativo y/o de recambio de la vía biliar principal, permitiría preservar las funciones biológicas evitando de este modo las comorbilidades asociadas a las técnicas quirúrgicas actuales. Del mismo modo se podrían desarrollar parches de un mismo material que preservando las características de las vías biliares, permitiera la reparación de las lesiones iatrogénicas y patológicas de éste tracto.

Hasta el momento, la patología grave de la vía biliar (tumoral, procesos inflamatorios severos, lesiones, etc.), trae consigo una alta morbimortalidad en los pacientes planteando soluciones técnicamente difíciles si no imposibles. En muchos casos desembocará en trasplante hepático pero, incluso éste, puede fracasar a causa de alteraciones en el drenaje biliar por la dificultad en la anastomosis.

# 3. Objetivos.

---

Los objetivos planteados en esta tesis doctoral son los siguientes:

## OBJETIVO GENERAL:

Valorar la utilidad terapéutica de un nuevo modelo de conducto biliar desarrollado mediante el uso de biomateriales de colágeno y agarosa, en un modelo experimental de lesión del conducto biliar principal extrahepático con defecto crítico de aproximadamente un centímetro.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1.- Establecer un **modelo experimental de lesión de la vía biliar principal extrahepática en el que exista un defecto** que impida la reparación directa en animales de laboratorio, útil para la evaluación de protocolos de medicina regenerativa.

2.- Diseñar un **conducto biliar artificial** elaborado mediante **técnicas que permitan la combinación de biomateriales de agarosa y colágeno** para tratar lesiones biliares en modelos animales experimentales, y desarrollar un material biocompatible que permita preservar las funciones fisiológicas y biológicas en su empleo en las reparaciones de la vía biliar.

3.- **Evaluar los resultados clínicos y funcionales** de la aplicación de técnicas de regeneración tisular para la reparación del conducto biliar

principal extrahepático mediante estudios bioquímicos y radiológicos estandarizados para las lesiones extrahepáticas en el modelo animal escogido.

4.- ***Desarrollar un procedimiento terapéutico de uso quirúrgico*** que permita ser empleado en la reparación de la vía biliar extrahepática para todo tipo de patología que requiera su extirpación y/o reparación de ésta solución de continuidad.

# 3. Objectives.

---

The aims that appeared at the beginning of this doctoral thesis were:

## GENERAL AIM:

To demonstrate the therapeutic usefulness of a new model of biliary conduit developed using collagen-agarose biomaterials in an experimental model of extrahepatic bile duct injury with critical fault of approximately one centimeter.

## SPECIFIC AIMS:

1.-To establish an **experimental model of injury in the extrahepatic bile ducts, in which exists a fault that prevents direct repair**, useful for regenerative medicine protocol's evaluation.

2.- To generate a **biliary artificial conduit** elaborated by **technologies that allows collagen-agarose biomaterials combination** to treat biliary injuries in experimental animal models. These materials allows to preserve the biological functions in his employment for the repairment of the biliary tract.

3.- **To evaluate the clinical and functional results** of the application of technologies in the tissue regeneration applied to the repair of the biliary main conduit using standardized biochemical and radiological studies for the extrahepatic injuries in the selected animal model. To develop biliary artificial

conduits with biological analogy that would allow its substitution instead of autogenous biliary tract.

**4.- To develop a powerful therapeutic weapon** that could be used in the repairment of the biliary tract in all pathology-kind that will need extirpation and / or repair of its continuity.

**5.- To open the doors to create a valuable technical option** for the accomplishment of biliary-anastomosis in hepatic transplant, which does not produce functional alteration and allows a correct tissue integration in an immunocompromised environment; that would **avoid the development of functional alterations** that take place in the hepatic parenchyma as usually take place in the current biliodigestive surgical techniques during the patient's survival.

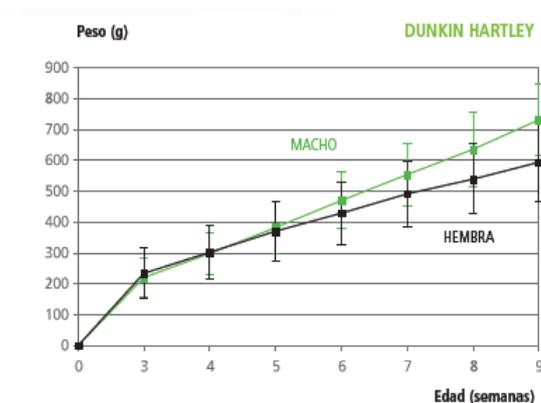
# 4. Material y Método.

## 4.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El estudio se ha llevado a cabo en 46 cobayas de la raza Dunkin Hartley obtenidas de Harlan Porcellus en 1992, cepa original del centro de investigaciones agrícolas en Compton en 1976. Se adquirieron de la empresa Harlan Laboratories Model, S.L. a través del servicio de reproducción y experimentación animal de la Universidad de Granada y se mantuvieron en los estabularios disponibles en el Departamento de Cirugía y sus Especialidades de dicha Universidad siguiendo todos los protocolos de bienestar animal y la legislación vigente al respecto.

Los cobayas ofrecen un modelo experimental adecuado ya que tienen -a diferencia de otras especies de roedores-, un árbol biliar completo similar al del ser humano con presencia incluida de vesícula biliar, lo cual facilita la identificación de estructuras biliares en animales de experimentación de tan reducido tamaño.

Todos ellos fueron adquiridos en su segunda semana de vida con un peso medio de 175 gramos, siendo intervenidos a partir de la tercera semana de vida con un peso medio superior a los 200 gramos.



**Figura 21:** Crecimiento normal de la especie Dunkin Hartley mantenidos en las condiciones especificadas por Harlan Porcellus (Compton, UK) y alimentados con dieta Teklad Global Diet 2940.

Los animales se mantuvieron en un medio controlado de humedad y temperatura con ciclos constantes y similares de luz/oscuridad. Fueron criados y mantenidos con Teklad Global Diet 2940. La gráfica corresponde al crecimiento normal de la especie en las condiciones especificadas y sin patología alguna (figura 21).

#### 4.2 MODELO DE LESION DE LA VIA BILIAR PRINCIPAL

En todos los animales de estudio se procedió a generar una lesión del árbol biliar principal bajo anestesia general. En primer lugar, en cuanto a la técnica anestésica se utilizó el siguiente protocolo:

- Atropina subcutánea 0,05 mg por kilogramo de peso.
- Acepromacina 1 mg intraperitoneal por cada kilogramo de peso.
- Ketamina 150 mg intraperitoneal por cada kilogramo de peso.

Una vez realizada la inducción anestésica y tras la inmovilización del animal de experimentación, se realizó un abordaje subcostal derecho (previo rasurado) a 0,5 centímetros del reborde costal, con una longitud determinada por los límites del apéndice xifoides y la curvatura mayor del arco costal. Se disecó la musculatura abdominal con sección de la misma y rigurosa hemostasia de los vasos perforantes y nutricios de los tejidos hasta alcanzar la capa peritoneal parietal. Se realizó apertura de la cavidad abdominal exponiéndose en primer lugar la prominente y voluminosa masa hepática que posee esta cepa de roedores. Tras levantar cuidadosamente este hígado tetralobulado, se observa una vesícula biliar voluminosa de mayores proporciones que la de la raza humana. Desde este punto y ayudados por un microscópico quirúrgico y de instrumental específico, se procede a la identificación y disección de las estructuras biliares desde la base de la vesícula, hallando un largo conducto cístico que desemboca en el tracto biliar

principal (colédoco) de unos 2-3 mm de diámetro y 15 mm de longitud aproximadamente, con una disposición craneal a los vasos hepáticos en el ligamento conjunto hepatoduodenal.

Se realizó una sección del colédoco distalmente a la inserción del conducto cístico y otra 3 mm por encima de lo que correspondería a la ampolla de Vater, eliminando la porción entre ambas. A continuación se procedió a la reparación del defecto interponiendo la prótesis de colágeno/agarosa, descrito en el apartado 4.4 de esta sección. Posteriormente se realizó cierre de la pared abdominal con sutura reabsorbible de ácido poliláctico de absorción intermedia (Dexon® de calibre 4/0) con posterior sutura de la piel mediante ágrafes metálicos quirúrgicos.

Tras la intervención, todos los animales fueron sometidos a estrictos cuidados postoperatorios incluyendo analgesia, desde el mismo momento que se produce la lesión traumática hasta el de su sacrificio.



**Figura 20:** Técnica quirúrgica para el abordaje de la vía biliar.

- 1- Colocación del animal a intervenir en decúbito supino y rasurado de la pared lateral derecha abdominal previo a la vía de abordaje.



2- Realización de incisión subcostal derecha. Disección y sección de la musculatura abdominal con hemostasia de los vasos locorregionales.



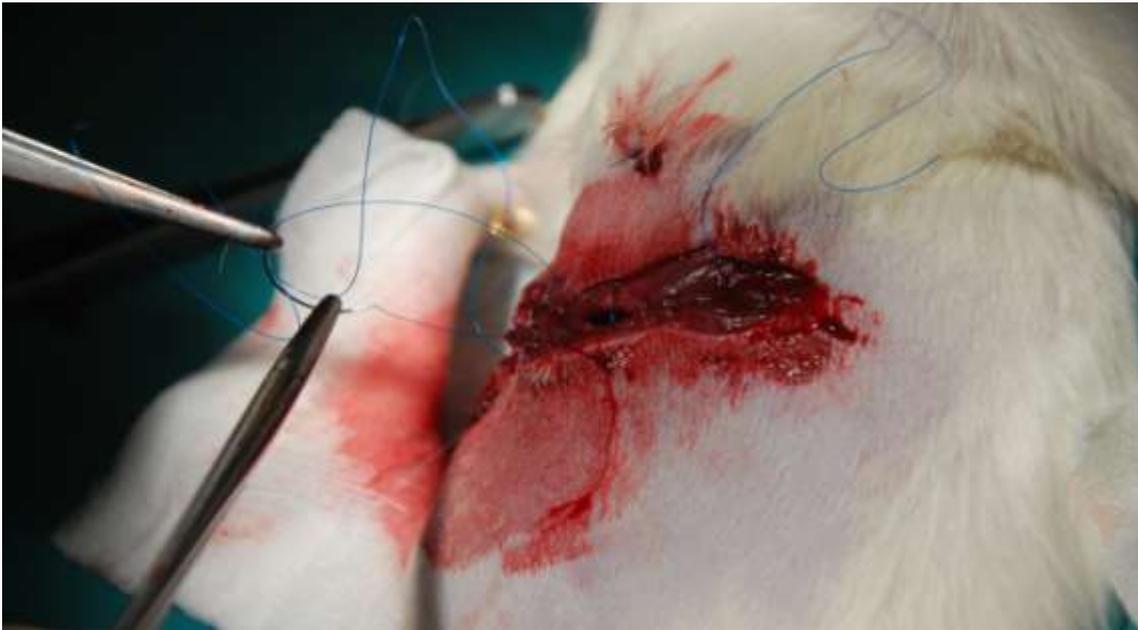
3- Apertura de la cavidad abdominal y aparición del voluminoso hígado que presenta la especie.



4- Identificación de la vesícula biliar bajo la masa hepática. Nótese las grandes proporciones de esta en contraposición de otras especies.



5- *Dissección e identificación del conducto colédoco correspondiente al cobaya tras la inserción del conducto cístico. Se observa su desembocadura en la primera porción de intestino delgado.*



6- *Cierre de la pared abdominal con sutura reabsorbible de tiempo intermedio de calibre 4/0. Cierre posterior de la piel con ágrafes quirúrgicos.*

### 4.3 GRUPOS DE ESTUDIO

En el estudio hemos establecido cuatro grupos de experimentación: un grupo control (no sometido a intervención) y otros tres grupos intervenidos cuyo criterio diferenciador ha sido el tiempo transcurrido desde la intervención hasta su sacrificio, distribuidos homogéneamente. Los tiempos de sacrificio para las diferentes observaciones se establecieron siguiendo el modelo de Miyazawa et al. <sup>19, 43</sup>.

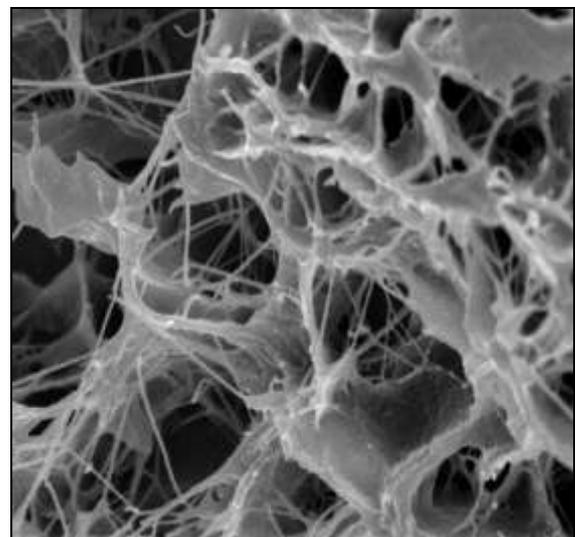
- **Grupo 1. (Grupo control).** Animales que se emplearon para conocer los valores normales séricos de bilirrubina y enzimas hepáticas, así como para el estudio de la normalidad de la especie. Fueron sacrificados paulatinamente en los mismos tiempos de estudio establecidos en los grupos siguientes (n=10).
- **Grupo 2.** Lesión de la vía biliar principal y reparación microquirúrgica mediante interposición de tubo de colágeno recubierto por agarosa suturado a ambos extremos libres del árbol biliar. Sacrificio del animal a los 7 días de la intervención. (n=12)
- **Grupo 3.** Lesión de la vía biliar principal y reparación microquirúrgica mediante interposición de tubo de colágeno recubierto por agarosa suturado a ambos extremos libres del árbol biliar. Sacrificio del animal a los 15 días de la intervención. (n=12)
- **Grupo 4.** Lesión de la vía biliar principal y reparación microquirúrgica mediante interposición de tubo de colágeno recubierto por agarosa suturado a ambos extremos libres del árbol biliar. Sacrificio del animal a los 45 días de la intervención. (n=12)

Todos los animales se mantuvieron durante el tiempo de estudio después de la intervención con comida y bebida *ad libitum*. Antes de la intervención y durante las 24 horas posteriores a la misma se administró

profilaxis antibiótica con Cefazolina intramuscular 30 mg/kg peso/12 horas. Al mismo tiempo, se instauró una pauta de analgesia con amitriptilina intramuscular (15 mg/kg/24 horas) durante los primeros 5 días tras la intervención.

#### 4.4 PRÓTESIS BIOCOMPATIBLE DE COLÁGENO/AGAROSA TRIDIMENSIONAL.

Para la generación del constructo formado por colágeno y agarosa se emplearon en primer lugar los tubos de colágeno Tipo I reabsorbible y biocompatible de uso clínico de 3 cm de longitud y 2 mm de diámetro, con un espesor de 0,5 mm y estructura tridimensional (Neuragen®, Integra Lifescience Corporation, Plainsboro, New Jersey, USA). Estos fueron recubiertos de agarosa en su capa externa (que estará en contacto con el epitelio que conforma el peritoneo visceral y parietal) para conseguir la impermeabilidad completa del tubo ya que carecen de esta característica debido a su porosidad (figura 23).



**Figura 23:** tubos de colágeno reabsorbible de uso clínico recubiertos por agarosa (imagen tomada durante la elaboración). Derecha, estructura tridimensional (fibrilar) observada mediante microscopio electrónico de barrido (facilitado por Prim S.A., Sevilla, España).

Ésta aportación se ha realizado por nuestra parte tras conocer en profundidad el comportamiento de la agarosa como base en los análisis electroforéticos, en los que se hace necesaria la utilización de un material impermeable, orgánico y que permita la migración de complejos proteicos y sustancias macromoleculares. A la hora de idear el sellado de la porosidad del tubo de colágeno, nos pareció que la agarosa era la sustancia ideal para tal fin, consiguiendo la impermeabilidad del constructo.

Para la preparación del recubrimiento se emplearon 10 ml de agarosa tipo VII especial para cultivos celulares (Sigma-Aldrich Ref. A9045) disuelta al 2% (p/v) en PBS (phosphated buffered saline) y calentada hasta alcanzar el punto de fusión. Una vez generada la mezcla, se realizó un baño del tubo de colágeno introduciéndolo cuidadosamente en ella evitando la impregnación del interior de la luz del tubo y prestando especial atención a la formación de burbujas sobre la superficie del mismo. Posteriormente, se dejaron polimerizar en reposo los tubos recubiertos de hidrogel durante aproximadamente 15 minutos después de su elaboración, siendo almacenados finalmente en estufas a 37°C hasta su utilización.

#### 4.5 REPARACION MICROQUIRÚRGICA DEL DEFECTO BILIAR MEDIANTE INTERPOSICIÓN DE PROTESIS AGAROSA/COLAGENO.

Una vez realizado el defecto biliar, en cada extremo del conducto principal seccionado se realizaron suturas con MAXON™ de calibre 9/0 (monofilamento absorbible de ácido poliglicólico sintético obtenido mediante copolímeros de ácido glicólico y carbonato de trimetileno), uniendo el tejido

conectivo del conducto colédoco con el constructo formado de colágeno y agarosa, e introduciendo en el interior del tubo los límites de epitelio de ambos cabos del colédoco; de ésta forma se pretende favorecer el contacto de las células que conforman el epitelio biliar con el colágeno presente en el interior del tubo (figura 22).

Tras comprobar la estanqueidad de ambas suturas mediante la inyección intraluminal de suero fisiológico al 0,9%, se procede a la extirpación de la vesícula biliar debido al traumatismo que sufre durante las maniobras quirúrgicas y en vistas a evitar un posible proceso inflamatorio de la misma que se interpusiera en los valores esperados del estudio.



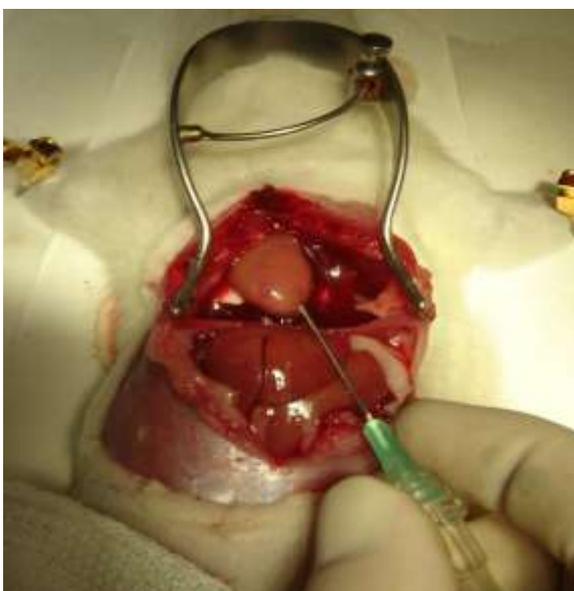
**Figura 22:** *Implantación del constructo de colágeno/agarosa mediante suturas reabsorbibles de tiempo intermedio. Detalle del aspecto de la vesícula biliar tras las maniobras quirúrgicas efectuadas para la interposición del biomaterial (flecha).*

Asociando la colecistectomía a este modelo, pretendemos conseguir un status lo más parecido posible a aquel en el que se puede hacer necesaria la reparación de la VBP, que como ha quedado expuesto en la introducción, es más frecuente en las colecistectomías tanto laparoscópicas como abiertas, así como en el trasplante hepático donde se realiza la colecistectomía de forma reglada.

