

11209

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PETRÓLEOS MEXICANOS
HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD**

**“REGENERACION DEL CONDUCTO BILIAR PRINCIPAL EN
PERROS ADULTOS MEDIANTE EL USO DE SUBMUCOSA DE
INTESTINO DELGADO PROCESADO DE CERDO (SIS)”**

T E S I S

Q U E P R E S E N T A

DR CARLOS NATALIO MELO MARTINEZ

PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD EN

CIRUGIA GENERAL

TUTOR DE TESIS:

**DR. JAVIER LUNA MARTINEZ
JEFE DEL SERVICIO DE CIRUGÍA GENERAL**

ASESORES DE TESIS:

**DR. FREDDY R. DOMINGUEZ SOSA
MEDICO ADSCRITO DE INFECTOLOGIA**

MÉXICO D.F.

OCTUBRE 2005.



0350687



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

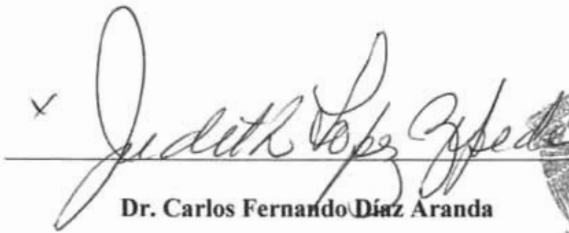


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

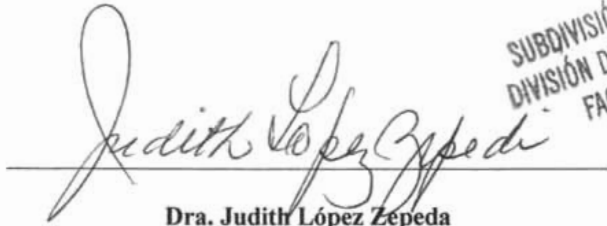
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

x 

Dr. Carlos Fernando Díaz Aranda

Director Médico del H.C.S.A.E.





Dra. Judith López Zepeda

Jefe del Servicio de Enseñanza



Dr. Javier Luna Martínez

Jefe del Servicio de Cirugía General



Dr. Freddy R. Domínguez Sosa

Médico Infectólogo



A mis padres por su inagotable fe, dedicación y ser siempre mis mejores fans.

A ti Gio que en cada obra mía se refleje mi amor por ti.

INDICE

I. Antecedentes Históricos	5
II. Justificación	16
III. Planteamiento del problema	18
IV. Objetivo	18
V. Hipótesis	18
VI. Metodología	19
VII. Tipo de estudio	19
VIII. Criterios de Inclusión	19
IX. Criterios de No Inclusión	19
X. Criterios de Exclusión	20
XI. Tipo de Muestra	20
XII. Variables de Estudio	20
XIII. Definición Operativa de las Variables	21
XIV. Técnicas y Procedimientos	22
XV. Análisis Estadístico	25
XVI. Aspectos Éticos	25
XVII. Recursos	27
XVIII. Resultados	28
XIX. Tablas	31
XX. Imágenes	38
XXI. Discusión	45
XXII. Conclusión	47
XXIII. Bibliografía	48

ANTECEDENTES CIENTIFICOS:

Con el advenimiento de la cirugía laparoscópica a partir de la década de los ochentas como una alternativa adecuada en algunos de los procedimientos quirúrgicos abdominales, ha visto incrementada su utilidad así como su popularidad en ciertos procedimientos usuales y tal vez rutinarios del cirujano general. Tal es el caso de la cirugía biliar, la colecistectomía laparoscópica y actualmente la exploración de vía biliar mediante el uso de la laparoscopia, ha llegado a convertirse en el estándar de oro para el manejo de la enfermedad litiasica de la vía biliar principal y accesoria. (1,2,3,4,22,23,24,25,26,27)

A pesar de la explosión de popularidad que este procedimiento ha tenido y fuera de la curva de aprendizaje que toda novedad conlleva, existe en datos objetivos un considerable aumento en el riesgo de lesión de vía biliar comparado con su homólogo convencional (cirugía abierta), así mismo existen metanálisis que demuestran en la actualidad que a pesar de haber superado el tiempo de la curva de aprendizaje el porcentaje de lesión de vía biliar por laparoscopia (0.5% a 1%) se mantiene estable, argumentando este efecto a un aumento de la confianza y nuevos adeptos a este procedimiento, en comparación con la cirugía abierta (0.1% a 0.2%) (22,23). Otro estudio comenta que exceptuando el mejor diagnóstico temprano de estas lesiones en comparación con años pasados no existe una mejora significativa en el algoritmo de manejo y diagnóstico de esta iatrogenia.

Se describen diferentes factores de riesgo para la ocurrencia de estas lesiones a la vía biliar incluyendo la pobre visualización del campo operacional, anatomía aberrante, la

experiencia quirúrgica, inflamación aguda y crónica, falta de conocimiento anatómico o pérdida de relación anatómica y, relativamente, ausencia de colangiografía transoperatoria. Sin embargo y bajo conocimiento de estos factores de riesgo una vez producida la lesión y sin que esta pase desapercibida por el cirujano, se intentara la reconstrucción de la vía biliar de manera inicial aún sin el conocimiento de la anatomía lesionada (²⁷). Finalmente llegamos al punto catastrófico, ya que esta lesión iatrogena conlleva una problemática importante para el cirujano en cuanto se refiere a la morbilidad de la lesión misma y de su reparación, hospitalización prolongada, aumento en costo beneficio, intervención jurídica, alteración de la relación médico-paciente y eventualmente la muerte del paciente.

Es de vital importancia en este punto comentar que desde el reconocimiento de esta entidad previa a la laparoscopia, como recordaremos la cirugía convencional de la vía biliar en ocasiones puede verse acompañada de una lesión con una incidencia baja pero reconocible (0.1% a 0.2%), se inicio el estudio para el algoritmo de manejo de cualquier alteración iatrogena en contra de los conductos extrahepáticos. Inicialmente el Dr. Bismuth ideó una clasificación (*Fig. 1*) basada en 5 puntos cuyo eje era la carina de los conductos biliares sin embargo esta fue considerada insuficiente en vísperas del crecimiento explosivo del uso de la laparoscopia (²²), motivo por el cual se desarrollaron en la década pasada, observando diferentes tipos de lesión y un mejor estudio de la vía biliar tanto intra como extrahepática así como la probabilidad de lesión por desconocimiento de estas alteraciones anatómicas, diferentes clasificaciones dentro de ellas las del Dr. Stewart y el Dr. Way valorando el daño biliar y vascular; clasificaciones con vista a reparación y manejo como la del Hospital de Brno, en Checoslovaquia donde no únicamente se limita a la descripción de la lesión sino también al desarrollo de un algoritmo para cada lesión (²⁶); hasta

clasificaciones aceptadas en congresos internacionales y en literatura hepatobiliar reconocida como lo es la clasificación de Bismuth – Strassberg donde se retoma la antigua clasificación y se acompaña de lesiones laparoscópicas de la vía biliar dividiéndolas estas en 9 subtipos ⁽²²⁾. (Fig. 2)

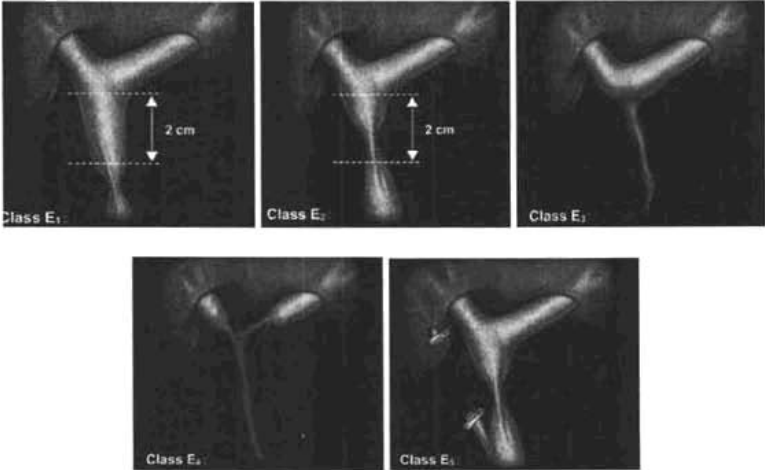


Fig.1 Clasificación de Bismuth.

