

Original

Reconstrucción del conducto biliar mediante tubos tridimensionales de colágeno

Alejandro José Pérez Alonso ^{a,*}, Carlos del Olmo Rivas ^b, Ignacio Machado Romero ^b, Beatriz Pérez Cabrera ^b, Francisco Javier Cañizares García ^c y Pablo Torne Poyatos ^b

^a Departamento de Cirugía Experimental, Universidad de Granada, Granada, España

^b Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo, Hospital Clínico San Cecilio, Granada, España

^c Departamento de Histología, Universidad de Granada, Granada, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 8 de mayo de 2012

Aceptado el 1 de octubre de 2012

On-line el 1 de julio de 2013

Palabras clave:

Vía biliar

Reparación

Nuevas técnicas

Ingeniería tisular

R E S U M E N

Introducción: En la actualidad el tratamiento de la vía biliar extrahepática afectada por cáncer, estenosis, lesiones iatrogénicas y otras patologías consiste en la resección de las mismas, y una anastomosis en los casos más graves de la placa hiliar biliar al intestino delgado.

Material y métodos: Nuestro grupo ha desarrollado un tubo tridimensional de colágeno y agarosa para reparar la vía biliar. Se emplearon 40 animales de experimentación, que fueron estudiados fisiológicamente e histológicamente a las 4 semanas, 3 y 6 meses.

Conclusiones: Nuestras prótesis mostraron gran histocompatibilidad y mantenían una normofisiología que hace pensar en las posibles aplicaciones clínicas que podrían tener en un futuro.

© 2012 AEC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Bile duct reconstruction using 3-dimensional collagen tubes

A B S T R A C T

Introduction: In recent years, with widespread laparoscopic cholecystectomy and liver transplantation, complications involving the biliary system are increasing. All current techniques have a high risk of recurrence or high-morbidity.

Material and methods: A 3-dimensional collagen bile duct modified with agarose hydrogel was developed to substitute the affected extrahepatic bile duct. It was used in 40 guinea pigs and the histology and physiology was studied at 4 weeks, 3 and 6 months after transplantation.

Conclusions: The graft shows to have a high potential in applications to treat hepatobiliary diseases which require surgery.

© 2012 AEC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Bile duct

Repair

New techniques

Tissue engineering

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: apma85@hotmail.com (A.J. Pérez Alonso).

0009-739X/\$ – see front matter © 2012 AEC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ciresp.2012.10.006>

Introducción

En la actualidad el tratamiento de la vía biliar extrahepática afectada por cáncer, estenosis, lesiones iatrogénicas y otras patologías consiste en la resección de las mismas, y una anastomosis en los casos más graves de la placa hiliar biliar al intestino delgado. Esta técnica, en muchos casos, tiene un transcurso dificultado por infecciones retrógradas de la vía biliar a través de los patógenos que ascienden del intestino, o debido a complicaciones como la estenosis de la anastomosis, que requieren una nueva intervención para rehacer la técnica quirúrgica. En menor número de casos, el estancamiento de las secreciones biliares y la dificultad para el flujo de la bilis, requerirán un trasplante hepático incluso en aquellos casos en los que únicamente la porción afectada es extrahepática. En aquellos pacientes receptores de injertos hepáticos, puede ocurrir en el seno de un rechazo crónico una nueva estenosis de la anastomosis biliar, requiriendo de este modo un retrasplante¹.

Si pudiéramos obtener un tubo artificial que funcionara morfológica e histológicamente de la misma manera que la vía biliar nativa, podría utilizarse como sustituto de las vías biliares patológicas, evitando de este modo complejas técnicas quirúrgicas que dificultan el paso de la bilis y, finalmente, evitando el trasplante hepático en aquellas enfermedades en las que el parénquima hepático se encuentra indemne. Nuestro grupo está desarrollando, basado en esta idea y gracias a las nuevas biotecnologías, un conducto artificial que mantiene las propiedades morfológicas, histológicas y funcionales de la vía biliar nativa.

En la bibliografía actual existen pocas referencias a conductos artificiales creados para sustituir vías biliares patológicas, algunas con la ayuda de biopolímeros y otras con la de estructuras histológicas de otra índole. Hasta el momento, estas o bien no presentaban una biocompatibilidad suficiente para permitir el flujo de la bilis (biopolímeros), o bien no se integraban histológicamente en el ambiente (intestino, vasos sanguíneos)²⁻⁴.