#### 4.6 SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Para el sacrificio de los animales se realizó toracolaparotomía media bajo anestesia general. Se procedió a la disección del mediastino, con exposición del septo y ventrículo izquierdo cardíaco. Finalmente se produjo punción directa sobre ventrículo izquierdo de cloruro potásico (ClK Braun Sol 14,9% env 20 ml, B.Braun Medical, España) previa extracción de 15 ml de sangre para las determinaciones séricas de estudio (figura 21).

Para realizar el estudio histológico de las muestras se extrajo en bloque el árbol biliar completo desde su desembocadura en intestino delgado hasta 5 mm por encima de la localización del biomaterial. Del mismo modo se extrajo un lóbulo hepático para valorar los posibles efectos producidos por estasis biliar o derivados de la interposición de la prótesis.



**Figura 21:** Técnica de sacrificio empleada en las ratas del estudio. Tóraco-laparotomía en línea media bajo anestesia general. Disección del mediastino. Exposición del septo y ventrículo izquierdo cardíacos. Punción directa sobre ventrículo izquierdo de KCl

#### 4.7 VARIABLES DE ESTUDIO.

En cada modelo animal experimental se recogieron las siguientes variables:

**1.- Parámetros clínicos:** se estudiaron las curvas de evolución de ganancia ponderal, recogiendo cada semana los valores que presentaba cada animal para, de este modo, valorar posibles efectos indirectos por variaciones digestivas al enfrentarlos con los casos control.

**2.- Estudio Bioquímico sanguíneo:** se recogieron muestras sanguíneas de cada animal en el momento de sacrificio tal y como se ha especificado anteriormente. Se analizaron los parámetros de fisiología biliar (Bilirrubina Total, Fosfatasa Alcalina) y función hepática/pancreática (Glucosa, GGT, GOT, GPT, Amilasa) de todos los grupos que conforman el estudio. A continuación se describe el proceso de análisis de los niveles sanguíneos de dichos parámetros.

Se realizaron las tomas de muestras sanguíneas mediante tubos de ensayo específicamente diseñados para la venopunción y el análisis bioquímico (Vacutainer™, Becton, Dickinson and Company), libres de anticoagulante que contienen trombina, la cual facilita la coagulación de elementos sanguíneos y permite separar rápidamente el suero de la sangre para la determinación bioquímica. A continuación se realizó el análisis con un Analizador COBAS 6000 (Roche Diagnostics, F. Hoffmann-La Roche Ltd, España)(figura 24).

El proceso analítico se lleva a cabo de manera automatizada en el Cobas 6000 (RD), analizador modular multiparamétrico selectivo discreto, mediante métodos espectrofotométricos, inmunoensayo homogéneo (HIA) y heterogéneo (HetIA) y métodos de potenciometría indirecta (ISE) para la determinación de iones. Las reacciones colorimétricas tienen lugar en las cubetas de reacción del módulo c501 cuya agitación se produce por ultrasonido. Estas lecturas fotométricas se realizan con 12 longitudes de onda

distintas, en función de la determinación, que varían entre 340 nm y 800 nm (tabla 5).

Los reactivos específicos para cada determinación (c-pack y e-pack) se localizan en un carrusel distinto por módulo. Se mantienen a temperatura constante y se dispensan mediante pipetas de uso exclusivo para reactivos. Existe una unidad informática con software especializado que controla el analizador, almacena los resultados de calibraciones, controles y muestras procesados, y emite alarmas cada vez que se detectan resultados o procesos operativos anormales en cada uno de las funciones realizadas por el mismo (en mantenimiento automático, en volúmenes de reactivos, en caducidad de calibraciones, uso de racks inadecuados, etc.).

PARÁMETRO	INTERVALO DE MEDICIÓN	VALORES	CALIBRADOR	CONTROL	DETERMINACIÓN
AMILASA	3-1500 U/l	28-100U/l	C.f.a.s. (Calibrator for automated systems)	PreciControl ClinChem Multi 1 y 2	Determinación cuantitativa, medida fotométrica
BILIRRUBINA TOTAL	0.1-30 mg/dl	< 1 mg/dl			
GLUCOSA	2-450 mg/dl	70-115 mg/dl			
GOT	4-800 U/l	Hasta 37 U/l			
GPT	4-600 U/l	Hasta 41 U/l			
GGT	1-1200 U/l	Hasta 40 U/l			
FOSFATASA ALCALINA	1-1200 U/l	Hasta 40-129 U/l			

**Tabla 5:** Características del analizador COBAS 6000 de Rochas Diagnostics (F. Hoffmann-La Roche Ltd, España) para los parámetros bioquímicos estudiados.

**3.- Estudio Radiológico:** en todos los sujetos de los diferentes grupos de estudio se realizó un examen radiológico mediante Colangiografía <sup>51, 52</sup>, inyectando directamente contraste radiológico (Iopramida) en el interior de la vía biliar <sup>53, 54</sup> mediante la técnica de la debimetria descrita por *Caroli* en 1941. Permite la medición del flujo y de la presión a través de una columna líquida <sup>55</sup>, y de este modo se puede observar directamente la anatomía de la vía biliar en los sujetos de estudio, permitiéndonos la observación de estenosis y dilataciones de la vía biliar <sup>56</sup>. La iopromida, principio activo responsable de la atenuación de los rayos X, es un medio de contraste radiológico triyodado, no iónico, hidrosoluble y con un peso molecular de 791,12. Las características fisicoquímicas de la solución inyectable de este medio de contraste son: una concentración de yodo de 300 mg/dl y una osmolalidad de 0,62 osm/Kg H<sub>2</sub>O, que lo hacen idóneo para su inyección intraluminal como medio de contraste radiológico <sup>57</sup>.

Para la realización de las colangiografías se siguió el mismo protocolo que se lleva a cabo intraoperatoriamente durante las intervenciones quirúrgicas que implican la vía biliar y el estudio de posibles patologías <sup>8, 9, 10, 58</sup>.

En primer lugar se produjo una inducción anestésica de los sujetos a estudiar del mismo modo que se realizó para el modelo experimental de reparación microquirúrgica de la vía biliar. Una vez sedados los sujetos se practicó una laparotomía subcostal derecha, similar a la realizada previamente para la sustitución del colédoco por el biomaterial, pero en esta ocasión de menos extensión, estando limitada a unos 2 cms aproximadamente. Tras la identificación de la vía biliar, se canaliza ésta mediante cánulas de venopunción pediátrica de calibre 8 Gaugh. Previo a la administración de contraste radiológico, se comprueba la localización mediante instilación de suero fisiológico normotónico. Tras ello se administró Iopramida a concentración estándar (240 mg I/ml) intraluminal mediante la técnica de la debimetría (medidas de normalidad presión:14-16 cm<sup>2</sup> H<sub>2</sub>O, flujo: 10 ml/min)<sup>55</sup> y se realizó estereoscopia y radiografías digitalizadas seriadas para visualización del paso de contraste a través de los conductos biliares y al duodeno. Para ello se empleó un equipo de radiología portátil con arco en "C" (Valley-Lab, Texas, USA).El equipo de radiología está conectado a

una estación de control que obtiene las imágenes digitalizadas para posterior edición y/o impresión (figura 26).



**Figura 26:** Preparación del sujeto de estudio para realización de Colangiografía. Derecha, Tubo de Rayos X portátil con arco en “C” empleado (Valley-Lab, Texas, USA).

La colangiografía es una técnica ampliamente conocida dentro del campo de la Medicina mediante la cual, gracias a la administración de contraste radiológico intraluminal, se permite la visualización directa de la anatomía de la vía biliar observando en imagen negativa posibles obstrucciones, así como estenosis, dilataciones, fugas de contraste, tumoraciones intraluminales y otras alteraciones de las anastomosis biliares 10, 58.

Se procedió a la instilación de iopramida hasta conseguir una representación completa de toda la vía biliar (intra y extrahepática) así como el pase de contraste al duodeno. Los puntos de análisis básicos de la colangiografía que fueron estudiados en los animales de experimentación fueron:

- Posición de la bioprotesis en relación al hepático común y el colédoco.
- Funcionalidad del mismo.

En función de la aparición o no de algunos eventos, estos fueron registrados para el análisis comparativo con los resultados de la colangiografía del grupo control. Para ello se empleó un rango de valores (tabla 8) para establecer los márgenes de normalidad y aquellos que presentaban una alteración de los eventos analizados y de este modo, facilitar el análisis comparativo de todos los grupos con el grupo control. En el estudio de la presencia de fistulas, estenosis y dilataciones así como complicaciones más graves, se respetaron de manera estricta los valores establecidos para cada rango de grupo. Gracias a la técnica de la debimetría<sup>55</sup> se consiguió una representación completa del árbol biliar, sin aumentar la presión intraluminal por encima de los valores fisiológicos que puedan interferir en los resultados obtenidos.

RANGO	Representación de toda la via biliar	Pase del medio de contraste
0	Completa	Completo
1	> 75%	> 75%
2	> 50%	> 50%
3	> 25%	> 25%
4	0 - 25%	0 - 25%

**Tabla 7:** *Parámetros empleados para el análisis estructural en la Colangiografía.*

RANGO	ESTENOSIS	DILATACIONES	FUGA	FISTULA
0	2-3 mm ø	2-3 mm ø	Ausencia	Ausencia
1	< 2 - 1 mm ø	> 3 - 4 mm ø	1 localización	Bilio-biliar
2	< 1 - 0,1 mm ø	> 4 - 5 mm ø	2 localizaciones	Bilio-entérica
3	Completa	Mayor a 5 mm ø	Mas de 2 localizaciones	Bilio-cutánea

**Tabla 8:** Rango de valores empleado para evaluar la presencia de alteraciones fisiológicas de la vía biliar observados durante la Colangiografía

**4.- Estudio Histológico Hepático:** La totalidad de las muestras de tejido hepático fueron procesadas para un estudio histológico mediante microscopía óptica. Todas ellas fueron procesadas en el Departamento de Cirugía y sus Especialidades. Los pasos llevados a cabo fueron los que se describen a continuación para la preparación de las muestras y su posterior visualización mediante microscopía.

#### **Procesamiento de muestras**

a) Fijación: las muestras correspondientes a biopsia hepática, fueron inmersas en una solución de formol al 10% en PBS 0,1 M durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se tallaron las piezas histológicas de forma macroscópica y se realizó una nueva fijación con una solución de formol al 10% en PBS 0,1 M durante 24 horas a temperatura ambiente.

b) Inclusión en parafina: las muestras fueron lavadas en agua esterilizada y posteriormente fueron deshidratadas en concentraciones ascendentes de alcohol (desde 70% hasta 99%). Una vez deshidratadas fueron aclaradas con xilol y posteriormente fueron incluidas en parafina a 60°C

(autotecnico MICROM® Mod. STP-120). La inclusión de las piezas histológicas fue realizada en un centro de inclusión (MICROM® Mod. EC 350-1).

c) Corte Histológico: las inclusiones correspondientes a los tejidos fueron cortadas a 5 µm de espesor en un micrótomo (MICROM® Mod. HM315). Las secciones fueron secadas en estufa a 60°C durante 1 hora.

### **Tinción de Hematoxilina-Eosina**

Las secciones de tejido fueron desparafinadas y deshidratadas de acuerdo al protocolo convencional <sup>48</sup>. Una vez deshidratadas, fueron colocadas en solución de hematoxilina de Harris durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó la tinción con eosina durante 3 minutos a temperatura ambiente. Una vez teñidas las muestras, fueron deshidratadas en soluciones alcohólicas de concentración ascendente, aclaradas en xilol y cubiertas con cubreobjetos.

Las muestras fueron estudiadas con un microscopio Olympus Modelo BX51 y las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Olympus DP70 V-CMAD-3, y finalmente, editadas con el software PICASA 3.

### **Parámetros histológicos estudiados**

*Estructura histológica del hígado.* Con el fin de valorar la respuesta del parénquima hepático en nuestro modelo experimental, se tomaron muestras procedentes del lóbulo hepático superior derecho en todos los animales para su posterior estudio histológico, y de este modo valorar signos de estasis biliar y/o cirrosis.

## 4.8 ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS 19.0 (IBM Inc.) y estuvo orientado para encontrar diferencias entre el modelo de conducto biliar elaborado con biomaterial de colágeno-agarosa y los casos control utilizados para evaluar la regeneración del conducto en los distintos grupos de estudio, así como la funcionalidad fisiológica de los mismos. Se optó por realizar un estudio estadístico no paramétrico debido a que la distribución de las variables no correspondía con una distribución normal de las mismas 59.

En orden a realizar una comparación general entre todas las muestras (grupo 1 a 4), utilizamos el test de comparaciones de datos cuantitativos entre más de dos grupos de **Análisis de la Varianza (ANOVA)**. Evalúa la posible igualdad de medias de una variable cuantitativa entre varias muestras sin aumentar la tasa de error tipo I (resuelve el problema de las múltiples comparaciones). El funcionamiento de ANOVA se basa en la descomposición de la variabilidad total de una variable en sus diferentes partes, la debida a las diferencias entre los grupos (efectos principales) y la debida a las diferencias entre los individuos de cada grupo (residuales). Este diseño está muy ligado al método experimental y es la base del análisis multivariante 59.

La hipótesis que se pone a prueba en el ANOVA de un factor es que las medias poblacionales (las medias de la variable directa-VD en cada nivel de la variable indirecta-VI) son iguales. Si las medias poblacionales son iguales, eso significa que los grupos no difieren en la VD y que, en consecuencia, la VI o factor es independiente de la VD. La estrategia para poner a prueba la hipótesis de igualdad de medias consiste en obtener un estadístico, llamado F, que refleja el grado de parecido existente entre las medias que se están comparando. El numerador del estadístico F es una estimación de la varianza poblacional basada en la variabilidad existente entre las medias de cada grupo:  $\sigma_{\mu}^2 = n \sigma_{\mu}^2$ . El denominador del estadístico F es también una estimación de la varianza poblacional, pero basada en la variabilidad existente dentro de cada grupo:  $\sigma_{\mu}^2 = \bar{s}_j^2$  (j se refiere a los distintos grupos o niveles del factor):

$$F = \frac{\hat{\sigma}_1^2}{\hat{\sigma}_2^2} = \frac{n \hat{\sigma}_Y^2}{\bar{S}_j^2}$$

Si las medias poblacionales son iguales, las medias muestrales serán parecidas, existiendo entre ellas tan sólo diferencias atribuibles al azar. En ese caso, la estimación  $\hat{\sigma}_1^2$  (basada en las diferencias entre las medias) reflejará el mismo grado de variación que la estimación  $\hat{\sigma}_2^2$  (basada en las diferencias entre las puntuaciones individuales) y el cociente F tomará un valor próximo a 1. Si las medias muestrales son distintas, la estimación  $\hat{\sigma}_1^2$  reflejará mayor grado de variación que la estimación  $\hat{\sigma}_2^2$  y el cociente F tomará un valor mayor que 1. Cuanto más diferentes sean las medias, mayor será el valor de F. Si las poblaciones muestreadas son normales y sus varianzas son iguales, el estadístico F se distribuye según el modelo de probabilidad F de Fisher-Snedecor (los grados de libertad del numerador son el número de grupos menos 1; los del denominador, el número total de observaciones menos el número de grupos). Si suponemos cierta la hipótesis de igualdad de medias, podemos conocer en todo momento la probabilidad de obtener un valor como el obtenido o mayor <sup>60</sup>.

El estadístico F se interpreta de la siguiente forma: Si el nivel crítico asociado al estadístico F (es decir, si la probabilidad de obtener valores como el obtenido o mayores) es menor que 0,05, rechazaremos la hipótesis de igualdad de medias y concluiremos que no todas las medias poblacionales comparadas son iguales. En caso contrario, no podremos rechazar la hipótesis de igualdad y no podremos afirmar que los grupos comparados difieran en sus promedios poblacionales.

Cuando no se cumplen las condiciones necesarias para aplicar ANOVA, la alternativa no paramétrica que se utiliza de manera mas habitual es la prueba de **Kruskal-Wallis** para muestras independientes <sup>59</sup>. El contraste de Kruskal-Wallis es la alternativa no paramétrica del método ANOVA, es decir, sirve para contrastar la hipótesis de que  $k$  muestras cuantitativas han sido

obtenidas de la misma población. La única exigencia versa sobre la aleatoriedad en la extracción de las muestras, no haciendo referencia a ninguna de las otras condiciones adicionales de homocedasticidad y normalidad necesarias para la aplicación del test paramétrico ANOVA.

De este modo, este contraste es el que debemos aplicar necesariamente cuando no se cumple algunas de las condiciones que se necesitan para aplicar dicho método. Al igual que las demás técnicas no paramétricas, ésta se apoya en el uso de los rangos asignados a las observaciones. Por tanto es el test estadístico más adecuado para la valoración de los resultados obtenidos en la valoración de las dilataciones de la vía biliar observadas en la colangiografía.

En todos los casos, se consideró que existían diferencias significativas cuando los valores de P eran menores a 0,05 para los test estadísticos utilizados.

# 5. Resultados.

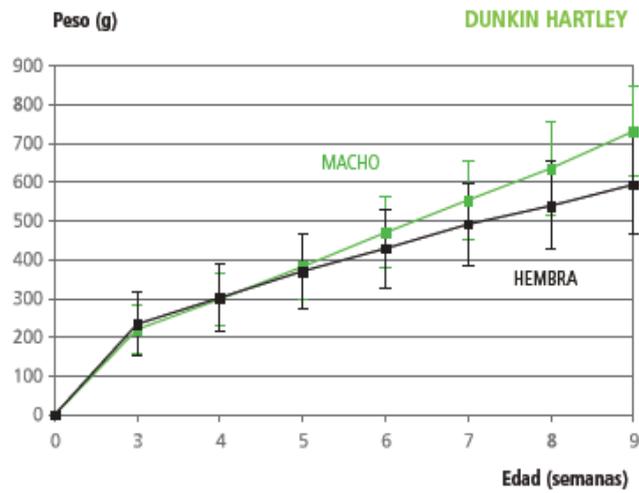
---

## 5.1 MODELO EXPERIMENTAL DE LESION DE LA VIA BILIAR.

En esta tesis doctoral hemos conseguido desarrollar un modelo experimental en el que existía un defecto de la vía biliar extrahepática extenso (de 4 mm) y que nos permita estudiar el proceso de reparación con conductos tridimensionales sintéticos formados por biomateriales. Todo ello se cuantificó durante la recuperación del animal realizando la medición de los distintos parámetros descritos en el apartado de material y métodos.

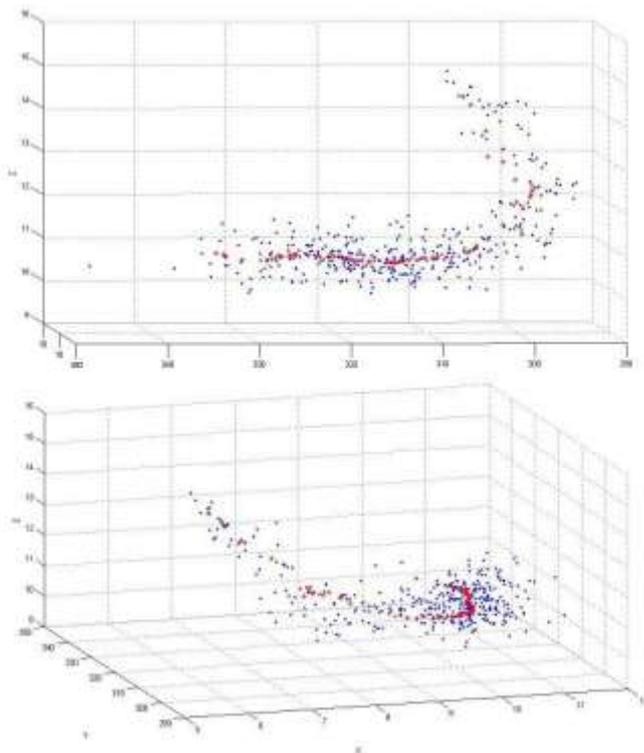
## 5.2 PARAMETROS CLINICOS.