En un inicio y aun en las lesiones que comprometen más la vía biliar se sugiere la reconstrucción mediante la coledocoyeyunostomía o la hepaticoyeyunostomía, la introducción, en estos momentos, no tan reciente del intervencionismo radiológico así como el endoscópico amplían aun mas las probabilidades de tratamiento de las lesiones sin aumentar la morbilidad del paciente. El manejo estandarizado sugiere el uso de una anastomosis biliointestinal mucosa – mucosa sin tensión, logrando un éxito a largo plazo del 80% al 90%. En una serie de 78 pacientes de Blumgart se demostró que a pesar de lo comentado con anterioridad 57% de los pacientes requirieron de mas de dos intervenciones antes de su referencia, en muchos pacientes se realizan múltiples intervenciones durante

largos periodos sin éxito real, encontrándose ya en situaciones de mala calidad de vida con morbilidad crónica secundaria a patología biliar, es decir, desnutridos, con desarrollo de cirrosis biliar secundaria con hipertensión portal como consecuencia de la misma lo cual impacta de manera importante en la evolución del paciente siendo estos factores de mal pronóstico. (1,2,23,26,27)

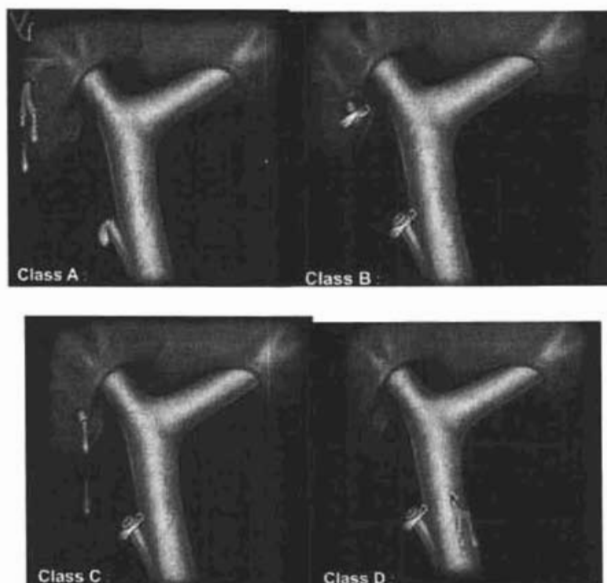


Fig. 2 Clasificación de Strassberg.

Dentro de las posibilidades para la reparación encontramos diferentes técnicas de anastomosis incluyendo aquellas que requieren ferulización preoperatoria o transoperatoria como son las técnicas de Völkner, Dogliotti o Longmayer, técnicas simples sin tensión con unión mucosa – mucosa como son Rodney-Smith y la de Blanco con gran inventiva utilizando material de rápida absorción como lo es el catgut, y técnicas de necesidad de

anastomosis altas como el Hepp, Hepp – Couinaud o con resección de lóbulo cuadrado; y muchas otras más (*Fig. 3*). El algoritmo aceptado del manejo actual independientemente del centro hospitalario, es la realización de canalización percutánea hepática, con delimitación de la anatomía por colangiografía hepática, con reparación tipo hepaticoyeyunostomía y exteriorización de los catéteres por yeyunostomía de asa con revisión cada 3 a 6 meses mediante radiología (colangiografía) valorando sitios de estenosis con colocación de “stents” expandibles o dilataciones mediante balón. ^(1,2,3,4,26,27)

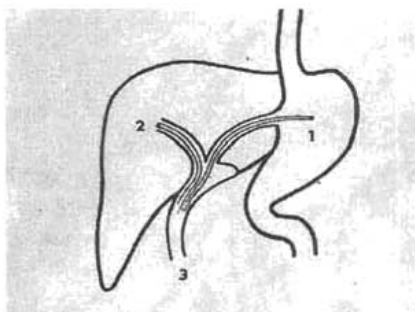


Fig. 3 Procedimiento de Dogliotti

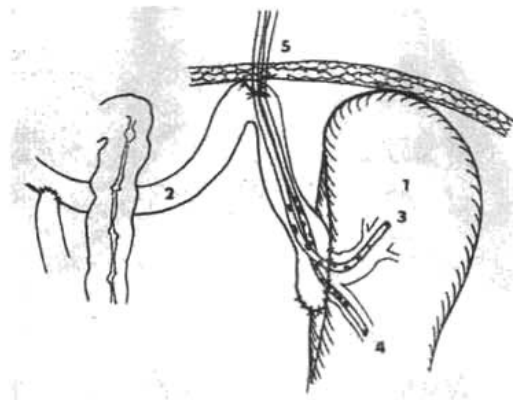


Fig. 3 Procedimiento de Völkner

Completando el párrafo anterior es de mencionar el uso actual de los procedimientos endoscópicos y de radiología intervencionista en estos casos con la inserción de “stents” metálicos expandibles o de Teflón. El uso del material metálico es preferido sobre el de Teflón ya que este produce menos cristales y por lo tanto menos obstrucción de la vía biliar así como integración del material metálico en comparación con el Teflón de la mucosa biliar, a pesar del incremento del uso de estas técnicas se ha demostrado que son secundarias y adyuvantes de las anastomosis biliodigestiva y son recomendadas para aliviar estenosis postquirúrgicas o en pacientes con riesgos prohibitivos para la cirugía. Existe un estudio en cuanto a la calidad de vida de estos pacientes donde a pesar de que medicamente no existe diferencia entre los grupos controles con las anastomosis biliodigestivas se encuentra una menor calidad de vida psicológica debido a la gran cantidad de estudios y la morbilidad que estos procedimientos conllevan en su seguimiento.

A pesar del manejo recomendado aun existe evidencia del uso de la colédoco - colédoco anastomosis, esto actualmente se encuentra en desuso y su falla aporta la principal consecuencia de la manipulación excesiva de la vía biliar; el punto débil de cualquier técnica que involucre la vía biliar es su irrigación axial, aunque altamente irrigada por plexos axiales a las 3 y 9 en sentido horario la mayor parte de la circulación se encuentra a nivel de la placa portal y en el colédoco supraduodenal distal, topográficamente la mayoría de las lesiones se localiza fuera de estas regiones hacia sitios dependientes de plexos motivo por el cual una colédoco-colédoco anastomosis terminara invariablemente en estenosis de la vía biliar así como una anastomosis biliodigestiva con tensión o con manipulación excesiva y pérdida de sustancia. ⁽²⁷⁾

Dentro de las complicaciones tanto de las técnicas descritas como de la evolución de una lesión de vía biliar se ha reportado la existencia de cirrosis biliar secundaria a la existencia de diferentes grados de obstrucción de vía biliar con aumento de la producción de conductos biliares en la triada portal hasta el desarrollo de fibrosis y cirrosis posterior con los consecuentes cambios hemodinámicos como son la hipertensión portal; sin embargo no unicamente la obstrucción desarrolla la cirrosis biliar secundaria sino también el reflujo continuo de material intestinal a la vía biliar produciendo cuadros repetidos de diferente intensidad de colangitis ocasionando la inflamación, obstrucción, fibrosis y cirrosis llevando a una evolución tórpida de la patología a largo plazo incluyendo el desarrollo final de colangiocarcinoma. ⁽²⁷⁾

Por este motivo se han buscado alternativas al tratamiento indicado que actualmente requiere un costo importante para su manejo postoperatorio, menos experimentadas para su manejo operatorio y de sus complicaciones, estas alternativas tratan de buscar una técnica quirúrgica mas fácil de desarrollar, mas fisiológica y anatómica con respecto a la problemática irrigación de la vía biliar y a la preservación de su esfínter natural sin aumentar la morbilidad de esta patología. Se han desarrollado materiales de injerto como son el Vitallium, la malla Tantalum, esponja de polivinilo, politetrafluoroetileno, Teflón y Dacrón con falla en su propósito debido a diferentes grados de colangitis, formación de cristales y estenosis por fibrosis; otras opciones de tratamiento han utilizado materiales autólogos como son el yeyuno, arterias, venas, injertos de piel, fascia, homoinjertos de vía biliar, uréter e inclusive el apéndice con falta de éxito debido a cicatrización del tejido o necrosis. (6,7,8,9,10,11,12,13,14)

Debido a estas inquietudes de desarrollar un reemplazo mas que un injerto o un material protésico se desarrollo en esta década un biomaterial acelular que puede promover la reparación tisular como un reemplazo de matriz teniendo una composición y una estructura completamente natural. Un biomaterial que no produce encapsulamiento pero que es remodelado gradualmente dejando atrás, tejido organizado. (15,16,17,18,19,20,21)

De esta idea nace el SIS (Small Intestinal Submucosa), es obtenido de la submucosa del intestino delgado de cerdos. El proceso aísla la submucosa de manera tal que remueve las células dejando una matriz prácticamente intacta.

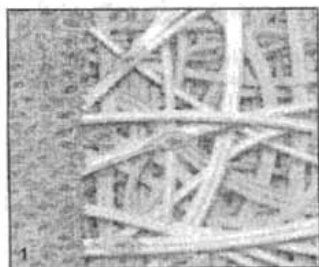
Esta matriz se encuentra entre la mucosa y las capas musculares del intestino conteniendo una gran cantidad de colágena que la provee de su fuerza y así mismo como reservorio de citocinas para guiar su reemplazo tisular.