En cuanto hemos tenido las técnicas suficientes para obtener colágeno y poder moldearlo a nuestro antojo, nuestro equipo modificó una estructura tridimensional tubular de colágeno bovino, cubierta por hidrogeles, totalmente

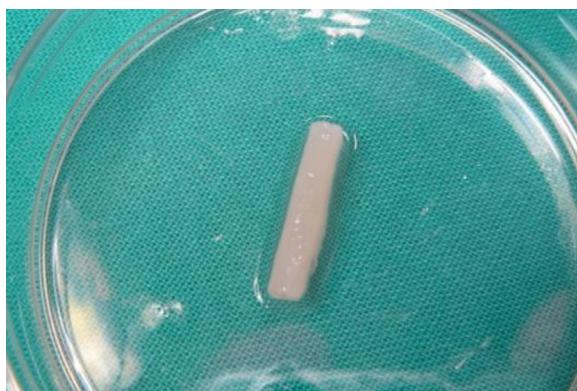


Figura 1 – Tubo tridimensional de colágeno-agarosa empleado.

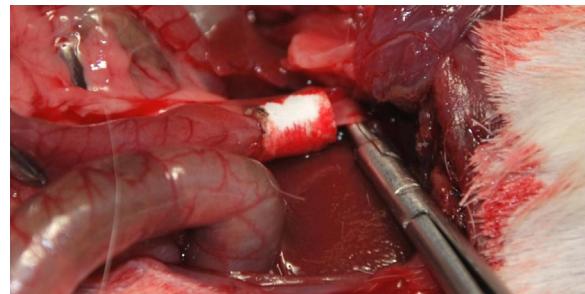


Figura 2 – Interposición de la prótesis utilizando suturas de reabsorción lenta de ácido poliláctico.

biocompatible. Estos nuevos conductos fueron implantados en animales de experimentación (cobayas) sustituyendo a la vía biliar nativa. Se evaluó la funcionalidad histológica y fisiológica de los mismos.

Material y métodos

Sustituto biliar

Se construyeron tubos tridimensionales de colágeno de 4 mm de diámetro y 1 mm de grosor de la pared (fig. 1). El tamaño de los poros formados es de 200 nm. Posteriormente se recubrieron todas sus superficies con hidrogel agarosa al 2%. Para su almacenamiento se emplearon estufas a 37 °C.

Implantación del conducto artificial en los animales de experimentación

Se implantó el conducto a 40 cobayas (Grupo 1: 13 cobayas; Grupo 2: 13 cobayas; Grupo 3: 14 cobayas) de la raza Dunkin Hartley con un peso aproximado de 1 kg ± 200 g. En todas ellas se sustituyó la vía biliar extrahepática en la porción comprendida entre la inserción del conducto cístico y la ampolla de Vater. Para la intervención se realizó una incisión subcostal derecha para acceder directamente a las vías biliares, realizando una inducción anestésica con 20 mg/kg de ketamina, y manteniendo una infusión continua de propofol a razón de 0,2 mg/kg/min. Una vez identificado el conducto común hepático en el interior del ligamento hepatoyeyunal, se realizó una sección circunferencial por debajo de la inserción del conducto cístico. A este nivel se interpuso la prótesis de colágeno con la ayuda de material de sutura compuesto de ácido poliláctico de reabsorción lenta de calibre 10/0 a través del microscopio quirúrgico (fig. 2). Los animales de experimentación se estabularon según la normativa vigente. Durante los primeros 7 días postoperatorios se administró por vía subcutánea analgesia y antibioterapia (azitromicina).

Estudio morfológico y funcional

Los animales fueron sacrificados a las 4 semanas, 3 meses y 6 meses tras la sustitución del conducto biliar. Tras el sacrificio se realizó un estudio histológico mediante tinción de hematoxilina-eosina. Del mismo modo, los especímenes

Tabla 1 – Cambios en las enzimas biliares y hepáticas en los tests sanguíneos de las cobayas trasplantadas a lo largo del periodo de estudio frente a los valores normales del grupo control

	4 semanas tras Tx (n = 13)	3 meses tras Tx (n = 13)	6 meses tras Tx (n = 14)	Controles (n = 10)
Bil total (mg/dL)	0,12 (\pm 0,02)	0,11 (\pm 0,02)	0,10 (\pm 0,02)	0,10 (\pm 0,02)
ALP (IU/L)	27 (\pm 5)	24 (\pm 5)	20 (\pm 5)	20 (\pm 5)
ALT (IU/L)	90 (\pm 5)	82 (\pm 5)	80 (\pm 5)	78 (\pm 5)

Los resultados se presentan como la media del grupo \pm desviación estándar.

fueron expuestos a antígenos de membrana epitelial y de queratina de bajo peso molecular. Todo ello fue comparado con los especímenes obtenidos de la vía biliar nativa conseguida de 10 cobayas control. Todos ellos fueron estudiados del mismo modo.