Se realizó una toma de datos para el estudio de las curvas de evolución de ganancia ponderal de peso en cada sujeto, recogiendo cada semana los valores de peso que presentaba cada animal. De este modo se pretende valorar los posibles efectos indirectos por variaciones digestivas al enfrentarlos con los casos control. Del mismo modo el proveedor de animales de experimentación (Harlan Porcellus) facilitó las curvas ponderales de los animales (mantenidos en las mismas condiciones basales que el estudio) basados en la media de todos los sujetos de la raza Dunkin Hartley que se hallan en reproducción en sus instalaciones (Gráfica 1).



**Gráfica 1:** Evolución ponderal media de los sujetos de la raza Dunkin Hartley mantenidos en las condiciones basales especificadas por el distribuidor (Harlan Porcellus).

De este modo además de enfrentar los resultados experimentales con los del grupo control, se enfrentaron a valores medios de evolución que presenta la gráfica de evolución ponderal de la especie (mantenidos en las mismas condiciones que las que se mantuvieron los animales de este estudio) (Gráfica 1).



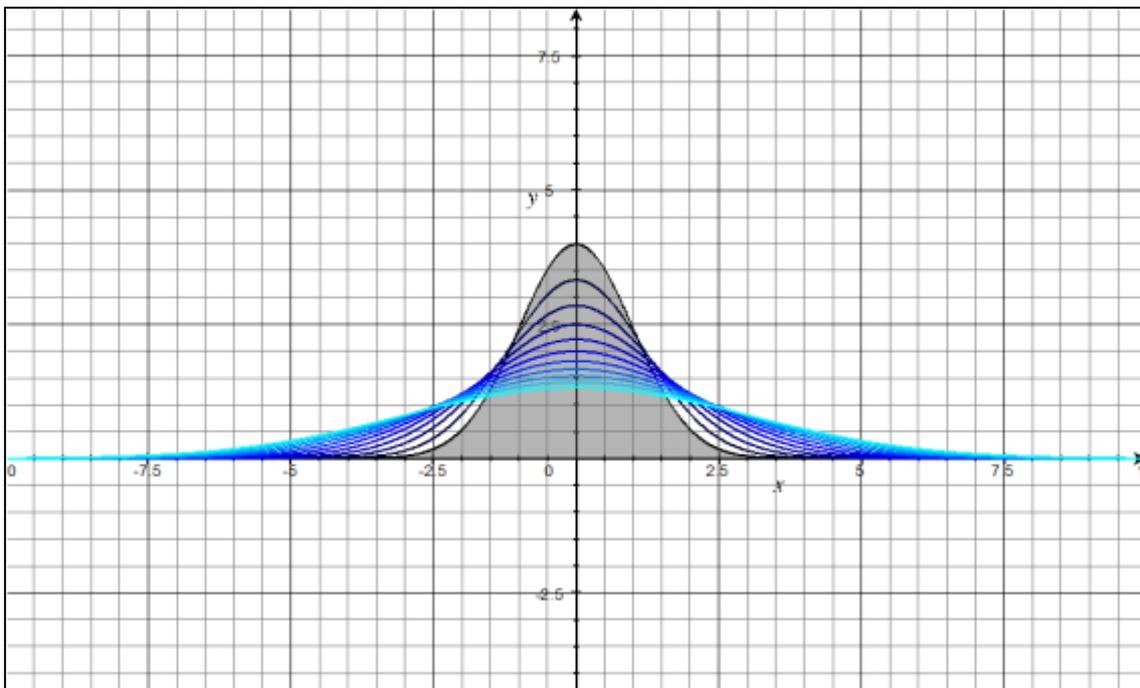
**Figura 27:** Nube de puntos que muestra la evolución de peso en función del tiempo transcurrido y grupo de estudio. Datos mostrados en la tabla 12.

Sujeto	Edad Intervención	Peso	Edad Sacrificio	Peso	Grupo
I	3 sem.	270 gr.	4 sem.	301 gr.	2
II	3 sem.	277 gr.	4 sem.	292 gr.	2
III	4 sem.	378 gr.	5 sem.	393 gr.	2
IV	4 sem.	330 gr.	6 sem.	470 gr.	3
V	4 sem.	358 gr.	5 sem.	395 gr.	2
VI	6 sem.	500 gr.	12 sem.	790 gr.	4
VII	6 sem.	519 gr.	12 sem.	800 gr.	4
VIII	6 sem.	500 gr.	8 sem.	610 gr.	3
IX	6 sem.	519 gr.	8 sem.	640 gr.	3
X	6 sem.	505 gr.	8 sem.	590 gr.	3
XI	6 sem.	503 gr.	8 sem.	678 gr.	3
XII	2 sem.	150 gr.	8 sem.	604 gr.	4
XIII	3 sem.	288 gr.	9 sem.	700 gr.	4
XIV	4 sem.	482 gr.	5 sem.	385 gr.	2
XV	4 sem.	458 gr.	13 sem.	630 gr.	4
XVI	4 sem.	440 gr.	13 sem.	641 gr.	4
XVII	4 sem.	614 gr.	6 sem.	715 gr.	3
XVIII	4 sem.	673 gr.	6 sem.	558 gr.	3
XIX	4 sem.	510 gr.	5 sem.	448 gr.	2
XX	5 sem.	395 gr.	7 sem.	697 gr.	2
XXI	3 sem.	280 gr.	12 sem.	830 gr.	4
XXII	3 sem.	267 gr.	12 sem.	798 gr.	4
XXIII	3 sem.	240 gr.	13 sem.	822 gr.	1
XXIV	3 sem.	274 gr.	13 sem.	812 gr.	1
XXV	3 sem.	244 gr.	13 sem.	792 gr.	1
XXVI	3 sem.	241 gr.	13 sem.	814 gr.	1
XXVII	3 sem.	237 gr.	13 sem.	799 gr.	1
XXVIII	3 sem.	256 gr.	13 sem.	795 gr.	1
XXIX	3 sem.	291 gr.	13 sem.	788 gr.	1
XXX	3 sem.	254 gr.	13 sem.	824 gr.	1
XXXI	3 sem.	265 gr.	13 sem.	800 gr.	1
XXXII	3 sem.	230 gr.	13 sem.	777 gr.	1

**Tabla 8:** Especificaciones de evolución del peso en cada sujeto previo a la intervención y en el momento de su sacrificio en función del grupo de estudio al que pertenecen.

El peso es una variable estadística cuantitativa continua medida en gramos. Puesto que todos los datos son cuantitativos dentro de una distribución paramétrica y hay 4 grupos se utiliza el **Análisis de Varianza (ANOVA)** <sup>59, 60</sup>.

Mediante el uso de este test estadístico de comparación de variables/hipótesis, se obtuvo con una significancia estadísticamente significativa de  $p < 0,05$  que todos los valores de distribución de la evolución ponderal se presentaban en la nube de puntos dentro de un área bajo la curva de  $1-x$ , extrapolando que no se encontraron diferencias estadísticas entre la evolución de cada sujeto dentro de su grupo así como entre los grupos de sujetos estudiados. De este modo podemos interpretar que no se hallaron diferencias en cuanto a la evolución del peso de los sujetos intervenidos en comparación con los sujetos del grupo control, así como la evolución media de la especie en condiciones basales similares.



**Gráfica 2:** Representación Gaussiana de las medias de Peso presentes en cada grupo.

### 5.3 PARAMETROS DE RECUPERACION FISIOLÓGICA. ESTUDIO BIOQUÍMICO.

Al igual que en el apartado anterior se recogieron muestras sanguíneas de cada sujeto en el momento de sacrificio tal y como se especificó anteriormente en el protocolo de sacrificio de los animales de experimentación en el apartado de material y métodos. Se analizaron los parámetros de fisiología biliar (Bilirrubina Total, Fosfatasa Alcalina) y función hepática/pancreática (Glucosa, GGT, GOT, GPT, Amilasa) de todos los grupos que conforman el estudio. A continuación se especifican los resultados estadísticos para cada valor estudiado. La definición de cada variable empleada en el estudio estadístico corresponde a:

- Glucosa: variable estadística continua medida en gr/dl
- Bilirrubina Total: Variable estadística continua medida en gr/cm<sup>3</sup>
- GOT: variable estadística cuantitativa continua medida en gr/cm<sup>3</sup>
- GPT: variable estadística cuantitativa continua medida en gr/cm<sup>3</sup>
- GGT: variable estadística cuantitativa continua medida en gr/cm<sup>3</sup>
- Fosfatasa Alcalina: variable estadística cuantitativa continua medida en gr/cm<sup>3</sup>
- Amilasa: variable estadística cuantitativa continua medida en gr/cm<sup>3</sup>

Puesto que todos los datos son cuantitativos dentro de una distribución paramétrica y hay 4 grupos se utiliza el **Análisis de Varianza (ANOVA)** <sup>59, 60</sup>.

COBAYA	GLUCOSA	BIL. T.	GOT	GPT	GGT	FOSFATASA	AMILASA	OTROS
I	238	0.10	303	75	13	340	1881	-
II	215	0.09	298	70	10	370	1557	-
III	200	0.11	301	77	15	350	1660	-
IV	195	0.07	295	65	20	302	1700	-
V	240	0.12	310	78	17	351	1620	-
VI	220	0.08	291	69	12	333	1788	-
VII	235	0.10	300	74	14	339	1850	-
VIII	241	0.10	300	70	10	330	1880	-
IX	220	0.09	302	74	12	338	1900	-
X	230	0.11	301	78	15	342	1892	-
XI	237	0.10	309	80	20	354	1907	-
XII	193	0.02	316	50	23	335	1559	-
XIII	213	0.10	315	65	10	338	1885	-
XIV	209	0.09	301	70	13	340	1856	-
XV	196	0.11	273	77	13	323	2032	-
XVI	240	0.10	408	68	28	294	1847	-
XVII	192	0.12	322	73	11	285	1932	-
XVIII	218	0.10	300	75	9	306	1647	-
XIX	222	0.10	298	80	13	341	1883	-
XX	238	0.08	304	76	17	314	2112	-
XXI	241	0.11	295	78	15	344	2009	-
XXII	197	0.10	304	70	16	339	1705	-
XXIII	212	0.10	315	49	22	334	1555	GRUPO CONTROL
XXIV	229	0.09	300	69	12	335	1878	
XXV	194	0.11	275	76	12	320	1864	
XXVI	208	0.10	400	65	24	294	1845	
XXVII	195	0.10	321	75	29	293	2001	
XXVIII	239	0.08	300	79	13	338	1930	
XXIX	191	0.09	295	76	10	313	2007	
XXX	217	0.11	301	69	19	286	2105	
XXXI	221	0.10	296	73	17	303	1985	
XXXII	236	0.08	272	77	14	338	1783	

**Tabla 9:** Resultados de la bioquímica sanguínea practicada a todos los sujetos del estudio.

Para el estudio comparativo de los valores de **Glucosa** de los diferentes grupos de estudio se inferenció la siguiente estadística:

**Grupo 1**

COBAYA	GLUCOSA	GRUPO	RANGO
XXIX	191	1	1
XXV	194	1	4
XXVII	195	1	5,5
XXVI	208	1	10
XXIII	212	1	12
XXX	217	1	15
XXXI	221	1	19
XXIV	229	1	21
XXXII	236	1	24
XXVIII	239	1	28

**Grupo 2**

COBAYA	GLUCOSA	GRUPO	RANGO
III	200	2	9
XIV	209	2	11
II	215	2	14
XIX	222	2	20
I	238	2	26,5
XX	238	2	26,5
V	240	2	29,5

**Grupo 3**

COBAYA	GLUCOSA	GRUPO	RANGO
XVII	192	3	2
IV	195	3	5,5
XVIII	218	3	16
IX	220	3	17,5
X	230	3	22
XI	237	3	25
VIII	241	3	31,5

**Grupo 4**

COBAYA	GLUCOSA	GRUPO	RANGO
XII	193	4	3
XV	196	4	7
XXII	197	4	8
XIII	213	4	13
VI	220	4	17,5
VII	235	4	23
XVI	240	4	29,5
XXI	241	4	31,5

Tabla ANOVA

	Suma cuad	G.L.	Cuad. Med.	F.experim	p-valor	F.teorica	
Entre grupos	346,167857	3	115,389286	0,34528004	0,792788042	0,40779984	para $\alpha=0,001$
Dentro grupo	9357,33214	28	334,190434				
Total	9703,5	31					

Como  $p > 0,2$  se acepta  $H_0$

Otra forma para el contraste: para  $\alpha=0,001$   $F_{exp} < F_{teorica}$  luego se acepta  $H_0$

	Suma cuad	G.L.	Varianza	Fexp	Fteor	
Entre grupos	346,167857	3	115,389286 $S^2_E$	0,345280038	0,41177568	para $\alpha=0,01$
Dentro grup	9357,33214	28	334,190434 $S^2_D$			
Total	9703,5	31				

Como  $F_{exp} < F_{teor}$  se acepta  $H_0$

Por tanto se acepta la homogeneidad de medias con un nivel de significación  $\alpha=0,001$

Como se puede inducir de los resultados estadísticos, queda demostrada con una significancia estadística que no existen diferencias entre los resultados encontrados en el grupo control y los resultados observados en los demás grupos en los que se realizó interposición de prótesis biliar.

Para el estudio comparativo de los valores de **Bilirrubina Total** de los diferentes grupos de estudio se inferenció la siguiente estadística:

**GRUPO 1**

COBAYA	BIL. T
XXIII	0,1
XXIV	0,09
XXV	0,11
XXVI	0,1
XXVII	0,1
XXVIII	0,08
XXIX	0,09
XXX	0,11
XXXI	0,1
XXXII	0,08
<b>TOTAL=</b>	<b>0,96</b>

**GRUPO 2**

COBAYA	BIL. T
I	0,1
II	0,09
III	0,11
V	0,12
XIV	0,09
XIX	0,1
XX	0,08
<b>TOTAL=</b>	<b>0,69</b>

**GRUPO 3**

COBAYA	BIL. T
IV	0,07
VIII	0,1
IX	0,09
X	0,11
XI	0,1
XVII	0,12
XVIII	0,1
<b>TOTAL=</b>	<b>0,69</b>

**GRUPO 4**

COBAYA	BIL. T
VI	0,08
VII	0,1
XII	0,02
XIII	0,1
XV	0,11
XVI	0,1
XXI	0,11
XXII	0,1
<b>TOTAL=</b>	<b>0,72</b>

Tabla ANOVA

	Suma cuad	G.L.	Cuad. Med.	F-valor	p-valor	F.teorica	
Entre grupos	0,00037607	3	0,00012536	0,35774607	0,78392106	0,40779984	para $\alpha = 0,001$
Dentro grup	0,00981143	28	0,00035041				
Total	0,0101875	31					

Como  $p > 0,2$  se acepta  $H_0$

Otra forma para el contraste: para  $\alpha = 0,001$   $F_{exp} < F_{teorica}$  luego se acepta  $H_0$

	Suma cuad	G.L.	Varianza	F.exp	F.teor	
Entre grupos	0,00037607	3	0,00012536 $S^2_E$	0,35774607	0,41177568	para $\alpha = 0,01$
Dentro grup	0,00981143	28	0,00035041 $S^2_D$			
Total	0,0101875	31				

Como  $F_{exp} < F_{teor}$  se acepta  $H_0$

Por tanto se acepta la homogeneidad de medias con un nivel de significación  $\alpha = 0,001$

Al igual que con los datos anteriores, al demostrarse la hipótesis con los resultados estadísticos, se puede inferir que no existen diferencias entre los resultados encontrados en los diferentes grupos entre sí y con el grupo control.

Para el estudio comparativo de los valores de **GOT** de los diferentes grupos de estudio se inferenció la siguiente estadística:

**GRUPO 1**

COBAYA	GOT
XXIII	315
XXIV	300
XXV	275
XXVI	400
XXVII	321
XXVIII	300
XXIX	295
XXX	301
XXXI	296
XXXII	272
<b>TOTAL=</b>	<b>3075</b>

**GRUPO 2**

COBAYA	GOT
I	303
II	298
III	301
V	310
XIV	301
XIX	298
XX	304
<b>TOTAL=</b>	<b>2115</b>

**GRUPO 3**

COBAYA	GOT
IV	295
VIII	300
IX	302
X	301
XI	309
XVII	322
XVIII	300
<b>TOTAL=</b>	<b>2129</b>

**GRUPO 4**

COBAYA	GOT
VI	291
VII	300
XII	316
XIII	315
XV	273
XVI	408
XXI	295
XXII	304
<b>TOTAL=</b>	<b>2502</b>

Tabla ANOVA							
	Suma cuad	G.L.	Cuad. Med.	F-valor	p-valor	F.teorica	
Entre grupos	489,004464	3	163,001488	0,19154341	0,90126688	0,40779984	para $\alpha = 0,001$
Dentro grup	23827,7143	28	850,989796				
Total	24316,7187	31					

Como  $p > 0,2$  se acepta  $H_0$

Otra forma para el contraste: para  $\alpha = 0,001$   $F_{exp} < F_{teorica}$  luego se acepta  $H_0$

	Suma cuad	G.L.	Varianza	F.exp	F.teor	
Entre grupos	489,004464	3	163,001488 $S^2_E$	0,19154341	0,41177568	para $\alpha = 0,01$
Dentro grup	23827,7143	28	850,989796 $S^2_D$			
Total	24316,7187	31				

Como  $F_{exp} < F_{teor}$  se acepta  $H_0$

Por tanto se acepta la homogeneidad de medias con un nivel de significación  $\alpha = 0,001$

Al igual que con los datos anteriores, al demostrarse la hipótesis con los resultados estadísticos, se puede inferir que no existen diferencias entre los resultados encontrados en los diferentes grupos entre sí y con el grupo control.

Para el estudio comparativo de los valores de **GPT** de los diferentes grupos de estudio se inferenció la siguiente estadística:

**GRUPO 1**

COBAYA	GPT
XXIII	49
XXIV	69
XXV	76
XXVI	65
XXVII	75
XXVIII	79
XXIX	76
XXX	69
XXXI	73
XXXII	77
<b>TOTAL=</b>	<b>708</b>

**GRUPO 2**

COBAYA	GPT
I	75
II	70
III	77
V	78
XIV	70
XIX	80
XX	76
<b>TOTAL=</b>	<b>526</b>

**GRUPO 3**

COBAYA	GPT
IV	65
VIII	70
IX	74
X	78
XI	80
XVII	73
XVIII	75
<b>TOTAL=</b>	<b>515</b>

**GRUPO 4**

COBAYA	GPT
VI	69
VII	74
XII	50
XIII	65
XV	77
XVI	68
XXI	78
XXII	70
<b>TOTAL=</b>	<b>551</b>

Tabla ANOVA

	Suma cuad	G.L.	Cuad. Med.	F-valor	p-valor	F.teorica	
Entre grupos	178,453571	3	59,4845238	1,12155865	0,35711262	0,40779984	para $\alpha = 0,001$
Dentro grup	1485,04643	28	53,0373724				
Total	1663,5	31					

Como  $p > 0,2$  se acepta  $H_0$

Otra forma para el contraste: para  $\alpha = 0,001$   $F_{exp} < F_{teorica}$  luego se acepta  $H_0$

	Suma cuad	G.L.	Varianza	F.exp	F.teor	
Entre grupos	178,453571	3	59,4845238 $S^2_E$	1,12155865	0,41177568	para $\alpha = 0,01$
Dentro grup	1485,04643	28	53,0373724 $S^2_D$			
Total	1663,5	31				

Como  $F_{exp} < F_{teor}$  se acepta  $H_0$

Por tanto se acepta la homogeneidad de medias con un nivel de significación  $\alpha = 0,001$

Al igual que en los casos anteriores, al demostrarse la hipótesis con los resultados estadísticos, se puede inferir que no existen diferencias entre los resultados encontrados en los diferentes grupos entre sí y con el grupo control.