La composición de este material es primordialmente proteico con cantidades secundarias de carbohidratos y lípidos. El proceso para su obtención le permite preservar intacta su estructura a base de colágena (tipo I, III y IV), glicosaminoglicanos (ácido hialurónico, condroitin sulfato A y B, heparina y heparan sulfato), proteoglicanos y glicoproteínas (fibronectina), que juegan un rol importante en la reparación y remodelación del tejido huésped. El SIS actúa como un soporte tridimensional para el crecimiento celular y su remodelación (*Fig. 4*).

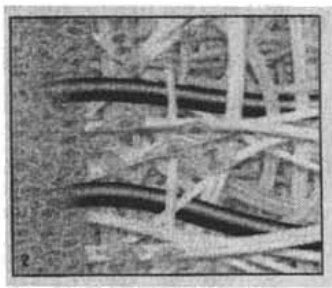
En la actualidad existen múltiples protocolos que aprueban su uso dentro del terreno de la otorrinolaringología en traqueoplastias y reparaciones septales reportado en 8vo Simposio Internacional de Cirugía Plástica Facial en mayo del 2002, en la urología en reparación vesical, cirugía de aumento vesical e implantes ureterales, la cirugía vascular para injertos en sitios contaminados, la neurocirugía como parches de dura, en la cirugía plástica como injerto y la cirugía general en terrenos de plastias de pared reportado en la revista *Hernia* (2002) con 25 pacientes con un seguimiento a 15 meses con contaminación de herida y hernia, con buenos resultados dentro de este plazo sin rechazo de material e integración completa del mismo; nuestro estudio tratara, basandonos en los antecedentes científicos presentes, de demostrar que existen otras posibilidades en el tratamiento de las lesiones de vía biliar sin producir tanta morbilidad a nuestros pacientes, facilitado así mismo su rápida recuperación y su mejor calidad de vida; y en el terreno quirúrgico

facilitando el abordaje y el manejo de la técnica de reparación aún en reparaciones complicadas que exigen el máximo conocimiento quirúrgico anatómico y técnico de cirujanos especializados. Fuera de el alcance de este estudio, la comprobación de nuestra hipótesis sentara las bases para la aplicación de este material en el área, ahora tan creciente, de la transplantología aprovechando sus bondades evitando así las complicaciones tempranas y tardías de los injertos. ^(15,16,17,18,19,20,21)

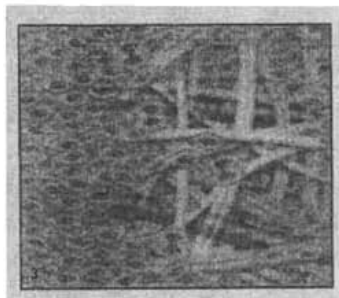
Fig. 4.



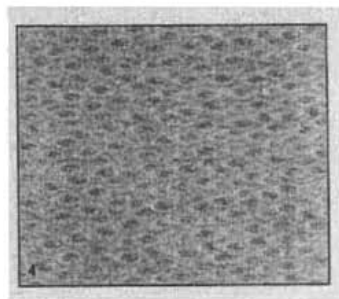
Después de que el SIS es implantado, el tejido adyacente libera células y nutrientes a la matriz.



Las células rápidamente invaden el SIS con crecimiento capilar.



El SIS es gradualmente remodelado mientras el tejido refuerza y reconstruye el tejido dañado.



La integridad de la reparación se mantiene y el nuevo tejido se convierte en propio.

JUSTIFICACION:

La colecistectomía laparoscópica y actualmente la exploración de vía biliar mediante el uso de la laparoscopia, ha llegado a convertirse en el estándar de oro para el manejo de la enfermedad litiasica de la vía biliar principal y accesoria. A pesar de esto

existe un considerable aumento en el riesgo de lesión de vía biliar comparado con su homólogo convencional (cirugía abierta), así mismo existen metanálisis que demuestran en la actualidad que a pesar de haber superado el tiempo de la curva de aprendizaje el porcentaje de lesión de vía biliar por laparoscopia (0.5% a 1%) se mantiene estable, argumentando este efecto a un aumento de la confianza y nuevos adeptos a este procedimiento, en comparación con la cirugía abierta (0.1% a 0.2%). Se han reconocido diferentes factores de riesgo para la ocurrencia de estas lesiones a la vía biliar incluyendo pobre visualización del campo operacional, anatomía aberrante, la experiencia quirúrgica, inflamación aguda y crónica, falta de conocimiento anatómico o pérdida de relación anatómica y, relativamente, ausencia de colangiografía transoperatoria. El significado de una lesión a la vía biliar para el paciente y para el médico se traduce en una hospitalización prolongada, aumento en costo beneficio, intervención jurídica, alteración de la relación médico-paciente y eventualmente la muerte del paciente. En un inicio y aun en las lesiones que comprometen más la vía biliar se sugiere la reconstrucción mediante la coledocoyunostomía o la hepaticoyunostomía, la introducción, en estos momentos, no tan reciente del intervencionismo radiológico así como el endoscópico amplían aun más las probabilidades de tratamiento de las lesiones sin aumentar la morbilidad del paciente. El manejo estandarizado sugiere el uso de una anastomosis biliointestinal mucosa – mucosa sin tensión, logrando un éxito a largo plazo del 80% al 90%. Sin embargo Blumgart reporta que estos pacientes requieren de reintervenciones en un 75% lo cual aumenta la morbilidad de estos pacientes al ser referidos finalmente a centros especializados. Dentro de las complicaciones tanto de las técnicas descritas como de la evolución de una lesión de vía biliar se ha reportado la existencia de cirrosis biliar secundaria a la existencia de diferentes grados de obstrucción de vía biliar con aumento de la producción de conductos biliares en

la triada portal hasta el desarrollo de fibrosis y cirrosis posterior con los consecuentes cambios hemodinámicos como son la hipertensión portal, también el reflujo continuo de material intestinal a la vía biliar posterior a una reconstrucción biliodigestiva produce cuadros repetidos de diferente intensidad de colangitis ocasionando la inflamación, obstrucción, fibrosis y cirrosis llevando a una evolución tórpida de la patología a largo plazo incluyendo el desarrollo final de colangiocarcinoma.

Por este motivo se han buscado alternativas al tratamiento indicado, más fisiológicas y anatómicas con respecto a la problemática irrigación de la vía biliar y a la preservación de su esfínter natural sin aumentar la morbilidad de esta patología; se han desarrollado múltiples tipos de injertos sintéticos (Vitalium, tantalium, Teflón, Dacron, PTFE) y homoinjertos (safena, vesícula, yeyuno, arteria) sin resultados adecuados por altos grados de cicatrización así como de estenosis o rechazo. De esta idea nace el SIS (Small Intestinal Submucosa), biomaterial acelular que puede promover la reparación tisular como un reemplazo de matriz teniendo una composición y una estructura completamente natural. Un biomaterial que no produce encapsulamiento pero que es remodelado gradualmente dejando atrás, tejido organizado.

Debido a la morbilidad que acompaña a estas lesiones, donde aún en manos experimentadas las reparaciones presentan algún grado de estenosis y necesidades de reintervención así como el desenlace en enfermedades inflamatorias crónicas, y aprovechando las virtudes de estos nuevos materiales de regeneración celular, se plantea la idea de realizar un injerto de vía biliar, una vez que esta ha sido lesionada parcial o totalmente, que nos permita sin desarrollar técnicas quirúrgicas laboriosas que no aseguran una integración ni una vascularidad adecuada de la vía biliar anastomosada, que presente una regeneración del epitelio biliar, sin estenosis, adherencias por fibrosis, fugas del

material ni rechazo del mismo, asegurando así una reconstrucción natural y altamente efectiva en terrenos fisiológicos y anatómicos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

¿Podrá el SIS regenerar la vía biliar lesionada parcialmente del modelo canino sin presentar complicaciones como lo son la estenosis, el rechazo o la fuga biliar?

OBJETIVO:

Evaluar la capacidad del SIS como matriz celular para la regeneración de la vía biliar lesionada parcialmente del modelo canino sin presentar fibrosis o encapsulamiento del injerto que pudiese producir estenosis, rechazo del material o fuga biliar.

HIPOTESIS:

El SIS regenerará de manera total la vía biliar lesionada del modelo canino sin presentar fibrosis o encapsulamiento del injerto que pudiese producir estenosis, rechazo del material o fuga biliar.

METODOLOGÍA:

TIPO DE ESTUDIO:

El diseño de nuestra investigación estará basado en un ensayo experimental, comparativo, aleatorizado y cegado para el observador histopatológico, donde un analista ajeno a nuestra investigación valorará los resultados.