Resultados

Todos los animales de experimentación sobrevivieron hasta el momento de su sacrificio (4 semanas en el Grupo 1; 3 meses en el Grupo 2; 6 meses en el Grupo 3) tras la implantación del conducto artificial. Se desarrollaron fisiológicamente, ganancia de peso y tamaño, de manera similar a los animales control ($1,9 \text{ kg} \pm 200 \text{ g}$). En todos los grupos se realizó una medición de los niveles sanguíneos de bilirrubina y enzimas hepáticas tras el sacrificio, obteniendo niveles normales en los 40 animales intervenidos (tabla 1).

Estudio macroscópico del neoconducto biliar

Macroscópicamente todos los conductos artificiales implantados parecían completamente degradados a partir de las 4 semanas, aunque persistían adherencias y ligera inflamación de los tejidos adyacentes. Los especímenes extraídos a partir de los 3 meses (3 y 6 meses) se encontraban completamente reabsorbidos, y el aspecto era comparable al de la vía biliar nativa, persistiendo ligeras adherencias de los tejidos circundantes. El aspecto macroscópico del hígado era completamente normal, sin observarse signos de cirrosis.

El neoconducto a partir de las 4 semanas estaba parcialmente reabsorbido, observándose algunos granulomas en los

extremos distales donde estaban presentes las suturas de ácido poliláctico. Se observan algunas áreas con la presencia de tejido glandular bajo el epitelio biliar. Todo el trayecto del neoconducto se encontraba reepitelizado, aparentemente con el mismo grosor en todos sus extremos, con algunas áreas irregulares (fig. 3). En el estudio realizado al neoconducto a partir de los 3 y 6 meses, el tubo artificial era indetectable. Todo el conducto estaba cubierto por un epitelio columnar simple. El colágeno que conformaba el tubo artificial estaba sustituido por tejido conjuntivo denso y cubierto en su cara intraabdominal por un epitelio de características similares al mesotelio de otros órganos. Apenas existía presencia de tejido glandular bajo la superficie del epitelio biliar. En todos los casos, el tejido hepático no sufrió ningún tipo de alteración, sin presencia de estasis biliar ni de cirrosis, como se demostró a través de los cortes histológicos del parénquima hepático obtenidos. No se evidenciaron restos de las suturas empleadas. La transición en los extremos entre el neoconducto y la vía biliar nativa no pudo llegar a localizarse, debido a la inexistencia de diferencias tisulares entre las porciones.

Inmunohistoquímica

Todos los especímenes fueron expuestos a los antígenos frente a membrana epitelial y frente a queratina de bajo peso molecular (CAM 5.2 anticuerpo). Todas las células que recubrían la luz del neoconducto fueron positivas para el antígeno frente a membrana epitelial, mostrando una organización similar a las células epiteliales de la vía biliar nativa. Por otro lado, la positividad para los antígenos que muestra la queratina de bajo peso molecular fue menor que la observada en los controles (fig. 4).

Discusión

El conducto tridimensional implantado se integra morfológica y fisiológicamente dentro de la vía biliar, manteniendo las funciones de conducción de la bilis y evitando técnicas con morbimortalidad elevada, así como costes sanitarios altos. La integración tisular que se produce a partir de las 4 semanas lleva a pensar que el conducto sirve de estructura para la regeneración a partir de los extremos nativos del tejido biliar nativo. Podríamos deducir múltiples aplicaciones que pueden desarrollarse en la clínica actual. Ante la presencia de estenosis o afecciones cancerígenas propias de la vía biliar extrahepática, estos segmentos pueden ser extirpados y sustituidos por el conducto artificial mediante anastomosis término-terminales. De este modo podemos preservar la papila de Vater, manteniendo las funciones biológicas de esta