Para el estudio comparativo de los valores de **GGT** de los diferentes grupos de estudio se inferenció la siguiente estadística:

**GRUPO 1**

COBAYA	GGT
XXIII	22
XXIV	12
XXV	12
XXVI	24
XXVII	29
XXVIII	13
XXIX	10
XXX	19
XXXI	17
XXXII	14

**GRUPO 2**

COBAYA	GGT
I	13
II	10
III	15
V	17
XIV	13
XIX	13
XX	17
<b>TOTAL=</b>	<b>98</b>

**GRUPO 3**

COBAYA	GGT
IV	12
VIII	10
IX	12
X	15
XI	20
XVII	11
XVIII	9
<b>TOTAL=</b>	<b>89</b>

**GRUPO 4**

COBAYA	GGT
VI	12
VII	14
XII	23
XIII	10
XV	13
XVI	28
XXI	15
XXII	16
<b>TOTAL=</b>	<b>131</b>

Tabla ANOVA							
	Suma cuad	G.L.	Cuad. Med.	F-valor	p-valor	F.teorica	
Entre grupos	105,971429	3	35,3238095	1,00832202	0,4037193	0,40779984	para $\alpha = 0,001$
Dentro grup	980,903571	28	35,0322704				
Total	1086,875	31					

Como  $p > 0,2$  se acepta  $H_0$

Otra forma para el contraste: para  $\alpha = 0,001$   $F_{exp} < F_{teorica}$  luego se acepta  $H_0$

	Suma cuad	G.L.	Varianza	F.exp	F.teor	
Entre grupos	105,971429	3	35,4845238 $S^2_E$	1,00832202	0,41177568	para $\alpha = 0,01$
Dentro grup	980,903571	28	35,0373724 $S^2_D$			
Total	1086,875	31				

Como  $F_{exp} < F_{teor}$  se acepta  $H_0$

Por tanto se acepta la homogeneidad de medias con un nivel de significación  $\alpha = 0,001$

Al igual que en los grupos de datos previos, al demostrarse la hipótesis con los resultados estadísticos, se puede inferir que no existen diferencias entre los resultados encontrados en los diferentes grupos entre sí y con el grupo control.

Para el estudio comparativo de los valores de la **Fosfatasa Alcalina** de los diferentes grupos de estudio se inferenció la siguiente estadística:

**GRUPO 1**

COBAYA	FOSFATASA
XXIII	334
XXIV	335
XXV	320
XXVI	294
XXVII	293
XXVIII	338
XXIX	313
XXX	286
XXXI	303
XXXII	338
<b>TOTAL=</b>	<b>3154</b>

**GRUPO 2**

COBAYA	FOSFATASA
I	340
II	370
III	350
V	351
XIV	340
XIX	341
XX	314
<b>TOTAL=</b>	<b>2406</b>

**GRUPO 3**

COBAYA	FOSFATASA
IV	302
VIII	330
IX	338
X	342
XI	354
XVII	285
XVIII	306
<b>TOTAL=</b>	<b>2257</b>

**GRUPO 4**

COBAYA	FOSFATASA
VI	333
VII	339
XII	335
XIII	338
XV	323
XVI	294
XXI	344
XXII	339
<b>TOTAL=</b>	<b>2645</b>

Tabla ANOVA

	Suma cuad	G.L.	Cuad. Med.	F-valor	p-valor	F.teorica	
Entre grupos	3552,45714	3	1184,15238	3,00780276	0,04692839	0,40779984	para $\alpha = 0,001$
Dentro grup	11023,4179	28	393,693495				
Total	14575,875	31					

Como  $p > 0,2$  se acepta  $H_0$

Otra forma para el contraste: para  $\alpha = 0,001$   $F_{exp} < F_{teorica}$  luego se acepta  $H_0$

	Suma cuad	G.L.	Varianza	F.exp	F.teor	
Entre grupos	3552,45714	3	1184,4845238 $S^2_E$	3,00780276	0,41177568	para $\alpha = 0,01$
Dentro grup	11023,4179	28	393,9373724 $S^2_D$			
Total	14575,875	31				

Como  $F_{exp} < F_{teor}$  se acepta  $H_0$

Por tanto se acepta la homogeneidad de medias con un nivel de significación  $\alpha = 0,001$

Al igual que para los datos anteriores, al demostrarse la hipótesis con los resultados estadísticos, se puede inferir que no existen diferencias entre los resultados encontrados en los diferentes grupos entre sí y con el grupo control.

Para el estudio comparativo de los valores de la **Amilasa** de los diferentes grupos de estudio se inferenció la siguiente estadística:

**GRUPO 1**

COBAYA	AMILASA
XXIII	1555
XXIV	1878
XXV	1864
XXVI	1845
XXVII	2001
XXVIII	1930
XXIX	2007
XXX	2105
XXXI	1985
XXXII	1783
<b>TOTAL=</b>	<b>18953</b>

**GRUPO 2**

COBAYA	AMILASA
I	1881
II	1557
III	1660
V	1620
XIV	1856
XIX	1883
XX	2112
<b>TOTAL=</b>	<b>12569</b>

**GRUPO 3**

COBAYA	AMILASA
IV	1700
VIII	1880
IX	1900
X	1892
XI	1907
XVII	1932
XVIII	1647
<b>TOTAL=</b>	<b>12858</b>

**GRUPO 4**

COBAYA	AMILASA
VI	1788
VII	1850
XII	1559
XIII	1885
XV	2032
XVI	1847
XXI	2009
XXII	1705

Tabla ANOVA							
	Suma cuad	G.L.	Cuad. Med.	F-valor	p-valor	F.teorica	
Entre grupos	43763,4223	3	14587,8074	0,60172519	0,6192988	0,40779984	para $\alpha = 0,001$
Dentro grup	678812,546	28	24243,3052				
Total	722575,969	31					

Como  $p > 0,2$  se acepta  $H_0$

Otra forma para el contraste: para  $\alpha = 0,001$   $F_{exp} < F_{teorica}$  luego se acepta  $H_0$

	Suma cuad	G.L.	Varianza	F.exp	F.teor	
Entre grupos	43763,4223	3	14587,8074 $S^2_E$	0,60172519	0,41177568	para $\alpha = 0,01$
Dentro grup	678812,546	28	24243,3052 $S^2_D$			
Total	722575,969	31				

Como  $F_{exp} < F_{teor}$  se acepta  $H_0$

Por tanto se acepta la homogeneidad de medias con un nivel de significación  $\alpha = 0,001$

Al igual que para los datos anteriores, al demostrarse la hipótesis con los resultados estadísticos, se puede inferir que no existen diferencias entre los resultados encontrados en los diferentes grupos entre sí y con el grupo control.

#### 5.4 PARAMETROS DE RECUPERACION ANATOMICA. ESTUDIO RADIOLOGICO: COLANGIOGRAFIA.

Tal y como se detalló en el apartado de material y métodos, se realizó un colangiografía a todos los sujetos del estudio previo a su sacrificio. Se realizó una medición de los parámetros radiológicos que fueron descritos en el mismo apartado, los cuales se recogen en la tabla 9. A partir de estos datos recogidos se realizaron análisis mediante test no paramétricos (contraste de Kruskal-Wallis), para estudiar la homogeneidad de la muestra, y poder deducir si existen diferencias estadísticamente significativas.

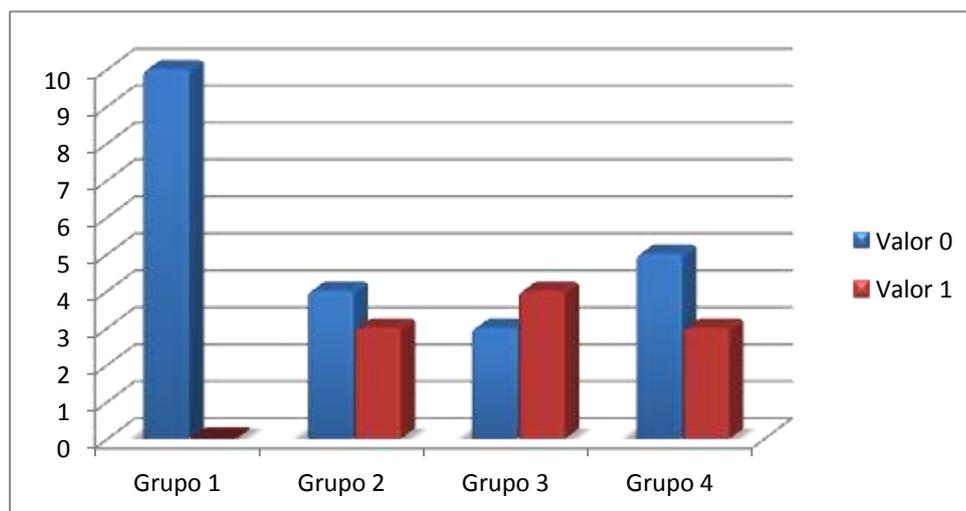
Cobaya / Parámetro	Representación Via Biliar	Contraste	Estenosis	Dilatación	Fuga	Fistula
I	0	0	0	1	0	0
II	0	0	0	0	0	0
III	0	0	0	0	0	0
IV	0	0	0	0	0	0
V	0	0	0	1	0	0
VI	0	0	0	1	0	0
VII	0	0	0	0	0	0
VIII	0	0	0	0	0	0
IX	0	0	0	1	0	0
X	0	0	0	1	0	0
XI	0	0	0	1	0	0
XII	0	0	0	0	0	0
XIII	0	0	0	1	0	0
XIV	0	0	0	0	0	0
XV	0	0	0	0	0	0
XVI	0	0	0	0	0	0
XVII	0	0	0	0	0	0
XVIII	0	0	0	1	0	0
XIX	0	0	0	1	0	0
XX	0	0	0	0	0	0
XXI	0	0	0	1	0	0
XXII	0	0	0	0	0	0
XXIII	0	0	0	0	0	0
XXIV	0	0	0	0	0	0
XXV	0	0	0	0	0	0
XXVI	0	0	0	0	0	0
XXVII	0	0	0	0	0	0
XXVIII	0	0	0	0	0	0
XXIX	0	0	0	0	0	0
XXX	0	0	0	0	0	0
XXXI	0	0	0	0	0	0
XXXII	0	0	0	0	0	0

DILATACION	Valor 0	Valor 1	ESTENOSIS	Valor 0	Valor 1
Grupo 1	10	0	Grupo 1	0	0
Grupo 2	4	3	Grupo 2	0	0
Grupo 3	3	4	Grupo 3	0	0
Grupo 4	5	3	Grupo 4	0	0

FUGA	Valor 0	Valor 1	FISTULA	Valor 0	Valor 1
Grupo 1	0	0	Grupo 1	0	0
Grupo 2	0	0	Grupo 2	0	0
Grupo 3	0	0	Grupo 3	0	0
Grupo 4	0	0	Grupo 4	0	0

**Tabla 9:** Resultados hallados en la observación de las pruebas de Colangiografía.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Valor 0	100 %	57.1 %	42.9 %	62.5 %
Valor 1	0%	42.9 %	57.1 %	37.5 %



**Tabla 10:** Incidencia relativa (en %) de la presencia de dilataciones en la Colangiografía.

De este modo, los resultados quedarían organizados tal como puede observarse a continuación, infiriéndose los siguientes resultados estadísticos:

**Grupo 1**

COBAYA	DILAT	RANGO
XXIII	0	11,5
XXXII	0	11,5
XXVI	0	11,5
XXV	0	11,5
XXIV	0	11,5
XXVIII	0	11,5
XXXI	0	11,5
XXVII	0	11,5
XXIX	0	11,5
XXX	0	11,5

**Grupo 2**

COBAYA	DILAT	RANGO
II	0	11,5
V	0	11,5
III	0	11,5
XIV	0	11,5
I	1	27,5
XIX	1	27,5
XX	1	27,5

**Grupo 3**

COBAYA	DILAT	RANGO
XVIII	0	11,5
IV	0	11,5
VIII	0	11,5
X	1	27,5
IX	1	27,5
XI	1	27,5
XVII	1	27,5

**Grupo 4**

COBAYA	DILAT	RANGO
XII	0	11,5
XXII	0	11,5
VI	0	11,5
XVI	0	11,5
VII	0	11,5
XIII	1	27,5
XXI	1	27,5
XV	1	27,5

$$(d.12)/n(n+1) = H$$

$$(d.12)/n(n+1) = 4.57$$

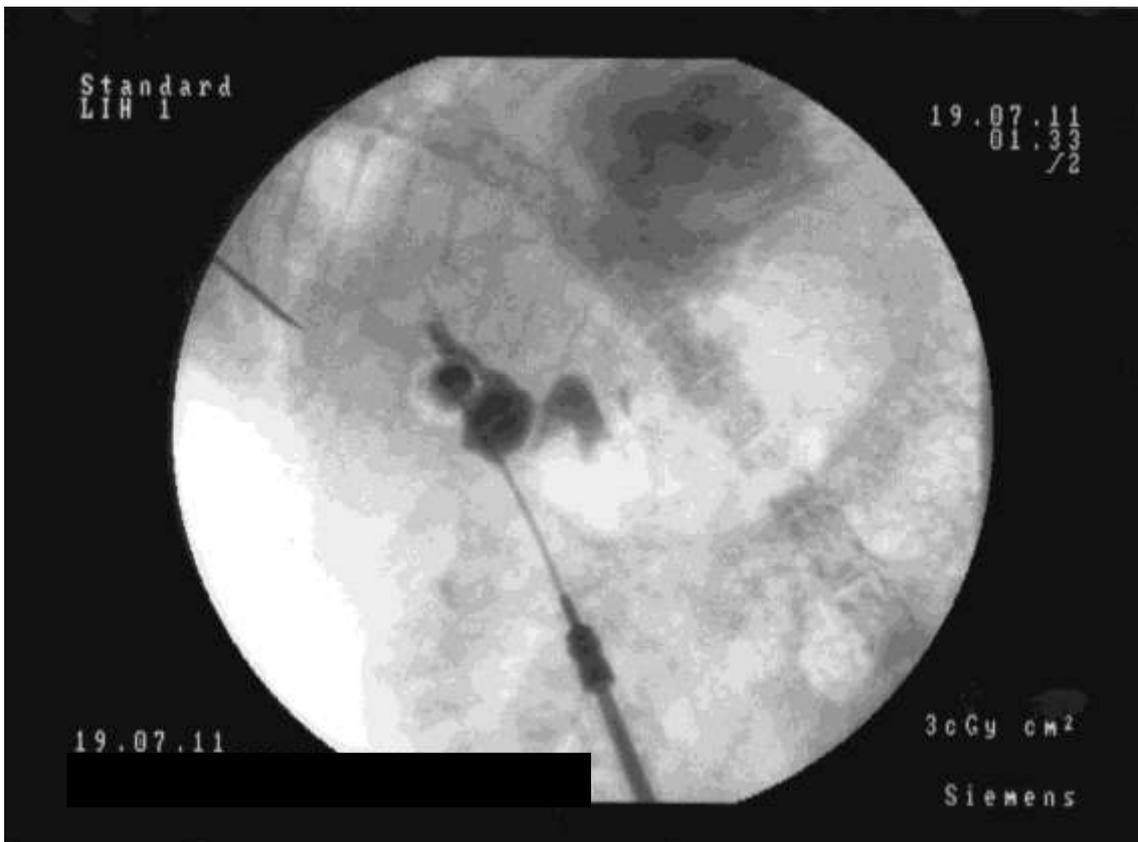
*g.l.* = 3 para nivel de significación **0.001**

Probabilidad de diferencias debidas al azar = **0.206**

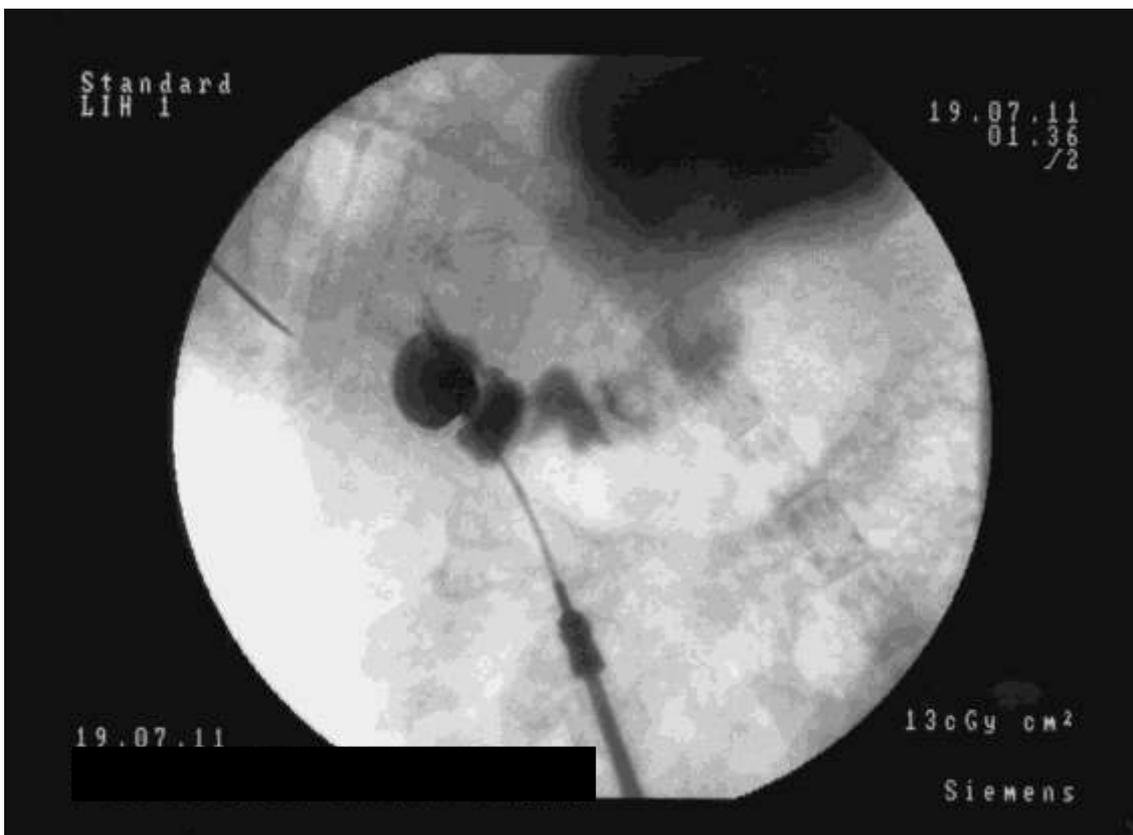
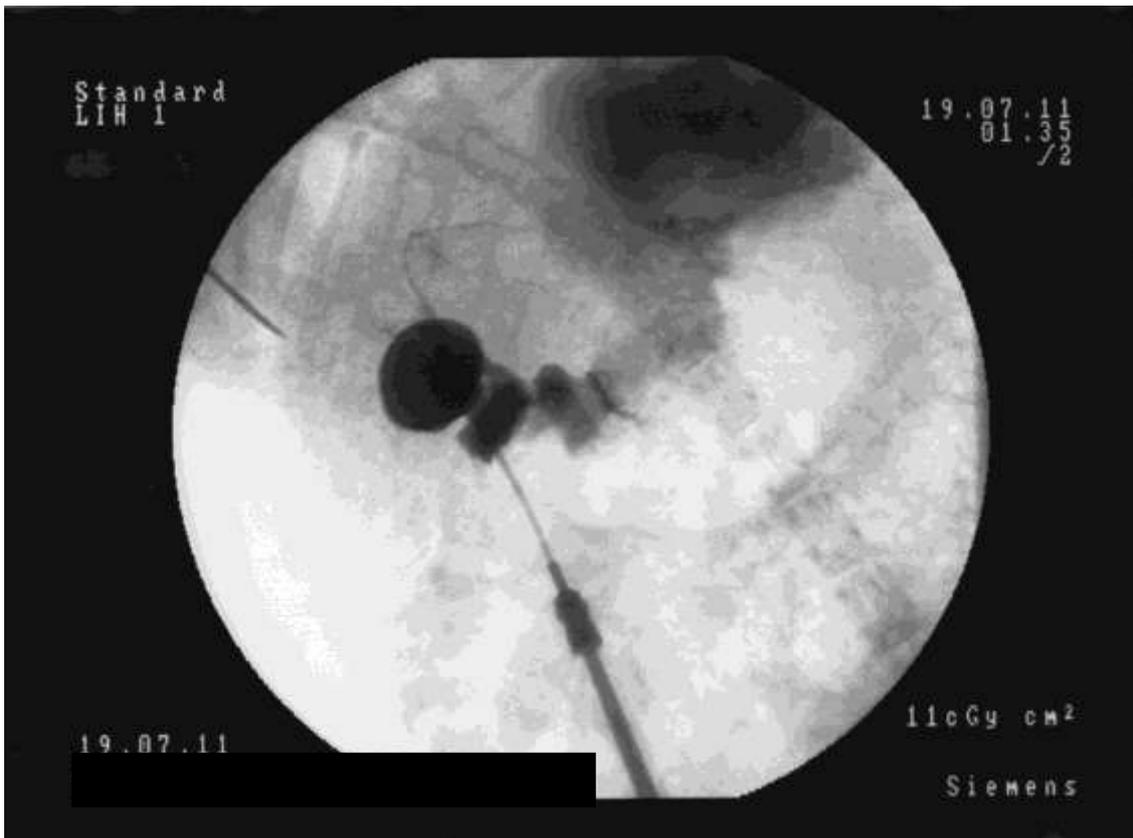
*No se rechaza la homogeneidad de las muestras.*

El estudio estadístico mediante test no paramétricos para 4 muestras independientes (**Test de Kruskal-Wallis**) mostró que no existían diferencias significativas en la incidencia de de dilataciones radiológicas de la via biliar entre el grupo de animales a los que no se les realizaba ningún tratamiento (grupo 0) y a aquellos animales a los que se les implantaba un conducto biliar artificial de colágeno (grupo II, III y IV), como se puede apreciar en las tablas anteriores.