CRITERIOS DE INCLUSION:

- perros adultos
- ambos sexos
- criollos
- mayores de 20 kgs. de peso
- sanos
- que no estén incluidos en algún otro protocolo

CRITERIOS DE NO INCLUSION:

- perros no adultos
- enfermos
- bajos de peso
- que estuviesen incluidos en otro protocolo.

CRITERIOS DE EXCLUSION:

- perros que, al momento de realizarse la laparotomía, se encontrase alguna otra patología inadvertida antes de su inclusión
- perros fallecidos durante el protocolo que demuestren causas ajenas al procedimiento de investigación al que son sometidos.

TAMAÑO DE MUESTRA:

Se tomará una muestra de modelo canino de 10 perros criollos (vox populi – callejeros) de ambos sexos, de aproximadamente 20 a 40 kg. de peso, realizándose una lesión parcial de la vía biliar, definiendo como lesión parcial aquella que involucra no más de 2/3 de la circunferencia total del colédoco del perro con reparación a base de un parche elíptico del material SIS que cubra este defecto. La muestra será dividida en dos grupos de 5 perros cada uno de manera aleatoria, dependiendo de las etapas clínicas a investigar en cuanto a la integración del injerto previa muerte del sujeto de estudio a los quince días (etapa clínica 1) y a los 56 días (etapa clínica 2).

VARIABLES DE ESTUDIO:

La *variable independiente* del estudio son las reparaciones con submucosa intestinal de cerdo (SIS) de las lesiones parciales.

La *variable dependiente* es el nivel de regeneración de la vía biliar. Esta se integra a su vez con las siguientes variables dependientes histopatológicas:

- inflamación aguda
- inflamación crónica
- inflamación granulomatosa
- neovascularización
- colágena laxa
- colágena nativa
- epitelización

DEFINICION OPERATIVA DE LAS VARIABLES:

Variable Independiente - biomaterial acelular que promueve la reparación tisular como un reemplazo de matriz teniendo una composición y una estructura completamente natural. Un biomaterial que no produce encapsulamiento pero que es remodelado gradualmente dejando atrás, tejido organizado.

Clasificación – Cualitativa ordinal.

Tipo de medición – ()

Variable Dependiente – La regeneración tisular del epitelio biliar será definida mediante el estudio histopatológico con la integración en las tres etapas clínicas; formación de microvasculatura en el SIS, crecimiento de fibroblastos y epitelio biliar con trazas de SIS en la integración y finalmente regeneración total con reemplazo del SIS por epitelio biliar.

Clasificación – Cualitativa nominal

TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS

Después de obtener la aceptación del Comité Local de Ética del Hospital Central Sur de Alta Especialidad PEMEX “Picacho”, se realizará un ensayo clínico, controlado, aleatorizado mediante técnica de tombola y después de cumplir con los criterios de inclusión se tomará un tamaño de muestra de 10 perros con lesión parcial de vía biliar dividido a su vez en dos grupos según los estadios clínicos a estudiar (1. 15 días y 2. 56 días) una vez sacrificados los animales y realizada la autopsia y extracción del material a estudiar (vía biliar). Previo al inicio del protocolo se entregará una muestra del SIS al servicio de histopatología para su identificación y tinción con técnica de Hematoxilina y Eosina. Se realizará la técnica quirúrgica por el investigador principal de la siguiente manera.

1. Se mantendrá a los sujetos a estudio con un ayuno de 12 horas privados de alimento sólido.
2. Se realizará anestesia a base de tiopental 30 mg/kg. de peso, utilizando intubación orotraqueal, una vez canalizado el sujeto de estudio con solución fisiológica al 0.9% administrando una dosis de antibiótico I.V. (oxitetraciclina 100 mg. / kg. de peso) previo a la cirugía. Se mantendrá en la manera posible las medidas de asepsia y antisepsia requeridas y solicitadas por el personal del bioterio.

3. Una vez en plano anestésico previa asepsia y antisepsia, se realizara incisión tipo Kocher disecando por planos mediante electrocoagulación hasta el acceso a cavidad, se colocará separador automático y se expondrá la región del ligamento gastrohepatico y hepatoduodenal (omento menor) identificando mediante disección roma la vía biliar principal y accesoria. Una vez expuesto el campo operatorio se identificara el colédoco y se esqueletizara en su totalidad supraduodenal; una vez realizado esto se procede a la coledocotomía de 2 cm. longitudinales al eje mayor de la vía biliar principal, posteriormente una vez colocado el SIS *4ply* en solución salina al 0.9% por 10 minutos se elaboraran los parches elípticos de 2.5 cm. a base de este material realizando la sutura continua longitudinal a los dos bordes libres de la coledocotomía de manera vascular con polipropileno 6-0. No se intentará en ninguno de los casos la colocación de stents, sonda en T o drenaje biliar. De todas las intervenciones se mantendrá un registro fotográfico digital del sujeto de estudio, de la anatomía inicial y del procedimiento una vez finalizado.
4. Los sujetos intervenidos iniciarán dieta en el primer día del postoperatorio, se manejarán con oxitetraciclina I.M. (100mg. /kg. peso al día) durante los cinco días siguientes del postoperatorio.
5. Una vez aleatorizados en subgrupos serán sacrificados según la etapa clínica a la que sean asignados. Para la etapa clínica 1. serán sacrificados a las 2 semanas del postoperatorio, etapa clínica 2. serán sacrificados a los 28 días y la etapa clínica 3. a los 56 días de haber sido intervenidos.
6. Una vez sacrificados se realizará una nueva laparotomía, a través de la herida inicial, se accederá al campo quirúrgico, se fotografiará el lecho quirúrgico y se diseccionará el injerto y la vía biliar principal así como la accesoria hasta por encima de

la carina, colocando una aguja 19Ga en fondo vesicular una para la instilación de medio de contraste hidrosoluble para la realización de una colangiografía transoperatoria, una vez obtenida esta se ligarán los hepáticos y el colédoco inmediatamente supraduodenal y se disecará vesícula de su lecho para la extracción de la pieza la cual se fijara en solución de formol al 4% y se enviará al servicio de histopatología del HCSAE. Este procedimiento será realizado en todos los sujetos de la muestra sin importar el grupo al que corresponda.

7. Una vez obtenida en patología se realizará un estudio con técnica de Mason y Hematoxilina y Eosina , en todas las etapas clínicas de ambos grupos.

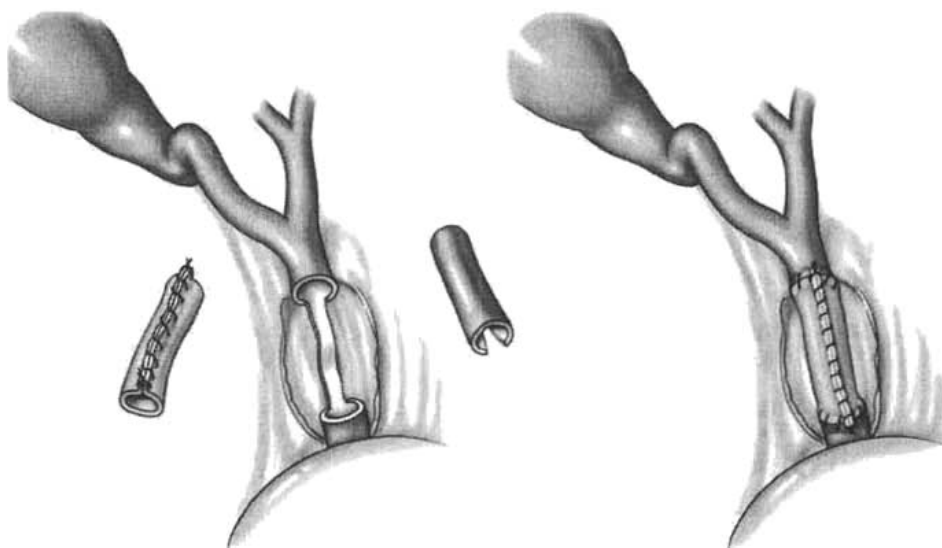


Fig. 5. Reemplazo de colédoco mediante cilindro de SIS. Esquematización de la técnica quirúrgica.

ANALISIS ESTADISTICOS

Se trata de un análisis comparativo en donde se toman dos grupos de perros a los cuales se les coloca un parche – injerto de material SIS en la vía biliar valorando el grado de regeneración a 15 y 56 días.

ASPECTOS ETICOS

Los progresos continuos en muchas áreas de la investigación biomédica requieren del uso de animales vivos con el propósito de investigar funciones y sistemas complejos porque, en tales casos, no existen alternativas adecuadas. Los progresos en la investigación básica y clínica en tales áreas no pueden continuar sin en el uso de animales vivos en calidad de sujetos experimentales, ya que los modelos animales aportan la posibilidad de hacer las pruebas sin poner en peligro la vida y la integridad de los seres humanos.