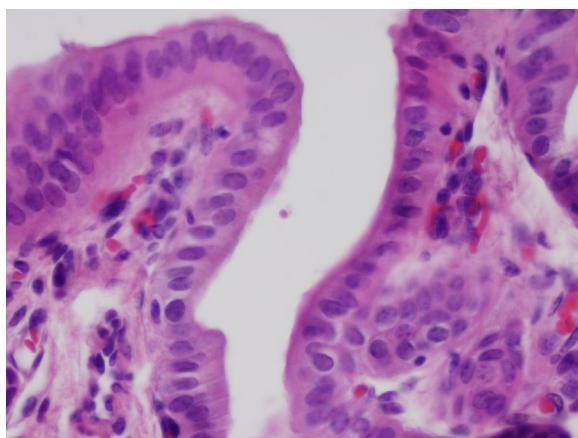


Figura 3 – Presencia del conducto biliar completo reepitelizado con el mismo grosor que el tejido nativo.

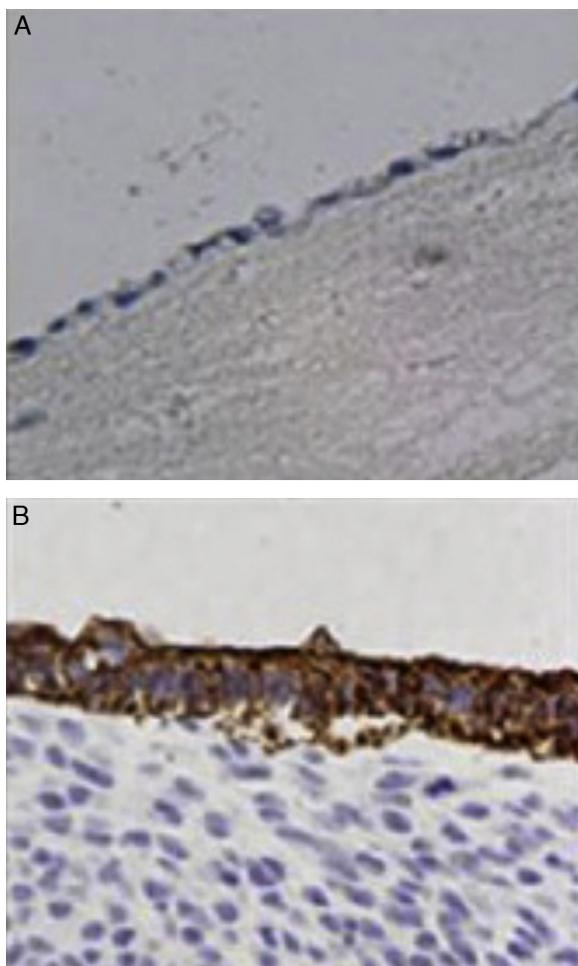


Figura 4 – Inmunohistoquímica, reacción positiva frente al antígeno de membrana epitelial (A) y frente al antígeno de la queratina de bajo peso molecular (B) en los animales trasplantados.

válvula, evitando infecciones retrógradas que ocurren en las anastomosis biliodigestivas. Si nuestro proyecto llega a ser factible, la disponibilidad en todo momento de un neoconducto biliar puede evitar derivaciones con grandes riesgos y ser utilizadas en multitud de técnicas que necesiten la extirpación de segmentos de conductos biliares, evitando las complicaciones derivadas y, finalmente, el trasplante.

Podemos pensar que nuestra prótesis se ha integrado correctamente si no aparecen complicaciones tras su implantación. No debemos observar signos o síntomas derivados de la obstrucción al flujo de la bilis producidos por una estenosis del conducto, así como tampoco observar signos que nos hagan pensar en la presencia de una fuga de bilis intraabdominal, debido a dehiscencias o puntos de fuga en las anastomosis. Ninguna de estas complicaciones estuvo presente en nuestros casos. La función favorable que hemos observado en los neoconductos formados en los períodos estudiados nos sugiere que estos injertos podrían ser aplicables a la práctica clínica.

Algunos autores han publicado recientemente el exitoso resultado en la formación de órganos artificiales como los

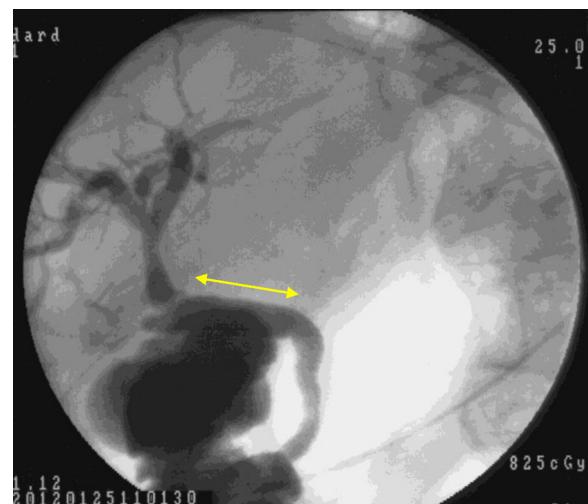


Figura 5 – Colangiografía 4 semanas después de la interposición de la prótesis biliar de colágeno-agarosa. No existe presencia de fuga o estenosis. La flecha indica la posición de la prótesis.

vasos sanguíneos^{5,6} y el intestino delgado^{7,8}, mediante cultivos celulares. Este principio ha sido utilizado por algunos autores como Rosen et al. para facilitar la reconstrucción de partes de la circunferencia del conducto biliar mediante el uso de submucosa intestinal, a partir de la cual se producía la reepitelización⁴. En nuestro caso, la reepitelización se produce desde los extremos del conducto artificial, extendiéndose a lo largo de todo el trayecto mediante la migración celular que permiten los poros de la estructura tridimensional que forma el colágeno. La tasa de reepitelización fue similar desde ambos extremos. Esto permite su uso en un mayor número de indicaciones clínicas y facilita la técnica. Grosso modo, podríamos asegurar que las células pluripotenciales biliares son viables y que se diferencian en células epiteliales de manera uniforme, migrando a través del conducto implantado, aunque para poder asegurar esto son necesarios más estudios histológicos dirigidos.

El examen macroscópico mostró que a partir de las 4 semanas, nuestro conducto biocompatible era completamente similar morfológicamente a la vía biliar nativa. La histología y la inmunohistoquímica demostraron que histológicamente la disposición tisular era similar, con una expresión antigenica parecida. En el nuevo ambiente creado, la bilis fluía a través del neoconducto hasta el duodeno (fig. 5). A través de nuestra investigación no hemos podido determinar qué factores estimulan la diferenciación celular y la reepitelización, bien a través de componentes en la bilis, bien mediante estímulos de quimiotaxis.

Nuestro tubo tridimensional de colágeno implantado en los animales de experimentación adquirió una función y forma similares a las de la vía biliar nativa a partir de las 4 semanas tras el injerto. La creación de un neoconducto biliar nos abre nuevas vías terapéuticas para el tratamiento de afecciones confinadas a la vía biliar extrahepática, evitando complejas técnicas quirúrgicas con elevados costes socioeconómicos y alta morbimortalidad. Si en estudios futuros se demuestra la

viabilidad a largo plazo de esta prótesis, nuestro conducto tendrá indudablemente una gran aplicación clínica.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

B I B L I O G R A FÍA

1. Egawa H, Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, Kiuchi T, Fujita S, et al. Biliary anastomotic complications in 400 living related liver transplantations. *World J Surg.* 2001;25:1300-7.
2. Shimono K, Nose Y. The need to develop artificial bile ducts. *Artif Organs.* 1995;19:115-6.
3. Xu J, Sun Z, Sun S, Zhang Q, Chen J, Wu L, et al. Experiment for a polyurethane replacement of the common bile duct. *Chin Med J (Engl).* 1998;111:86-7.
4. Rosen M, Ponsky J, Petras R, Faming A, Brody F, Duperier F. Small intestinal submucosa as a bioscaffold for biliary tract regeneration. *Surgery.* 2002;132:480-7.
5. Teebken OE, Haverich A. Tissue engineering of small diameter vascular grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002;23:475-85.
6. Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med.* 2001;344:532-3.
7. Kaihara S, Kim S, Benvenuto M, Kim BS, Mooney DJ, Tanaka K, et al. End-to-end anastomosis between tissue-engineered intestine and native small bowel. *Tissue Eng.* 1999;5:339-46.
8. Perez A, Grikscheit TC, Blumberg RS, Ashley SW, Vacanti JP, Whang EE. Tissue-engineered small intestine: Ontogeny of the immune system. *Transplantation.* 2002;74:619-23.