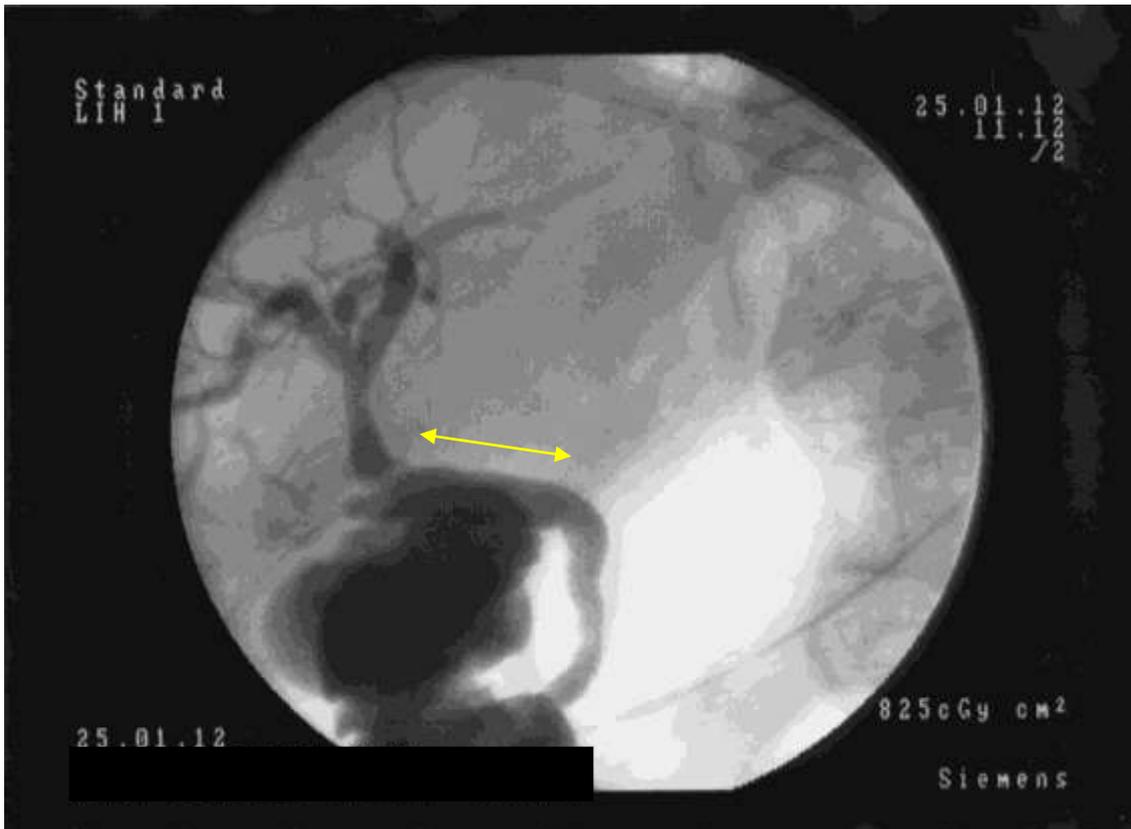
A continuación se muestran las imágenes radiológicas más significativas de cada grupo de estudio en las que se inferencian las principales características descritas, así como la presencia de las dilataciones en el lugar de la implantación de los conductos artificiales sin presencia de estenosis distal al constructo implantado y sin dilatación proximal del árbol biliar, que queda representado en su totalidad.



**Figuras 28 y 29:** Colangiografía practicada a animal del grupo control en la que se observa la representación completa del árbol biliar. No existe presencia de alteraciones.



**Figuras 30 y 31:** Colangiografía practicada a animal del grupo II en la que se observa la representación completa del árbol biliar. No presencia de estenosis ni fugas.



**Figuras 32 y 33:** Colangiografía practicada a animal del grupo III. Se observa la dilatación de la porción en la que se encuentra el implante artificial (delimitado por las flechas) sin dilataciones proximales ni distales. Representación completa del árbol biliar.

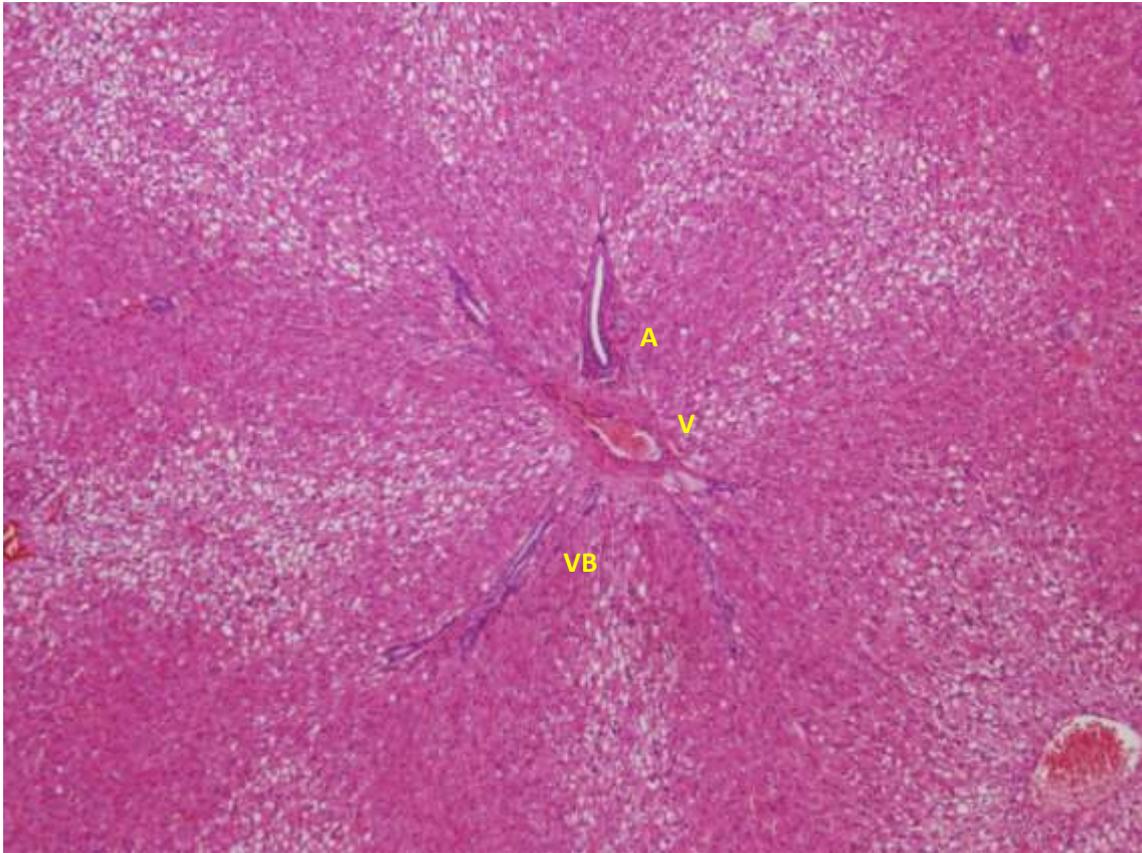
## 5.5 RESULTADOS HISTOLOGICOS. BIOPSIA HEPATICA.

### **Estudio Histológico del Parénquima Hepático**

Para el estudio de los especímenes extraídos de parénquima hepático, no se ha procedido a indicar los resultados hallados en función de los grupos de estudio y el tiempo de sacrificio, puesto que no se hallaron diferencias entre los diferentes grupos de estudio en los especímenes histológicos del parénquima hepático.

Todos los especímenes estudiados presentaban una arquitectura histológica similar a la hallada en los grupos control. No se encontraron características morfológicas que indicaran signos de colestasis, semejantes a los cuadros obstructivos, que tienen en común la acumulación de pigmentos biliares en el interior del parénquima hepático. Los canalículos biliares no se encontraban dilatados y no presentaban tapones de ácidos biliares. Del mismo modo no se apreció acumulación de pigmentos biliares en el interior de los hepatocitos (denominado degeneración espumosa). No se hallaron signos de inflamación en los espacios porta, ni edema ni infiltrados periductales de neutrofilos, así como tampoco la presencia de destrucción de parénquima hepático.

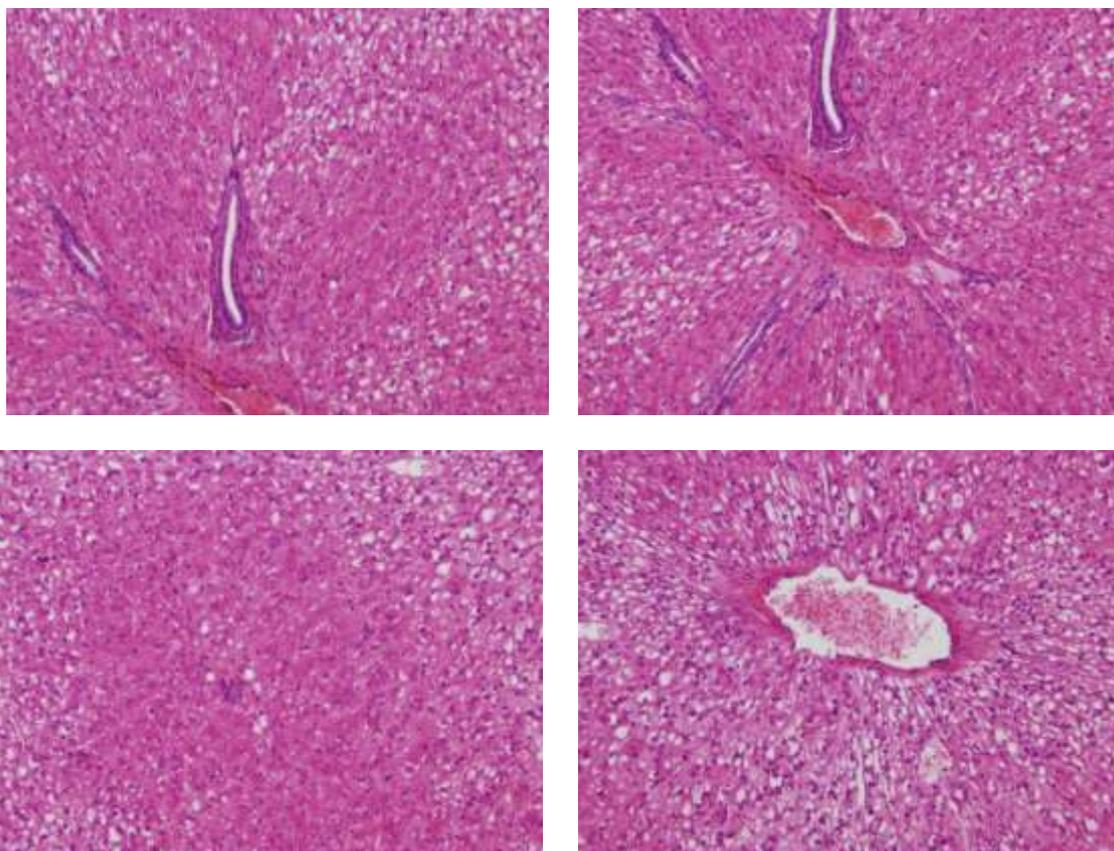
Dado que no se hallaron signos de obstrucción al flujo de la bilis, es extensible que tampoco se hallaron signos de cirrosis hepática secundaria a procesos de colestasis. No se encontraron tampoco signos de cirrosis hepática secundaria a otros procesos inflamatorios (ausencia de tabiques fibrosos, de nódulos parenquimatosos por la regeneración de los hepatocitos, así como ausencia de algún tipo de alteración de la arquitectura de la totalidad del hígado).



**Figura 34:** Detalle de la triada portal en la que se advierten todos los elementos que la conforman (arteria: "A"; vena: "V"; canaliculo biliar: "VB"). No se observan signos inflamatorios ni formación de tabiques fibrosos en el mismo, así como tampoco obstrucción al flujo de la bilis. Tinción HE 10X.



**Figura 35:** Arquitectura histológica hepática similar a la nativa. Los triángulos señalan las unidades funcionales hepáticas (hepatonas) en disposición radial a la triada portal (estrella). No se advierten formaciones anómalas, ni signos de inflamación crónica o aguda. Del mismo modo no se aprecian signos de colestasis. Tinción HE 10X.



**Figuras 36, 37, 38 y 39:** *Detalle de la triada portal en espécimen sacrificado a los 45 días tras la interposición del conducto biliar artificial. No se aprecian signos de degradación del parénquima hepático. Las células vacuoladas corresponden a acúmulos de glucógeno que quedan degradados debido a los reactivos empleados en la tinción. Tinción HE 40X.*

## 6. Discusión.

---

Las **lesiones de la vía biliar** tienen una etiología común en la mayor parte de los casos. Son lesiones graves, que comprometen la viabilidad del flujo de la bilis pudiendo involucrar la funcionalidad hepática, limitando las actividades del sujeto que las sufre al generar en un porcentaje elevado de casos, una minusvalía física asociada a secuelas psicológicas y también por el dolor crónico y las alteraciones gastrointestinales que, a veces, perduran en estos pacientes. En Estados Unidos, las lesiones de la vía biliar extrahepática afectan al 2,8% de los pacientes (*Egawa et al., 2001*), existiendo alrededor de 200.000 personas al año con algún tipo de alteración derivada de las mismas. En Europa las cifras son aún mayores, se estima una incidencia de 300.000 casos nuevos por año englobando todos los pacientes de la Unión Europea (*Azoulay et al., 2011*). Todo ello, supone unos 8.648.000 días de baja laboral y 4.916.000 días de ocupación de cama hospitalaria. Además, a todo ello habría que sumar los problemas derivados de la gran cantidad de secuelas gastrointestinales y digestivas que se asocian a estas lesiones (*Ammori et al., 2000*). La mayoría de los autores consultados expresan que es imposible medir el coste que éste problema supone para un sistema de salud (público o privado), pero que de cualquier manera está infravalorado, puesto que el número de pacientes que sufren estas lesiones es elevado y la cronicidad de la mayoría de los procesos obliga a tratamientos (médicos y quirúrgicos) que se prolongan de forma ilimitada en el tiempo. Además del coste económico, habría que añadir la limitación permanente que genera en el paciente y en la familia ya que, generalmente, son pacientes que asocian trastornos adaptativos ante las limitaciones que sufren.

La incidencia de estas lesiones se debe fundamentalmente a la variabilidad anatómica y los planos tisulares en los que se encuentran las estructuras biliares extrahepáticas, que las hace especialmente vulnerables a agentes externos. Los principales mecanismos de lesión son las heridas incisas, traumatismos cerrados, tracción, isquemia prolongada, quemaduras,

radiación, lesiones eléctricas, tumoraciones intrínsecas, compresión extrínseca de estructuras vecinas, y la variabilidad anatómica (*Lillemoe et al., 1992*).

Las lesiones iatrogénicas de la vía biliar extrahepática, producidas durante las maniobras de la colecistectomía laparoscópica, son el tipo de lesión más frecuente, y se corresponden con lesiones descritas por Bismuth y Strasberg que, por norma general, asocian alteraciones que requieren una intervención quirúrgica para reparar la alteración producida y facilitar el flujo biliar hacia el duodeno (*Connor et al., 2006*). También hay que incluir todas aquellas enfermedades propias, con o sin repercusión sistémica, que afectan a la vía biliar extrahepática en forma simulada a las obstrucciones iatrogénicas (por ejemplo la enfermedad de Charoli, coledocolitiasis, tumoraciones intrínsecas) o a las fugas biliares por lesiones extrahepáticas (por ejemplo el sdr. de Mirizzi) (*Judah et al., 2007; Lillemoe et al., 1992; López et al., 2001*).

La mayor parte se localizan a nivel del conducto hepático derecho en las lesiones iatrogénicas, aproximadamente un 75,3% de los casos, siendo la lesión más frecuente el clipado y sección del mismo por confundirlo con un falso conducto cístico de implantación cercana a la vesícula biliar. En menor porcentaje podemos encontrarlo asociado a otras lesiones de la vía biliar extrahepática, o incluso lesiones vasculares. (*Connor et al., 2006; Thomson et al., 2006*).

Históricamente, las lesiones de la vía biliar periférica han sido consideradas de mal pronóstico, por un lado por el desconocimiento de los mecanismos de regeneración biliar, que aún hoy día siguen sin conocerse en profundidad, y por otro, por la grave repercusión funcional que asocia cualquier gesto de reparación por parte del cirujano, probablemente por la primera causa descrita.

A pesar del mayor conocimiento de los estado pre y postoperatorios, el desarrollo de las unidades de cuidados intensivos y el avance de la tecnología aplicada a técnicas quirúrgicas, la morbimortalidad asociada a la dehiscencia de sutura permanece siendo elevada.

Han sido muchos los autores que a lo largo de la historia han intentado revelar la clave del proceso de regeneración y muchos más los que han intentado tratar las lesiones biliares mediante diferentes técnicas de derivación entero-biliar, con los consecuentes efectos a largo plazo que se describieron en la parte de introducción de este trabajo de investigación, sobre todo aquellas técnicas que no preservaban la funcionalidad de la ampolla de Vater.