El uso de un animal de depósito o abandonado en refugio programado para ser sometido a eutanasia, salva la vida de otro. Por lo tanto el uso de estos animales está aprobado en los proyectos de investigación para cuales (vivisección, Dr. Ferrier, época Victoriana. 1881 Londres) sean sujetos apropiados. Además, para la adquisición de estos animales, como para todos los otros aspectos de la investigación, los investigadores deben observar las leyes locales, estatales y federales.

En México la utilización de animales en estudios de experimentación se rige por la “LEY DE PROTECCION A LOS ANIMALES” publicada en el Diario Oficial, la cual estipula en el artículo 8° lo siguiente: Los experimentos que se llevan a cabo en animales, se realizarán únicamente cuando estén plenamente justificados ante las autoridades correspondientes y cuando tales actos sean imprescindibles para el estudio y avance de la ciencia, siempre y cuando esté demostrado:

- a) Que los resultados experimentales deseados no pueden obtenerse por otros procedimientos o alternativas.
- b) Que las experiencias sean necesarias para el control, la prevención, el diagnóstico o el tratamiento de enfermedades que afectan al hombre o al animal.
- c) Que los experimentos sobre animales vivos no puedan ser sustituidos por esquemas, dibujos, películas, fotografías, videocintas o cualquier otro procedimiento análogo.

Si los experimentos llenan alguno de los anteriores requisitos, no se aplicará sanción alguna al experimentador.

Y en el artículo 9°: En principio ningún animal podrá ser usado varias veces en experimentos de vivisección, debiendo previamente ser sensibilizado, curado y alimentado en forma debida, antes y después de la intervención. Si las heridas son de consideración o implican mutación grave, serán sacrificados inmediatamente al término de la operación.

El uso de animales vivos en proyectos de investigación científica bien diseñados, es por lo tanto ético y apropiado.

RECURSOS

RECURSOS HUMANOS

1 residente del 4to año de Cirugía General del Hospital Central Sur de Alta Especialidad.

2 técnicos del Bioterio del Hospital Central Sur de Alta Especialidad.

1 técnico Radiólogo del Hospital Central Sur de Alta Especialidad.

1 médico histopatologo del Hospital Central Sur de Alta Especialidad.

1 médico Maestro en Investigación Clínica

RECURSOS MATERIALES

24 perros criollos de deposito en el Bioterio del Hospital Central Sur de Alta Especialidad.

Tipoental sódico ampulas ()

Oxitetraciclina ampulas ()

Venoset ()

Punzocats ()

Solución salina ()

Material de cirugía biliar reutilizable (separador de Gosset, cirugía de vías biliares)

Hojas de bisturi # 24.

Polipropileno 6-0 con aguja de punta redonda.

Seda sutopack 3-0

Nylon de pescar

SIS (SurgiSIS™) 4ply.

Cámara digital de video y fotografía SAMSUNG.

Röntgenografo portátil.

Chasis para placa radiográfica.

Hematoxilina y Eosina.

Tinción Mason.

RESULTADOS

Se intervinieron 10 perros con las características mencionadas en los criterios de inclusión y exclusión, se separaron en dos grupos como ya se explico con anterioridad para observar la integración del parche de SIS, de los cuales 10 sobrevivieron sin complicaciones postoperatorias.

En el grupo I se encontraron macroscópicamente adherencias laxas de epiplón a sitio quirúrgico con adherencia de pared vesicular hacia parche de SIS sin fistula, fuga o estenosis del conducto biliar principal, en los cinco perros de este grupo se realizo colangiografía transvesicular con adecuado paso de medio hasta duodeno, sin fuga con ligera dilatación del conducto biliar principal sin estenosis. Se evaluaron la inflamación aguda (reacción sobre el injerto no cicatrizal), inflamación crónica (reacción cicatrizal en bordes del injerto) y granulomatosa (reacción sobre el injerto); neovascularización (presencia de vasos de neoformación en la zona quirúrgica), presencia de colágena nativa laxa (injerto) y colágena nativa densa (presencia de infiltración de colágena nativa sobre todo el injerto) y la epitelización (presencia de epitelio biliar de regeneración sobre parche). Del primer grupo 4/5 perros presentaron inflamación aguda leve, sin embargo ya 4/5 presentaban reacción crónica moderada, en 2/5 se presentó reacción granulomatosa al parche el resto sin reacción. Se presentó neovascularización en 5/5. En cuanto a la presencia de colágena laxa (parche aun no infiltrado por colágena nativa completamente) se encontró presente en 5/5 perros. La epitelización en 4/5 sin embargo solo en bordes del parche el último no presentaba epitelio de regeneración.

Siguiendo con el protocolo establecido durante la laparotomía del segundo grupo se encontraron menos adherencias peritoneales, sin embargo, el hallazgo más importante fue la presencia de adherencias firmes organizadas de la pared libre vesicular hacia la zona del injerto sin presencia de fístula, estenosis o dilatación de los conductos biliares, así mismo se realiza la colangiografía transvesicular sin datos de complicaciones ya mencionadas. Se evaluó el injerto histopatológicamente siguiendo los parámetros establecidos para el primer grupo.

Del segundo grupo ningún perro presentaba inflamación aguda, 5/5 presentaron reacción inflamatoria crónica completa, así mismo ninguno presentó reacción granulomatosa. En 2/5 perros se presentó neovascularización. En ningún perro de este grupo se encontró colágena laxa contra la presencia de colágena densa (parche infiltrado por colágena nativa completamente) en 5/5 perros. La epitelización se encontró 5/5 perros y completamente cubriendo el injerto sobre el lumen coledociano. En uno de los perros se encontró absorción del 80% del parche.

En cuanto se refiere a la epitelización se consideran tres situaciones: ausente (0), en bordes del injerto (1) y completa (2), se observó un grado dos en 5/5 perros del segundo grupo mientras que en el primer grupo se obtuvo 1/5 sin epitelización (0), y 4/5 en bordes del injerto. En relación a la presencia de inflamación aguda marcando esta como tejido inflamatorio no cicatrizal en el segundo grupo se encontró que 5/5 perros no presentaban reacción, mientras que en el primer grupo 3/5 perros la presentaban. Según el parámetro de inflamación crónica, identificado como tejido cicatrizal organizado, se encontró en 3/5 perros de manera organizada y en 2/5 perros bien organizada en el

segundo grupo mientras que en el primer grupo 1/5 no presentaba reacción y 4/5 perros con reacción organizada.

A la evaluación de la inflamación granulomatosa se reportó que en 5/5 perros del segundo grupo no existía reacción mientras que en el primer grupo 1/5 perros presentó reacción al injerto, 2/5 a la sutura y 2/5 sin reacción. El siguiente parámetro evaluado fue la neovascularización la cual en el segundo grupo en 3/5 perros presentaba vaso bien conformado y en 2/5 en organización mientras que en primer grupo 3/5 presentaban neovascularización completa y 2/5 en organización. Finalmente evaluamos la evolución del injerto considerandolo como colágena laxa y la reacción de integración como colágena densa obteniendo lo siguiente: en el segundo grupo 5/5 perros presentaron la no existencia de colágena laxa intacta mientras que en el primer grupo 4/5 presentaron poca infiltración al injerto y en 1/5 perros injerto intacto. Así mismo en el segundo grupo 3/5 perros presentaron infiltración completa de colágena densa y 2/5 con infiltración media mientras que de el primer grupo 3/5 sin infiltración y 2/5 con infiltración leve al injerto.

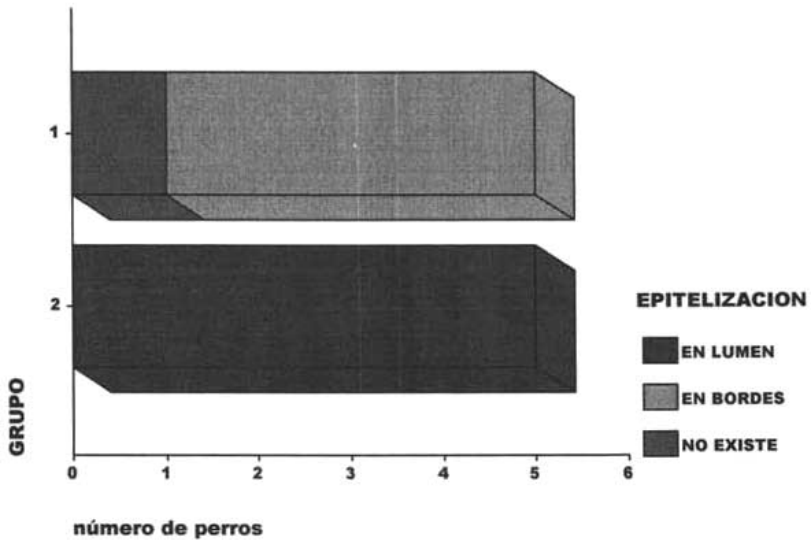
GRUPO * EPITE Crosstabulation

Count

		EPITE			Total
		0	1	2	
GRUPO	1	1	4		5
	2			5	5
Total		1	4	5	10

EPITELIZACION

por grupo

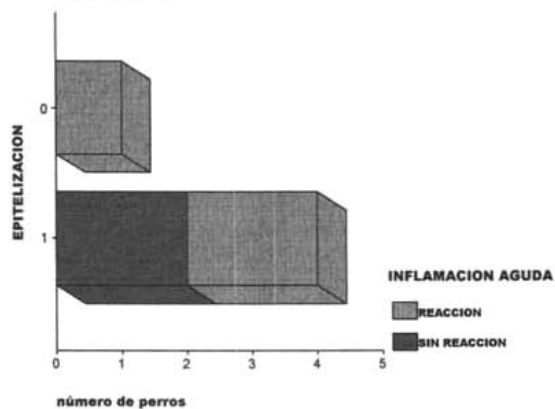


EPITE * I.AGUDA * GRUPO Crosstabulation

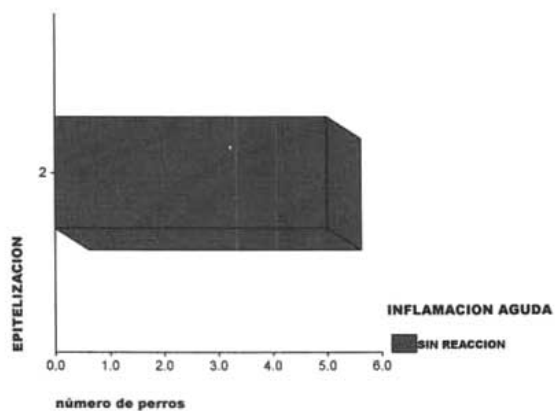
Count

GRUPO			I.AGUDA		Total
			0	1	
1	EPITE	0		1	1
		1	2	2	4
	Total		2	3	5
2	EPITE	2	5		5
	Total		5		5

GRUPO=1



GRUPO=2

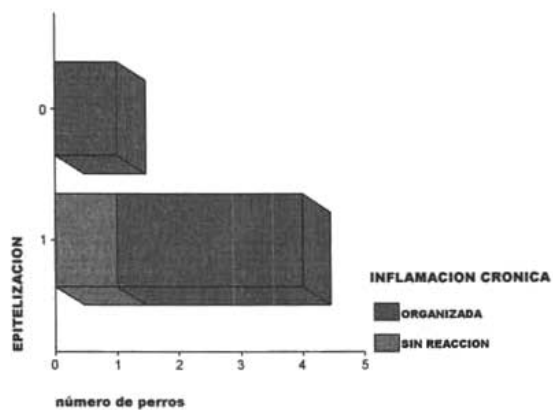


EPITE * I.CRONIC * GRUPO Crosstabulation

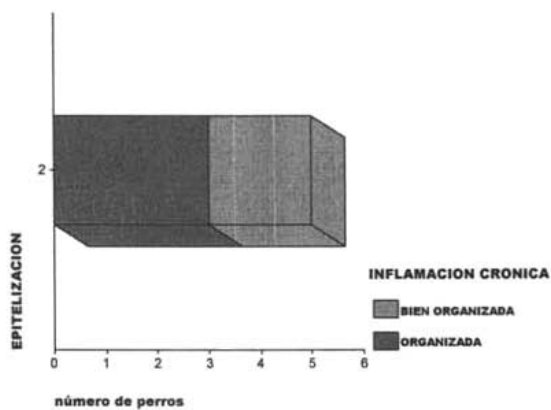
Count

GRUPO			I.CRONIC			Total
			0	2	3	
1	EPITE 0		1			1
	1		1	3		4
Total			1	4		5
2	EPITE 2			3	2	5
	Total			3	2	5

GRUPO=1



GRUPO=2

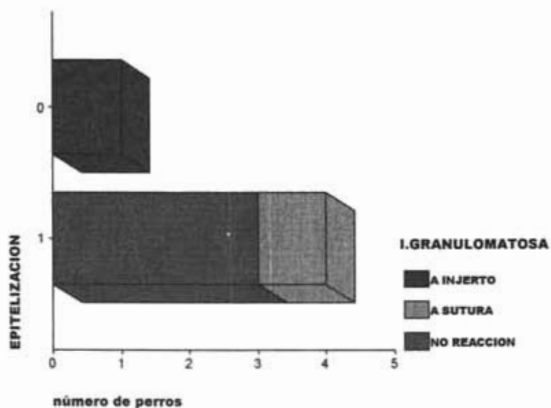


EPITE * I.GRA * GRUPO Crosstabulation

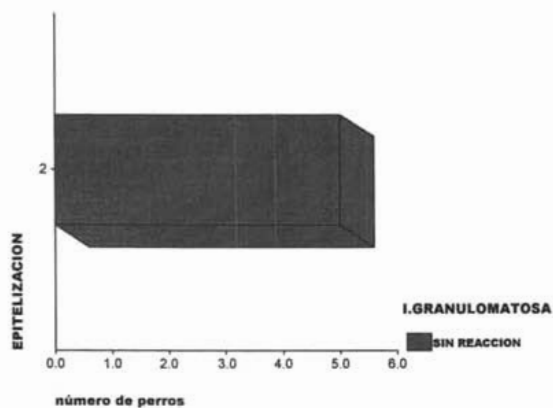
Count

GRUPO	EPITE	I.GRA			Total
		0	2	3	
1	0			1	1
	1	3	1		4
	Total	3	1	1	5
2	2	5			5
	Total	5			5

GRUPO=1



GRUPO=2

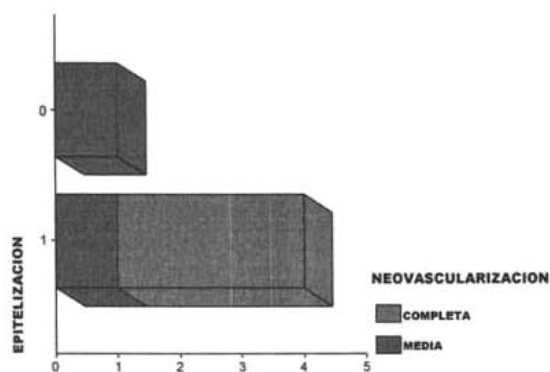


EPITE * NEOVAS * GRUPO Crosstabulation

Count

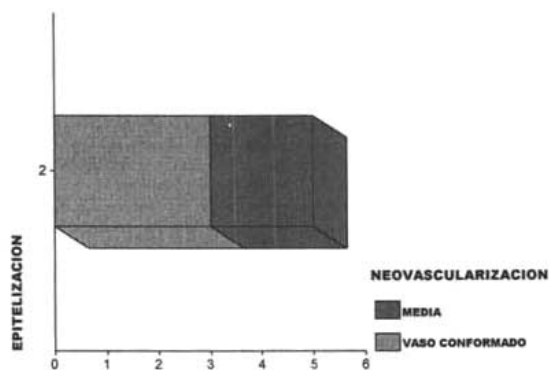
GRUPO	NEOVAS			Total
	0	1	2	
1	EPITE 0		1	1
	1		1	3
	Total		2	3
2	EPITE 2	3	2	5
	Total	3	2	5

GRUPO=1



número de perros

GRUPO=2



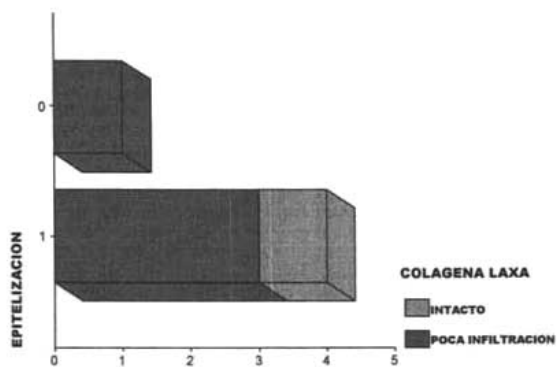
número de perros

EPITE * C.LAXA * GRUPO Crosstabulation

Count

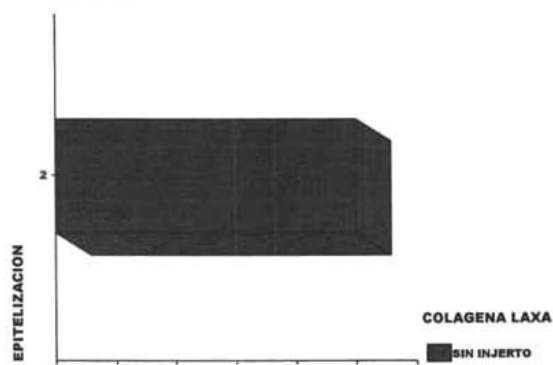
GRUPO	EPITE	C.LAXA	C.LAXA			Total
			0	1	2	
1	0			1		1
	1		3		1	4
	Total		4		1	5
2	2		5			5
	Total		5			5