La historia de las anastomosis biliares se inicia en el año 1880, fecha en que se hizo la primera mención de dirigir internamente la vía biliar, en el caso de un obstáculo a nivel del hepatocolédoco (vía biliar principal), idea extraída de Nussbaun. Hasta entonces no se conocía ningún método quirúrgico para resolver los problemas de interrupción del drenaje biliar, por obstrucción de las vías biliares tanto intra como extrahepáticas. En el año 1882 Von Winivarther efectúa la primera derivación bilio-digestiva anastomosando la vesícula biliar con el yeyuno (colecisto-yeyunostomía) para resolver un caso de obstrucción del colédoco terminal, caso que fuera publicado en una revista médica de Praga: *“Un paciente con ictericia mecánica producida por una estenosis del colédoco, se le practicó una anastomosis entre la vesícula biliar (colecisto) y el yeyuno (una colecisto-yeyunostomía). Esta operación fue ejecutada entre los años 1880-1882 en siete etapas, seguida de muchas complicaciones y considerada un fracaso por su autor”*.

Lentamente, aparecieron a lo largo de los años del siglo XX multitud de técnicas, algunas de ellas con variantes anastomóticas de todo tipo (estómago, vesícula, dobles anastomosis intestinales). En los últimos años de nuestra era, han aparecido algunos autores que han intentado suplir experimentalmente las lesiones de la vía biliar mediante el implante de otros tejidos o materiales, siendo el resultado bastante pobre en la mayoría de los casos (*Aikawa et al. 2010, Miyazawa et al. 2005, Sugawara et al. 2001, Shimono et al. 1995*).

La **biotecnología y la ingeniería tisular** representan un conjunto de doctrinas científicas multidisciplinares que podrían contribuir a solventar algunos de los problemas médicos de mayor gravedad y más demandados mediante la creación de nuevos tejidos similares a los existentes en los

organismos vivos (Johnson E.O. *et al*, 2008). Las nuevas técnicas que aplican estas doctrinas permiten el desarrollo de nuevos constructos biológicos como alternativas de futuro en la regeneración tisular (Johnson E.O. *et al*, 2008). La generación de tejidos artificiales empleando biomateriales altamente compatibles, es uno de los principales objetivos en la investigación biomédica. Aunque estos tejidos biogenerados mediante ingeniería tisular pudieran ser potencialmente útiles para la sustitución clínica de tejidos dañados, la obtención de células nativas con elevada capacidad de proliferación y diferenciación no es siempre posible (De Ugarte *et al.*, 2003). Por esta razón, la búsqueda de fuentes celulares alternativas para su utilización como sustitutos de las células nativas es uno de los retos actuales de la medicina regenerativa, ya que permite la elaboración de tejidos y la restitución del órgano dañado (Zavan *et al.*, 2010).

Al gran desarrollo de la biomedicina en los últimos años, habría que asociar el conocimiento más profundo de los mecanismos implicados en el proceso de regeneración de la vía biliar, que nos permiten, además de conocer los elementos celulares que median el proceso y qué factores tróficos y tróficos influyen, cómo actúan, cuándo actúan y la manera de mejorar el proceso de regeneración.

### **Modelo Experimental**

La cirugía experimental surge de la necesidad de dar respuesta a planteamientos derivados de la práctica diaria del cirujano en la atención a pacientes mediante la realización de modelos quirúrgicos equivalentes. A pesar del constante desarrollo de métodos alternativos, existen investigaciones para los cuales los animales de laboratorio siguen siendo imprescindibles <sup>61</sup>.

La cobaya en sus distintas líneas ha sido ampliamente utilizada en investigación biomédica desde finales del siglo XIX, debido fundamentalmente a su sencillo manejo, capacidad de adaptación y a su rápida velocidad de reproducción. Algunas neoplasias como el carcinoma de ovario y el carcinoma

de mama presentan un desarrollo similar al que ocurre en el hombre, por lo que constituye un modelo adecuado para el conocimiento de estas patologías. Su uso resulta especialmente útil en estudios anatómicos y fisiológicos del tracto gastrointestinal debido a que esta macroscópicamente compuesto por los mismos segmentos que el intestino humano; así como ocurre con la vía biliar, que presenta una disposición anatómica similar. Por tanto, consideramos adecuada la elección de la cobaya Dunkin Hartley (*cavia porcellus*) para la realización de nuestro trabajo.

La mayoría de los estudios referentes a la sustitución y/o reparación de la vía biliar han sido realizados en animales de experimentación, y se resumen en función del año de publicación en la siguiente tabla.

AUTOR	AÑO	MODELO	n	MATERIAL	RESULTADOS
Aikawa M.	2012	Cerdos	20	Policaprolactona y ácido poliglicólico	No reabsorción del material transcurridos 3 meses
Tao L.	2012	Cerdos	10	Colágeno + bFGF	Shock séptico por peritonitis biliar (100%)
Okamoto K.	2009	Cerdos	12	Policaprolactona y ácido polilactico	Valoración únicamente como parches
Miyazawa M.	2005	Cerdos	18	Policaprolactona y ácido polilactico	Preservación de parámetros bioquímicos. Presencia de estenosis, inflamación y grandes adherencias de tejidos circundantes.
Takahiro T.	2005	Cerdos	18	Policaprolactona + células medula osea (BMC)	Similar al anterior, sin diferencias respecto a la adición de BMC

El primer material que se utilizó para elaborar un conducto artificial que pudiese en contacto ambos cabos fue el PTFE. Sin embargo, los resultados fueron malos debido a los fenómenos de fibrosis que se producían y que obligaban a su retirada en los animales de experimentación (*Xu J et al. 1998; Kurumado et al. 2004; Baudura et al. 1961; Gómez et al. 2002*). Posteriormente, se han utilizado otros materiales más biocompatibles (injertos

venosos, caprolactona) que han reducido la respuesta inflamatoria y que, a su vez, era responsable de los fenómenos de fibrosis producidos en el cabo proximal del colédoco lesionado (*Miyazawa et al. 2005; Aikawa et al. 2010; Christensen et al. 2005; Mendelowitz et al. 2002; Gómez et al. 2004*). La mayoría de los estudios experimentales coinciden en la utilidad de los conductos sintéticos de distintos materiales que existen en el mercado para el tratamiento de lesiones con defecto, sin embargo, la experiencia comunicada en la literatura con el uso de estos conductos es contraria, observando una mayor proporción de malos resultados que los obtenidos mediante materiales completamente biocompatibles y que desaparecen transcurrido un periodo de neoformación <sup>99</sup>.

En nuestro trabajo, el modelo de conducto biliar artificial pretende favorecer o estimular el proceso de reparación mediante la aplicación de biomateriales que sirvan como “andamio” de distribución tridimensional, que probablemente favorezca la diferenciación de algunas células latentes en el epitelio biliar, en células con cierto poder de regeneración epitelial que favorezcan y promuevan el proceso de neoformación a este nivel.

Este objetivo forma parte de una segunda fase de nuestro trabajo de investigación, actualmente en avanzada etapa de desarrollo es espera de resultados definitivos que permitan su publicación.

Se ha demostrado en varios estudios, que cuando existe una lesión que afecta a menos del 30% de la circunferencia de la vía biliar extrahepática, el proceso de recuperación se produce a expensas fundamentalmente de los fibroblastos que forman una fibrosis cicatricial. Sin embargo, cuando hay lesiones más graves, que afectan a más del 90% de la circunferencia, el mecanismo fundamental que interviene en la reparación apenas sufre la necesidad regenerativa que sería necesaria para producir un neoconducto biliar.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que cuando utilizamos un material inerte alrededor de suturas, este produce a su vez un cierto aislamiento sobre la acción local del sistema inmune, el cual podría favorecer la proliferación bacteriana y la producción de abscesos. Los resultados

contradictorios al analizar el uso de métodos similares en la producción de anastomosis biliares sobre diferentes especies animales, nos hace pensar que la respuesta clínica a la dehiscencia de sutura difiere entre las mismas. Así, parece que las cobayas y los cerdos son los animales que presentan mayor similitud con los humanos en cuanto a la respuesta a infecciones intraabdominales <sup>62</sup>.

Nuestro objetivo en el estudio experimental ha sido valorar la calidad y recuperación de la fisiología biliar tras la implantación de un tubo artificial interpuesto, previamente utilizado como biomaterial en otros ámbitos, aunque novedoso para esta aplicación: el colágeno unido a la agarosa. No existe en la bibliografía actual revisada ningún artículo o trabajo en el que se analice el proceso de recuperación y cicatrización de la vía biliar tras la interposición de un tubo compuesto de biomaterial.

El empleo de biomateriales como andamio para el crecimiento tisular constituye una línea de investigación emergente en el ámbito de la regeneración y sustitución de tejidos. Estos biomateriales necesitan cumplir una serie de requisitos para su utilización como soporte tisular. Además de ser biocompatibles y biodegradables, deben constituirse como una estructura porosa tridimensional que permita la integración celular y el intercambio con los tejidos, así como mantener unas propiedades mecánicas adecuadas y una superficie química apropiada para la adhesión de células y proteínas. En este sentido, el colágeno y la agarosa, constituyen materiales ideales por sus propiedades reconocidas de compatibilidad, permeabilidad, viabilidad celular, estabilidad dimensional y fácil manejo. Su versatilidad ha permitido su utilización en una amplia variedad de aplicaciones médicas como la encapsulación y el transporte celular, la reconstrucción de nervios, la reconstrucción de mucosa oral y multitud de aplicaciones electrofisiológicas <sup>63-65</sup>.

Existen múltiples trabajos de investigación en los que el colágeno (tanto en disposición bidimensional, como tridimensional), ha sido utilizado como

soporte temporal para favorecer la regeneración tisular <sup>66-70</sup>. Basándonos en los estudios publicados en cobayas, hubo mínima respuesta inmune, mínima encapsulación y adecuada incorporación celular <sup>71</sup>. Nuestro grupo realizó estudios previos que pusieron de manifiesto la tolerancia de éste material tras su implantación en el modelo animal seleccionado para nuestra investigación, sin observar efectos adversos. En una fase previa al desarrollo de la investigación, se emplearon 5 cobayas de la misma raza que el resto de series, a las cuales se le implanto el constructo de colágeno/agarosa a diferentes niveles de la anatomía: tejido celular subcutáneo, musculatura abdominal, vísceras intraabdominales y grasa retroperitoneal. En todas ellas no se encontró formación de abscesos y/o infección, así como reabsorción macroscópica completa del material transcurridos dos meses.

En concreto, en este trabajo se ha utilizado un modelo de reparación biliar periférica basado en el uso de conductos de colágeno/agarosa. De este modo, pretendemos comparar los resultados del nuevo modelo frente a la situación nativa de los conductos biliares, para poder observar similitudes y alteraciones. Se realiza una evaluación directa de la influencia de los biomateriales en el proceso de recuperación y si su uso, podría constituir un avance en el tratamiento de las lesiones de los conductos biliares. Además, la validez interna del trabajo queda contrastada mediante la inclusión del grupo control: animales sanos (sin lesión).

El hecho de incluir el grupo control (grupo 1), donde no existía reparación de ninguna lesión generada, nos ha permitido estudiar la fisiológica hepática y biliar basal de la especie. Del mismo modo permitió el estudio histológico hepático de esta especie, que no había sido descrito hasta el momento. El defecto crítico ha sido muy debatido por distintos autores, considerando que, en algunos casos, un defecto menor a la mitad de la circunferencia del conducto biliar puede regenerar espontáneamente con cierto grado de fibrosis. Para evitar este punto de conflicto, se produjo una lesión completa de toda la sección del conducto.

Se considera que el periodo crítico en la cicatrización de las anastomosis de índole digestiva varía entre el tercer y quinto día postoperatorio. Teniendo en cuenta que a las dos semanas se mantiene el 75% de la resistencia inicial de la mayoría de las suturas reabsorbibles actualmente utilizadas, no parece que el uso de éstas pueda aportar beneficios en este sentido <sup>72</sup>. Por este motivo en nuestro estudio optamos por la utilización de suturas de reabsorción lenta (Maxon ®), la cual mantiene aproximadamente el 70% de su fuerza de tensión original hasta 6 meses después de la implantación y más del 40% transcurridos 7 meses, con periodos de absorción completa variables en torno a 12 meses <sup>73</sup>.

En todos los grupos se realizó una técnica quirúrgica similar, por lo que la variabilidad entre los mismos únicamente difiere en el tiempo hasta su sacrificio y a la presencia de colágeno/agarosa utilizado para la reparación biliar. En la mayoría de los estudios de investigación, los parámetros utilizados para evaluar el proceso de reparación que ocurre tras la realización de una anastomosis se engloban en tres categorías: bioquímicos, fisiológicos e histológicos. La relación entre los resultados obtenidos de su medición y el proceso real de reparación permanece siendo incierta, no asociándose axiomáticamente solo a uno de los parámetros.

### **Parámetros bioquímicos y clínicos**

En primer lugar, el estudio de los parámetros **clínicos** en todos los grupos de experimentación permitió evaluar la ganancia ponderal de peso en los sujetos de estudio para, de este modo, valorar posibles efectos indirectos por variaciones digestivas que se podrían producir en aquellos sujetos con una reparación de la vía biliar. La existencia de una lesión periférica que impida el flujo de la vía biliar desde los conductillos intralobulillares hepáticos hasta el conducto digestivo, provoca el desequilibrio y alteraciones en la digestión de los alimentos que se traducen en un crecimiento y ganancia de peso por debajo de las condiciones fisiológicas al igual que ocurre en el ser humano.

Como era de esperar, las cobayas del grupo control siguieron una ganancia ponderal similar al crecimiento normal de la especie en las condiciones de estabulación recreadas, tal y como se pudo comprobar al enfrentar los resultados en las gráficas de crecimiento normal de la especie suministradas por la empresa Harlam Porcellus. Por otro lado, cuando se aplicaron conductos biliares interpuestos en la vía biliar nativa, se observó un crecimiento de los sujetos similar a las condiciones basales, sin diferencias estadísticas significativas como se puede contrastar en el apartado de resultados, ello sugiere que la técnica mantiene íntegra la función fisiológica de conducir el flujo de la bilis hasta el intestino delgado para contribuir a la digestión de los alimentos. Se comprueba así que la utilización de biomateriales biocompatibles como los conductos de colágeno constituyen una mejora significativa respecto al tratamiento actualmente empleado en clínica humana consistente en una derivación bilioenterica, puesto que se consigue preservar la función fisiológica de la vía biliar extrahepática, evitando las comorbilidades asociadas a las técnicas de derivación bilioenterica.

A pesar de no ser objeto de cuantificación por nuestros técnicos del animalario, estos no refirieron cambios en el consumo del alimento previsto en los días postoperatorios ni en el número-calidad de las deposiciones.

Los resultados **bioquímicos** nos permiten determinar de forma objetiva la existencia de obstrucción al flujo de la bilis mediante la medición de los niveles sanguíneos de bilirrubina total y fraccionada. En todos los grupos experimentales estudiados se pudo observar que los valores eran muy cercanos a los obtenidos en los animales del grupo control. Mediante los test paramétricos estadísticos pudimos demostrar con un rango de significación  $p < 0,05$  que los valores de bilirrubina obtenidos en todos los sujetos de estudio eran similares a los encontrados en las determinaciones practicadas a los sujetos control. Del mismo modo, se procedió a la determinación de otros parámetros sanguíneos relacionados con la fisiología de la vía biliar para determinar variaciones indirectas que pudieran producirse por alteraciones en el flujo normal de la bilis al intestino delgado. Al igual que el caso anterior, las determinaciones sanguíneas fueron evaluadas mediante test estadísticos paramétricos, que nos permiten afirmar que no existen diferencias significativas en los valores encontrados en los grupos de estudio en

comparación con el grupo control ( $p < 0,05$ ). A su vez nos van a permitir establecer una correlación con los hallazgos clínicos y los hallazgos histológicos, lo que incrementa el grado de validez del estudio. Algunos de estos parámetros estudiados correspondían a las enzimas hepáticas habituales (GGT, GOT, GPT), que se elevan frente a pequeñas agresiones del parénquima hepático, o incluso en casos de estrés metabólico del mismo. Como hemos mencionado anteriormente, ninguna de estas enzimas se encontraba elevada en las determinaciones realizadas a lo largo del estudio, lo que sugiere que no se produjo ninguna alteración fisiológica a nivel hepático tras la implantación del neoconducto biliar de colágeno/agarosa.

Una de las principales aportaciones de este estudio es la inclusión de forma sincrónica de un estudio bioquímico pormenorizado de cada animal y, al mismo tiempo, un análisis radiológico. En la mayoría de los estudios de técnicas de reparación de la vía biliar publicados hasta el momento, no existe un estudio de parámetros bioquímicos, clínicos y fisiológicos al mismo tiempo  
98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105.

### **Parámetros fisiológicos**

Con respecto al **estudio radiológico** realizado, se midieron cuatro parámetros para evaluar la funcionalidad y características anatómicas de la vía biliar (estenosis, dilataciones, fuga, fistula). La implantación del biomaterial de colágeno en la longitud de la vía biliar, como hemos mencionado hasta el momento sugiere que se integra de manera correcta en el ambiente tisular, pero gracias a la visión indirecta de la colangiografía podemos afirmar que se produce un paso correcto del flujo de la bilis desde las vías biliares intrahepáticas hasta el duodeno sin presencia de fugas o estenosis. A lo largo de todas las colangiografías realizadas a los animales de experimentación no se observó en ningún momento la presencia de salida del material de contraste fuera del árbol biliar o la luz intestinal, así como tampoco obstrucciones al flujo normal de la misma. Indirectamente podemos afirmar pues que no existen fistulas biliares a otros órganos, puesto que el recorrido que llevaba el contraste yodado era el esperado a través de su vía fisiológica, confirmado también a través de la no presencia de trayectos

anómalos o presencia de residuos de contraste en otros órganos o incluso en la cavidad abdominal. Se realizó una comparación estadística a través del *análisis de Varianza (ANOVA)*, que nos permite asegurar de manera estadísticamente significativa, que los resultados no son debidos al azar, y que la prótesis artificial de colágeno/agarosa se integra de manera correcta para realizar las funciones fisiológicas de la vía biliar extrahepática.

Por otro lado debemos afirmar que sí existió un mayor número de dilataciones de la vía biliar presentes en los animales de experimentación a los que se les implantó el conducto artificial biliar. Estos hallazgos pueden ser matizados y aclarados, puesto que el calibre del conducto artificial biliar tenía en ocasiones un calibre un 25% mayor al de la luz del colédoco nativo (sobre todo en aquellos sujetos de experimentación de menor edad y peso en el momento de la intervención). Todas las dilataciones observadas en los sujetos intervenidos fueron clasificadas como grado 1 (>3-4mm) dentro de los rangos establecidos en el apartado de material y métodos. Sin embargo, estas dilataciones no tuvieron ninguna correlación bioquímica o clínica, puesto que los valores de bilirrubina no estaban alterados, y las enzimas de colestasis no estaban alteradas. La ganancia ponderal de estos sujetos tampoco se vió afectada. Podemos afirmar que a pesar de existir una mayor incidencia de dilataciones en los grupos de animales intervenidos, éstas eran de pequeño calibre y no tenían correlación clínica ni funcional, como puede inferirse en los resultados de los demás parámetros estudiados. Por tanto, podríamos confirmar que la aplicación de biomateriales no altera el comportamiento de la vía biliar extrahepática del animal para ninguno de los parámetros radiológicos estudiados en ninguno de los tres intervalos de tiempo.

Dada la alta evidencia de conservación en los parámetros clínicos y fisiológicos al aplicar biomateriales biocompatibles a los conductos biliares sintéticos de colágeno, probablemente este estudio radiológico no sea aplicable para determinar si existe regeneración de la vía biliar. Sin embargo, sí que nos permite afirmar que la función biológica de mayor repercusión (conducción de las secreciones biliares) se mantiene conservada sin presencia de obstrucciones o trayectos anómalos que pudieran repercutir en su correcto funcionamiento.

En su conjunto, todos estos resultados demuestran que los conductos biliares de colágeno a los que se añaden biomateriales biocompatibles de agarosa favorecen el proceso de reparación, y más aún, mantienen el correcto funcionamiento de la vía biliar extrahepática hasta la completa regeneración y degradación del conducto artificial, sin la presencia de complicaciones o comorbilidades de otras técnicas, ni tampoco con la presencia de efectos adversos a corto plazo. En el momento actual, se postula que una de las principales causas de fracaso en el tratamiento de una lesión de la vía biliar periférica con pérdida de sustancia o defecto que nos impida realizar una reparación directa, es la ausencia de un “andamio o armazón” tridimensional que ponga en contacto ambos cabos del conducto lesionado (*Shimono K., Nose Y., 1995*).

El momento más adecuado para el estudio de la calidad de la reparación y recuperación funcional no ha sido precisado en los múltiples trabajos experimentales publicados. En la literatura se describen varios periodos de tiempo para el sacrificio de los animales según los parámetros que se pretenden analizar. En nuestro estudio elegimos 3 momentos distintos (7, 15 y 45 días) para evaluar las fases inicial y media de la cicatrización, consideradas críticas para la aparición de fugas y dehiscencias en las posibles suturas. Este criterio no es coincidente con la mayoría de los estudios realizados para valoración de anastomosis <sup>110, 111, 112</sup>. En los tratados de Veterinaria no existen datos al respecto sobre la incidencia y variación en las anastomosis biliares correspondientes a las cobayas empleadas. Básicamente estos datos están referidos únicamente a perros y gatos en la práctica clínica, por lo que los resultados no son extrapolables <sup>142</sup>.

En nuestra serie la tasa global de abscesos perianastomóticos y fistulas biliares ha sido similar (0%), no siendo concordantes con lo ocurre en la práctica habitual, donde ambas son complicaciones infecciosas y pueden ser consideradas como la evolución de un mismo proceso. Estas cifras se muestran similares a las recogidas por otros grupos experimentales, aunque algunos de ellos tienen escasos estudios que analizan de forma específica estas variables. Éste hecho puede ser explicado por los criterios y variables de estudio planificados en algunos grupos donde únicamente se valoran los

parámetros bioquímicos e histológicos, sin tener presente cualquier discontinuidad o fallo anastomótico.

De igual forma y en relación con lo anterior, la mortalidad ha sido nula en nuestra serie, lo cual nos orienta hacia la validación de nuestra técnica quirúrgica y en general de los cuidados perioperatorios realizados.

No obstante, los resultados obtenidos tras el análisis inferencial de estas variables cualitativas deben ser interpretados con cautela debido a la existencia de algunas frecuencias teóricas bajas. Para una valoración específica de estas complicaciones sería necesario plantear un estudio experimental con mayor tamaño muestral.

#### **Parámetros histológicos. Biopsia hepática**

Los hallazgos histológicos (biopsia hepática) obtenidos en nuestro trabajo fueron recogidos mediante protocolo que incluyó parámetros de medición estandarizados y validados en estudios previos <sup>74-79</sup>.

El estudio histológico del parénquima hepático mostró que no existían diferencias significativas entre los grupos de estudio y los sujetos del grupo control. En los tres grupos de estudio no se observaron signos de cirrosis, ni de estasis biliar. La morfología de las hepatonas estaba conservada, observándose todos los elementos de la triada portal sin puentes de fibrosis ni presencia de células inflamatorias perivasculares. En nuestro estudio, se valoró el grado de infiltración conectiva que existía en cada uno de los casos sin encontrar tampoco diferencias significativas.

En definitiva, podemos decir que el presente trabajo de investigación ha evaluado el efecto de la interposición de una prótesis de colágeno/agarosa aplicado de forma novedosa en la recuperación de la continuidad de la vía biliar principal en los primeros 45 días del postoperatorio. No obstante, su comportamiento a largo plazo necesita ser analizado en futuros estudios experimentales, basados en estos resultados iniciales. Son necesarias nuevas investigaciones con el fin de determinar si la utilización combinada de ambos compuestos puede modular la reparación y reconstrucción histológica de la vía biliar.

En cuanto a las **limitaciones** del estudio, habría que resaltar que el modelo desarrollado y en el que se han aplicado los conductos biliares artificiales son animales de experimentación, lo que nos permite extrapolar los resultados sólo parcialmente a espera de estudios en animales de mayor tamaño.

# 7. Conclusiones.

---

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se infieren las siguientes conclusiones:

1. Los métodos y técnicas aplicados en este trabajo de investigación permitieron el desarrollo de un constructo modificado *ad hoc* como sustituto artificial en animales de experimentación. Del mismo modo se consiguió desarrollar un **modelo experimental de lesión de la vía biliar periférica (colédoco) con defecto de 10 mm en animales de experimentación**, que favoreciera su evaluación objetiva mediante técnicas y métodos estandarizados, dando respuesta al objetivo general que nos planteamos al diseñar el mismo. Se valida el diseño realizado de un modelo experimental de lesión crítica de la vía biliar en cobayas así como la reparación mediante biomateriales modificados.

2. La sustitución del conducto biliar principal en cobayas por un constructo de colágeno/agarosa ha mantenido inalterable la funcionalidad de la vía biliar como demuestran la normalidad de los **parámetros bioquímicos** (bilirrubina total, GOT, GPT, GGT, fosfatasa alcalina y amilasa) en todos los grupos de estudio con una significancia estadística para  $p < 0.5$ .

3. La sustitución del conducto biliar principal en cobayas por un constructo de colágeno/agarosa no ha producido en ningún caso de todos los grupos de estudio situaciones de **peritonitis diseminada, localizada (abscesos), y/o adherencias** con una significancia estadística para  $p < 0.5$ .

4. La sustitución del conducto biliar principal en cobayas por un constructo de colágeno/agarosa no ha producido en nuestro estudio ninguna alteración **histológica a nivel hepático**, hecho este concordante con la

normalidad de los parámetros bioquímicos antes expuestos con una significancia estadística para  $p < 0.5$ .

**5.** La sustitución del conducto biliar principal en cobayas por un constructo de colágeno/agarosa ha mantenido el calibre de la vía biliar en parámetros normales como ha demostrado el **estudio radiológico**, así como la ausencia de fugas, fistulas o dehiscencias con una significancia estadística para  $p < 0.5$ .

# 7. Conclusions.

---

Of the results obtained in the present work the following conclusions are inferred:

**1.** The methods and technologies developed in this project allowed the construction of an artificial substitute, which could facilitate his use in experimentation animals. In the same way we managed to develop an experimental model of injury of the biliary peripheral tract (choledoco) with a fault of 10 mm in experimentation animals, which could favor his objective evaluation through standarized methods and techniques.

**2.** The use of **biocompatible biomaterials** of collagen and agarose gel allowed to elaborate an efficient hidrogel for the growth of the biliary extrahepatic tract to his slant that favored the regeneration. These biomaterials constructs of collagen managed to put in contact both ends, settling this way the zone of fault and contributing to his repair.

**3.** The **clinical and functional evaluation** of the animals in those who were implanted three-dimensional tubes, made of biomaterials of collagen and agarose gel demonstrated the usefulness of these constructs for the treatment of injuries from the biliary peripheral tract with a fault of 10 mm in an animal model. The animals treated with the above mentioned artificial implants showed clinical, biochemical and functional parameters of regeneration of the biliary tissue similar to the basal situation of the studied organism, without presence of digestive alterations and without biliodigestive associated comorbidities, present in other surgical techniques.

# 8. Bibliografía.

---

La bibliografía utilizada para la realización de este trabajo de investigación es la que sigue a continuación, por orden de aparición:

- 1.** Anatomia Humana descriptive, topografica y functional. H. Rouviere, A. Delmas. Duodecima edicion. Ed. Masson 2010. Barcelona.
- 2.** Anatomia Humana. Francisco Orts LLorca. Quinta Edicion. Editorial Cientifico-Médica. Madrid.
- 3.** Atlas de Anatomia Humana. Frank H. Netter. Cuarta edicion. Ed. Masson 2010. Barcelona.
- 4.** Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular. Quintra edicion. Ross, Pawlina. Ed. Panamericana 2013.
- 5.** Atlas de histologia y organografía microscopica. Jesus Boya Vegue. Ed. Panamericana 2012.
- 6.** Histology for pathologists, second edition. Edited by Stephen S. Stemberg. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997.
- 7.** Tratado de fisiología médica. Guyton & Hall. Decima edicion. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana 2009. Madrid.
- 8.** Changing the culture of cholecistectomy. Strasberg. J AM Coll Surg 2000; 201:604-11.
- 9.** Cirugia biliopancreatica. D. Casanove, L. Fernandez-Cruz. Primera edicion. Editorial Arán 2009. Madrid.

- 10.** Cirugia AEC. Segunda edicion. P. Parrilla Paricio, J.L. Landa Garcia. Editorial medica Panamericana 2012.
- 11.** Medicina Interna. Farreras, Rozman. Decimoquinta Edicion.. Volumen I. Ed. Elsevier.
- 12.** Randomized trial of choledochocholedochostomy with or without a T tube in orthotopic liver transplantation. Scatton O, Boudjema K, et al. Service de Chirurgie, Hopital Cochin, Assistance Publique, Paris, France. Annals of surgery 2001 Mar; 233 (3): 432-7.
- 13.** Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. Fodor, WL. Reprod Biol Endocrinol 2003; 1:102.
- 14.** Reconstruccion de tejidos y órganos utilizando la ingeniería tisular. Falke GF, Atala A. Arch Argent Pediat 2000; 98(2):103-114.
- 15.** Tissue engineering and biomaterials in regenerative medicine. Nolan K, Millet Y, Ricard C, Stabler CL. Cell transplant 2008; 17(3):241-3.
- 16.** The emerging field of cell and tissue engineering. Park DH, Borlogan CV, Eve DJ, Sandberg PR. Med Sci Monit 2008 Nov 14; (11):RA 206-20.
- 17.** Cell engineering: spearheading the next generation in healthcare. Jayasinghe SN. Biomed Mater 2008 Sep; 3(3).
- 18.** Challenginf in tissue engineering. Ikada Y. J R Soc Interface 2006; 4(10): 589-601.
- 19.** A tissue-engineered artificial bile duct grown to resemble the native bile duct. American journal of transplantation 2005;5:1541-1547.

20. Nanotechnology for cancer diagnostic: promises and challenges. Gradzinski P, Silver M, Molnan LK. *Expert Rev Mol Diag* 2006; 6(3): 307-18
21. Potential of nanofiber matrix a tissue engineering scaffolds. Ma Z, Kotaki M, Inai R, Ramkrishna S. *Tissue Eng* 2005;11(1-2):101-9.
22. The design os scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Young S, Laong K, Du Z. *Tissue Eng* 2001, 7(6):679-89.
23. An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications. *Ann Acad Med Singapore* 2001; 30:183-91.
24. Tissue engineering in plastic reconstructive surgery. Walgenbach RJ, Voigt M, Andree. 2001, 263:372-8.
25. Principles of tissue engineering. Kwan MD, Wan MC, Longaker MT. Skeletal. *Tissue engineering* 3<sup>rd</sup> Edition; 62, 932-4 p 935.
26. Repair of critical size defect in the rat mandibule using allogeneic type I collagen. Saadeh PB, Rhosla RK, Mehrara BJ. *J Craniofac Surg* 2001; 12:573-79.
27. Chitosan: potential use as bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants. Bumgardner JD, Wiser R, Gerard PD. *J biomater sci Polym* 2003; 14(5), 423-38.
28. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. Seol Y, Lee JY, Park YJ. *Biotechnol Lett* 2004; 26 (13):1033-41.
29. Treatment of osteochondral defect with autologous bone marrow in a hyaluronan-based delivery vehicle. Scholaga LA, Gao J, Dennis JE. *Tissue Eng* 2002 8(2):333-47.
30. Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering. Neuss S, Apel C, Buttler P. *Biomater* 2008;29:302-13.

- 31.** Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1997; 36 (1):17-28.
- 32.** Synthetic biodegradable polymers for orthopaedic applications. Behravesch E, Yasko AW, Engel PS. *Clin Orthop Relat Res* 1999; 367(5):118-29.
- 33.** The use of fibrin and polylactic acid hybrid scaffold for articular cartilage use. Munirah S, Kim SH, Ruzzimah BH. *Eur Cell Mater* 2008; 21(15): 41-52.
- 34.** Principios de bioquímica. Lehninger. Ediciones Omega 2010. Barcelona.
- 35.** The use of porcine Organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. Reichl S, Muller-Guyman CC. *Int J Pharm* 2003; 250, 191-201.
- 36.** Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast containing fibrin gels. Meana A, Iglesias J, Del Rio M. *Burns* 1998; 24, 621-630.
- 37.** Direct patterning of mammalian cells onto porous tissue engineering substrates using agarose stamps. Stevens MM, Mayer M, Anderson Dg. *Biomaterials* 2005; 26 (36):7636-41.
- 38.** A histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. Sanchez-Quevedo MC. *Histol Histopathol* 2007; 22:631-40.
- 39.** Small intestinal submucosa as a bioscaffold for biliary tract regeneration. Roscu M, Ponsky J. *Surgery* 2002; 132, 480-487.

40. Tissue engineering of small diameter vascular grafts. Teebken OE, Haverich A. Eur J vasc Endovasc Surg 2002; 23, 475-485.
41. Isolation and characterization of mouse hepatic stem cells in vitro. Weiss MC, Strick-Marchand H. Semin Liver Dis 2003; 23:313-324.
42. Liver stem cells and development- gerber MA, Thung SN. Lab Invest 1993; 68:253-254.
43. The need to develop artificial bile ducts. Shimono K, Nose Y. Artif Organs 1995; 19:115-116.
44. Experiment for a polyurethane replacement of the common bile duct. XU, Sun Z, Zhang Q. Chin Med J 1998; 11:86-87.
45. End-to-End anastomosis between tissue-engineered intestine and native small bowel. Rahaira S, Kim S. Tissue Eng 1999; 5:339-346.
46. Regeneration of extrahepatic bile ducts by tissue engineering with a bioabsorbable polymer. Miyazawa M, Aikawa M, Okada K. J Artif organs 2012; 15:26-31.
47. A novel treatment for bile duct injury with a tissue-engineered bioabsorbable polymer patch. Aikawa M, Miyazawa M, Okamoto K. Surgery 2009; 12:575-580.
48. Histological and histochemical methods. Kiernan JA. Theory and practice 4<sup>th</sup> Edition by Scion Publishing limited 2008.
49. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection. Junquera LCV. Histochemical journal 1979; 11, 447-455.
50. A procedure to prepare cultured cells in suspension for electron probe X-ray microanalysis: application to scanning and transmission microscopy. Fernandez-Segura E; Cañizares FJ, Cubero MA, Campos A. A. Journal of Microscopy 1999, 196(pt1):19-25.

- 51.** Routine or selected intraoperative cholangiography during laparoscopic cholecystectomy. Berci G, Sackier JM, Paz-Partlow M. *American Journal Surgery* 1991; 161: 365-60.
- 52.** Operative cholangiography in elective cholecystectomy. Pernthaler H, Sandbichler P, Schimid TH. *British Journal Surgery* 1990;77:390-400.
- 53.** Routine operative cholangiography. Mills JL, Beck OE. *Surgical Gynecol Obstet* 1986,163:363-4.
- 54.** A requiem for the routine operative cholangiogram. Gerber A. *Surg Gynecol Obstet* 1987; 164:124-6.
- 55.** Manometria y debimetria en la cirugía de las vías biliares. Garrido Santo A, Varela de Ugarte A, Asension Perez M, Muñoz Serrano M. *Cirugia Española* 1983, 37(1):68-71.
- 56.** Selective operative cholangiography. Boyokowsky H, Slutzki S. *Surg Gynecol Obstet* 1987; 164:124-6.
- 57.** Operative cholangiography. Shively EH. *American journal of Surgery* 1990; 159:350-47.
- 58.** Selective use of intraoperative cholangiography. Greco L, gentile A. *Minerva Gastroenterology* 1995 (Sep):41(3): 223-6.
- 59.** Manual de estadística y Epidemiología 2º Edicion. Eduardo Forcada, Jurado Ramon A, Ruiz Mateos B. Editorial Iceberg 2010. Madrid.
- 60.** Bioestadística aplicada. Pardo y San Martín 1998. Editorial Masson. Pags 248-250.
- 61.** The age of biology: opportunities and challenges for laboratory animal medicine. Van Hooser G. *Scand J Lab Anim Sci* 1999; 26:176-84.
- 62.** Choosing the best animal species to mimic clinical anastomotic leakage in humans: a qualitative systematic review. Pommergaard HC,

Rosenberg J, Scgumacher-Petersen C, Achiam M. Eur Surg Res 2011; 47:173-81.

- 63.** Based hydrogel as potential biopolymeric carrier for drug delivery and cell delivery systems. Present status and applications. Giri Tk, Thabur D, Alexander A, Ajazuddin, Badwaik H, Tipotteni. Curr Drug Deliv 2012; 9:539-55.
- 64.** Scaffold: a novel barrier for cell and drug delivery. Cit Rev Ther Drug Carrier Syst 2012; 29:1-63.
- 65.** Microencapsulation using vibrating technology. Whelelan M, Marson IW. Microencapsul 2011; 28:669-88.
- 66.** Itoh S, Takakuda K, Kawabata S et al. Evaluation of cross-linking procedures of collagen tubes used in peripheral nerve repair. Biomaterials 2002; 23: 4475-4481
- 67.** Ishaug S.L., Crane G.M., Miller M.J., Yasko A.W., Yaszemski M.J., Mikos AG. Bone formation by three- dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. J Biomed Mater Res 1997; 36(1): 17- 28.
- 68.** Junquera LCU, Bignolas G and Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. Histochemical Journal 1979; 11: 447-455.
- 69.** Kwan M.D., Wan D.C., Longaker M.T. (2007). Principles of tissue engineering. Skeletal - tissue engineering. 3 rd . Edit. 62, 935- 44. p.935.
- 70.** Ma Z, Kotaki M, Inai R, Ramkrishna S. Potencial of nanofiber matrix a tissue engineering scaffolds. Tissue Eng 2005; 11(1-2): 101-9
- 71.** Miyata t, Taira T, Noishiki Y. Collagen engineering for biomaterials use. Clin Mater 1992; 9: 139-148.

- 72.** Rapidly resorbable vs non resorbable suture for experimental colonic anastomosis in rats. A randomized experimental study. Klein M, Pommergaard HC, Gögeun I, Rosenberg J. *Int J Surg* 2011; 9:332-4.
- 73.** Factors affecting the degradation. Alexis F. polymer International 2005; 54:36-46.
- 74.** Mirizzi PL: La colangiografía durante las operaciones de las vías biliares. *Bol Soc Cir (Arg)* 1932;16:1133-5.
- 75.** Sackier JM, Berci G, Phillips E, Carroll B, Shapiro, S, Paz Partlow M: The role of cholangiography in laparoscopic cholecystectomy. *Arch Surg* 1991; 126:1021-5.
- 76.** Gregg RD : The case for selective cholangiography, *AM J Surg* 1988, 155:540-4.
- 77.** Shively EH: Operative cholangiography. *Am J Surg.* 1990; 159:350-4.7
- 78.** Ammori BJ, Joseph S, Attia M, Lodge JP. Biliary strictures complicating pancreaticoduodenectomy. *Int J Pancreatol* 2000; 28:15–21.
- 79.** Egawa H, Inomata Y, Uemoto S et al. Biliary anastomotic complications in 400 living related liver transplantations. *World J Surg* 2001; 25: 1300–1307.
- 80.** Sugawara Y, Makuuchi M, Takayama T et al. Small-for-size grafts in living-related liver transplantation. *J Am Coll Surg* 2001; 192:510–513.
- 81.** Halme L, Hockerstedt K, Lautenschlager I. Cytomegalovirus infection and development of biliary complications after liver transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 1853–1858.

- 82.** Rosen M, Ponsky J, Petras R, Fanning A, Brody F, Duperier F. Small intestinal submucosa as a bioscaffold for biliary tract regeneration. *Surgery* 2002; 132: 480–487.
- 83.** Teebken OE, Haverich A. Tissue engineering of small diameter vascular grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002; 23: 475–485.
- 84.** Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* 2001; 344: 532–533.
- 85.** Kaihara S, Kim S, BenvenutoMet al. End-to-end anastomosis between tissue-engineered intestine and native small bowel. *Tissue Eng* 1999; 5: 339–346.
- 86.** Perez A, Grikscheit TC, Blumberg RS, Ashley SW, Vacanti JP. Tissue-engineered small intestine: ontogeny of the immune system. *Transplantation* 2002; 74: 619–623.
- 87.** Terai S, Yamamoto N, Omori K, Sakaida I, Okita K. A new cell therapy using bone marrow cells to repair damaged liver. *J Gastroenterol* 2002; 37: 162–163.
- 88.** Vessey CJ, de la Hall PM. Hepatic stem cells: a review. *Pathology* 2001; 33: 130–141.
- 89.** Watanabe M, Shin'oka T, Tohyama S et al. Tissue-engineered vascular autograft: inferior vena cava replacement in a dog model. *Tissue Eng* 2001; 7: 429–439.
- 90.** EI-Assmy A, Hafez AT, EI-Sherbiny MT et al. Use of single layer small intestinal submucosa for long segment ureteral replacement: a pilot study. *J Urol* 2004; 171: 1939–1942.

- 91.** Noishiki Y, Tomizawa Y, Yamane Y, Matsumoto A. Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. *Nat Med* 1996; 2: 90–93.
- 92.** Malhi H, Irani AN, Gagandeep S, Gupta S. Isolation of human progenitor liver epithelial cells with extensive replication capacity and differentiation into mature hepatocytes. *J Cell Sci* 2002; 115: 2679–2688.
- 93.** Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 1999; 284: 1168–1170.
- 94.** Green JA, Carthew P, Heuilet E, Simpson JL, Manson MM. Cytokeratin expression during AFB1-induced carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1175–1182.
- 95.** Gerber MA, Thung SN. Liver stem cells and development (editorial). *Lab Invest* 1993; 68: 253–254.
- 96.** Weiss MC, Strick-Marchand H. Isolation and characterization of mouse hepatic stem cells in vitro. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 313–324.
- 97.** Azoulay D, Adam R, Bhangui P, Andreani P, Salloum C, Karam V, Hoti E, Pascal G, Samuel D, Ichai P, Saliba F, Castaing D. Short- and long-term liver transplant morbidity: twenty years of experience in a European Center. AP-HP Hôpital Paul Brousse, Centre Hépatobiliaire, Villejuif, France. *Am J Transplant*. 2011 Jan;
- 98.** Masayasu Aikawa, Miyazawa, Okamoto, Toshimitsu, Akimoto, Ueno, Koyama, Ikada. An extrahepatic Bile duct grafting using a bioabsorbable polymer tube. *Journal of gastrointestinal Surgery*. Volume 16, Number 3 (2012), 529-534.
- 99.** Masayasu Aikawa, Miyazawa, Okada, Toshimitsu, Okamoto, Akimoto, Koyama, Ikada. Development of a novel reflux-free bilioenteric anastomosis procedure by using a bioabsorbable polymer tube.

Journal of hepatobiliary-pancreatic sciences. Volume 17, Number 3 (2010), 284-290.

- 100.** Miyazawa, Aikawa, Okada, Toshimitsu, Okamoto, Koyama, Ikada. Regeneration of extrahepatic bile ducts by tissue engineering with a bioabsorbable polymer. *Journal of artificial organs*. Volume 15, Number 1 (2012), 26-31.
- 101.** Li Q, Tao L, Chen B, Ren H, Hou X, Zhou S, Zhou J, Sun X, Dai J, Ding Y. Extrahepatic bile duct regeneration in pigs using collagen scaffolds loaded with human collagen-binding bFGF. *Biomaterials*. 2012 Jun; 33(17): 4298-308.
- 102.** Masayasu Aikawa, Miyazawa, Okamoto, Toshimitsu, Torii, Okada, Akimoto, Ohtani, Koyama, Ikada. A novel treatment for bile duct injury with a tissue-engineered bioabsorbable polymer patch. *Surgery* 2010 (April): 575-580.
- 103.** Lillemoe KD, Melton GB, Cameron JL, Pitt HA, Campbell KA, Talamini MA, et al. Postoperative bile duct strictures: management and outcome in the 1990s. *Ann Surg*. 2000;232:430-441
- 104.** Shah SA, Grant DR, McGilvray ID, Greig PD, Selzner M, Lilly LB, et al. Biliary strictures in 130 consecutive right lobe living donor liver transplant recipients: results of a Western center. *Am J Transplant*. 2007;7:161-167
- 105.** Feller RB, Waugh RC, Selby WS, Dolan PM, Sheil AG, McCaughan GW. Biliary strictures after liver transplantation: clinical picture, correlates and outcomes. *J Gastroenterol Hepatol*. 1996;11:21-25
- 106.** Judah JR, Draganov PV. Endoscopic therapy of benign biliary strictures. *World J Gastroenterol*. 2007;13:3531-3539

- 107.** Lillemoe KD, Pitt HA, Cameron JL. Current management of benign bile duct strictures. *Adv Surg.* 1992;25:119–174
- 108.** Lopez RR, Cosenza CA, Lois J, Hoffman AL, Sher LS, Noguchi H, et al. Long-term results of metallic stents for benign biliary strictures. *Arch Surg.* 2001;136:664–669
- 109.** Hakamada K, Sasaki M, Endoh M, Itoh T, Morita T, Konn M. Late development of bile duct cancer after sphincteroplasty: a ten- to twenty-two-year follow-up study. *Surgery.* 1997;121:488–492
- 110.** Maghsoudi H, Garadaghi A, Jafary GA. Biliary peritonitis requiring reoperation after removal of T-tubes from the common bile duct. *Am J Surg.* 2005;190:430–433
- 111.** Tang CN, Tai CK, Ha JP, Tsui KK, Wong DC, Li MK. Antegrade biliary stenting versus T-tube drainage after laparoscopic choledochotomy—a comparative cohort study. *Hepatogastroenterology.* 2006;53:330–334.
- 112.** Gharaibeh KI, Heiss HA. Biliary leakage following T-tube removal. *Int Surg.* 2000;85:57–63
- 113.** Maeda A, Yokoi S, Kunou T, Saeki S, Murata T, Niinomi N, et al. Bile duct cancer developing 21 years after choledochoduodenostomy. *Dig Surg.* 2003;20:331–334
- 114.** Herba MJ, Casola G, Bret PM, Lough J, Hampson LG. Cholangiocarcinoma as a late complication of choledochoenteric anastomoses. *AJR Am J Roentgenol.* 1986;147:513–515
- 115.** Bettschart V, Clayton RA, Parks RW, Garden OJ, Bellamy CO. Cholangiocarcinoma arising after biliary-enteric drainage procedures for benign disease. *Gut.* 2002;51:128–129

- 116.** Tocchi A, Mazzoni G, Liotta G, Lepre L, Cassini D, Miccini M. Late development of bile duct cancer in patients who had biliary-enteric drainage for benign disease: a follow-up study of more than 1,000 patients. *Ann Surg.* 2001;234:210–214
- 117.** Kurumado K, Nagai T, Kondo Y, Abe H. Long-term observations on morphological changes of choledochal epithelium after choledochoenterostomy in rats. *Dig Dis Sci.* 1994;39:809–820
- 118.** Miyazawa M, Torii T, Toshimitsu Y, Koyama I, Ikada Y. A tissue-engineered artificial bile duct grown to resemble the native bile duct. *Am J Transplant.* 2005;5:1541–1547
- 119.** Bandura WP, Arbulu A. Experimental replacement of the common bile duct with Teflon graft. *Am Surg.* 1961;27:518–524
- 120.** Christensen M, Laursen HB, Rokkjaer M, Jensen PF, Yasuda Y, Mortensen FV. Reconstruction of the common bile duct by a vascular prosthetic graft: an experimental study in pigs. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2005;12:231–234
- 121.** Mendelowitz DS, Beal JM. Expanded polytetrafluoroethylene in reconstruction of the canine biliary system. *Am J Surg.* 1982;143:221–224
- 122.** Bottger T, Mann B, Pickel B, Weber W, Sorger K, Junginger T. Animal experiment studies of pedicled small intestine transplantation as partial extrahepatic bile duct replacement. *Langenbecks Arch Chir.* 1991;376:77–84
- 123.** Belzer FO, Watts JM, Ross HB, Dunphy JE. Auto-reconstruction of the common bile duct after venous patch graft. *Ann Surg.* 1965;162:346–355

- 124.** Aydin M, Bakir B, Kosem M, Kisli E, Genccelep M. Biliary tract reconstruction with autologous rectus sheath graft—an experimental study. *Hepatogastroenterology*. 2005;52:1019–1022
- 125.** Gomez NA, Zapatier JA, Vargas PE. Re: “Small intestinal submucosa as a bioscaffold for biliary tract regeneration”. *Surgery*. 2004;135:460
- 126.** El-Assmy A, Hafez AT, El-Sherbiny MT, El-Hamid MA, Mohsen T, Nour EM, et al. Use of single layer small intestinal submucosa for long segment ureteral replacement: a pilot study. *J Urol*. 2004;171:1939–1942.
- 127.** Behraves E., Yasko A.W., Engel P.S., Mikos A.G. Synthetic biodegradable polymers for orthopaedic applications. *Clin Orthop Relat Res* 1999; 367(S): 118-29.
- 128.** Bianchi G, Muraglia A, Daga A, Corte G, Concedda R, Quarto R. Microenvironment and stem properties of bone marrow derived mesenchymal stem cell. *Wound Rep Reg* 2001; 9: 460-6.
- 129.** Bjerknes M, Chen H. Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283:767-777.
- 130.** Ciriza J, García-Ojeda ME. Expression of migration-related genes is progressively upregulated in murine Lineage-Sca-1+c-Kit<sup>+</sup> population from the fetal to adult stages of development. *Stem Cell Res Ther* 2010 May 20;1(2):14.
- 131.** De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, Hedrick MH and Fraser JK. Differential expression of stem cell mobilization - associated molecules on multi - lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett* 2003; 89: 267-270.

- 132.** Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 2001; 414: 92-97. 70.
- 133.** Fodor WL. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 102.
- 134.** Forbes SJ, Vig P, Poulson R, Wright NA, Alison MR. Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. *Clin Sci (Lond)* 2002 a; 103: 355-369.
- 135.** Flowers JL, Zucker KA, Graham SM et al: Laparoscopic cholangiography. Results and indications. *Ann Surg.*, 1992:209,216.
- 136.** Grounds MD, Garrett KL, Lai MC, Wright WE, Beilharz MW. Identification of muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell Tiss Res* 1992 ; 267: 99-104.
- 137.** Hutmacher D.W., Goh J.C., Teoh S.H. An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications, *Ann Acad Med Singapore* 2001; 30: 183- 91.
- 138.** Neuss S., Apel C., Buttler P., Denecke B., Dhanasingh A., Ding X., Grafahrend D., Groger A., Hemmrich K., Herr A., Jahn-Dechent W., Mastitskaya S., Perez-Bouza A., Rosewick S., Salber J., Waltje M., Zenke M. Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell - based tissue engineering. *Biomater* 2008; 29: 302- 13.
- 139.** Nolan K, Millet Y, Ricard C, Stabler CL. Tissue engineering and biomaterials in regenerative medicine. *Cell transplant* 2008; 17(3): 241-3 Review.
- 140.** Park DH, Borlogan CV, Eve DJ, Sandberg PR. The emerging field of cell and tissue engineering. *Med Sci Monit* 2008 Nov; 14(11): RA 206-20.

- 141.** Rao M, Mattson MP. Stem cell and aging: expanding the possibilities. *Mach Ageing Dev* 2001; 122(7): 713-4
- 142.** Saadeh P.B. Khosla R.K., Mehrara B.J., Steinbrech D.S., McCormick S.A., DeVore D.P., Longaker M.T. Repair of a critical size defect in the rat mandible using allogenic type I collagen. *J Craniofac Surg* 2001; 12: 573- 79.
- 143.** Schaffler A, Buchler C. Concise review: Adipose tissue- derived stromal cells- basic and clinical implications for novel cell- based therapies. *Stem Cells* 2007; 25: 818- 27.
- 144.** Seol Y.J., Lee J.Y., Park Y.J., Lee Y.M., Young - Ku, Rhyu I.C., Lee S.J., Han S.B., Chung C.P. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnol Lett* 2004; 26(13): 1037-41
- 145.** Serrato D, Nieto-Aguilar R, Garzón I, Roda O, Campos A, Alaminos M. Evaluation of the histological architectural patterns of tissues generated by tissue engineering under different protocols of cryopreservation. *Histology and Histopathology* 2009; 24(12):1531-1540.
- 146.** Stevens MM, Mayer M, Anderson DG, Weibel DB, Whitesides GM, Langer R. Direct patterning of mammalian cells onto porous tissue engineering substrates using agarose stamps. *Biomaterials* 2005;26(36):7636-41
- 147.** Stocum DL. Regenerative biology and engineering: strategies for tissue restoration. *Wound Rep Reg* 1998; 6: 276-290.
- 148.** Thowfeequ S, Myatt EJ, Tosh D. Transdifferentiation in developmental biology, disease, and in therapy. *Dev Dyn.* 2007 Dec; 236(12): 3208-17. Review

- 149.** Walgenbach K.J., Voigt M ., Riabikhin A.W., Andree C ., Schaefer D.J, Galla T.J. Tissue engineering in plastic reconstructive surgery 2001; 263: 372 - 8.
- 150.** Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosebaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest 2003; 112: 1796- 1808.
- 151.** Weiss L. Histología. Ed. Ateneo. Madrid. 4º Edición, 1982. P 297-300.
- 152.** Yang S., Leong K., Du Z., Chua C. The design of scaffolds for use in tissue engineering: Part I. Traditional factors. Tissue Eng 2001 7(6): 679- 89
- 153.** Connor S, Garden OJ. Bile duct injury in the era of laparoscopic cholecystectomy. Br J Surg 2006; 93: 158-68.

# 9. Anexos.

---

## CONSIDERACIONES LEGALES Y ÉTICAS

El proyecto se encuentra en la categoría C de la clasificación del *Institutional Animal Care and Use Comittee (IACUC)*, en la que se incluyen los procedimientos que van a inducir dolor moderado, malestar o estrés, que será eliminado con los anestésicos y analgésicos apropiados. ( IAUC guidelines for administration of analgesics and anxiolitics. Recognition and assesment of pain, stress and distress in laboratory animals. Virginia University, 1-7; 2007).

Los animales han sido tratados durante todo el proceso experimental según los acuerdos del Consejo de Europa sobre protección de los animales empleados en experimentación animal.

Se ha garantizado el reemplazo y reducción de animales en los procedimientos del proyecto, así como el refinamiento de la cría, alojamiento, cuidados y utilización de los mismos. Se les ha concedido un trato evitando al máximo el dolor, sufrimiento y estrés, y todo aquello que pudiera interferir en las buenas condiciones de salud y bien estar de los animales. En cuanto al procedimiento de sacrificio, se ha realizado siguiendo las directrices presentes en la Directiva Europea mencionada anteriormente, la cual hace referencia al sacrificio humanitario de los animales.

El uso de este modelo experimental está justificado en animales al no existir ningún otro medio que permita obtener los resultados que se esperan.

### **Normativa**

- *DIRECTIVA DEL CONSEJO DE EUROPA 86/609/CEE, sobre aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros de la*

*respecto a la protección de los animales para experimentación y otros fines científicos. 24 de Noviembre de 1986.*

- *REAL DECRETO 223/1988, de 14 de Marzo sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. B.O.E. de 18 de Marzo de 1988.*
  
- *INSTRUMENTO de Ratificación del Convenio Europeo sobre protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos, hecho en Estrasburgo el 18 de Marzo de 1986. B.O.E. 25 de Octubre de 1990.*
  
- *REAL DECRETO 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normativas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.*

# JUNTA DE ANDALUCÍA

## CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA Dirección General de la Producción Agraria

Fecha: 21-jul-06

Ref.: DGPA/ISSA/SIS/SGG

Asunto: Resolución acreditación R. D. 1201/2005  
de 10 de octubre

D.N.I.C.F.: 24298675H

Nº EXPEDIENTE: 1041

SERAFÍN VELEZ GARCIA  
JOSE MARIA SILES FERNANDEZ, 10  
JUN  
18213 GRANADA

Visto lo establecido en el art 9º del Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, que indica que las personas que lleven a cabo procedimientos o tomen parte en ellos y las personas que estén al cuidado de animales utilizados en procedimientos, incluyendo las tareas de supervisión, deberán tener la preparación y la formación adecuada, acreditada mediante la posesión de un título académico que haya sido considerado adecuado a estos efectos por la autoridad competente, y encuadrado en una de las categorías profesionales descritas en el anexo I; o/y atendiendo a lo dispuesto, en la disposición transitoria tercera de esta norma, que indica que no obstante lo dispuesto en el artículo 9.1, la autoridad competente podrá decidir, a solicitud del interesado, no exigir la posesión título académico correspondiente al personal que acreditara suficientemente venir realizando las tareas y funciones previstas en el artículo 9.1 y en el anexo I durante ciertos periodos de tiempo, en función de cada categoría.

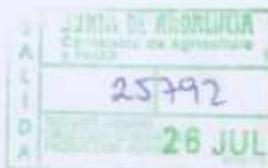
Por todo ello, una vez estudiado su expediente de solicitud, y en virtud de cuanto antecede y de conformidad en lo establecido en Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre, y en uso de las facultades atribuidas a esta Dirección General mediante el Real Decreto 3490/1981 de 29 de diciembre, por el que se transfieren competencias en materia de agricultura y pesca a la Junta de Andalucía y el Decreto 204/2004, de 11 de mayo, por el que se regula la Estructura Orgánica de la Consejería de Agricultura y Pesca, HE RESUELTO y le comunico, ACREDITAR su formación en la/s categoría/s profesional/es que a continuación se detallan definida/s en Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre.

CATEGORIA **A**

CATEGORIA **B**

Contra la presente Resolución, que no pone fin a la vía administrativa, podrá interponer recurso de alzada ante el Excmo. Sr. Consejero de Agricultura y Pesca, en el plazo de un mes contado a partir del día siguiente a aquel en que tenga lugar la notificación del presente acto, de conformidad con lo establecido en el artículo 114 y siguiente de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, modificada por la Ley 4/1999, de 13 de enero. La presentación del mismo podrá realizarse en cualquiera de los lugares previsto en el artículo 38.4 de la citada Ley.

La Directora General



FDO. JUDIT ANIDA UGARTE

Tabladilla, s/n  
Teléfono 95 5032000  
41071 - Sevilla