GRUPO=1



número de perros

GRUPO=2



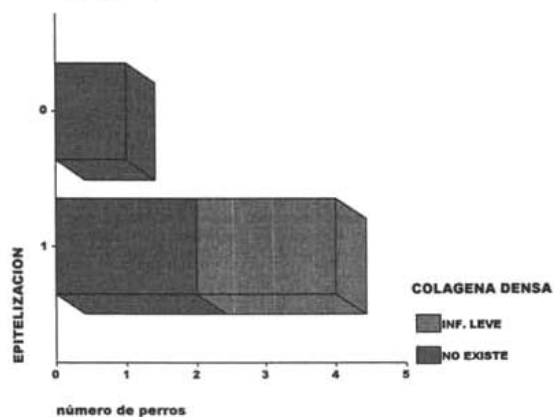
número de perros

EPITE * C.DENSA * GRUPO Crosstabulation

Count

GRUPO	EPITE		C.DENSA				Total
			0	1	2	3	
1	0		1				1
	1		2	2			4
	Total		3	2			5
2	2				2	3	5
	Total				2	3	5

GRUPO=1



GRUPO=2

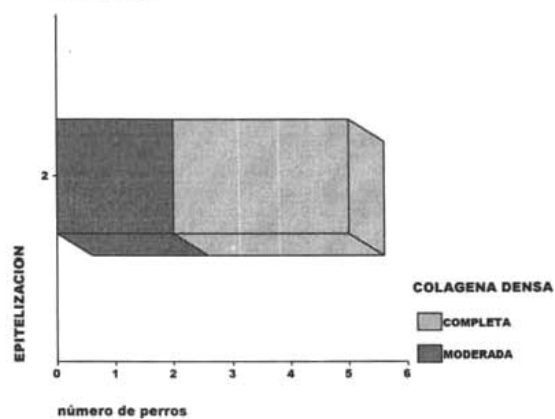




Imagen. 1. Se muestra pieza macroscopica transoperatoria con adherencia laxa de la pared vesicular a la zona del injerto



Imagen. 2.



Imagen. 3.

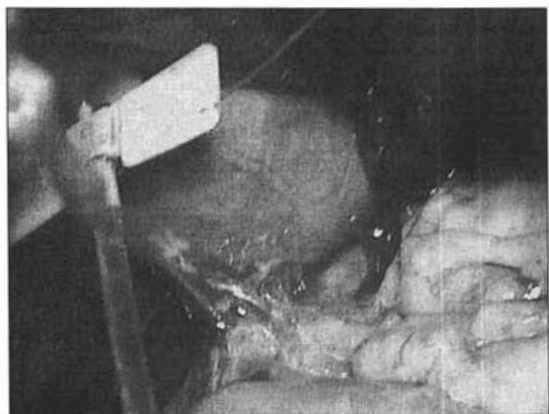


Imagen. 4. Colangiografía transvesicular



Imagen. 5. Adherencia laxa a la zona del injerto distinguible por la presencia de sutura no absorbible.



Imagen. 6.



Imagen. 7. Zona marcada de integración del injerto sin adherencias, se observa coledoco sin dilatación.

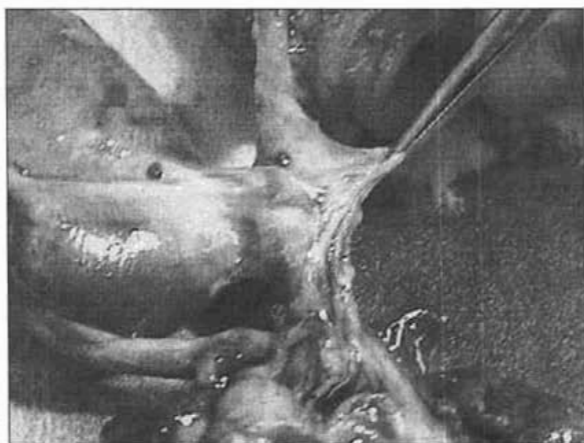


Imagen. 8. Adherencia de la pared vesicular a la zona del injerto



Imagen. 9. Colédoco con adherencias bien organizadas sin estenosis, fistula o dilatación.



Imagen. 10. Se observa material protésico integrado a la pared revestido por monocapa de epitelio, se observa zona de inflamación crónica .

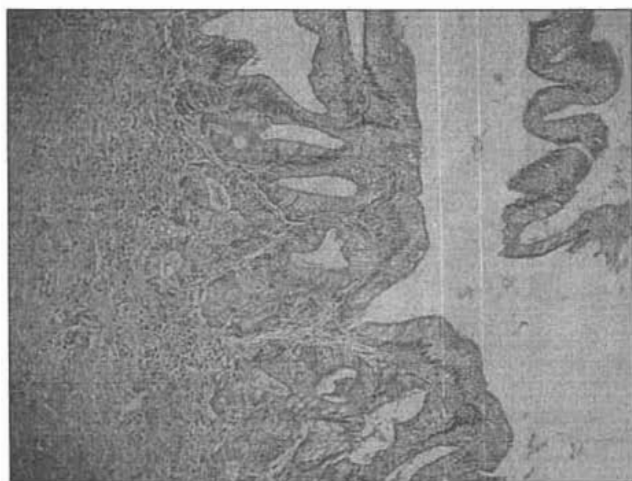


Imagen. 11. Colédoco normal con mínima reacción inflamatoria



Imagen. 12. Parche integrado, epitelizado en superficie monocapa, sin infiltrado inflamatorio

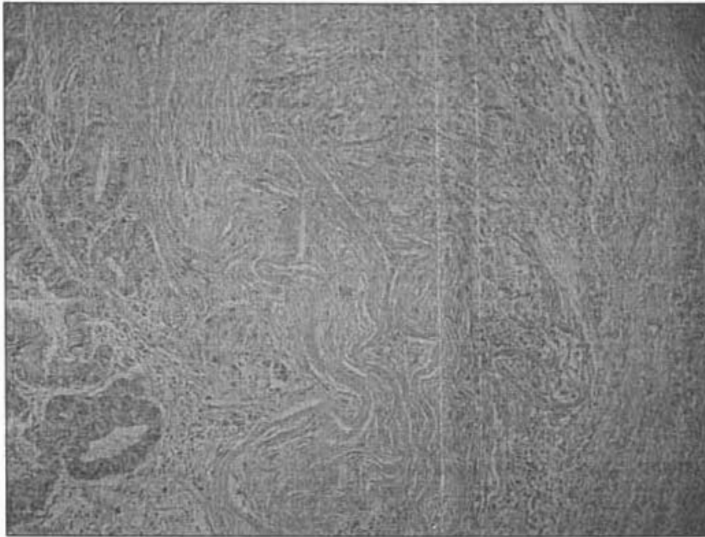


Imagen. 13. Parche con integración completa , mucosa hiperplásica, completamente reepitelizada.

DISCUSION

Existen en la actualidad una gran cantidad de estudios de investigación con respecto al uso del SIS en diferentes situaciones clínico-quirúrgicas. Así este material ha sido utilizado, como injerto en cirugía urológica como implante vesical e injerto ureteral, en cirugía general para malla protésica en reparación de hernia inguinal, en neurocirugía como parche de duramadre, en cirugía plástica como injerto en el paciente quemado así como injerto en tenorrafias y muchos otros.

Se encuentra un estudio en la literatura a cargo del Dr. Rosen, quien describe la utilización del SIS como material protésico para regeneración del conducto biliar en perros, con resultados descriptivos de su estudio donde el SIS demuestra ser una excelente herramienta en la cirugía de vía biliar, con regeneración del epitelio biliar en 5 meses de estudio.

Nuestro protocolo basado en este y otros, donde se utiliza el SIS como injerto que permite la regeneración tisular, trata de marcar de manera más objetiva los parámetros de integración celular del material protésico a la vía biliar, logrando esto a base de estudios histopatológicos cegados para el observador de dos grupos a 15 y 56 días, siendo esta prácticamente la única diferencia entre los dos grupos, ya que, tanto medica como quirúrgicamente se siguió el mismo protocolo para evitar sesgo de resultados.

Prácticamente coincidimos con las observaciones macroscópicas (imágenes 1 – 9) en la laparotomía posteriormente a la integración del parche con los resultados de otros estudios en cuanto se refiere a la presencia a 15 días de adherencias laxas en la región quirúrgica sin datos de fistula o estenosis de los conductos, sin embargo en comparación con el estudio de Rosen a los 15 días el SIS estaba prácticamente integrado a la vía biliar principal y solo era localizable por la sutura no absorbible, así mismo se observó una dilatación discreta del sitio proximal al injerto que no alteraba la función biliar clínicamente ni radiológicamente

(imágenes 10 – 15) donde se comprobaba esta discreta dilatación sin datos de estenosis o limitación del paso del medio a duodeno. Consideramos en base a estas observaciones innecesario llevar el estudio a 5 meses y observaríamos la evolución macroscópica a 56 días. En esta segunda etapa se encuentra una limitación en la dilatación proximal al injerto, con adherencias firmes de la pared vesicular al injerto sin embargo con disminución franca de la reacción inflamatoria en el lecho quirúrgico, en la colangiografía se observa un adecuado paso del material al duodeno sin fistula o estenosis.

Consideramos innecesario el uso de laboratoriales ya que clínicamente nuestros sujetos se mantuvieron anictéricos, con buen apetito e incremento de peso.

Microscópicamente a comparación de otros estudios, llevamos de manera más objetiva los parámetros de integración describiendo la presencia de inflamación aguda, inflamación crónica e inflamación granulomatosa, colágena laxa y densa, epitelización y neovascularización permitiendonos esto observar la evolución natural de la integración del injerto. Siendo así observamos en el primer grupo la presencia de epitelización unicamente en los bordes del parche con presencia en la mayoría de la muestra de tejido inflamatorio agudo no cicatrizal, conjuntamente observamos en bajo grado reacción cicatrizal a los bordes del injerto, en todo el primer grupo se observo neovascularización abundante, y presencia de colágena laxa en toda la muestra con infiltración leve de colágena nativa (densa) hacia el injerto como se menciona en el estudio de Rosen. En tanto el segundo grupo presenta unicamente inflamación crónica cicatrizal sin inflamación aguda o granulomatosa, con neovascularización más ordenada hasta vaso bien conformado así como integración de un 80% del material SIS con presencia de colágena densa en toda la muestra con injerto no intacto de colágena laxa, a diferencia del estudio de Rosen y otros esta valoración nos permite observar la evolución del injerto, donde se encuentra que la

epitelización del segundo grupo es completa unicamente cuando el injerto es integrado representado esto por ausencia de colágena laxa y abundante infiltración de colágena densa y la reacción inflamatoria no cicatrizal desaparece y la neovascularización más organizada permite el crecimiento del epitelio de regeneración hacia el lumen del conducto biliar así integrando el material a los dos meses de su colocación a comparación de cinco meses de otros estudios.

CONCLUSIONES

Basados en los resultados de este estudio podemos considerar que el SIS (small intestinal submucosa) es un material adecuado para realizar injertos en la vía biliar lesionada agudamente o en reparación de una vía biliar estenótica sin requerir de el uso de una derivación biliodigestiva, tratamiento estándar en la actualidad. Podemos concluir que debido a la facilidad del material para producir neovascularización permite su integración a la vía biliar a diferencia de otros injertos donde la necrosis de estos ocasiona el rechazo y la reestenosis del conducto biliar reparado.

Se demuestra que la epitelización del injerto de SIS es dependiente en tiempo de su integración y la organización adecuada de la neovascularización hasta la conformación de un vaso nutricio.

Se encuentra que los parámetros descritos para la integración del parche son una herramienta suficiente para evaluar la evolución natural del parche hasta su integración.

Sin embargo cabe mencionar que para validar este estudio se requiere de una muestra mayor así como de un estudio comparativo donde no se utilizo el injerto de SIS y unicamente se realiza la coledocorrafia y comparar con esta herramienta desarrollada si la regeneración de la vía biliar es afectada o no por el parche de SIS.

BIBLIOGRAFIA

1. Lillemoie 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;232:430-41.
2. Longmire WP Jr. Early management of injury to the extrahepatic biliary tract. *JAMA* 1966;195:623-5.
3. Dogliotti AM, Fogliati E. Operations for fibrous stenosis of the common bile duct. *Surgery* 1954;36:69.
4. 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;234:210-4.
5. Lord JW, Chenoweth AI. Free graft over a Vitallium tube for bridging a gap in the bile duct of the dog. *Arch Surg* 1943;46:245-52.
6. Hooper JH, Shackelford RT. Experimental replacement of the common bile duct. *Arch Surg* 1962;85:166-70.
7. Bergan JJ, Anderson M, Lounsbury FB. Vascularized polyvinyl sponge prosthesis. Its use to replace the canine common bile duct. *Arch Surg* 1962;84:49-53.
8. Mendelowitz DS, Beal JM. Expanded polytetrafluoroethylene in reconstruction of the canine biliary system. *Am J Surg* 1982;143:221-4.
9. Hartung H, Kirchner R, Baba N, Waldmann D, Strecker EP. Histological, laboratory, and X-ray findings after repair of the common bile duct with a Teflon graft. *World J Surg* 1978;2:639-42.
10. Gulati SM, Iyengar B, Thusoo TK, Pan Dey KK. Use of Dacron velour in choledochoplasty. An experimental study. *Am Surg* 1983;49:440-5.
11. Kirby CK, Gitts WT. Reconstruction of the bile ducts with an isolated segment of jejunum: an experimental study. *Arch Surg* 1950;61:462-8.
12. Belzer FO, Watts JM, Ross HB, Dunphy JE. Auto-reconstruction of the common bile duct after venous patch graft. *Ann Surg* 1965;162:346-55.
13. Schatten WE, Cramer LW, Herbsman H, Swarm RL. Experimental reconstruction of the common bile duct with split thickness skin graft. *Surg Gynecol Obstet* 1957;42:747-53.
14. Ginsburg N, Speese J. Autogenous fascial reconstruction of the bile duct. *Ann Surg* 1916;64:753-4.
15. Badylak SF. Small intestinal submucosa: a biomaterial conducive to smart tissue remodeling. *Tissue Engineering: Current Perspectives* 1993;179-89.
16. Cobb MA, Badylak SF, Janas W, Simmons-Byrd A, Boop FA. Porcine small intestinal submucosa as a dural substitute. *Surg Neurol* 1999;51:99-104.
17. Prevel CD, Eppley BL, Summerlin DJ, Sidner R, Jackson JR, McCarty M, et al. Small intestinal submucosa: utilization as a wound dressing in full-thickness rodent wounds. *Ann Plast Surg* 1995;35:381-8.
18. Liatsikos EN, Dinlenc CZ, Kapoor R, Alexianu M, Yohannes P, Anderson AE, et al. Laparoscopic ureteral reconstruction with small intestinal submucosa. *J Endourol* 2001;15:217-20.
19. Kropp BP, Eppley BL, Prevel CD, Rippey MK, Harruff RC, Badylak SF, et al. Experimental assessment of small intestinal submucosa as a bladder wall substitute. *Urology* 1995;46:396-400.
20. Peel SAF, Chen H, Renlund R, Badylak SF, Kandel RA. Formation of a SIS Cartilage composite graft in vitro and its use in the repair of articular defects. *Tissue Eng* 1998;4:143-55.
21. Badylak SF, Kokini K, Tullius B, Whitson B. Strength over time of a resorbable bioscaffold for body wall repair in a dog model. *J Surg Res* 2001;99:282-7.
22. Strasberg SM, Eagon CJ, Drebin JA. The "Hidden Cystic Duct" Syndrome and the Infundibular Technique of Laparoscopic Cholecystectomy - the Danger of the False Infundibulum. *J Am Coll Surg* 2000; 191:661-667.
23. Keulemans YC, Bergman JJ, Th de Wit L, Rauws EA, Huibregtse K, Tytgat GN, Gouma DJ. Improvement in the Management of Bile Duct Injuries?. *J Am Coll Surg* 1998;187:246-254.
24. Tez M, Keskek M, Özkan Ö, Karamursel S. External metallic circle in microsurgical anastomosis of common bile duct. *The American Journal of Surgery* 182 (2001) 130 - 133.
25. Gómez NA, Alvarez LR, Mite A, Andrade JP, Alvarez JR, Vargas PE, Tonalá NE, Vivas AE, Zapater JA. Repair of Bile Duct Injuries With Gore-Tex Vascular Grafts: Experimental Study in Dogs. *J Gastrointest Surg* 2002;6:116-120.
26. Michek J, Zelnicek P, Ochmann J, Svoboda P, Vrstýak J, Cierný M. New Classification of Major Bile Duct Injuries Associated With Laparoscopic Cholecystectomy. *SCRIPTA MEDICA (BRNO) - 75 (6): 283-290.*

27. Johnson SR, Koehler A, Pennington LK, Hanto DW. Long-term results of surgical repair of bile duct injuries following laparoscopic cholecystectomy. Surgery 2000; 128:668-77.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA