

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA  
Departamento de Cirugía**



**RESPUESTA INFLAMATORIA ESPLÁCNICA EN LA  
COLESTASIS MICROQUIRÚRGICA EXPERIMENTAL.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**José García Domínguez**

Bajo la dirección de los doctores

Jaime Arias Pérez  
M<sup>a</sup> Angeles Aller Reyero  
M<sup>a</sup> Cruz García Martín

**Madrid, 2008**

- **ISBN: 978-84-692-1008-6**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGIA**



**RESPUESTA INFLAMATORIA ESPLÁCNICA  
EN LA COLESTASIS  
MICROQUIRÚRGICA EXPERIMENTAL**

**Directores:**

**Dr. Jaime Arias Pérez**

**Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Aller Reyero**

**Dra. M<sup>a</sup> Cruz García Martín**

**JOSÉ GARCÍA DOMÍNGUEZ**

**TESIS DOCTORAL**

**MADRID 2008**

## *ÍNDICE DE ABREVIATURAS*

## Índice de abreviaturas

**$\gamma$ GT** :  $\gamma$  Glutamilttransferasa

**$\Delta$  Peso**: Incremento del peso

**$\alpha$ 1-AGP**:  $\alpha$ 1-Glicoproteína ácida

**$\alpha$ 1-MAP**: Proteína mayor ácida  $\alpha$ 1

**ABAT**: Transportador de ácidos biliares apical dependiente de sodio

**ACBIL**: Ácidos biliares

**ALB**: Albúmina

**ALT**: Aspartato Amino Transferasa

**AST**: Alanina Amino Transferasa

**ATP**: Adenosín trifosfato

**BD**: Bilirrubina directa

**BS**: Sales biliares

**BSEP**: Bomba exportadora de sales biliares

**BT**: Bilirrubina total

**CK**: Citoqueratina

**CLMS**: Complejo linfático mesentérico superior

**CME**: Ratas con colestasis microquirúrgica extrahepática

**COX**: Citocromo C oxidasa

**CREAT**: Creatinina

**CTGF**: Factor de crecimiento de tejido conectivo

**DE**: Desviación estándar

**EGF**: Factor de crecimiento epidérmico

**EP**: Espacio porta

**ERi**: Circulación colateral portosistémica de tipo esplenorrenal inferior

**ERK**: Quinasa extracelular regulada

**ERs**: Circulación colateral portosistémica de tipo esplenorrenal superior

**FA**: Fosfatasa Alcalina

**GAG<sub>s</sub>**: Glicosaminoglicanos

**HDL**: Lipoproteínas de alta densidad

**HGF**: Factor de crecimiento hepatocitario

**HIF-1 $\alpha$**  : Factor inducible por hipoxia

**IF $\gamma$** : Interferón  $\gamma$

**IGF:** Factor de crecimiento similar a insulina

**IL-10:** Inteleuquina 10

**IL-1 $\beta$  :** Inteleuquina 1 $\beta$

**IL-4:** Interleuquina 4

**JNK:** c-Jun N- terminal quinasa

**LBP:** Proteína de unión a lipopolisacárido

**LC:** Lóbulo caudado del hígado

**LDH:** Lactato deshidrogenasa

**LLD:** Lóbulo lateral derecho del hígado

**LLI:** Lóbulo lateral izquierdo del hígado

**LM:** Lóbulo medio del hígado

**LPS:** Lipopolisacárido

**MAP:** Proteína activadora mitógena

**MCP-1:** Proteína quimioattractora de monocitos

**MDR3:** Glicoproteína de resistencia a multifármacos 3

**MIF:** Factor inductor de macrófagos

**MMPs:** Metaloproteinasas de la matriz

**MRP2:** Proteína asociada a resistencia a multifármacos

**NADP:** Nicotinamida dinucleido fosfato

**NADPH:** Nicotinamida dinucleido fosfato reducido

**NGF:** Factores de crecimiento nervioso

**NTCP:** Polipéptido co-transportador de taurocolato sódico

**OATP<sub>s</sub> :** Proteína transportadora de aniones orgánicos

**PAF:** Factor de activación plaquetario

**PAR 2:** Receptor proteinasa activado tipo 2

**PC:** Fosfatidilcolina

**PCF:** Peso corporal final

**PCI:** Peso corporal inicial

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PE/PC:** Peso esplénico en relación con peso corporal

**PE:** Peso esplénico

**PEs:** Circulación colateral portosistémica de tipo paraesofágical

**PH/PC:** Peso hepático en relación con peso corporal

**PH:** Peso hepático

**PI3K:** Fosfoinositido-3-quinasa

**PKC:** Proteinquinasa C

**PLHA/PH:** Peso de los lóbulos hepáticos anteriores respecto al peso hepático

**PLHP/PH:** Peso de los lóbulos hepáticos posteriores respecto al peso hepático

**PLHP/PLHA:** Relación entre los lóbulos hepáticos posteriores y los lóbulos hepáticos anteriores

**PR/PC:** Peso renal en relación con peso corporal

**PR:** Peso renal

**PRc:** Circulación colateral portosistémica de tipo pararectal

**PSO:** Ratas pseudo-operadas

**PT/PC:** Peso testicular en relación con peso corporal

**PT:** Peso testicular

**PT:** Proteínas totales

**RMCP-II :** Proteasa de células cebadas de rata tipo II

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**SMA- $\alpha$ :** Actina de músculo liso alfa

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformador beta

**TLR:** Receptor Toll-like

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**VEGF:** Factor de crecimiento de endotelio-vascular

**X:** media aritmética

# ***ÍNDICE***

# ÍNDICE

	Página
<b>I. INTRODUCCION</b> .....	1
1. CONCEPTO DE COLESTASIS .....	1
2. FISILOGIA DE LA SECRECCIÓN BILIAR .....	7
3. ANATOMIA DE LA VIA BILIAR .....	11
4. COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA EXPERIMENTAL .....	16
5. FISIOPATOLOGIA DE LA COLESTASIS .....	20
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO</b> .....	42
<b>III. MATERIAL Y METODOS</b> .....	43
<b>1. MATERIAL</b> .....	43
1.A. ANIMALES .....	43
1.B. INSTALACIONES .....	43
1.B.1. Sala de estabulación .....	43
1.B.2. Sala de operaciones .....	43
1.B.3. Sala de evolución postoperatoria .....	44
1.B.4. Sala de sacrificio y procesado de muestras .....	44
1.B.5 Area de conservación de muestras .....	45
1.B.6 Eliminación de residuos biológicos .....	45
1.C. FARMACOS .....	45
1.C.1 Anestésicos .....	45
1.C.2 Otros fármacos .....	45

1.D. MATERIAL.....	45
1.D.1 Instrumental quirúrgico .....	45
1.D.2 Material de sutura y ligadura .....	46
1.D.3 Material quirúrgico complementario .....	46
1.D.4 Otros materiales para procedimiento operatorio y de extracción de muestras.....	47
1.D.5 Material de laboratorio .....	47
1.E. EQUIPOS DE LABORATORIO .....	48
1.E.1 Procesado de muestras .....	48
1.E.2. Estudios bioquímicos en suero .....	48
1.E.3 Estudio proteínas de fase aguda en suero .....	48
1.E.4 Determinación de los niveles de quimasa (RMCP-II) en la mucosa-submucosa intestinal y en el CLMS .....	48
1.E.5 Determinación de los niveles de citoquinas en hígado, íleon, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos .....	48
1.E.6 Laboratorio de anatomía patológica .....	49
1.F. REACTIVOS DE LABORATORIO .....	49
1.F.1 Estudios bioquímicos en suero .....	52
1.F.2 Proteínas de fase aguda en sangre .....	51
1.F.3 Niveles de Proteasa II de células cebadas (RMCP-II) en la . mucosa-submucosa íleon y en ganglios linfáticos msentéricos....	51
1.F.4 Niveles de citoquinas en hígado, íleon, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos superiores .....	52
1.F.5 Reactivos para estudio histológico.....	52

<b>2. MÉTODOS</b> .....	53
2.A. CONDICIONES DE UTILIZACIÓN Y ESTABULACIÓN DE LOS ANIMALES .....	53
2.B. TÉCNICA ANESTÉSICA .....	54
2.C. TÉCNICA QUIRÚRGICA .....	54
2.C.1 Pseudoperación .....	54
2.C.2 Colestasis extrahepatica microquirurgica .....	56
2.D. EVOLUCION POSTOPERATORIA.....	58
2.E. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES.....	60
2.E.1 Técnica de necropsia .....	60
2.E.2 Técnica de estudio de la circulación portosistémica .....	60
2.E.3 Técnica de estudio de la vasculopatía venosa .....	61
2.E.4 Técnica de extracción sanguínea .....	61
2.E.5 Recogida de muestras histológicas.....	61
2.E.5.a. Extracción de muestras de íleon .....	61
2.E.5.b. Extracción del Complejo Linfático Mesentérico Superior .....	62
2.E.5.c. Extracción esplénica.....	62
2.E.5.d. Extracción del parénquima hepático .....	62
2.E.6 Eliminación de los restos biológicos .....	62
2.F. TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	63
2.F.1 Determinación de la bilirrubina total y directa en Suero .....	63
2.F.2 Determinación de alanin aminotransferasa (ALT) y de aspartato aminotransferasa (AST) en suero .....	64

2.F.3 Determinación en suero de $\gamma$ glutamiltransferasa (GGT) .....	66
2.F.4 Determinación de lactatodeshidrogenasa (LDH) en suero .....	67
2.F.5 Determinación de fosfatasa alcalina (FA) en suero .....	67
2.F.6 Determinación de creatinina en suero.....	68
2.F.7 Determinación de urea en suero.....	69
2.F.8. Determinación de albúmina sérica .....	70
2.F.9. Determinación de ácidos biliares en suero.....	70
2.F.10. Determinación de Tiostatina o Proteína mayor ácida $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1-MAP) en suero.....	71
2.F.11. Determinación de Glicoproteína ácida $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1-AGP) en suero .....	72
2.F.12. Determinación de los niveles de proteínas en la mucosa-submucosa íleon y en el CLMS.....	72
2.F.13. Determinación de los niveles de Proteasa II(RMCP-II) en la mucosa-submucosa de íleon y en CLMS .....	73
2.F.14. Determinación de los niveles de citoquinas en el hígado íleon, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos .....	74
2.G. ESTUDIO MICROSCÓPICO E HISTOPATOLÓGICO.....	75
2.G.1 Fijación .....	75
2.G.2 Inclusión .....	75
2.G.3 Procesado de los cortes .....	76
2.G.4 Tinción.....	76
2.G.5 Montaje.....	78

2.G.6 Estudio histomorfométrico de fibrosis en el parénquima hepático con tinción de Rojo Sirio.....	78
2.H. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS .....	79
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>80</b>
1. SUPERVIVENCIA Y COMPLICACIONES POSTOPERATORIAS.....	80
2. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL .....	80
3. EVOLUCION DEL PESO HEPATICO .....	82
4. EVOLUCION DEL PESO ESPLÉNICO .....	84
5. EVOLUCION DEL PESO TESTICULAR .....	85
6. EVOLUCION DEL PESO RENAL .....	86
7. CIRCULACION COLATERAL VENOSA .....	88
8. VASCULOPATIA VENOSA MESENERICA .....	90
9. HISTOLOGIA HEPÁTICA .....	91
10. BIOQUIMICA SANGUÍNEA .....	96
11. PROTEINAS DE FASE AGUDA EN SANGRE .....	97
12. CITOQUINAS .....	101
12.A. Niveles tisulares de TNF- $\alpha$ .....	101
12.B. Niveles tisulares de Inteleukina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) .....	102
12.C. Niveles tisulares de Interleukina 4 (IL-4).....	104
12.D. Niveles tisulares de Inteleukina 10 (IL-10) .....	105
13. NIVELES DE QUIMASA EN COMPLEJO LINFATICO MESENERICO SUPERIOR E ILEON .....	109

<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	111
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	142
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b> .....	143

## *I. INTRODUCCION*

## 1. CONCEPTO DE COLESTASIS

La colestasis es un síndrome clínico que se produce por alteraciones en la formación de la bilis, una propiedad única y vital del hígado. Las causas de la colestasis son numerosas e incluyen desde enfermedades genéticas raras y alteraciones del desarrollo normal de la anatomía excretora biliar, hasta patologías progresivamente letales, como son la cirrosis biliar primaria y la colangitis esclerosante (Trauner y cols. 1998). La colestasis puede también ser secundaria a obstrucciones mecánicas de la vía biliar extrahepática, a hepatitis vírica o a la administración de ciertos fármacos u hormonas. Pero, independientemente de cual sea su causa, éste síndrome se manifiesta por la retención hepática de productos que se excretan normalmente en la bilis, en particular sales biliares. A medida que éste proceso progresa en el tiempo pueden aparecer ictericia e hipercolesterolemia y casi siempre cursa con una elevación sérica de fosfatasa alcalina y finalmente con fibrosis, cirrosis y signos clínicos de fallo hepático (Boyer, 2007).

La colestasis obstructiva consiste en la obstrucción de la vía biliar, ya intra- o extrahepática y se caracteriza clínicamente por ictericia, coluria, acolia y prurito (Schaffner y cols. 1979; Sherlock, 1984; Li y cols. 2004). Los pacientes con colestasis sufren de una elevada morbi-mortalidad, que es especialmene intensa cuando son sometidos a intervenciones quirúrgicas (Armstrong y cols. 1984). La colestasis obstructiva cursa con múltiples alteraciones sistémicas, entre las que se incluyen un déficit de la cicatrización con aumento de la incidencia de infecciones de la herida quirúrgica, incremento de la posibilidad de insuficiencia renal aguda, así como de los niveles plasmáticos de endotoxina y de bacteriemia biliar (Beyer y Ellis, 1976; Hunt y cols. 1982; Clements y cols. 1992; Clements y cols. 1996; Pain y cols. 1997). Desde el punto de vista bioquímico, la colestasis cursa con niveles séricos elevados de bilirrubina, ácidos biliares (ABIL), fosfatasa alcalina y  $\gamma$ -Glutamil transferasa (Li y Crawford, 2004). Si se produce una elevación extrema de transaminasas séricas se debe sospechar una severa lesión hepatocelular, pero lo más frecuente es que sus concentraciones aumenten de forma moderada (Li y Crawford, 2004).

La patología derivada de la colestasis incluye aspectos morfológicos (acúmulo o estasis de bilis en la vía biliar y en los hepatocitos), funcionales (disminución de la secreción hepática de bilis y del flujo biliar canalicular) y clínicos (retención en la circulación sanguínea de sustancias que normalmente son excretadas en la bilis) (Sherlock, 1997; Li y cols. 2004).

La causa más frecuente de colestasis extrahepática en la clínica humana es la obstrucción mecánica de la vía biliar extrahepática, que puede ser secundaria a malformaciones de la vía biliar y pancreáticas, litiasis biliar, infecciones y tumores (Tabla 1) (Sherlock, 1997; Li y cols. 2004; Lefkowitch 2006).

En esencia, la colestasis es un deterioro del flujo biliar y puede ser aguda o crónica. La consecuencia es la retención de ácidos biliares, bilirrubina y otros solutos colefilicos en el hígado y en la sangre y un déficit de ácidos biliares en el intestino. Se pueden desarrollar varias formas de colestasis, bien por una alteración de la secreción biliar, por una obstrucción del flujo biliar, o por una combinación de ambas (Figura 1).

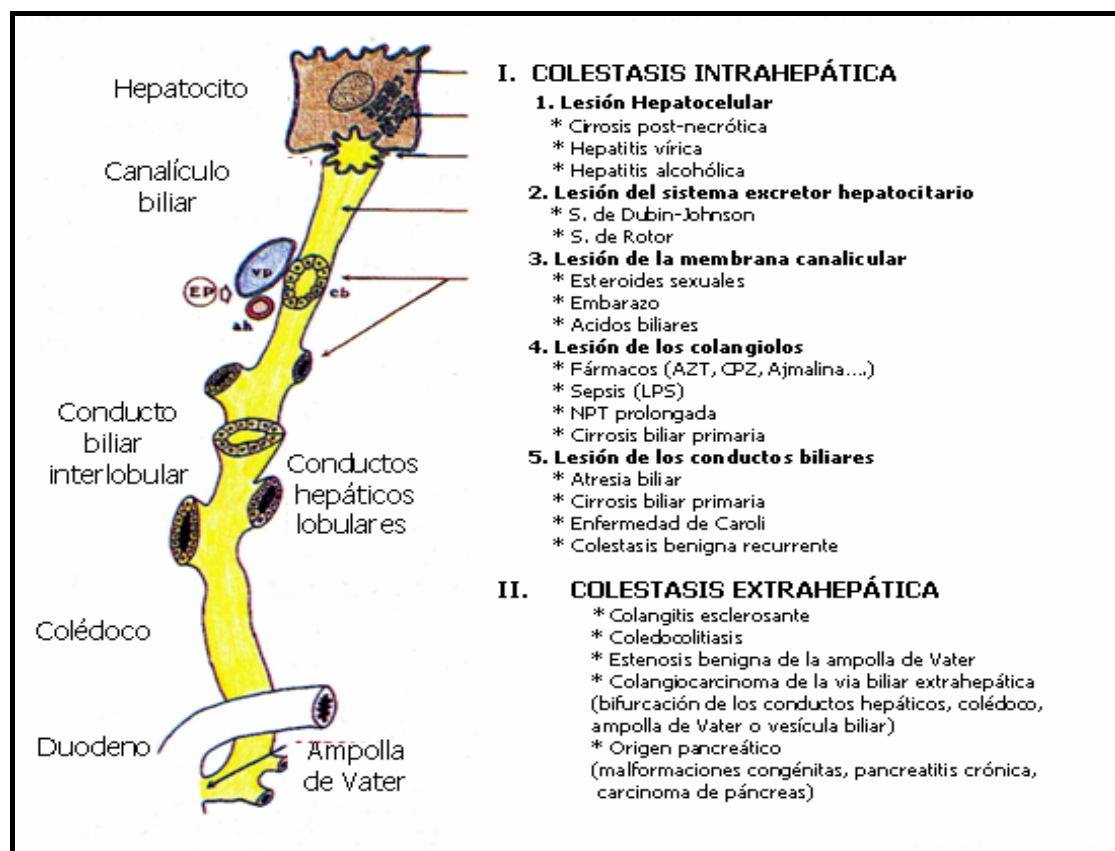


Figura 1. Clasificación etiopatogénica de la colestasis.

El deterioro de la secreción biliar puede ser genético, por ejemplo, en diferentes tipos de colestasis intrahepática familiar recurrente, en la colestasis intrahepática benigna recurrente o en la fibrosis quística y puede ser también adquirida por inflamación, toxinas, fármacos o hormonas (Rodríguez-Garay, 2003; Paumgartner y Bevers, 2004; Trauner y cols. 2005).

En las patologías inflamatorias, como la sepsis, las infecciones bacterianas, la hepatitis vírica, así como en las hepatitis inducidas por toxinas o fármacos, las citoquinas pro-inflamatorias pueden alterar la secreción biliar. Así, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  inhiben los transportadores NTCP y BSEP, que son responsables del transporte de ácidos biliares, así como OATP2 y MRP2, que transportan la bilirrubina y otros múltiples iones orgánicos (Trauner y cols. 1999; Zollner y cols. 2001). Los fármacos pueden causar colestasis al inhibir la función de las proteínas de transporte hepatobiliar. Algunos fármacos inhiben BSEP directamente desde el interior de los hepatocitos, lo cual se denomina cis-inhibición, por ejemplo, Ciclosporina A, glibenclamida, troglitazona y bosentan (Fattinger y cols. 2001; Byrne y cols. 2002).

La obstrucción del flujo biliar puede ser secundaria a trastornos genéticos, como la fibrosis quística o puede ser adquirida, como en la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante o el síndrome de desaparición o "*vanishing*" de los conductos biliares. Sin embargo, es mucho más frecuente la colestasis obstructiva secundaria a litiasis o tumores (Paumgartner, 2006). En los trastornos colestásicos causados por una lesión inicial de los colangiocitos (p.ej. en la agresión inmunológica en el caso de la cirrosis biliar primaria) los ácidos biliares hidrofóbicos presentes en la bilis (en concentraciones milimolares) pueden agravar la lesión de los conductos biliares y contribuir a su destrucción y pérdida, lo cual resulta en una colestasis obstructiva progresiva. Esto puede ser denominado citotoxicidad extracelular por ácidos biliares, en contraposición a la toxicidad intracelular por AB, que ocurre cuando los AB se acumulan en el interior de los hepatocitos (en concentraciones micromolares). Una causa de toxicidad extracelular del epitelio biliar por AB también es el déficit de fosfolípidos en la bilis (Paumgartner, 2006).

El síndrome colestásico cursa con ictericia, prurito y malabsorción intestinal con esteatorrea e hipertensión portal en patologías colestásicas crónicas (Heathcote 2007). La hipertensión portal puede incluso ser un hallazgo precoz que se desarrolla antes de la cirrosis (Heathcote, 2007). La ictericia, o coloración amarilla de la piel, mucosas y fluidos corporales, se debe fundamentalmente al exceso de bilirrubina. Clínicamente es detectable cuando la concentración sérica de bilirrubina es superior a 2-3 mg/dl. Inicialmente es más evidente en el paladar y en la esclerótica, donde se fija al tejido elástico. En colestasis prolongadas la piel y la esclerótica pueden adquirir un tinte verdoso por conversión de la bilirrubina en biliverdina (Simpson y cols. 1995; Sherlock y cols. 1997). El grado de severidad de la ictericia es variable y depende del balance entre la producción de pigmentos biliares y su capacidad de excreción renal (Sherlock y cols. 1997).

El prurito es un síntoma frecuente y ocasionalmente incapacitante en los pacientes con patología colestásica crónica (Wolfhagen y cols. 1997). El prurito en colestasis representa un problema clínico difícil de manejar, ya que su tratamiento suele ser poco satisfactorio. El prurito es más intenso en la palma de la mano y en la planta del pie (Bergasa y cols. 1993; Bergasa 2007). El mecanismo que desencadena el prurito suele atribuirse a la retención cutánea de ácidos biliares hidrofóbicos que estimulan las terminaciones nerviosas de la piel (Bergasa y cols. 1993; Pasha y cols. 1996). La degranulación de las células cebadas cutáneas, con la consiguiente liberación de histamina, podría contribuir al desarrollo de prurito en los pacientes con colestasis (Clements y cols. 1994).

Se ha sugerido que el prurito podría tener un origen central y ser producido por diversas sustancias que actuarían a través de un mecanismo de neurotransmisión (Bergasa y cols. 1995; Bergasa y cols. 1996; Wolfhagen y cols. 1997). Esta hipótesis es avalada por la presencia de opioides endógenos circulantes en el organismo que son responsables de la etiopatogenia del prurito (Bergasa y cols. 1996; Wolfhagen y cols. 1997). Además, se ha demostrado que los niveles plasmáticos de endorfinas, encefalinas y dinorfinas se elevan en la patología colestásica crónica y que el tratamiento con antagonistas opioides y con ondasetrón, un antagonista específico del receptor tipo 3 de la Serotonina, mejora la sintomatología del

prurito (Bergasa y cols. 1995; Schworer y cols. 1995; Wolfhagen y cols. 1997; Greaves y Califa, 2004). Estos hallazgos no indican que el prurito en colestasis sea mediado exclusivamente por opioides endógenos, pero sí sugieren que diversas sustancias similares a los agonistas opioides pueden concentrarse en el plasma y en la piel de estos pacientes y desencadenar el prurito (Bergasa y cols. 1993; Jones y cols. 1996; Bergasa 2007).

Después de una Reunión sobre prurito, celebrada en Oxford en el año 2000, Yosipovitch y cols. (2003) y Twycross y cols. (2003) establecieron una clasificación fisiopatológica del prurito en cuatro categorías:

1. Pruritoceptivo: generado en la piel, usualmente por un proceso inflamatorio (p.ej. urticaria, escabiosis).
2. Neurogénico: generado en el sistema nervioso central en respuesta a sustancias pruritogénicas circulantes, como ocurre en colestasis o en respuesta a la administración intraespinal de morfina.
3. Neuropático: debido a lesiones anatómicas de los sistemas nervioso central o periférico, p.ej. por atrapamiento nervioso o tumores, y
4. Psicógeno: incluyendo alucinaciones por parásitos.

Por lo tanto, el prurito que sufren los pacientes con colestasis es de tipo neurogénico. La obstrucción biliar comporta un incremento de la síntesis intrahepática de péptidos opioides (Bergasa y cols. 1995) que se diseminan en la circulación sanguínea y causan prurito al actuar sobre los receptores opioides  $\mu$  en el SNC y en la piel (Greaves y cols. 2007). Este tipo de prurito puede ser parcialmente tratado por antagonistas opioides  $\mu$ , como la naltrexona (Greaves y Califa, 2004; Bergasa y cols. 1992).

Recientes trabajos sugieren que la epidermis por sí misma, especialmente, los queratinocitos que forman la epidermis, constituyen el receptor del prurito (Inoue y cols. 2002). Los queratinocitos expresan múltiples mediadores neuropeptídicos y receptores que parecen estar implicados en el prurito, incluyendo opioides, factores de crecimiento nervioso (*Nerve Growth Factors*, NGF), sustancia P y receptores, entre los que se incluyen receptores vaniloideos y receptor proteinasa activado tipo 2 (*proteinase activated receptor type 2*; PAR 2) y canales de ATP *voltage-gated*, todos ellos característicos de células neuronales. Así, la epidermis y

sus ramificaciones asociadas a finos filamentos de neuronas C intraepidérmicas pueden ser consideradas como "el receptor del prurito" (Greaves 2007). Se ha demostrado la existencia de neuronas C amielínicas de baja conductancia que únicamente transmiten la sensación de prurito y los cambios de temperatura en respuesta a histamina, descartándose así la idea de que el prurito es solamente una versión moderada del dolor (Schmelz 2001). Estas neuronas, que representan aproximadamente el 5% del total, y las que se encargan de la transmisión contralateral de la sensación de prurito al tálamo son una subclase específica de las neuronas de la lámina 1 del tracto espinotalámico (Andrew y Craig, 2001), demostrándose así que existen neuronas dedicadas específicamente al prurito no sólo periféricamente, sino también en el SNC (Greaves 2007).

Por último, la esteatorrea se produce por la ausencia de sales biliares en la luz intestinal, que son esenciales para la absorción de las grasas presentes en los alimentos. Suele ser proporcional a la intensidad de la ictericia y se asocia con una deficitaria absorción de calcio y de vitaminas liposolubles (Bergasa y cols, 1993; Sherlock y cols. 1997; Bergasa 2007). Así, la malnutrición es una consecuencia inevitable de las hepatopatías crónicas colestásicas, en particular en los niños, que sufren la pérdida de depósitos de grasa y atrofia muscular en un 60-80% de los casos (Protheroe y Kelly, 1998). La disminución de la ingesta energética secundaria a anorexia, los vómitos y la malabsorción de grasas, asociado a los trastornos del metabolismo de los carbohidratos y proteínas por la insuficiencia hepática, el aumento de los requerimientos energéticos y los déficit de vitaminas y minerales, contribuyen al retraso de crecimiento en los niños (Protheroe y Kelly, 1998). El color de las heces es un buen indicador de la obstrucción de la vía biliar, que si es completa, cursa con acolia (Sherlock y cols. 1997).

Los ácidos biliares son necesarios para una eficiente absorción intestinal de los lípidos y además, ejercen una potente función antimicrobiana directa e indirecta, en el intestino delgado (Hofman, 2007). La circulación enterohepática, que es interrumpida en las situaciones de colestasis obstructiva, es el resultado de la absorción de los ácidos biliares en el ileon y es regulada en dos localizaciones. En los hepatocitos, la biosíntesis de

ácidos biliares se regula por un mecanismo de retroalimentación o “*feed-back*” negativo por el receptor nuclear FXR, así como por citoquinas y por un péptido (FGF-19) liberado por la acción de los ácidos biliares sobre los enterocitos ileales. En el enterocito ileal, la reabsorción de los AB es regulada también por un mecanismo de *feed-back* negativo por FXR y otros receptores nucleares (Hofman, 2007). La bomba exportadora de sales biliares (BSEP) media la secreción canalicular de ácidos biliares en contra de un gradiente (Hofman, 2007).

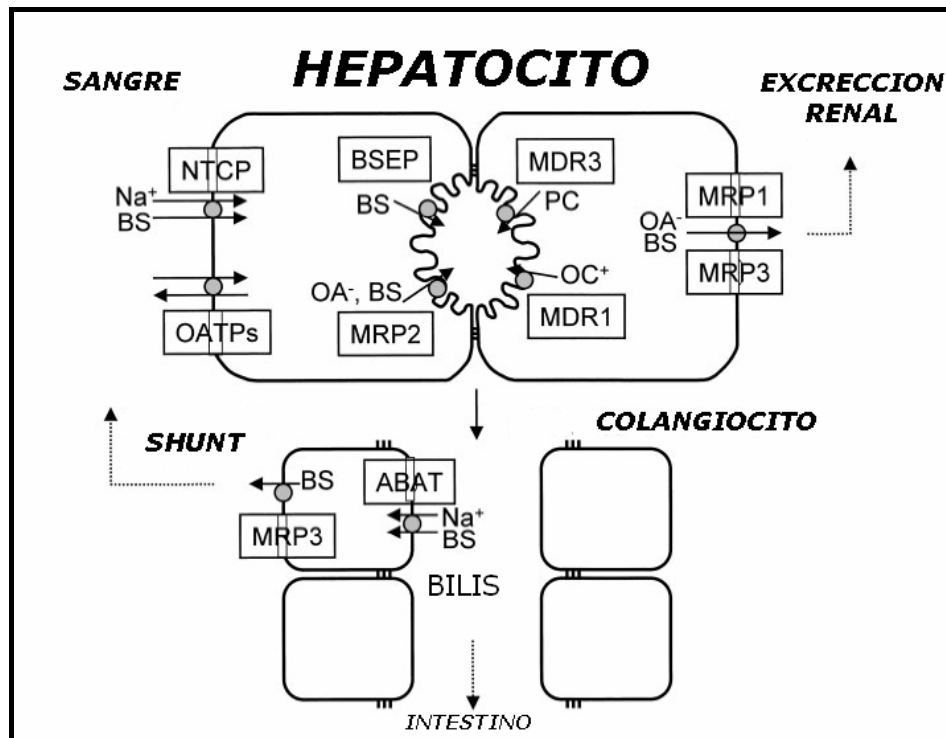
## 2. FISILOGIA DE LA SECRECIÓN BILIAR

La secreción biliar es el resultado de las funciones coordinadas de varios sistemas de transporte hepatobiliar y la colestasis puede ser producida por un deterioro de la secreción biliar, por una obstrucción del flujo biliar, o bien por una combinación de éstos dos factores (Paumgartner, 2006).

### *Mecanismos moleculares de formación de la bilis.*

La formación hepática de la bilis es crítica para la supervivencia. La “fuente de la bilis” es el hepatocito, una célula poligonal polarizada que posee una membrana plasmática con una superficie basolateral, localizada en el espacio de Disse, subyacente a las células endoteliales del sinusoides, y una cara apical que delimita el canaliculo biliar (Figura 2) (Li y Crawford, 2004).

La membrana plasmática basolateral contiene proteínas transportadoras que utilizan gradientes de Na<sup>+</sup> y de pH para captar solutos orgánicos desde la sangre hacia el interior del hepatocito. Y la membrana canalicular contiene sistemas de transporte activo que facilitan la secreción de solutos orgánicos hacia la luz canalicular. Los principales solutos orgánicos secretados en la bilis son sales biliares conjugadas con taurina o con glicina (ursodeoxicolato, colato, quenodeoxicolato, deoxicolato y litocolato), fosfatidilcolina, colesterol, glucurónidos de bilirrubina y glutatión (Li y Crawford, 2004).



**Figura 2.** Representación esquemática de los mecanismos de secreción biliar. BS(sales biliares),PC (fosfatidilcolina),  $OA^-$  (aniones orgánicos),  $CA^+$  (cationes orgánicos),BSEP( bomba exportadora de sales biliares),NTCP (polipéptido co-transportador de taurocolato sódico),OATPs (proteína transportadora de aniones orgánicos),ABAT (transportador de ácidos biliares apical dependiente de sodio). (Modificado de Li y Crawford, 2004).

La bilis hepatocelular se forma por el transporte activo de solutos en el canalículo biliar. Así, se establece un gradiente osmótico local entre la bilis canalicular y el plasma sinsuoidal. Esto comporta un flujo de agua, electrolitos y pequeños solutos hacia el interior del canalículo biliar, principalmente por una vía paracelular, a través de las uniones estrechas que tienen una permeabilidad selectiva y son impermeables a solutos grandes y con carga negativa (Nathanson y Boyer, 1991).

La carga osmótica más importante para la formación hepatocelular de bilis es la secreción de ácidos biliares (AB) desde la sangre sinusoidal hacia la bilis (Kullak-Ublick y cols. 1004). Los AB conjugados, que representan la mayor fracción de los AB presentes en la sangre, son transportados a través de la membrana basolateral de los hepatocitos junto con sodio por el cotransportador de taurocolato-sódico (NTCP, *SLC10A1*). Los ácidos biliares

---

no conjugados y múltiples aniones orgánicos, incluyendo la bilirrubina, son captados por los hepatocitos vía el polipéptido transportador de aniones orgánicos (*organic anion-transporting polypeptide*) 2 (OATP2, SLC21A9). La función secretora de la bilis hepatocelular muestra una distribución zonal, siendo máxima en los hepatocitos más cercanos al flujo venoso portal (zona 1) y disminuyendo progresivamente a lo largo del sinusoides hasta los hepatocitos adyacentes a las venas hepáticas terminales (zona 3) (Jungermann y Kietzmann, 1996).

La fase limitante para la formación de bilis es el transporte activo de AB y otros solutos a través de la membrana canalicular de los hepatocitos. Esta fase es regulada por diversas bombas exportadoras dependientes de ATP proteínas (ATP-binding-cassette transport, también denominadas ABC-transporters). Las sales biliares son transportadas por la bomba exportadora de sales biliares (SEP, ABCB11), en tanto que el diglucurónido de bilirrubina, el glutatión, los conjugados de ácidos biliares divalentes y una gran variedad de otros aniones orgánicos conjugados son transportados por la proteína asociada a resistencia a multifármacos (*multidrug resistance associated protein*, MRP2, ABCC2)-2 (Kullak-Ublick y cols. 2000). Un ABC-transportador especial, denominado Glicoproteína de resistencia a multifármacos 3 (*multidrug resistance P-glycoprotein* 3 (MDR3, ABCB4), impulsa los fosfolípidos desde la capa interna a la externa de la membrana canalicular. Esta "flipasa" proporciona fosfatidilcolina a la bilis, que forma micelas mixtas con AB y colesterol (Kullak-Ublick y cols. 2000).

La formación y composición final de la bilis depende de transportadores adicionales localizados en la membrana canalicular de los hepatocitos, así como de transportadores en los colangiocitos que añaden bilis colangiocelular a la bilis hepatocelular (Kullak-Ublick y cols. 2000; Paumgartner, 2006).

La membrana basolateral de los hepatocitos posee diversos transportadores que son expresados durante la colestasis y que transportan solutos de forma retrógrada hacia la sangre. Son MRP4 (ABCC4), que transporta ácidos biliares con glutatión (Rius y cols. 2003), MRP3 (ABCC3), que transporta bilirrubina conjugada y otros aniones orgánicos (Kullak-Ublick y cols. 2000; Bohan y cols. 2003) y OST $\alpha$ /OST $\beta$ , un transportador

heteromérico de solutos orgánicos que transporta ácidos biliares (Ballaton y cols. 2005). Durante la colestasis, MRP3 (Trauner y cols. 2005) y OST $\alpha$ /OST $\beta$  son también activados en la membrana basolateral de los colangiocitos (Soroka y cols. 2005).

Los colangiocitos expresan el transportador de ácidos biliares apical dependiente de sodio (*apical sodium-dependent bile acid transporter*, ABAT), el mismo transportador responsable de la captación de AB desde la luz intestinal. Las sales biliares entran en los colangiocitos desde la luz de la vía biliar, lo cual aumenta la secreción ductal estimulada por secretina. Este efecto es mayor para las sales biliares más hidrofóbicas, como taurocolato y taurolitocolato, y puede ayudar a proteger a la vía biliar de la acción detergente de las sales biliares hidrofóbicas que se acumulan durante la colestasis (Li y Crawford, 2004). La secreción de sales biliares a través de la membrana plasmática basolateral en el espacio del tracto portal constituye un "shunt colehepático", en el que las sales biliares son recirculadas dentro del hígado, desde la vía biliar hacia los hepatocitos para ser secretadas de nuevo (Benedetti y cols. 1997).

Los determinantes de la secreción biliar sufren una respuesta adaptativa durante la colestasis que tiende a minimizar la lesión hepática (Boyer, 2007). Esta adaptación se produce: a) limitando la captación hepática de ácidos biliares y otros solutos orgánicos; b) reduciendo la síntesis de AB; c) acelerando la detoxificación de los AB y d) activando vías alternativas para la excreción de sales biliares y otros solutos por el hígado (Zollner y cols. 2001; Lee y cols. 2001; Denson y cols. 2002; Bohan y cols. 2003; Trauner y cols. 2005), el riñón (Lee y cols. 2001; Denson y cols. 2002; Trauner y Boyer 2003) y el intestino (Zollner y cols. 2003; Dietrich y cols. 2004).

La consecuencia común de todas las formas de colestasis es la retención de los AB en los hepatocitos. Los elevados niveles de AB pueden inducir apoptosis o necrosis de los hepatocitos y, eventualmente, una patología hepática colestásica crónica (Paumgartner y Bevers, 2002). En algunos tipos de colestasis se produce una fuga de AB hacia el espacio peribiliar, lo cual es causa de inflamación portal y fibrosis secundarias a la inducción de quimioquinas y citoquinas (Fickert y cols. 2004).

La obstrucción de la vía biliar, intra- o extrahepática induce un patrón característico de cambios morfológicos precoces y crónicos en el hígado que pueden ser atribuidos a la evolución de una respuesta inflamatoria (Li y cols. 2004).

La inflamación del hígado es un hallazgo fundamental de la patología colestásica hepática, tanto en el ser humano (Schaffner y cols. 1979) como en los animales de experimentación (Saito y cols. 2000; Gujral y cols. 2003). Los cambios inflamatorios en la colestasis obstructiva incluyen edema de los tractos portales (Li y cols. 2004), proliferación de las células epiteliales biliares (Schaffner y cols. 1979; Li y cols. 2004) y fibrosis del tracto portal (Schaffner y cols. 1979; Li y cols. 2004; Bataller y cols. 2005).

La localización preferente de la respuesta inflamatoria en el tracto portal refleja la importancia de este espacio en el desarrollo de la patología hepática colestásica. En éste sentido, el papel protagonista del tracto portal en la inflamación hepática es similar al del espacio intersticial en la inflamación de otros órganos o tejidos (Aller y cols. 2004; Aller y cols. 2006). Por ésta razón, ambos espacios, el tracto portal y el intersticio, pueden ser considerados equivalentes.

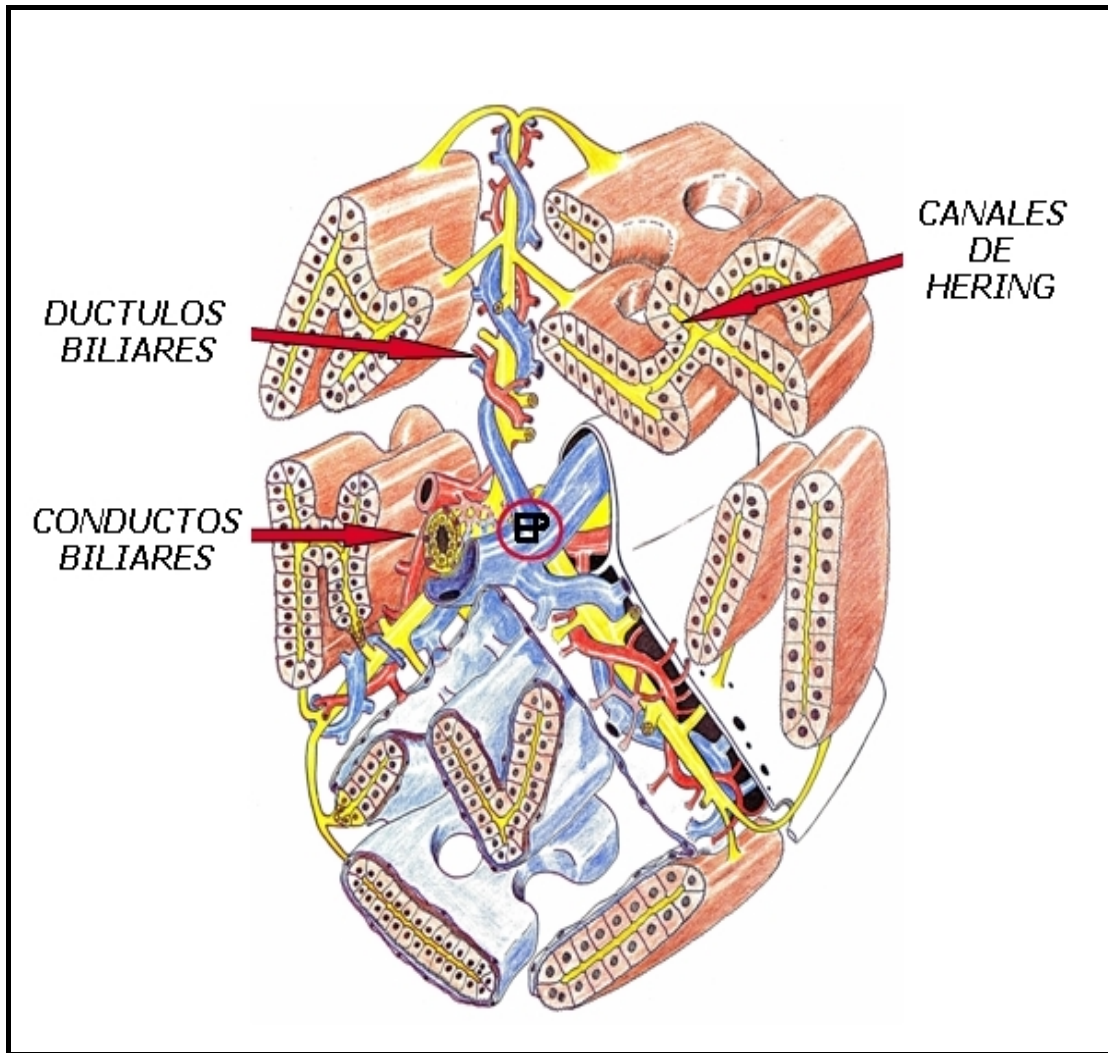
Dependiendo del nivel anatómico de la obstrucción, la colestasis se clasifica en intrahepática y extrahepática (Figura 1). Las causas más frecuente de colestasis intrahepática en la clínica humana son la colestasis esclerosante primaria, la cirrosis biliar primaria y la cirrosis hepática, en tanto que la patología litiásica y tumoral predominan en la colestasis extrahepática (Figura 1).

### **3. ANATOMIA DE LA VIA BILIAR.**

La vía biliar se origina en el canalículo biliar, constituido por el polo canalicular de hepatocitos adyacentes (Li y cols. 2004) (Figura 3). El canalículo biliar es un canal de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro formado por unas muescas existentes en la membrana apical de hepatocitos adyacentes, que se individualiza del espacio vascular por uniones estrechas. Los microfilamentos hepatocelulares de actina y miosina rodean el canalículo y

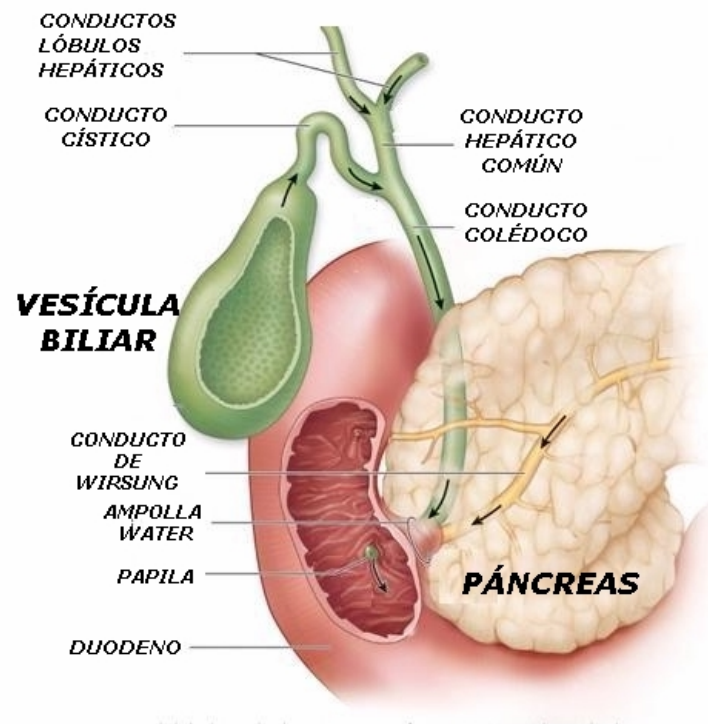
su contracción contribuye a impulsar el flujo biliar a lo largo del canal canalicular (Li y Crawford 2004). El canalículo biliar forma una red de canales situados entre los hepatocitos que drenan en los canales de Hering o conductos biliares intrahepáticos, delimitados por hepatocitos y colangiocitos, aunque también están presentes células "stem" o progenitoras hepáticas (Nakanuma y cols. 1997; Theise y cols. 1999; Li y cols. 2004; Alvaro y cols. 2007). Las células epiteliales cuboideas que delimitan la vía biliar desde el canal de Hering se denominan colangiocitos. Estas células se apoyan sobre una membrana basal y tienen una membrana apical libre que se localiza hacia la luz canalicular. Las uniones estrechas y el citoesqueleto subyacente constituyen una barrera entre la luz biliar y el espacio basolateral. La relación núcleo/citoplasma de los colangiocitos más pequeños es alta y disminuye a medida que los conductos biliares aumentan progresivamente de tamaño. El área celular de los colangiocitos aumenta de  $8 \mu\text{m}^2$  a  $80\text{-}100 \mu\text{m}^2$  a lo largo de la vía biliar intrahepática. Además, los conductos biliares interlobulares más pequeños están delimitados por 4 ó 5 células, en tanto que los de mayor tamaño son delineados por varios cientos de células (Li y Crawford, 2004).

La función secretora de los colangiocitos consiste en la generación de un fluido rico en bicarbonato, que constituye hasta un 40% del volumen biliar (Strazzabasco y cols. 2000; Alpini y cols. 2000). Los colangiocitos más pequeños de los canales de Hering y de los conductillos biliares contribuyen poco a la secreción de fluido, en tanto que los colangiololes de mayor tamaño tienen una gran capacidad secretora. Estos colangiololes aumentan la secreción de fluido en respuesta a varias hormonas gastrointestinales (secretina, gastrina, somatostatina, bombesina y péptido intestinal vasoactivo, VIP), a péptidos (endotelina-1) y a la estimulación neuronal (Li y Crawford, 2004). Los canales de Hering se continúan con los ductulos biliares, que drenan a su vez en los conductos biliares interlobulares, localizados en los espacios porta (EP) (Figura 3). Los ductulos hepáticos y los conductos biliares están formados únicamente por colangiocitos



**Figura 3.** Unidad funcional hepática. Los canaliculos biliares drenan en los canales de Hering y estos a su vez en los ductulos biliares, que desembocan en los conductos biliares interlobulares, situados en los espacios porta (EP). (Arias y cols, 1993).

Los conductos biliares interlobulares drenan en conductos progresivamente de mayor calibre y, finalmente, en el tracto biliar extrahepático, que se divide, en el ser humano, en el conducto hepático común, el colédoco, el conducto cístico y la vesícula biliar (Nakamura y cols. 1997; Li y cols. 2004; Alvaro y cols. 2007) (Figura 4).



**Figura 4.** Vía biliar extrahepática en el ser humano.

Los canales de Hering son la porción más terminal de la vía biliar intrahepática. Son extensiones acanaladas del epitelio biliar (colangiocitos) que se apoyan en los hepatocitos para formar conductos eficientes para drenar la bilis (Saxena y cols. 1999). A nivel ultraestructural, un canal de Hering consta de 2 ó más pequeñas células epiteliales biliares que forman un canal hemicircular con uno o dos hepatocitos de tamaño mucho mayor, unidos por uniones estrechas entre cada célula adyacente y se suelen visualizar a lo largo del parénquima periportal. Su identificación se facilita mediante tinción inmunohistoquímica con citoqueratina (CK)19 o CK17 (Theise y cols. 1999).

Una vez dentro del mesénquima del tracto portal, el conducto biliar se convierte en completamente circunferencial y está rodeado por una membrana basal. Este es el conductillo biliar, también denominado colangiolo. En esencia, el conductillo biliar es el canal completo más pequeño de la vía biliar intrahepática, sirviendo como un enlace lateral para unir el parénquima a los conductos biliares que se dividen hacia el hilio hepático (Crawford, 2002). Un conductillo biliar tiene en un extremo un

canal de Hering en la interfase parenquimatosa o ya dentro del parénquima periportal, y en el otro extremo una unión, aproximadamente perpendicular con un conducto biliar terminal (Saxena y cols. 1999). Los conductillos biliares o colangiolos pueden estar formados tan solo por 3 ó 4 células epiteliales circunferenciales y suelen tener 10 ó 20  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Con cada sucesiva confluencia de los conductos biliares intrahepáticos el diámetro de la luz canalicular aumenta hasta los 3-4 mm de diámetro de los conductos biliares hepáticos izquierdo y derecho. La terminología del árbol biliar intrahepático en el ser humano se basa en el diámetro de los conductos biliares: así, los conductillos biliares tienen menos de 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, los conductos biliares terminales interlobulares tienen un diámetro de 15 a 100  $\mu\text{m}$ , los ductos biliares septales de 300 a 400  $\mu\text{m}$ , los conductos segmentarios de 400 a 800  $\mu\text{m}$  y los conductos hepáticos más de 800  $\mu\text{m}$  de diámetro (Nakamuna y cols. 1997).

La vía biliar intra y extrahepática es vascularizada por una red de vasos de pequeño calibre que constituyen el plexo vascular o capilar peribiliar, que depende exclusivamente de la arteria hepática (Li y cols. 2004; Alvaro y cols. 2007).

El hígado tiene una cápsula conectiva, que presenta una inflexión a nivel del hilio y acompaña a los conductos biliares y a los vasos en el interior del órgano hasta los espacios periportales. Estos últimos constituyen el centro de las unidades funcionales del hígado. Desde el tracto portal, la sangre drena en los sinusoides, que están delimitados por láminas o trabéculas de hepatocitos, y drena por último en la vena central eferente (Poli, 2000)

Entre el endotelio sinusoidal y el polo vascular de los hepatocitos se encuentra el espacio de Disse, o espacio perisinusoidal (Poli, 2000) (Figura 4). Este espacio contiene la matriz extracelular y las células estrelladas hepáticas, también denominadas células de Ito, lipocitos, células perisinusoidales almacenadoras de grasa, y constituye el "esqueleto" estructural del acino (Poli 2000; Bataller y cols. 2005; Friedman, 2008).

La composición de la matriz extracelular en el interior del hígado no es homogénea. El tejido conectivo del espacio de Disse es diferente del tejido conectivo del resto del hígado, como la cápsula externa, los septos, las áreas periductales y perivasculares y los tractos portales (Poli, 2000). Así,

en el acino hepático normal existen dos tipos de matriz extracelular, la matriz extracelular del tracto sinusoidal en el espacio de Disse, en el que se localizan las células estrelladas, y la matriz extracelular presente en los tractos portal y de la vena central, en los cuales están presentes los miofibroblastos (Poli, 2000; Iredale, 2007; Henderson y cols. 2007).

Por lo tanto, ambas localizaciones, el espacio de Disse y los espacios portal y de la vena central, son considerados espacios intersticiales del acino hepático. El primero, tiene la capacidad para sintetizar matriz extracelular, en tanto que los segundos poseen capacidad para sintetizar, pero también para degradar matriz extracelular (Poli, 2000; Henderson y cols. 2007). Es decir, que la matriz extracelular no es sólo un "esqueleto" estructural con un papel mecánico para servir de soporte a las estructuras tisulares, sino que además constituye una malla compleja y dinámica que posee múltiples funciones biológicas. Así, la matriz extracelular ejerce una marcada influencia sobre la estructura, la viabilidad y la función de las células del parénquima. Además, se ha reconocido que los efectos de la matriz extracelular se extienden a células inflamatorias e inmunes (Adair-Kirk y cols. 2997). Ya que la microcirculación biliar está inmersa en la matriz extracelular hepática de los espacios intersticiales, de Disse y en los espacios porta, no es osado proponer que en la colestasis obstructiva la matriz extracelular del hígado desempeña un papel etiopatogénico clave.

#### **4. COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA EXPERIMENTAL**

La ictericia obstructiva causa una elevada incidencia de morbi-mortalidad en la clínica humana (O'Connor, 1985). Las severas repercusiones hepáticas y sistémicas de la colestasis (Schaffner y cols. 1979; O'Connor, 1985; Sherlock 1986; Li y cols. 2004) han sido la causa de la creación de diversos modelos experimentales que permitan una mejor comprensión de su patogénesis, profilaxis y tratamiento.

Han sido descritas múltiples técnicas quirúrgicas para desarrollar colestasis extrahepática, en particular en la rata, y todas ellas se fundamentan en la obstrucción del colédoco, bien por ligadura simple,

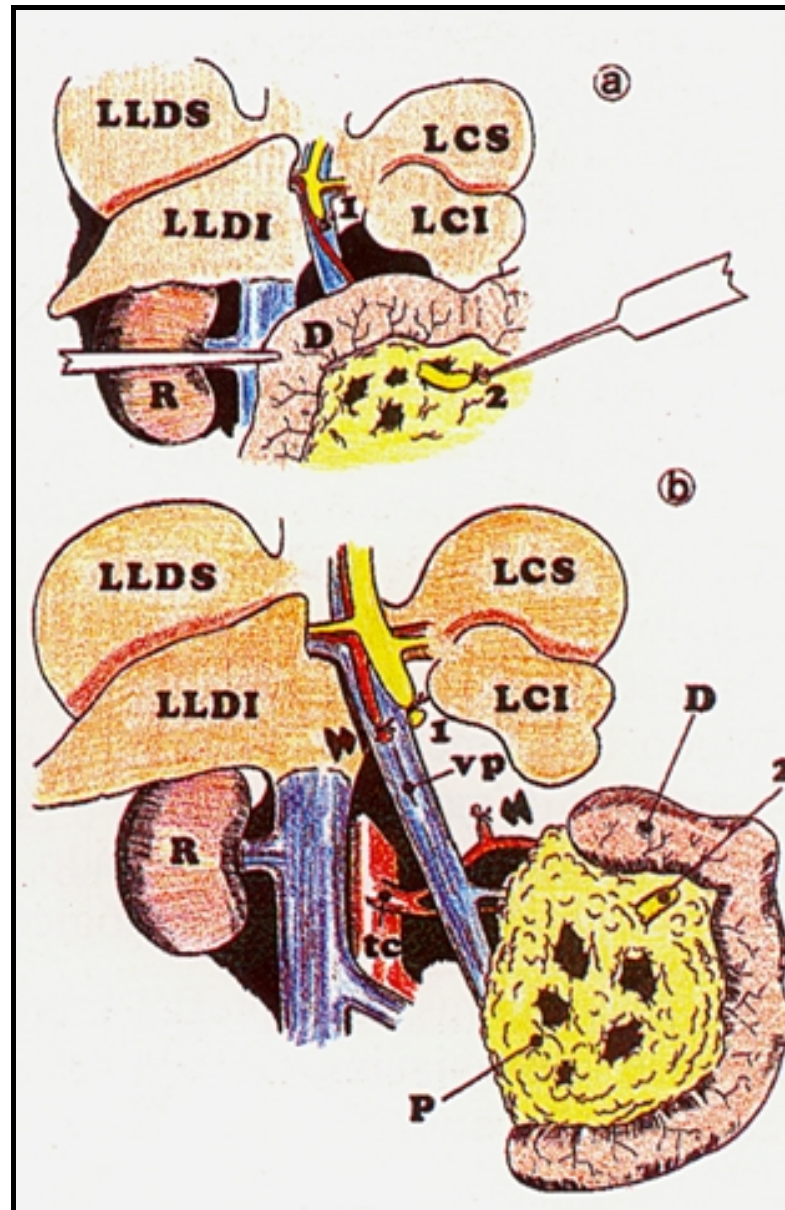
procedimiento ya realizado por Malpighi en 1687 (Holmberg y cols. 1985), por sección del colédoco entre ligaduras (Schaffner y cols. 1971; Buscher y cols. 1989), por resección de un segmento de colédoco (Kountouras y cols. 1984; Holmberg y cols. 1985), mediante compresión con una banda elástica o "vessel-loop" (Posner y cols. 1990), o bien creando una obstrucción biliar parcial al ligar el colédoco sobre una varilla de acero inoxidable que se retira posteriormente (Sekas, 1990), consiguiendo así modelos experimentales de ictericia obstructiva reversible (Aller y cols. 1993a).

Sin embargo, éstas técnicas se acompañan de una elevada incidencia de recanalización de la vía biliar extrahepática durante el postoperatorio (Holmberg y cols. 1985; Ni y cols. 1994), lo cual invalida el modelo experimental. Dicha recanalización es secundaria a la fusión de las colaterales biliares originadas por proliferación de las células epiteliales biliares en la porción distal del colédoco, con la porción proximal ligada y distendida (Holmberg y cols. 1985).

La recanalización de la vía biliar tras la ligadura y sección del colédoco se puede impedir al asociar una sencilla maniobra quirúrgica descrita por Holmberg y cols. 1985 y que consiste en la interposición del duodeno y de la porción distal del estómago entre los dos extremos ligados y seccionados del colédoco (Holmberg y cols. 1985) (Figura 5).

Mediante esta maniobra se consigue obviar la recanalización p.o. de la vía biliar extrahepática pero, como consecuencia de la progresiva dilatación del colédoco proximal a la ligadura, éstas técnicas macroquirúrgicas "clásicas" de ligadura y sección del colédoco cursan con la formación de pseudoquistes biliares en el hilio hepático (Holmberg y cols. 1985; Aller y cols. 1993b; Tovar 1997; Aller y cols. 2000).

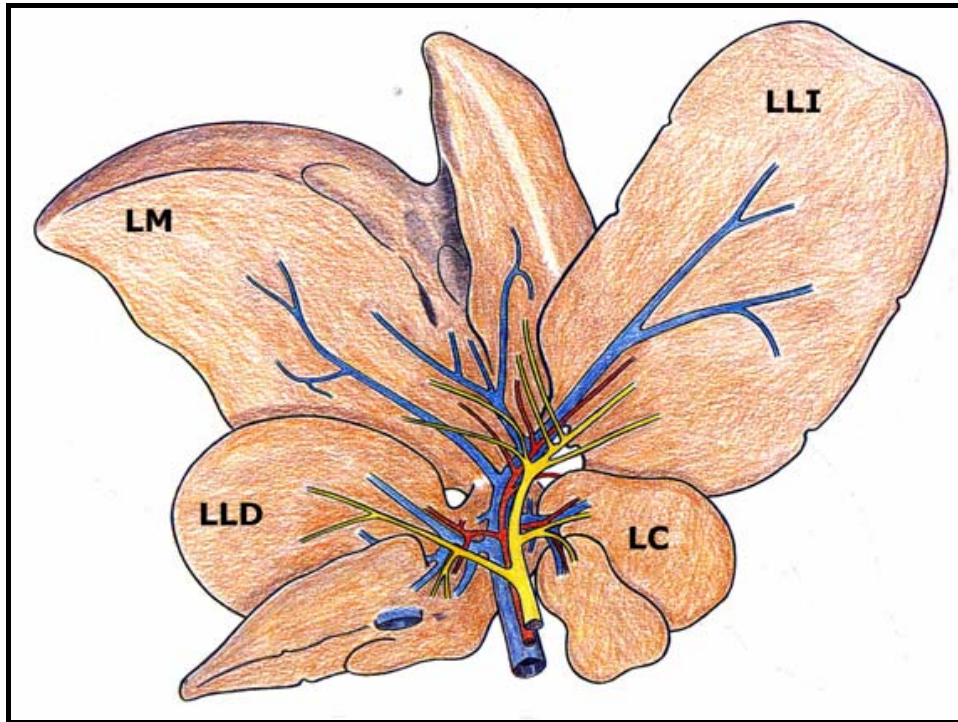
El cultivo de la bilis almacenada en éstos pseudoquistes hiliares es positivo y los gérmenes más frecuentes fueron *Escherichia coli* y *Enterococcus* (Aller y cols. 2000), lo cual evidencia que en éste modelo experimental se produce traslocación bacteriana intestinal. Además, un porcentaje elevado de éstos animales cursan también con abscesos hepáticos, intraperitoneales y pulmonares y su elevada mortalidad precoz (35,7%) se atribuye a sepsis (Aller y cols. 1993; Aller y cols. 2004a).



**Figura 5.** Técnica macroquirúrgica de colestasis extrahepática, utilizando la maniobra de Holmberg (Holmberg y cols. 1985). Consiste en la interposición del duodeno y de la porción distal del estómago entre los dos extremos ligados y seccionados del colédoco.

Sin embargo, las características anatómicas del hígado de los roedores permiten obviar éstas complicaciones inherentes a las técnicas clásicas de colestasis extrahepática, basadas en la ligadura y sección del colédoco, mediante el desarrollo de una técnica microquirúrgica. Así, el parénquima hepático de los roedores, tanto de la rata (Lorente y cols. 1993), como del ratón se compone de cuatro lóbulos: lateral derecho (LLD), medio (LM), lateral izquierdo (LLI) y caudado (LC) que, a su vez poseen una

vascularización porto-arterial y un drenaje biliar y venoso individualizado (Castaing y cols. 1980; Lorente y cols. 1995) (Figura 6).



**Figura 6.** El hígado de la rata se compone de cuatro lóbulos: lateral derecho (LLD), medio (LM), lateral izquierdo (LLI) y caudado (LC) que, a su vez poseen una vascularización porto-arterial y un drenaje biliar y venoso individualizado

Esta característica anatómica permite la resección de los conductos biliares que drenan los cuatro lóbulos hepáticos en continuidad con el colédoco hasta el inicio de su porción intrapancreática utilizando una técnica microquirúrgica (Aller y cols. 1993).

Esta técnica microquirúrgica de colestasis extrahepática puede ser también realizada en el ratón. El hígado del ratón, al igual que el de la rata, está compuesto por cuatro lóbulos que reciben los mismos nombres. La principal diferencia en la vía biliar de ambos roedores es que el ratón posee vesícula biliar. Por ello, si se efectúa ligadura del colédoco se produce una marcada dilatación de la vesícula biliar que puede evolucionar a perforación y coleperitoneo (Abralde y cols. 2006). La colestasis extrahepática microquirúrgica en el ratón también consiste en la resección de los cuatro conductos biliares lobulares hepáticos en continuidad con el colédoco, pero

se debe añadir una colecistectomía. La disección, ligadura y sección de los conductos biliares de los lóbulos medio y lateral izquierdo se simplifica si se realiza previamente la disección de la vesícula biliar y del conducto cístico.

La utilización profiláctica de antibióticos de amplio espectro y la administración semanal de vitamina K1 (8 mg/kg i.m.) permite reducir la mortalidad precoz de éstos animales (Beck y Lee, 1995; Huan y cols. 2003; Akimoto y cols, 2005; Abrales y cols. 2006).

A largo plazo, ambos modelos de colestasis extrahepática, macro- y microquirúrgica, cursan con hepatomegalia con desarrollo de una intensa fibrosis y proliferación biliar, si bien la pérdida de la arquitectura hepática normal típica de cirrosis se observa en raras ocasiones (Kountouras y cols. 1984; Aller y cols. 1993; Aller y cols. 2004; Abrales y cols. 2006). Respecto de las alteraciones extrahepáticas destacan la ictericia, la coluria (Huang y cols. 2003; Aller y cols. 2004), la hipertensión portal con esplenomegalia y circulación colateral portosistémica (Aller y cols. 1993; Huang y cols. 2003; Aller y cols. 2004; Chan y cols. 2004; Katsuta y cols. 2005), la encefalopatía hepática (García-Moreno y cols. 2002; García-Moreno y cols. 2005) y la ascitis (Huang y cols. 2003). Por lo tanto, la colestasis extrahepática experimental no es sólo un modelo idóneo para estudiar la patología hepática secundaria a la obstrucción biliar, sino también sus complicaciones extrahepáticas.

## **5. FISIOPATOLOGIA DE LA COLESTASIS**

Las alteraciones hepáticas que se producen como consecuencia de la colestasis extrahepática han sido comparadas a las que protagonizan la curación de las heridas, esto es, la proliferación epitelial y, en particular, la fibrogénesis (Bissell. 2004).

Inmediatamente después de la obstrucción completa de la vía biliar en la rata, se produce un intenso incremento (60%) de la presión biliar intraductal (Slott y cols. 1990) y ésto es seguido por alteraciones patológicas de la matriz extracelular (Desmouliere y cols. 1997). Por el contrario, la descompresión biliar, al suprimir el estrés mecánico, revierte las lesiones hepáticas inducidas por la ligadura del colédoco (Ramm y cols.

2000; Costa y cols. 2003). Estos experimentos demuestran la importancia fundamental que tiene la energía mecánica en la etiopatogenia de la patología hepática secundaria a la obstrucción de la vía biliar.

La respuesta del hígado de los roedores a la lesión obstructiva biliar implica su reprogramación transcripcional, favoreciendo la activación de genes reguladores del metabolismo, de la proliferación celular y de la remodelación de la matriz de forma secuencial y limitada en el tiempo (Campbell y cols. 2004). Aunque se produce una activación predominante de genes metabólicos en todas las fases posteriores a la ligadura del colédoco, desde una fase inmediata (1 día) hasta una fase tardía (21 días), la afectación de vías metabólicas específicas es diferente dependiendo de la duración de la obstrucción (Campbell y cols. 2004). En tanto que algunos genes son activados, por ejemplo genes implicados en la disrupción del metabolismo lipídico y en la fibrosis en el periodo precoz de la colestasis, otros genes, como son los implicados en mecanismos de protección celular frente a la agresión por acumulación tóxica de ácidos biliares, son inhibidos (Kojima y cols. 2004).

Después de la ligadura del colédoco el hígado de la rata sufre severas alteraciones hemodinámicas, portales y arteriales, que pueden comportar lesiones por isquemia-reperfusión y estrés oxidativo. El aumento de la resistencia vascular en el sistema portal hepático secundario a colestasis extrahepática produce hipertensión portal (Ohara y cols. 1993; Li y Yang, 2005) e isquemia hepática, asociadas a una síntesis deficitaria de Nítrico Sintetasa-inducible (iNOS) y de óxido nítrico (NO) (Barón y cols. 2000).

La vía biliar es vascularizada por el plexo peribiliar (Gaudio y cols. 1996; Li y cols. 2007), localizado alrededor de los conductos biliares de menor calibre, haciéndose progresivamente más estrecho y más simple (Gaudio y cols. 1996). Estas características del plexo peribiliar permiten asumir que el aumento de presión intraductal con dilatación de la vía biliar en la colestasis extrahepática, podría inducir la compresión del plexo peribiliar y, por lo tanto, la isquemia de la vía biliar. Sin embargo, se ha descrito que después de la disminución del flujo sanguíneo a través de la vena porta se produce un aumento del flujo arterial hepático o "*hepatic arterial buffer response*" (Lautt, 1983). Además, dos semanas después de ligadura del colédoco en la

rata se produce una proliferación significativa del plexo peribiliar, que es drenado por pequeñas vénulas en ramas de la vena porta y en los sinusoides hepáticos (Gaudio y cols. 1996). A su vez, la lesión por isquemia-reperfusión ha sido implicada en la patogénesis de la colestasis intrahepática (Tanaka y cols. 2006).

Las ratas con ligadura del colédoco sufren una excesiva acumulación de ácidos biliares hidrofóbicos que se consideran la causa principal de hepatotoxicidad (Poli, 2000). En éstos animales se produce un deterioro parcial de las funciones de la cadena transportadora de electrones mitocondriales y estrés oxidativo (Poli, 2000; Huang y cols. 2003). La retención y el acúmulo de sales biliares hidrofóbicas (tauro- y glicoquenodesoxcoilato) puede inhibir la actividad antioxidante en el hígado de catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reducido y superóxido dismutasa, así como inducir necrosis hepatocitaria al activar la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Orellana y cols. 1997; Wang y cols. 2007; Portincosa y cols. 2007; Assimakopoulos, 2007).

Existe una estrecha relación entre la ictericia obstructiva experimental y el estrés oxidativo (Orellana y cols. 1997; Assimakopoulos y cols. 2004; Wang y cols. 2007). Sin embargo, la ligadura del colédoco altera fundamentalmente la capacidad antioxidante del hígado, especialmente a nivel mitocondrial (Portincasa y cols. 2007). Así, se ha demostrado que el tratamiento con antioxidantes mejora el estado redox celular hepático (Assimakopoulos y cols. 2004; Soylyu y cols. 2006). De hecho, los antioxidantes ejercen un efecto protector sobre la intensidad hepatocelular y sobre las funciones hepáticas al inhibir la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Soylyu y cols. 2006; Assimakopoulos y cols. 2007; Portincasa y cols. 2007; Tahang y cols. 2007).

Por consiguiente, en la fase precoz tras ligadura del colédoco en la rata, el insuficiente aporte de oxígeno que sufre el hígado, secundariamente a alteraciones hemodinámicas, así como a la incorrecta utilización del oxígeno por la hepatotoxicidad de las sales biliares, constituirían factores esenciales que inducirían una inhibición del metabolismo energético hepático. Como consecuencia, el hígado reduce su capacidad funcional para poder satisfacer las necesidades metabólicas tisulares.

La lesión oxidativa hepática podría disminuir el contenido intracelular de proteínas que participan en la síntesis energética y en las funciones de membrana, como son las proteínas reguladoras del transporte de H<sub>2</sub>O e iones (Portincasa y cols. 2007), lo cual induciría edema intersticial y celular. Además, el aumento de peroxidación lipídica hepática, un marcador de estrés oxidativo (Portincasa y cols. 2007) puede relacionarse con el aumento de la permeabilidad de membrana, el aumento de la degradación de los componentes de la matriz extracelular y el edema (Kennett y Davies, 2007). La acumulación de fragmentos de Glicosaminoglicanos (GAGs) se ha propuesto como un importante mecanismo de la formación del edema debido a las propiedades hidrofílicas de GAGs, en particular del hialuronan (Day y de la Motte, 2005; Cantor y Nadkarni, 2006; Stein y cols. 2006; Kennett y Davies, 2007; Yung y Chan 2007; Bartlett y cols. 2007; Jiang y cols. 2007).

GAGs son largas cadenas de polisacáridos no ramificadas compuestas de unidades repetidas de disacáridos que tienden a adoptar conformaciones en espiral al azar ("*random coil*"), altamente extendidas y que ocupan un gran volumen en relación con su masa. Estos polisacáridos atraen y atrapan agua e iones, con lo cual forman geles hidratados, aunque permiten el flujo a su través de nutrientes para las células (Alberts y cols. 1983; Rodees y Simons, 2007; Jiang y cols. 2007). En situaciones de inflamación hialuronan es más polidisperso y tiende a formas "*lower-molecular*", favoreciendo la infiltración edematosa de los tejidos (Jiang y cols. 2007), así como el flujo del líquido intersticial y el gradiente de presión del sistema linfático (Chen y Fu, 2005).

Además la tensión mecánica producida por la ligadura del colédoco puede producir por mecanotransducción alteraciones en la remodelación de los proteoglicanos y de GAGs en el intersticio (Evanko y cols. 2007). Virtualmente todos los órganos y tejidos están organizados en jerarquías estructurales y poseen una capacidad de respuesta mecánica inmediata aumentando su rigidez en proporción directa al estrés mecánico aplicado (Ingber, 2006). La rigidez de la matriz y la tensión mecánica que resulta de la adhesión celular a sustratos rígidos es fundamental en determinar el

---

fenotipo expresado por muchas células en cultivo (Bischofs y Schwarz, 2003).

En el modelo de fibrosis biliar por CCl<sub>4</sub> en la rata se ha descrito la producción precoz de rigidez hepática. Este aumento de la consistencia y/o rigidez hepática parece ser el resultado de *cross-linking* de la matriz y, posiblemente de otras variables desconocidas, además de la cantidad de matriz (Georges y cols. 2007). Las alteraciones precoces en la rigidez mecánica del hígado podrían inducir precozmente la diferenciación de los miofibroblastos en las patologías hepáticas (Georges y cols. 2007; Muddu y cols. 2007). La función miofibroblasto aporta a las células estrelladas hepáticas activadas la capacidad para comportarse como células musculares lisas y, por consiguiente, las células estrelladas activadas responden a las sustancias vasoactivas contrayéndose. Además, la constricción subsiguiente regula potencialmente el diámetro de la vascularización hepática y altera el flujo sanguíneo y la presión hepática (Winaw y cols. 2008).

La adquisición posterior en la evolución del hígado colestásico de un fenotipo inmune activo afecta a las células parenquimatosas (hepatocitos y colangiocitos), a las no parenquimatosas (células endoteliales sinusoidales, células de Kupffer y miofibroblastos) y a las células sanguíneas que migran al intersticio hepático (Azouz y cols. 2004; Morwood y Nicholson, 2006; Szabo y cols. 2007; Muddu y cols. 2007; Winaw y cols. 2008). Sin embargo, el espacio intersticial parece ser el que modula la actividad inflamatoria de las células inmunes tras la ligadura del colédoco en la rata.

En particular, los fragmentos de matriz extracelular y sus receptores ejercen importantes efectos sobre las células inflamatorias y, por ello, se considera que están claramente implicados en la evolución de la respuesta inmune intersticial (Morwood y Nicholson, 2006; Adair-Kirk y Señor, 2007; Yung y Chan 2007). Las Metaloproteasas de la matriz (MMPs) son una familia de enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular y que son expresadas en los tejidos inflamados (Cuenca y cols. 2006) y, en particular, en el hígado colestásico (Roelo y cols. 1997; Bergheim y cols. 2006). La destrucción enzimática de la matriz extracelular cursa con la liberación inmediata de los mediadores secuestrados en dicha matriz (Stern y cols. 2006; Yung y Chan, 2007). Los fragmentos de la matriz extracelular

---

están constituidos por moléculas con funciones proinflamatorias que pueden potenciar la respuesta inmune activando la respuesta inmune innata y la adquirida (Morwood y Nicholson, 2006). Así, los fragmentos de proteínas de la matriz extracelular y hialuronan tienen la capacidad de promover la inflamación por unión a los receptores *Toll-like* (TLR)-4 y TLR-2 (Szabo y cols. 2007), mediante la activación del complejo regulador transcripcional NF $\alpha$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  y mediante la producción de citoquinas proinflamatorias, por ejemplo, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , y quimioquinas que inducen la activación y el reclutamiento intersticial de leucocitos (Morwood y Nicholson, 2006). Los linfocitos T, una vez activados, se polarizan hacia la producción de distintos perfiles de citoquinas. El tipo 1 (Th<sub>1</sub>) sintetiza Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e IL-2 y, los de tipo 2 (Th<sub>2</sub>) producen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. Las citoquinas Th<sub>2</sub> están implicadas fundamentalmente en la mediación de la inflamación alérgica y los trastornos fibroproliferativos crónicos (Azouz y cols. 2004).

Los macrófagos residentes en el hígado, o células de Kupffer, se localizan fundamentalmente en el área periportal del lobulillo y, debido a su localización, podrían desempeñar un papel fundamental en la lesión secundaria a isquemia-reperfusión (Kolios y cols. 2006). Pero las células de Kupffer están también implicadas en la inflamación hepática que produce la colestasis mediante la liberación de sustancias biológicamente activas que inducen un proceso inmunopatogénico (Minter y cols. 2005).

Las células de Kupffer están claramente afectadas en la obstrucción biliar (Minter y cols. 2005) y muestran una activación de la fagocitosis y una marcada respuesta proinflamatoria frente a endotoxina y a la proteína de unión a lipopolisacárido (*lypopolysacharide-binding protein*, LBP), ambas aumentadas en colestasis extrahepática (O'Neil y cols. 1997; Minter y cols. 2005; Kolios y cols. 2006). La hipersensibilidad a endotoxina en colestasis es la causa de la síntesis aumentada de citoquinas proinflamatorias y del aumento de la peroxidación lipídica (Harry y cols. 1999), con agravamiento de la apoptosis que, finalmente progresa a necrosis (Moazzam y cols. 2002). Sin embargo, la deplección de células de Kupffer agrava la inflamación y la necrosis hepatocelular en ratones con colestasis (Gehring y cols. 2006). La respuesta proinflamatoria inducida por LPS es inhibida por lipoproteínas de alta densidad (HDL), que inhibe las vías proinflamatorias

hepáticas, restaura la actividad de eNOS y reduce la presión portal (Thabut y cols. 2007).

La inflamación se asocia siempre a la infiltración intersticial por leucocitos, un proceso que es regulado por quimioquinas (Aller y cols. 2006). En la colestasis extrahepática monocitos/macrófagos infiltran el hígado, que hiperexpresa a su vez proteína quimioattractora de monocitos (*monocyte chemoattractant protein*, MCP-1), una quimioquina CC y, por tanto, éstos monocitos favorecen la respuesta inflamatoria (Imamura y cols. 2005). Además, la colestasis extrahepática estimula la síntesis de quimioquinas CXC que son, en parte, responsables de la infiltración de los tractos portales por neutrófilos (Saito y cols. 2000; Gujral y cols. 2003).

La infiltración del hígado colestásico por células inflamatorias (monocitos, neutrófilos), también sería secundaria a traslocación bacteriana intestinal. Endotoxinas y bacterias de procedencia intestinal alcanzarían el hígado en elevadas concentraciones como resultado del aumento de la permeabilidad de la barrera mucosa intestinal (Balzan y cols. 2007).

Los neutrófilos son componentes esenciales de la respuesta inflamatoria precoz a la agresión que sufre el hígado por colestasis (Shivakumar y cols. 2004). En la colestasis extrahepática experimental, la infiltración intersticial por neutrófilos ocurre en fases iniciales, yá a los tres días de la ligadura del colédoco (Levy y cols. 1993; Gujral y cols. 2003; Georgiev y cols. 2008). Las células del epitelio biliar contribuyen a la inflamación produciendo quimioattractantes de neutrófilos (Saito y Maher, 2000). En ratas con ligadura de colédoco a largo plazo persiste una importante migración celular alrededor de la triada portal y de la vena central que se asocia con un aumento de citoquinas proinflamatorias en el hígado (Fernández-Martínez y cols. 2008). Sin embargo, las citoquinas proinflamatorias inducen una respuesta hepatocitaria heterogénea al estímulo colestásico con una inhibición selectiva de los hepatocitos de la zona periportal (Donner y cols. 2007).

Ambos tipos celulares presentes en el intersticio hepático, las células estrelladas y los miofibroblastos, tienen la capacidad de expresar un fenotipo inmune. En particular, las células estrelladas hepáticas sintetizan un amplio espectro de mediadores inflamatorios, como quimioquinas (MCP-

1, RANTES), Factor de activación plaquetario (*platelet activation factor*, PAF), IL-8 y moléculas de adhesión leucocitaria (ICAM-1, VCAM), que son necesarias para el reclutamiento y la activación de los leucocitos en el intersticio (Bataller y Brenner, 2005; Rockey, 2006; Iredale, 2007; Gressner y cols. 2007; Friedman, 2008). El alojamiento de leucocitos en el espacio intersticial hepático es favorecido por las células estrelladas hepáticas ya que éstas células expresan MMPs, lo cual aumenta la degradación de la matriz extracelular (Rockey, 2006; Gressner y cols. 2007).

Por lo tanto, las células estrelladas hepáticas cambian su fenotipo contráctil a un fenotipo inmune. Se considera que éstos dos fenotipos están íntimamente relacionados, e incluso son interdependientes (Rockey, 2006).

La traslocación bacteriana, es decir, la diseminación extraintestinal de bacterias de origen intestinal, es una complicación de la hipertensión portal y, por consiguiente, se produce en ratas con ligadura de colédoco (Garcia-Tsao y Wiest, 2004; Sztrymf y cols. 2005). Las bacterias que colonizan la luz intestinal constituyen un gran reservorio de productos microbianos, como LPS, endotoxinas y otros fragmentos de la pared bacteriana que son capaces de inducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Garcia-Tsao y Wiest, 2004). Por lo tanto, la traslocación bacteriana es un mecanismo etiopatogénico de infecciones bacterianas en la colestasis experimental (Sztrymf y cols. 2005). El aumento de la producción de TNF- $\alpha$  puede constituir un importante mecanismo en el proceso de traslocación bacteriana en ratas con cirrosis y ascitis ya que el bloqueo de TNF- $\alpha$  es capaz de inhibirlo sin aumentar la incidencia de infecciones sistémicas (Francés y cols. 2007).

Se ha propuesto que la respuesta inmune, con expresión de mediadores pro- y antiinflamatorios y reclutamiento de células inmunes puede ser diferente durante la evolución de la ictericia obstructiva (Morita y cols. 2007). Así, después de una respuesta inmune proinflamatoria inicial, se establece una actividad anti-inflamatoria moduladora (Morwood y Nicholson, 2006), en la cual participan células T y células cebadas (Rioux y cols. 1996; Schraum y cols. 2004; Takeshita y Shibayama, 2005; Franceschini y cols. 2006).

La diferenciación de las células dendríticas en un medio ambiente hepático colestásico puede inducir una polarización Th<sub>2</sub> y la secreción de IL-4 e IL-10 más que de IFN- $\gamma$  (Cabillic y cols. 2006). En situaciones de obstrucción biliar extrahepática se produciría la activación de p-38, c-Jun N-terminal quinasa (JNK) y quinasa extracelular regulada (*extracellular signal-regulated kinase*, ERK), consideradas "quinasas de estrés" (Samuel, 2008). En particular, la MAPquinasa p-38 (*Mitogen activated protein*) se considera que regula la síntesis de IL-10 por medio de la activación del factor de transcripción Sp1, no a través de la vía NF $\kappa$ B (Waseen y cols. 2008). Ya que la expresión de IL-10 está significativamente aumentada a los 14 días de ligadura del colédoco en el ratón (Morita y cols. 2007), los mediadores anti-inflamatorios pueden modular la producción de citoquinas proinflamatorias en las fases tardías de colestasis, lo cual induce un aumento de la susceptibilidad a traslocación bacteriana e infección (Morita y cols. 2007). En éste sentido, moléculas de la matriz extracelular, como hialuronan, pueden servir como matrices o redes para prevenir la pérdida de componentes de la matriz extracelular durante la inflamación y para secuestrar mediadores proinflamatorios. Este es el motivo de que se haya sugerido un papel protector o anti-inflamatorio para las redes de hialuronan (Day y de la Motee, 2005; Cantor y Nadkarni, 2006).

La ictericia constituye también un importante mediador de la respuesta inflamatoria hepática en éste modelo experimental de colestasis. La bilirrubina se produce por la reducción del derivado del heme- biliverdina por el enzima biliverdin-reductasa (Schmidt y McDonagh, 1975). A la bilirrubina se le han atribuido un gran número de interesantes propiedades biológicas y bioquímicas (Vitek y Schmertner, 2007). Además de poseer un efecto protector frente al estrés oxidativo (Vitek y Schwertner, 2007), la bilirrubina tiene propiedades antiapoptóticas y antimutagénicas (Bulner y cols. 2007) y tiene una potente acción como inmunomodulador (Selye, 1971; Moseley, 1999). En un modelo de endotoxemia en el ratón, la administración de una simple dosis de bilirrubina ha demostrado ejercer una acción antioxidante y una potente actividad anti-inflamatoria (Moseley, 1999).

La ictericia obstructiva ocurre además en el contexto de la sepsis (Moseley, 1999). Las alteraciones que sufre el hígado durante la sepsis incluyen colestasis e hiperbilirrubinemia. En particular, la hiperbilirrubinemia se desarrolla en la sepsis en las situaciones de bacteriemia y precede a los hemocultivos positivos en un tercio de los casos (Marrero y cols. 2003).

Las fases evolutivas tardías del modelo experimental de colestasis extrahepática se caracterizan por el desarrollo de angiogénesis, esto es, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a expensas de vasos pre-existentes (Kurz y cols. 2003).

Aunque el objetivo final de la proliferación endotelial es formar nuevos vasos sanguíneos para el transporte de oxígeno, sustratos y células sanguíneas (fase vascular), otras funciones pueden ser ejecutadas antes de que los nuevos vasos se desarrollen (fase prevascular) (Aller y cols. 2007a, Aller y cols. 2007b). Así, en las fases iniciales de la respuesta inflamatoria (fenotipos de isquemia-reperfusión y leucocitario), las nuevas células endoteliales podrían adoptar una función asociada a efectos anti-inflamatorios. Dichas propiedades, anti-oxidantes y anti-inmunes, favorecerían la resolución, así como la progresión al fenotipo angiogénico vascular (Aller y cols. 2007b). La angiogénesis requiere la migración de células endoteliales al interior del espacio intersticial, con la consiguiente proliferación y diferenciación en capilares (Aller y cols. 2007b).

En ratas con ligadura de colédoco la proliferación de los conductillos biliares, como ocurre en la organogénesis hepática, precede a la proliferación de los microvasos que los vascularizan. Después de una semana de ligadura de colédoco, a pesar de la intensa proliferación biliar, el plexo arterial peribiliar mantiene su arquitectura normal. Por el contrario, después de 2 a 4 semanas de ligadura de colédoco se desarrolla una significativa proliferación de la microvascularización que se extiende desde el plexo peribiliar de los tractos biliares (Gaudio y cols. 1996).

El papel fundamental que ejercen los colangiocitos en la angiogénesis que ocurre después de la ligadura del colédoco en la rata ha sido corroborado al asociar la ligadura de la arteria hepática a la colestasis por ligadura del colédoco. En ésta situación, el hígado sufre un aumento de la apoptosis de colangiocitos, se altera de la proliferación de los colangiololes, disminución de

la secreción de factor de crecimiento de endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) por los colangioloos y desaparición del plexo peribiliar. Curiosamente, las funciones de los colangiocitos y, por lo tanto, la integridad del plexo peribiliar son conservadas mediante el tratamiento con VEGF-A recombinante (Gaudio y cols. 2006). Igualmente, en el trasplante de hígado en el ser humano la regeneración biliar se produce a expensas de una proliferación inicial del compartimento epitelial, seguido del compartimento vascular que parece ser inducido por la expresión epitelial de VEGF-A (Van den Heuvel y cols. 2006).

La matriz extracelular desempeña un papel crítico en la mayoría de los procesos que constituyen la formación de nuevos vasos sanguíneos. En el proceso angiogénico, componentes de la matriz extracelular y sus fragmentos proporcionan vías para regular la migración, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de las células vasculares (Rhodes y Simons, 2007). Las Integrinas son el tipo fundamental de receptor de la matriz extracelular en las células endoteliales (Hynes, 2002).

En el hígado colestásico se produce la infiltración por células inflamatorias (monocitos, neutrófilos, células cebadas), en parte como consecuencia de traslocación bacteriana intestinal (Assima y cols. 2006). Sin embargo, el origen de la respuesta inflamatoria podría estar localizada en los propios colangiocitos, que sufren tanto la hiperpresión biliar como la posible isquemia secundaria a la compresión del plexo arterial peribiliar (Nakamura y cols. 1997; Gaudio y cols. 2006). Por lo tanto, la respuesta inflamatoria inicial en los colangiocitos estimularía su proliferación, activaría las células hepáticas que poseen capacidad proinflamatoria (células de Kupffer y macrófagos), estimularía la angiogénesis secundaria a la isquemia arterial, favorecería la infiltración portal por leucocitos y, finalmente promovería la fibrogénesis.

La hiperplasia de las células cebadas se asocia con la proliferación biliar durante la colestasis extrahepática (Takeshita y Shibayama, 2005; Franceschini y cols. 2006). Este hallazgo sugiere que la acumulación de células cebadas en las tríadas portales puede estar implicado en la proliferación biliar. La recanalización del colédoco previamente ligado comporta un incremento brusco y transitorio del número de células

cebadas, que se asocia con un rápido aumento del número de células epiteliales biliares apoptóticas. Por lo tanto, se puede sospechar que las células cebadas intersticiales hepáticas pueden estar implicadas en la remodelación hepática mediante la inducción de apoptosis (Takeshita y Shibayama, 2005).

Las células cebadas o mastocitos están ampliamente distribuidas por prácticamente todos los tejidos vascularizados del organismo, donde se localizan en estrecha proximidad con los vasos sanguíneos y los nervios (Galli y cols. 2005). Son especialmente abundantes en los lugares anatómicos que están directamente expuestos al medio ambiente, como son el tracto gastrointestinal, la piel y las vías aéreas (Galli y cols. 2005; Metz y cols. 2007). Se ha demostrado que las células cebadas están presentes en los hígados normales y patológicos, tanto del ser humano como de la rata (Farrel y cols. 1995; Rioux y cols. 1996). Múltiples estudios han comprobado que los mastocitos están implicados en diversas hepatopatías (Farrel y cols. 1995; Armbrust y cols. 1997; Yamashiro y cols. 1998; Matsunaga y Terada, 2000), demostrándose así que éstas células inmunes tienen un papel más amplio de lo que se pensaba originalmente (Franceschini y cols. 2006).

Las células cebadas participan en el desarrollo de fibrosis hepática, tanto en roedores como en el ser humano (Armbrust y cols. 1997; Matsunaga y cols. 1999). Estudios experimentales han demostrado que la ligadura del colédoco en la rata, un modelo de fibrosis hepática (Kountouras y cols. 1984), cursa con un aumento de las células cebadas en el hígado (Mori y cols. 1966; Rioux y cols. 1996). Sin embargo, todavía se desconoce el mecanismo por el cual las células cebadas participan en el desarrollo de fibrosis. Ya que la ligadura del colédoco en la rata produce una inflamación hepática (Ramadori y Suile, 2004a) y muchos mediadores liberados por las células cebadas son considerados pro-inflamatorios (Galli y cols. 2005; Metz y cols. 2007), se podría especular que la activación de las células cebadas influiría en la fibrosis hepática en el contexto de una respuesta inflamatoria crónica. En este sentido, la fibrosis asociada a la remodelación tisular, ambas mediadas por los mastocitos, podrían ser una de las principales consecuencias de la inflamación hepática crónica (Bachelet y cols. 2006;

Metz y cols. 2007). Por ello, se ha sugerido que la fibrogénesis hepática se asemeja a un proceso de cicatrización (Ramadori y Saile, 2004a; Ramadori y Saile, 2004b).

Las interacciones entre las células cebadas y los fibroblastos son fundamentales en la génesis de la fibrosis (Gruber, 2003; Albrecht y cols. 2005). Las células cebadas pueden comunicarse con los fibroblasto, lo cual induce su activación y la subsiguiente modulación de algunos aspectos de la fibrosis extracelular (Albrecht y cols. 2005; Au y cols. 2007). Sin embargo, los resultados de un estudio que utilizaba ratas *Ws/Ws*, deficientes en células cebadas, sugirió que un aumento de células cebadas en el hígado podría estar asociado con fibrosis, pero que no era la causa (Sugihara y cols. 1999). Además, recientemente se ha comprobado que las células cebadas deben participar en la fibrinolisis produciendo MMP-1 en los estadios tardíos tanto de la fibrosis, como de la cirrosis experimental (Jeong y cols. 2002). Ya que las terapias efectivas de la cirrosis hepática deben estar basadas en la comprensión de su patogenia (Friedman, 2007), un mejor conocimiento de ésta acción dual, pro- y anti-fibrogénica de las células cebadas en la fibrosis biliar experimental sería de gran interés.

Las células cebadas en el hígado fibrótico pueden además estar implicadas en la arterialización hepática. Durante el establecimiento de la fibrosis hepática la estructura de los sinusoides es similar a la de los capilares (Zimmermann y cols. 1999). Este cambio se denomina "capilarización sinusoidal" y las células cebadas pueden ser consideradas como elementos clave en éste proceso de transformación de las células endoteliales sinusoidales en células endoteliales de tipo capilar (Zimmermann y cols. 1999; Franceschini y cols. 2006). La capilarización altera el intercambio fisiológico entre el plasma y los hepatocitos y es la causa principal del empeoramiento de la función hepática (Zimmermann y cols. 1999).

Por lo tanto, se podría especular que el papel de las células cebadas en la colestasis extrahepática experimental es doble, es decir, que cambia a lo largo de la evolución del hígado colestásico. Así, en fases evolutivas precoces las células cebadas participarían en el proceso proinflamatorio que induce la proliferación biliar y la fibrogénesis (Rioux y cols. 1996). Sin

embargo, la colestasis prolongada favorecería el cambio del medio ambiente de los mastocitos e induciría un cambio en su fenotipo, promoviendo la fibrolisis al inducir metaloproteasas y, subsiguientemente la degradación de la matriz (Jeong y cols. 2002). Este supuesto papel protector y antifibrótico de las células cebadas en la colestasis crónica explicaría el persistente incremento de su número durante la producción de fibrosis y/o cirrosis hepática, que se asocia con un marcado descenso de miofibroblastos y de macrófagos en las regiones periportales (Jeong y cols. 2002). Las células cebadas, debido a su localización periportal, inducirían la apoptosis del epitelio biliar reduciendo la apoptosis hepatocitaria y, por lo tanto, éste puede ser otro mecanismo por el cual las células cebadas inducen una actividad antifibrogénica, así como la preservación de los hepatocitos (Canbay y cols. 2004; Ghavami y cols. 2005).

Al corregir el imbalance epitelial producido por la colestasis entre los dos tipos de células epiteliales hepáticas, biliar (proliferación) y hepatocitario (apoptosis), los mastocitos intentarían limitar la fibrosis característica de la inflamación hepática crónica. Estas acciones protectoras pueden ser asumidas en algunas circunstancias por las células cebadas que protagonizarían entonces el control de la inflamación (Kinet, 2007).

Los ácidos biliares en la colestasis pueden interaccionar con los colangiocitos produciendo alteraciones en la secreción, apoptosis, diferenciación y proliferación (Xia y cols. 2006). El transporte de ácidos biliares en los colangiocitos es vectorial, esto es, desde apical a basolateral, para drenar en el plexo arterial peribiliar (De Vos y cols. 1978; Lazaridis y cols. 1997). En la colestasis, la proliferación biliar se asocia al incremento del shunt colehepático de sales biliares por el aumento del número de conductos biliares. Los ácidos biliares absorbidos por los colangiocitos se reciclarían a través del plexo arterial peribiliar y de los sinusoides en los hepatocitos, y de nuevo serían secretados en la bilis. Este reciclaje de los ácidos biliares denominado *shunt* hepatobiliar, podría ser un mecanismo de adaptación a la colestasis crónica secundaria a la ligadura del colédoco (Xia y cols. 2006). Sin embargo, los ácidos biliares pueden desencadenar señales intracelulares en los colangiocitos, como son cambios en la concentración de calcio y activación de proteinquinasa-C (PKC),

fosfoinositido-3-quinasa (PI3K) y proteína activadora mitógena (MPA) quinasa, que alterarían a su vez la secreción y proliferación de los colangiocitos (Xia y cols. 2006).

La hiperexpresión de citoquinas proinflamatorias por los colangiocitos colestásicos también podría regular tanto las alteraciones en la secreción biliar (Geier y cols. 2003) como la supervivencia de los propios colangiocitos (Wolf y Vierling 1993).

La ligadura del colédoco en la rata causa la proliferación biliar con elongación del árbol biliar, así como su ramificación (Nakanuma y cols. 1997; Masyuk y cols. 2001). A su vez, la proliferación biliar induce la proliferación vascular o angiogénesis. La vía biliar se rodea de un plexo vascular arterial que procede de las ramas de la arteria hepática (Nakamura y cols. 1997). Durante el desarrollo embrionario las células epiteliales biliares migran a través del mesénquima y se transforman en túbulos durante el estadio de formación de la vía biliar intrahepática (Roberts y cols. 1997). A su vez, el plexo vascular arterial peribiliar se desarrolla y madura en relación con el tracto biliar. Sin embargo, en tanto la vía biliar madura, el plexo vascular periarterial permanece inmaduro y continúa proliferando hasta que alcanza su madurez a lo largo de la vida postnatal (Nakamura y cols. 1997). En la colestasis extrahepática la proliferación biliar también parece preceder a la proliferación vascular (Gaudio y cols., 2006). Trás la ligadura del colédoco en la rata la proliferación de colangiocitos es un proceso rápido que consigue ocupar el 30% del total de las células hepáticas, en tanto que en el hígado normal los colangiocitos representan el 2% de la masa celular hepática (Alvaro y cols., 2006). La proliferación de colangiocitos es modificada por neuropéptidos, factores de crecimiento y hormonas. En particular, el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) protagoniza la hiperplasia ductural. VEGF-A y VEGF-C aumentan en los conductos biliares de ratas con ligadura del colédoco, ya que son factores que pueden ser secretados por los colangiocitos (Gaudio y cols., 2006). Ya que también VEGF regula la angiogénesis, parece lógico suponer que los colangiocitos proliferantes regulan mediante la proliferación de VEGF la formación de un plexo vascular que suministre sangre para cubrir las demandas funcionales del epitelio biliar intrahepático proliferante (Gaudio y

cols., 2006). Incluso se ha considerado que el epitelio biliar intrahepático podría estar condicionado por el diferente aporte sanguíneo (Kanno y cols., 2000).

La inflamación de origen biliar también puede ser causa de apoptosis de los hepatocitos. La hiperproducción de citoquinas (TNF- $\alpha$ ) se ha asociado a la apoptosis hepatocitaria (Ding y Yin, 2004). En los síndromes colestásicos destaca la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B ya que las elevadas concentraciones de ácidos biliares en los hepatocitos durante la colestasis activa NF- $\kappa$ B (Miyoshi y cols. 2001; Zollner y cols., 2005). En éste contexto, la activación de NF- $\kappa$ B promueve la expresión de ligandos asociados a muerte celular por las células de Kupffer, como Fas y TNF que, a su vez son citotóxicos para el hígado (Nanji y cols, 1999; Ding y cols, 2004; Malhi y cols, 2006).

Las células progenitoras de células hepáticas ó células madre también podrían desempeñar un importante mecanismo en la proliferación biliar. En lesiones hepáticas por D-Galactosamina, la regeneración del hígado ocurre a expensas de células epiteliales biliares, denominadas células ovas, que derivan probablemente de los canales de Hering. Ya que las células biliares que proliferan expresan  $\alpha$ -1-fetoproteína, esta reactivación de genes fetales ha planteado la existencia de un proceso de retrodiferenciación en la colestasis (Kuhlmann 2006).

En la colestasis extrahepática a largo plazo la alteración hepática predominante es la marcada proliferación ductular con una infiltración inflamatoria portal moderada y apoptosis hepatocitaria (Sánchez-Patán y cols. *en prensa*). Sin embargo, la colestasis extrahepática permite también la creación de un modelo experimental de fibrosis biliar a largo plazo (Aube y cols. 2007; Sánchez-Patán y cols. *en prensa*).

La fibrosis hepática post-ligadura del colédoco en roedores es la consecuencia de un proceso inflamatorio de origen biliar (Kerhenobich y Weissbrod, 2003; Li y Crawford, 2004). La fibrosis hepática es la acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular entre las que se incluye el colágeno (Bataller y Brenner, 2005; Rockey 2006; Gressner y cols. 2007). Un concepto fundamental respecto de la etiopatogenia de la fibrosis hepática es que éste proceso representa una respuesta de

cicatrización por parte del organismo frente a otra agresión que es similar a la respuesta de otros órganos a una agresión recurrente (Rockey, 2006).

La colestasis es también causante de estrés oxidativo secundario a la formación de peróxidos lipídicos (Huang y cols. 2003). En el hígado la peroxidación lipídica se asocia con una alteración del metabolismo oxidativo mitocondrial, quizá por disminución de la actividad del enzima citocromo-oxidasa-C (Sokol y cols. 1993). En éste sentido, hemos comprobado que la colestasis extrahepática microquirúrgica disminuye la actividad de citocromo-C-oxidasa (López y cols. 1999). Citocromo-C-oxidasa es un enzima localizado en la membrana mitocondrial interna que cataliza la reacción final de la cadena transportadora de electrones, en la cual el oxígeno es reducido a agua mediante la adición de electrones procedentes de dehidrogenasas primarias del ciclo del citrato. Este proceso genera un gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial que es entonces capaz de inducir la síntesis de ATP (Wong-Riley, 1989). La oxidación por Citocromo-oxidasa representa más del 90% del consumo de oxígeno por los organismos vivos sobre la tierra y es esencial para órganos vitales como el hígado (Wong-Riley, 1989). Por lo tanto, los cambios en el fenotipo de las células ductulares biliares, asociados a la disminución de la actividad de Citocromo-oxidasa en el hígado colestásico, puede atribuirse a los menores requerimientos energéticos del fenotipo neuroendocrino expresado por estas células (López y cols. 1999).

La depresión de la respiración mitocondrial sufrida por los colangiocitos en la colestasis obstructiva podría inducir la activación e hiperexpresión del factor inducible por hipoxia (*hipoxia-inducible factor* (HIF)-1 $\alpha$ , secundaria a la disminución del metabolismo oxidativo con una reducida síntesis de ATP, promoviéndose así la obtención de energía por otros mecanismos. Por ejemplo, los colangiocitos podrían generar suficiente Nicotinamida dinucleido fosfato reducido (*reduced nicotinamide dinucleotide phosphate*, NADPH) para realizar sus funciones biológicas mediante el continuo aporte de intermediarios del ciclo de Krebs (Bruneugraber y Roe, 2006). Por medio de éstos mecanismos anapleróticos los colangiocitos podrían obtener suficiente energía no solo para las nuevas funciones neuroendocrinas

adquiridas, sino también para su proliferación (Bruneugraber y Roe 2006; Deberardinis y cols. 2007).

El estrés oxidativo y enzimático y la infiltración por células inflamatorias en la colestasis obstructiva experimental podrían estar implicados en la patogenia de la proliferación de células epiteliales biliares y en la reduplicación y ramificación de los conductos y conductillos biliares (Kilicoglu y cols., 2008). Así, se ha sugerido que el efecto hepatoprotector de la miel en ratas con ligadura del colédoco podría ser secundario a sus actividades antioxidante y anti-inflamatoria (Kilicoglu y cols., 2008).

Una intensa proliferación biliar en los espacios porta caracteriza a la colestasis extrahepática microquirúrgica a largo plazo en la rata. Los conductos biliares proliferantes invaden las zonas 1 y 2 del acino de Rapaport, pero no la zona 3 o pericentral (Aller y cols., 2004) y ésta es la razón de que sea considerada una proliferación "atípica" (Alvaro y cols., 2007).

En esencia, la respuesta fisiopatológica del hígado cuando se alteran, tanto el flujo biliar (colestasis extrahepática) como portal (capilarización sinusoidal e hipertensión portal) es la atrofia del área hepática afectada y la hipertrofia del área no afectada (Black y Behrus, 2002). Histopatológicamente, el complejo atrofia-hipertrofia se caracteriza por fibrosis septal en el hígado atrofico con necrosis biliar en mosaico, apoptosis y proliferación ductular (Black y Behrus, 2002; Kilicoglu y cols. 2008).

Los colangiocitos son un epitelio biológicamente importante por los múltiples procesos celulares en los que participan, incluyendo el transporte de agua, iones y solutos (Boger y Larusso, 2007). Estas células epiteliales biliares han sido propuestas como la "diana" principal de los ácidos biliares en el hígado. Los ácidos biliares alteran significativamente la secreción, la proliferación y la supervivencia de los colangiocitos (Xia y cols., 2006). Así, los ácidos biliares pueden antagonizar la pérdida de conductillos biliares inducida por la denervación colinérgica en la rata con ligadura de colédoco (Marzioni y cols., 2006). Sin embargo, durante su intensa proliferación en colestasis obstructiva, los colangiocitos adquieren un fenotipo de células neuroendocrinas y secretan diferentes sustancias, entre las que se incluyen neurotransmisores (serotonina) (Marzioni y cols., 2005), neuropéptidos

(péptidos opioides, como met-enkefalina) (Muezi y cols. 2006; Mombeini y cols. 2006; Nelson y cols. 2006; Marzioni y cols. 2007), hormonas (prolactina) (Bogorad y cols. 2006) y sus receptores (estrógenos) (Alvaro y cols. 2007) y factores de crecimiento, como el Factor de crecimiento similar a Insulina (*Insuline-like growth factor*, IGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*; PDGF), el factor de crecimiento hepatocitario (*hepatocyte growth factor*, HGF), TGF- $\beta$  y VEGF (Marzioni y cols. 2006; Alvaro y cols. 2007). Existe la evidencia de que la activación de células progenitoras hepáticas en el hígado colestásico es regulada por factores neuronales y neuroendocrinos que modulan la biología de los colangiocitos malignos y no-malignos (Marzioni y cols. 2006).

La principal característica de la célula estrellada hepática activada, así como de otras células productoras de matriz extracelular, como los fibroblastos y los miofibroblastos, es el aumento de la expresión de actina de músculo liso alfa (*smooth muscle actin- $\alpha$* ; SMA- $\alpha$ ) y la hiperproducción de proteínas de la matriz extracelular (Issa y cols. 2001; Bissell, 2004). En éste sentido, la determinación del grado de fibrogénesis hepática posee un valor diagnóstico y pronóstico superior a la simple valoración de la fibrosis (Bissell, 2004).

La activación de las células estrelladas hepáticas es un factor patogénico clave en la producción de fibrosis hepática ya que los miofibroblastos resultantes son principalmente responsables del ensamblaje del tejido conectivo (Rockey, 2006; Gressner y cols. 2007; Proell y cols. 2007). Múltiples y variados estímulos contribuyen a la inducción y el mantenimiento de la activación de las células estrelladas hepáticas, como son el estrés oxidativo, los neurotransmisores (Norepinefrina), la cascada Renina-Angiotensina, citoquinas (IL-4, IL-13), quimioquinas y factores de crecimiento, p.ej. el factor de crecimiento transformador  $\beta_1$  (*transforming growth factor  $\beta_1$* ; TGF $\beta_1$ ) y el factor de crecimiento de tejido conectivo (*connective tissue growth factor*; CTGF) (Sedlacek y cols. 2001; Rockey, 2006; Muddu y cols. 2007; Gressner y cols. 2007; Proell y cols. 2007; Friedman, 2008; Sánchez-Patán y cols. en prensa). En particular, los radicales libres de oxígeno son capaces de activar NF- $\kappa$ B y así, la producción de citoquinas proinflamatorias (Aller y cols. 2004). Se establecería por tanto

---

una relación entre estrés oxidativo, inflamación y fibrogénesis (Ramadori y Smile, 2006b). Sin embargo, las células epiteliales que proliferan también son una importante fuente de CTGF en la rata con fibrosis biliar (Sedlacek y cols. 2001).

En la colestasis los ácidos biliares inducen apoptosis de los hepatocitos y se ha propuesto que dicha apoptosis facilita a su vez la activación de las células estrelladas hepáticas (Canbay y cols. 2002). Por lo tanto, en la colestasis extrahepática los ácidos biliares están implicados tanto en la proliferación biliar como en la fibrogénesis (Isayama y cols. 2006). Además, la endotoxemia presente en colestasis (Ingoldby y cols. 1984) también podría exacerbar la fibrogénesis hepática. En ratones con colestasis extrahepática, la administración de LPS favorece la fibrogénesis hepática. Esta acción fibrogénica de LPS está mediada por CD<sub>14</sub> y TLR-4 (*Toll-like receptor-4*) y es estimulada por la proteína de unión a lipopolisacárido (*lipid binding protein*; LBP) (Isayama y cols. 2006). Ratones con ligadura del colédoco y déficit de CD4 no expresan TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , factor inductor de macrófagos (*Macrophage induction factor*, MIF), ni TGF $\beta$ , una citoquina con potente acción fibrogénica (Yang y cols. 2003; Isayama y cols. 2006). Aunque la retención de ácidos biliares por sí sola es suficiente para producir lesión hepatocelular, proliferación biliar, respuesta inflamatoria moderada y discreta fibrosis, cuando se asocia a estímulo por LPS, mediado por el receptor CD<sub>14</sub>, se activan macrófagos y aumenta la síntesis de agentes oxidantes y de citoquinas y, en consecuencia, la fibrosis (Isayama y cols. 2006).

Las células estrelladas hepáticas, al ser estimuladas por PDGF, por factor de crecimiento epitelial (*epithelial growth factor*; EGF) y TGF $\beta$ <sub>1</sub> expresan metaloproteinasa de la matriz-2 (MMP-2), que induce su migración. La migración de las células estrelladas hepáticas es dependiente de Integrinas ya que la administración de anticuerpos anti-integrinas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  inhiben dicha migración (Yang y cols. 2003). Otros mediadores que activan a las células estrelladas hepáticas son neurotransmisores, como noradrenalina, que aumentan la expresión hepática de TGF- $\beta$ <sub>1</sub> (Oben y cols. 2004), leptina (Ikejima y cols. 2003) y Angiotensina II, que no solo aumenta la fibrosis hepática, sino que promueve el estrés oxidativo, la inflamación y la

trombogénesis (Bataller y cols. 2005). Así, las células estrelladas hepáticas son posteriormente estimuladas de forma paracrina por trombocitos, leucocitos polimorfonucleares, células cebadas y linfocitos que infiltran el hígado, pero también por células de Kupffer inactivadas, células endoteliales sinusoidales y hepatocitos para diferenciarse en miofibroblastos (Szabo y cols. 2007; Gressner y cols. 2007; Sánchez-Patán y cols., *en prensa*). Las células estrelladas hepáticas podrían también tener su origen en la médula ósea y adquirir el fenotipo miofibroblasto si está presente el microambiente hepático estresor adecuado (Gressner y cols. 2007; Friedman, 2008).

El miofibroblasto hepático es la principal célula responsable de la promoción del depósito de colágeno fibrilar en el hígado colestásico (Bataller y Brenner, 2005; Gressner y cols. 2007). La gran plasticidad de los miofibroblastos hepáticos sugiere que incluso podrían coexistir diversos inmunofenotipos en la fibrosis biliar crónica, p.ej. portal, septal, intermedios o de transición y perisinusoidales (Cassiman y cols. 2002). Ha sido también propuesta la coexistencia de transición epitelio-mesenquimal del epitelio biliar o de los hepatocitos (Sicklick y cols., 2006; Henderson e Iredale, 2007; Friedman, 2008). La coexpresión de marcadores de células epiteliales y mesenquimales por algunas células del hígado adulto sugiere que la existencia de transición epitelio-mesenquimal puede producirse también durante la vida post-natal. En los hígados fetales la transición epitelio-mesenquimal se ha demostrado que constituye un mecanismo implicado en el desarrollo hepático (Ghagraoui y cols. 2003). Asimismo, algunos hepatocitos adultos podrían ser capaces de sufrir una transición epitelio-mesenquimal ya que progenitores epiteliales hepáticos, esto es, las células ovales, expresan conjuntamente marcadores epiteliales y mesenquimales, en tanto que las células estrelladas hepáticas pueden ser inducidas para que expresen genes que las confieren un fenotipo epitelial (Sicklick y cols. 2006). Se explicaría así que conductillos biliares proliferantes en niños con atresia biliar expresen el marcador mesenquimal  $\alpha$ -SMA. Por lo tanto, la transición desde el fenotipo epitelial al fenotipo mesenquimal en la colestasis extrahepática constituiría un nuevo mecanismo productor de fibrosis (Zavadil y cols. 2005; Sicklick y cols. 2006).

Dada la plasticidad de las células estrelladas hepáticas y de las células del parénquima hepático (eje hepatocito-colangiocito), puede hipotetizarse que durante la evolución del hígado colestásico, éstas células pueden expresar los mismos fenotipos que se suceden en la respuesta inflamatoria post-traumática (Aller y cols. 2004; Aller y cols. 2006): un fenotipo de isquemia-reperfusión (hipóxico), un fenotipo leucocitario (con respuesta pro- y anti-inflamatoria) y, por último, un fenotipo angiogénico con proliferación biliar y fibrosis.

Durante éstas fases evolutivas se podría especular que los colangiocitos adoptan un comportamiento similar a las células tumorales con una complejidad metabólica progresiva (neuroendocrina), que se asocia a su vez a una complejidad estructural creciente. En éste supuesto, el tipo de tumor que se desarrolla sería benigno, a pesar de su importante capacidad para invadir el parénquima. Este tumor biliar "atípico" parece capaz de inducir una respuesta inflamatoria en el hígado remanente o "hígado hepatocitario del huésped". Por lo tanto, es posible que éste hígado compuesto por hepatocitos del huésped pueda participar en el desarrollo del tumor biliar por un proceso denominado "desmoplasia". Esto consiste en células fibroblásticas y matriz extracelular, elementos inflamatorios de respuesta inmune, representados por linfocitos, macrófagos y células dendríticas, con angiogénesis, evidenciada por los vasos sanguíneos neoformados (Marcel y Lamy, 2003). En esencia, todos los elementos que constituyen la respuesta inflamatoria participan en ésta "reacción del hígado del huésped", que puede tener un objetivo trófico para el desarrollo del tumor colestásico biliar. La persistencia de ésta respuesta inflamatoria durante una evolución más prolongada induciría un grado más intenso de desdiferenciación tumoral (Arias y cols. 2005; Arias y cols. 2006; Arias y cols. 2007), produciendo una transformación celular maligna como ocurre en el ser humano cuando se produce un cáncer de la vía biliar o colangiocarcinoma (Marzioni y cols. 2006).

## ***II. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO***

La colestasis extrahepática en la rata cursa con alteraciones esplácnicas y sistémicas en cuya producción podrían estar implicados mecanismos patogénicos de naturaleza inflamatoria.

Con el objeto de caracterizar el tipo de respuesta inflamatoria esplácnica secundaria a la colestasis obstructiva, se utilizó un modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica, para estudiar en una fase evolutiva considerada crónica, la concentración de citoquinas tipo Th<sub>1</sub> (TNF $\alpha$  e IL-1) y Th<sub>2</sub> (IL-4 e IL-10) e hígado, bazo, intestino delgado y ganglios linfáticos mesentéricos.

Se ha considerado la participación de células cebadas esplácnicas en la etiopatogenia de la inflamación esplácnica en este modelo experimental de colestasis extrahepática y por esta razón se han determinado las concentraciones de RMCP-II en intestino delgado y CLMS.

### *III. MATERIAL Y MÉTODOS*

## **1. MATERIAL**

### **1.A. ANIMALES**

Se han utilizado 85 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (Hsd:Sprague-Dawley®SD®) procedentes de las instalaciones homologadas para la cría de animales de experimentación que posee Harlan Interfauna Ibérica S.L. Sant Feliu de Codines (Barcelona). Todos los ejemplares cumplían los requisitos de salud para animales de experimentación recomendados por la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)*.

Los pesos corporales de los animales oscilaron entre 200 y 300 gramos. Para su estudio se dividieron en dos grupos:

Grupo I (n = 32): ratas pseudo-operadas.

Grupo II (n = 53): ratas operadas mediante la técnica de colestasis extrahepática microquirúrgica experimental.

Los animales de ambos grupos fueron sacrificados a las 6 semanas para su estudio.

### **1. B. INSTALACIONES**

#### **1.B.1 Sala de estabulación**

El transporte desde el proveedor se realizó en las condiciones establecidas en la Normativa vigente sobre comercio, sanidad y bienestar animal, es decir en un medio adecuado y en contenedores homologados. La estabulación se efectuó en una sala acreditada para tal fin en el Animalario de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Getafe. (Registro del Ministerio de Agricultura nº 28079-38-AB).

#### **1.B.2 Sala de operaciones**

Los procedimientos experimentales empleados en el presente estudio se realizaron en el laboratorio de microcirugía que posee la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Getafe (Madrid),

cuyas instalaciones cumplen con los principios y normas legales vigentes en España: *Real Decreto de utilización de animales 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.* (BOE 252; 21-10-2005).

Este laboratorio de microcirugía dispone de:

- Refrigerador para conservación de los fármacos anestésicos.
- Mesa de trabajo.
- Sillas ergonómicas ajustables en altura.
- Microscopio operatorio Carl Zeiss OPMI 1-DFC nº serie 211069.
- Lámpara de brazo adaptable con bombilla de 60 Watios Osram.
- Balanza de precisión para pesado de los animales Jadever LPW-1260 nº certificado PM-245/04 (Jadever Scale Co.LTD, Taiwan).
- Contenedor desechable de residuos biológicos cortantes y punzantes.

### **1.B.3 Sala de evolución postoperatoria**

La Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Getafe posee instalaciones propias acondicionadas para el mantenimiento y el control de la evolución postoperatoria de las ratas.

### **1.B.4 Sala de sacrificio y procesado de muestras**

Esta sala dispone de los siguientes elementos:

- Mesa de trabajo.
- Sillas ergonómicas ajustables en altura.
- Lámpara halógena de brazo con bombilla de 60 W.
- Contenedor hermético con bolsa para residuos biológicos.
- Contenedores desechables de residuos biológicos punzantes.
- Centrífuga.
- Contenedor de nitrógeno líquido.
- Elementos de protección individual: guantes y gafas.
- Recipiente y pinzas para inmersión de muestras en nitrógeno líquido.

### **1.B.5 Área de conservación de muestras**

Se realizó en un espacio habilitado para ese fin en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Getafe. La misma dispone de un congelador SANYO MDF-U5186S nº de serie 50709226 (SANYO Electric Biomedical Co., Ltd Japan) que conserva las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **1.B.6 Eliminación de residuos biológicos**

Los residuos biológicos se almacenaron en espera de su eliminación en un área especial que dispone de un congelador tipo arcón modelo ZCF320L/2 Zanussi (Electrolux Home Products España, S.A. Madrid).

## **1.C. FÁRMACOS**

### **1.C.1 Anestésicos**

- Ketamina (Imalgene®) 1000. Laboratorios Merial S.A. ).
- Xilacína (Rompum® solución al 2%. Bayer HealthCare).

### **1.C.2 Otros fármacos**

- Ceftriaxona sódica (D.C.I), 500 mg. (Ceftriaxona Normon 500 mg FG Lab. Normon S.A. Madrid).
- Fitomenadiona, vit. K<sub>1</sub> ampollas 1ml con 10 mg. (Konakion® Roche Farma S.A. Madrid).
- Heparina Rovi ®1% (Laboratorios Rovi).

## **1.D. MATERIAL**

### **1.D.1 Instrumental quirúrgico**

- Clamp de paños BACKHAUS de 13.3 cm (2)
- Disección con dientes de 13cm (1)
- Disección de Adson con dientes de 12cm (1)
- HALSTED Mosquito curva sin dientes de 12.7 cm (2)
- HALSTED Mosquito recta sin dientes de 12.7 cm (2)
- Pinza de Heiss recta (1)
- Pinza de Heiss curva (1)

- Pinza de microcirugía recta de 10.5 cm. (1)
- Pinza de microcirugía curva de 10,5 cm.(1)
- Porta-agujas Mayo-Hegar de 12,7 cm. (1)
- Tijeras de Metzenbaum curva de 14 cm (1)
- Tijeras de Mayo recta de 14cm (1)
- Tijera de microcirugía recta de 15 cm. (1)

#### **1.D.2. Material de sutura y ligadura**

- Seda trenzada ligadura 3/0 Silkam®. (B. Braun España).
- Seda negra trenzada ligadura 8/0 Silkam®.(B. Braun España).
- Sutura de VICRYL® (poliglactina 910) aguja curva 3/0.  
(Ethicon Inc.)
- Sutura de seda negra trenzada aguja curva de 4 /0 Silkam®.  
(B.Braun España).

#### **1.D.3 Material quirúrgico complementario**

- Paños quirúrgicos.
- Guantes de exploración de látex natural sin polvo. Talla 7 <sup>1/2</sup>  
(King <sup>TM</sup> Amebil S.A. Vizcaya. España).
- Guantes quirúrgicos de látex natural con polvo (estériles). Talla  
7 <sup>1/2</sup> (Medi-Grip® Plus. Ansell Ltd. UK).
- Gasas de 10 × 10 cm . (Envase de 10 unidades Texpol®.  
Manresa. España).
- Torundas de algodón pequeñas montadas (Algodones del  
Bages,S.A. Barcelona. España).
- Jeringas de 10, 5 y 2 ml BD Discardit<sup>TM</sup> II (Becton Dickinson  
S.A. Fraga. Huesca. España).
- Agujas de tipo Luer 20G 0,91×25,4 mm (monoject magellan  
Safety Needle . Tyco Healthcare Group LP.USA).
- Agujas de tipo Luer 21G 0,82×38,1 mm (monoject magellan  
Safety Needle . Tyco Healthcare Group LP.USA).
- Agujas de tipo Luer 25G 0,51×15,8 mm (monoject magellan  
Safety Needle . Tyco Healthcare Group LP.USA).

- Hojas de bisturí de acero estériles del nº 11 (Albion Surgical Limited . Sheffield. England).
- Solución Salina isotónica: ClNa, 0.9 g/100ml. Envase 10 ml. (B.Braun).

#### **1.D.4. Otros materiales para el procedimiento operatorio y la extracción de muestras**

- Guantes de protección frente a mordedura de animales.
- Bloque de plastilina de 10 × 2 × 3 cm.
- Contenedor cilíndrico de polietileno para residuos biológicos marca Consenur de 30 litros fabricado según norma DIN-30739.
- Contenedor de polipropileno para residuos biológicos punzantes y cortantes marca Biocompact 1,8 lts (Sanipick Plastic SA. Madrid).
- Bolsas de plástico de 15 litros para residuos biológicos.
- Recipiente de acero inoxidable para transporte de nitrógeno líquido Airliquide GT 2 (Airliquide España).
- Guantes de protección frente frío Midera 10.

#### **1.D.5. Material de laboratorio**

- Pipetas Pasteur no estériles de 1 ml.
- Tubos de centrifuga 10ml (BD Vacutainer™. BD Vacutainer Systems. Plymouth. UK).
- Microtubos para muestras de suero (Eppendorf Ibérica, S.L. Madrid).
- Tubos de polipropileno de 50 ml para muestras de tejido (BD Falcon™ NY USA ).

## **1.E. EQUIPOS DE LABORATORIO**

### **1.E.1 Procesado de muestras**

- Centrífuga angular Nahita modelos 2610 ref. 2610000 OF.
- Balanza analítica de precisión AB 204 Mettler Toledo nº serie:1113043273 (Mettler-Toledo S.A.E. L'Hospitalet de Llobregat Barcelona).

### **1.E.2 Estudio bioquímico en suero**

- Autoanalizador Olympus AU400 nº serie 311267. Olympus Optical España S.A.

### **1.E.3 Estudio de proteínas de fase aguda en sangre**

- Lector de placas ELISA EMS Reader MF V2.9-0

### **1.E.4 Determinación de los niveles de quimasa (RMCP-II) en la mucosa–submucosa intestinal y en el complejo linfático mesentérico superior**

- Homogeneizador eléctrico Polyton. (Brinkmann Instruments, Inc. Westminster, NY. USA).
- Sonicador VirSonic 5 (Virtis. Gardiner, NY. USA).
- Centrífuga Biofuge 17RS (Heraeus Sepatech).
- Espectrofotómetro Ultrospec III (Pharmacia LKB, Suecia).

### **1.E.5 Determinación de los niveles de citoquinas en hígado, ileon, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos**

- Homogeneizador eléctrico Polyton. (Brinkmann Instruments, Inc. Westminister, NY. USA).
- Sonicador.
- Centrífuga.
- Espectrofotómetro.

### 1.E.6 Laboratorio de anatomía patológica

El procesado de las muestras histológicas y su posterior estudio microscópico se efectuó en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Carlos III de Madrid (IMSALUD). Este centro cuenta con:

- Mesa de tallado de órganos.
- Procesador de tejidos de vacío.
- Estación de inclusión muestras (Histomatic 166 MP Fisher).
- Microtomo de parafina tipo Minot (Microm).
- Teñidor automático.
- Montador automático.
- Microscopio óptico (Nikon Labophot-2)
- Cámara Hitachi color C503.
- Cámara digital Nikon Coolpix 850.
- Microscopio Leica DM 5000B con pletina motorizada
- Cámara Leica DC 300
- Instrumental:
  - Pinzas
  - Bisturí
  - Cassettes
  - Moldes de cassettes
  - Portaobjetos.
  - Cubreobjetos.

### 1.F. REACTIVOS DE LABORATORIO

#### 1.F.1 Estudios bioquímicos en suero

- **Bilirrubina total y directa:**
  - *Total Bilirubin Olympus System Reagent y Direct Bilirubin Olympus System Reagent* ( Olympus Irlanda ref. OSR 6111 y OSR 6112).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).

- **Aspartato aminotransferasa (AST)**
  - *AST Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6109).
  - *Pyridoxal phosphate liquid (P5P)* (Olympus Irlanda ref. 60106).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).
- **Alanina aminotransferasa (ALT)**
  - *ALT Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. SR6107).
  - *Pyridoxal phosphate liquid (P5P)* (Olympus Irlanda ref. 60106).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).
- **$\gamma$  - glutamiltransferasa (GGT)**
  - *GGT Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6120).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300)
- **Lactato deshidrogenasa (LDH)**
  - *LDH Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6126).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).
- **Fosfatasa alcalina (FA)**
  - *ALP Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6104).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).
- **Creatinina**
  - *Creatinin Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6178).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).

- **Urea**
  - *Urea Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6134).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).
- **Albúmina**
  - *Albumin Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6102).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).
- **Acidos biliares**
  - Kit de método enzimático colorimétrico de ácidos biliares (Randox Laboratories Ltd. United Kingdom Cat.No.BI3863).

#### 1.F.2. Proteínas de fase aguda en suero

- **Tiostatina o Proteína mayor ácida  $\alpha 1$  ( $\alpha 1$ -Mayor Acid Protein)**

*Rat Thiostatin ELISA Test Kit*  
(Life Diagnostics, Inc.; Ref. 3000-2).
- **Glicoproteína ácida  $\alpha 1$  ( $\alpha 1$ -AGP)**

*Rat  $\alpha$ -1- Acid Glycoprotein ELISA Test Kit*  
(Life Diagnostics, Inc.; Ref. 2510-2)

#### 1.F.3. Niveles de Proteasa II de células cebadas (RMCP-II) en la mucosa-submucosa ileon y en ganglios linfáticos mesentéricos

- *Rat Mast Cell Protease II (RMPC II) ELISA Test Kit* (Moredun Scientific Limited; Ref. MS- RM2): 1 vial de anticuerpo monoclonal anti-RMPC II, 1 vial de RMPC II estándar, 2 ampollas de Conjugado anti-RMPC II-HRPO y 2 ampollas de sustrato preparado para usar.
- Solución baño-tampón: 79 ml  $\text{Na}_2 \text{CO}_3$  (0,2M), 171ml  $\text{NaHCO}_3$  (0,2M) y 500ml de agua destilada.

- Solución tampón para lavado: Tampón fosfato salino (PBS) con 0,05% de Tween 20.
- Albúmina sérica bovina (BSA) al 4% en PBS/Tween 20.
- Acido Sulfúrico al 0,25 M.

#### **1.F.4. Niveles de citoquinas en hígado, íleon, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos**

- Tampón de lisis que contiene 1 mmol/l de fenilmetilsulfonil flúor (PMSF; Sigma Chemical Company), y 1 µg/ml de pepstatina A (Sigma Chemical Company), aprotinina (Sigma Chemical Company), antipaína (Sigma Chemical Company) y leuceptina, en tampón fosfato a pH 7,2 (Biofluids, Rockville, Md.) conteniendo un 0,05% de azida sódica (Sigma Chemical Company).
- ELISA Test para TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 y IL-10 de BioNOVA Científica Ltd., Madrid, España.

#### **1.F.5 Reactivos para estudio histológico**

##### **- Fijación**

- Formol tamponado al 10%

##### **- Inclusión**

- Agua destilada
- Alcohol etílico (70°,96°,100°)
- Xilol
- Parafina

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

- Hematoxilina de Harris
  - Agua destilada ..... 400ml
  - Glicerina ..... 100ml
  - Iodato potásico ..... 0,1ml
  - Sulfato alumínico potásico ..... 20g.
  - Hematoxilina ..... 0,5g.
- Eosina ..... 1g.

- Agua destilada ..... 100ml

**- Tinción con Giemsa**

- Azur-eosina-azul de metileno en solución ..... 10ml
- Solución tampón ..... 190ml

**- Tinción de Rojo-Sirio**

- Solución Picro-RojoSirio 0,1% (Swet et al. 1964):
  - Pítrico acuoso saturado ..... 250ml
  - Rojo-Sirio F3B ..... 0,5 g.
- Solución Picro-Fast green
  - Pítrico acuoso saturado ..... 250ml
  - Fast green ..... 0,5 g.
- Agua destilada

## **2. MÉTODOS**

### **2.A. CONDICIONES DE UTILIZACIÓN Y ESTABULACIÓN DE LOS ANIMALES**

La estabulación se realizó de acuerdo con la legislación vigente en nuestro país sobre el cuidado y la utilización de animales de laboratorio, por la cual España adopta la normativa de la Unión Europea de 1996 sobre el uso de animales con fines científicos. Se incorporó a nuestro ordenamiento legal con fecha de 4 de Agosto de 1986 en el *Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos*. (BOE 252; 21-10-2005).

La temperatura se mantuvo a  $20 \pm 2$  ° C, y con una humedad relativa del  $65 \pm 10$  %. Las condiciones de luz / oscuridad fueron cíclicas estableciéndose períodos alternos de 12 horas (8:00 –20:00 /20:00 – 8:00).

Los animales se mantuvieron en estanterías, y en grupos de tres en cajas homologadas para tal fin: Plexiglas de 42x65x15 cm (Letica,

España) móviles con lecho de viruta (Panlab S.L. Barcelona). Dichas cajas fueron etiquetadas, y consignándose en éstas últimas los datos de identificación de los animales allí alojados.

Todos los animales fueron alimentados con una dieta estándar para roedores de laboratorio (rata /ratón dieta de mantenimiento A04. Panlab: España) y agua *ad libitum* .

## **2.B. TÉCNICA ANESTÉSICA**

La anestesia se administró por vía intramuscular profunda utilizando la siguiente mezcla (Waynfonth, H.B. y Cols 1992), (Lee-Parritz, 2001):

- Clorhidrato de Ketamina..... 80 mg/kg
- Xilacina ..... 12 mg/kg

Esta pauta proporciona un plano anestésico quirúrgico y adecuada relajación muscular durante 40 minutos aproximadamente. Una vez finalizado el tiempo quirúrgico la recuperación espontánea de la consciencia se produce habitualmente entre los 5 y 10 minutos. Por la sensibilidad de los pequeños roedores a la hipotermia (Rodríguez, 1989), durante el postoperatorio inmediato se colocó a las ratas en un ambiente cálido suministrado por una lámpara eléctrica

## **2.C. TÉCNICA QUIRÚRGICA**

### **2.C.1. PSEUDO-OPERACIÓN**

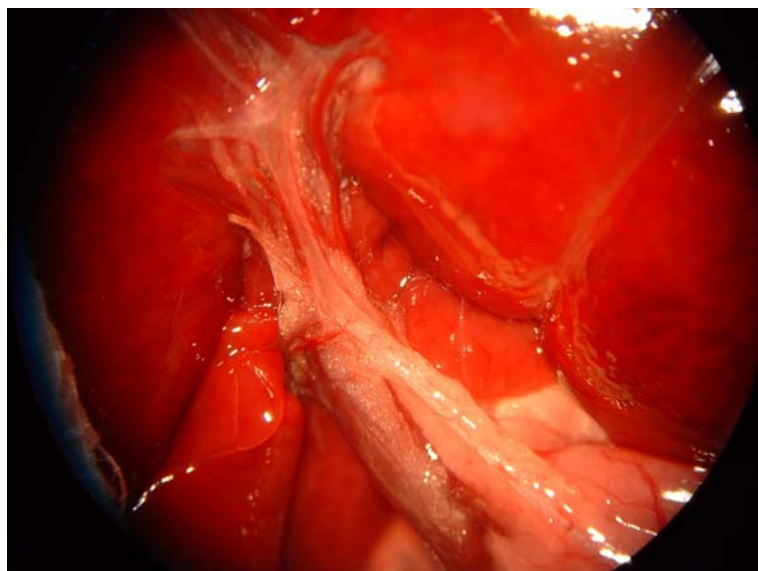
Con la rata en decubito supino, y tras colocar un bloque de plastilina en la zona dorsolumbar, se realiza una laparotomía media xifopubiana, las asas intestinales se cubren con una gasa humedecida en suero salino , y son desplazadas hacia el lado izquierdo. A continuación, se secciona el ligamento falciforme (situado entre el LLI y el LC) (Figura 7), y posteriormente también los ligamentos triangulares izquierdo y derecho.



**Figura 7.** Laparotomía media y sección del ligamento falciforme

Las maniobras anteriores permiten evertir el hígado y exponer el hilio. La tracción ligera sobre el duodeno hacia el lado izquierdo permite visualizar la vía biliar.

Mediante la utilización de un microscopio quirúrgico binocular se disecciona el colédoco y los conductos biliares correspondientes a cada uno de los lóbulos del hígado de la rata sin lesionar la vascularización portal y arterial de los mismos. (Figura 8)



**Figura 8.** La vía biliar extrahepática es anterior respecto de las ramas de la arteria hepática y éstas a su vez son anteriores respecto de las ramas portales.

En la serie de animales pseudos-operados se introduce de nuevo el hígado y el intestino en la cavidad peritoneal, y la pared abdominal se cierra en 2 planos: peritoneo, músculo y aponeurosis mediante sutura continua reabsorbible vycril<sup>®</sup> (polyglactin 910) de 4/0, y piel con sutura continua de seda de 4/0.

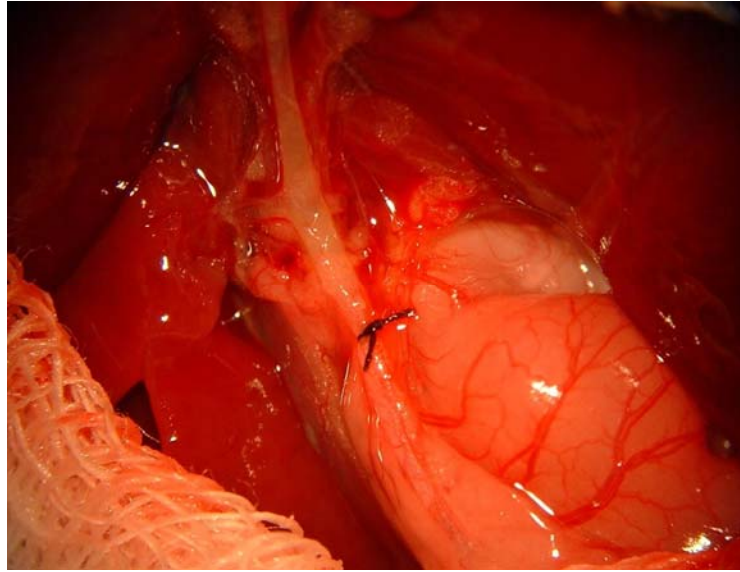
### **2.C.2. COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA MICROQUIRÚRGICA**

El hígado de la rata está formado por cuatro lóbulos: lateral derecho (LLD), medio (LM), lateral izquierdo (LI), y caudado (LC); que a su vez poseen una vascularización porto-arterial y un drenaje biliar individualizado (Lorente y cols., 1993). Esta característica anatómica permite la resección de los conductos biliares que drenan los cuatro lóbulos hepáticos en continuidad con el colédoco hasta el inicio de su porción intrapancreática utilizando una técnica microquirúrgica (Aller y cols., 1993). (Figura 6)

Con la rata en decubito supino, y tras colocar un bloque de plastilina en la zona dorsolumbar, se realiza una laparotomía media xifopubiana. A continuación se secciona el ligamento falciforme (situado entre el LLI y el LC) (Figura 7), y posteriormente también los ligamentos triangulares izquierdo y derecho.

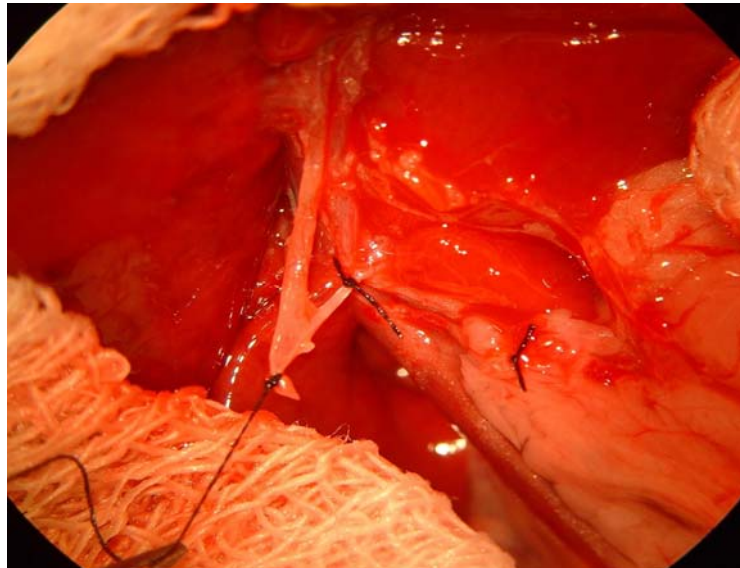
Para las siguientes fases de la intervención es necesario utilizar un microscopio operatorio binocular como medio de magnificación, ya que la disección y sección de los conductos biliares de los cuatro lóbulos hepáticos debe ser realizada sin lesionar la vascularización portal o arterial de estos lóbulos.

La tracción del duodeno hacia la izquierda permite visualizar el colédoco, que se liga y se secciona proximalmente al inicio de su porción intrapancreática. Esta maniobra, al producir dilatación de la vía biliar extrahepática, facilita la identificación y posterior disección del colédoco y de los conductos biliares procedentes de los cuatro lóbulos hepáticos que constituyen el hígado de la rata. (Figura 9)



**Figura 9.** Ligadura del colédoco en su porción intrapancreática.

El colédoco, una vez seccionado, se desplaza proximalmente y se disecciona hasta el origen de los conductos biliares propios del LLD y del LC. Después de diseccionar el conducto biliar del LC y de identificar la rama de la arteria hepática de este lóbulo, se liga y se secciona el conducto biliar lo más próximo posible de su salida del parénquima hepático. (Figura 10)



**Figura 10.** Tracción del colédoco y ligadura de los conductos biliares procedentes del lóbulo caudado(LC).

La disección, ligadura y sección del conducto biliar del LLD se realiza de igual forma.

Se continúa la disección del colédoco en sentido craneal, liberándolo del tejido graso y de las adherencias peritoneales, e individualizándolo de la arteria hepática, y de la vena porta hasta los conductos biliares procedentes del lóbulo medio (LM). Estos últimos se disecan y se ligan independientemente. Por último, se disecciona, se liga y se secciona el conducto biliar del LLI. (Figura 11 A y B)

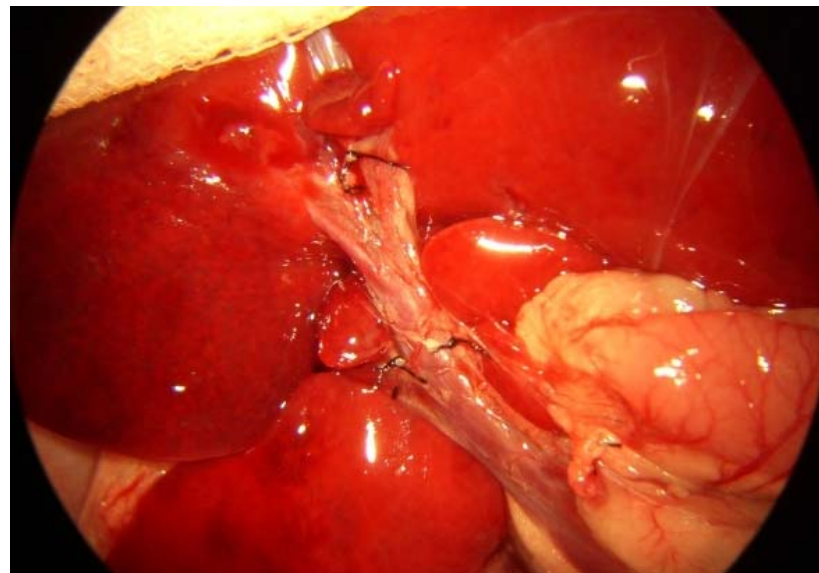
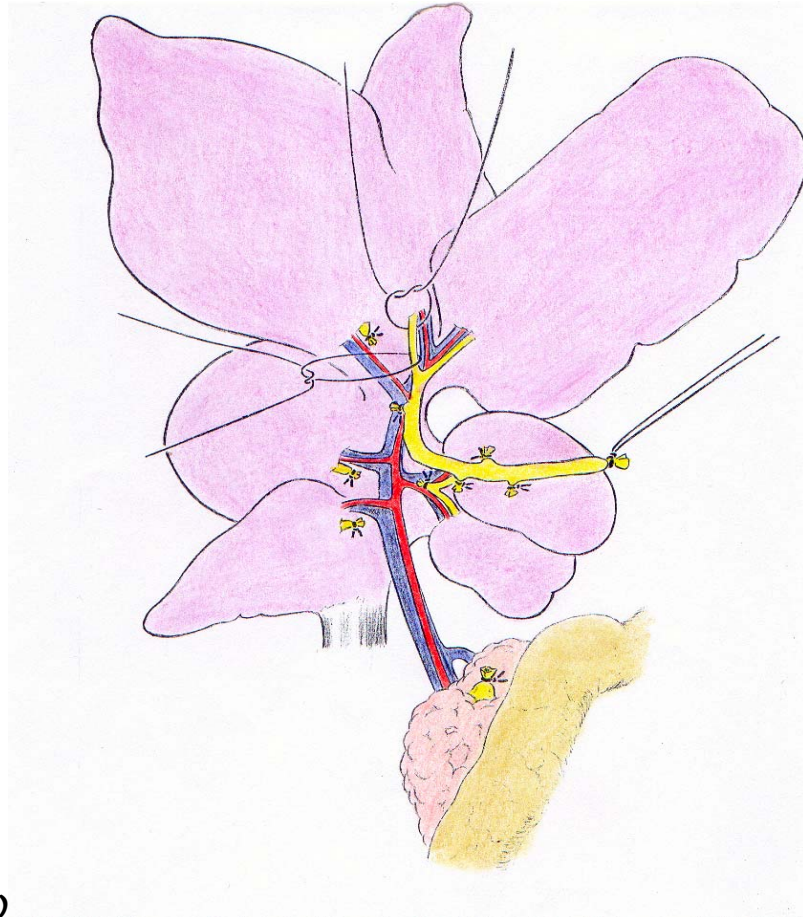
Seguidamente se reintegran las asas intestinales al interior de la cavidad abdominal y se procede al cierre del plano peritoneo-músculo-aponeurótico con sutura reabsorbible vycril<sup>®</sup> (polyglactin 910) de 4/0, y de la piel con sutura continua de seda de 4/0.

Por último se administra ceftriaxona por vía intramuscular profunda, a dosis única de 50 mg/kg, antes de la recuperación anestésica total de las ratas.

## **2.D. EVOLUCION POSTOPERATORIA**

Inmediatamente después de la intervención el animal es colocado de nuevo en su jaula, cerca de una fuente de calor. Durante la primera hora se restablece progresivamente la deambulacion.

Se administró vitamina K<sub>1</sub> (50 mg) por vía subcutánea una vez a la semana para prevenir las hemorragias secundarias a la insuficiencia hepática. ( Beck PL. Lee SS, 1995)



**Figura 11.**

**(a)** *Disección y ligadura de los conductos biliares que drenan el LM.*

**(b)** *Vía biliar extrahepática completamente reseca.*

## **2.E. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES**

Los animales supervivientes en cada serie fueron sacrificados por exanguinación a las 6 semanas del post-operatorio.

### **2.E.1. Técnica de necropsia**

Antes de proceder a la anestesia y sacrificio de los animales se determinó su peso corporal (PC). La anestesia se realizó de nuevo vía intramuscular profunda, utilizando la mezcla anestésica de Clorhidrato de Ketamina y Xilacina (Waynfonth H.B. y cols ,1992) a las siguientes dosis:

- Clorhidrato de Ketamina..... 40 mg/kg
- Xilacina ..... 6 mg/kg

Tras colocar a la rata en decúbito supino se realizó una laparotomía xifopubiana y mediante estudio macroscópico de la cavidad abdominal, se valoró la existencia de circulación colateral, tanto porto-sistémica como porto-hepática, y la existencia de vasculopatía venosa mesentérica (VVM).

### **2.E.2. Técnica de estudio de la circulación portosistémica**

Para comprobar el desarrollo de circulación colateral se realizó una laparotomía media con extensión bilateral subcostal, estudiando posteriormente la presencia de venas colaterales en aquellas áreas donde se desarrolla habitualmente circulación colateral venosa, es decir, en las áreas esplenorenal superior (ERS) esplenorenal inferior (ERI), gastroesofágica (colaterales paraesofágicas)(PE), y colorectal (hemorroidal o colateral pararectal)(PR).

### **2.E.3. Técnica de estudio de la vasculopatía venosa mesentérica**

La presencia de dilatación y tortuosidad de las ramas de la vena mesentérica superior se denomina vasculopatía venosa mesentérica (VVM). Se consideran 3 grados de VVM. (Aller y cols, 2002):

- Grado 0: ramas de la vena mesentérica superior de apariencia normal.
- Grado I: dichas ramas presentan dilatación y tortuosidad secundaria al clampaje de la vena mesentérica superior.
- Grado II: la dilatación y tortuosidad de las ramas de la vena mesentérica superior son espontáneas.

Para su estudio, se extrajeron parcialmente las asas intestinales, situando el árbol mesentérico por su región ileocecal, donde se visualizaron con facilidad las ramas de la vena mesentérica superior.

### **2.E.4. Técnica de extracción sanguínea**

Las muestras sanguíneas fueron extraídas mediante punción en la vena cava inferior infrahepática (VCI-IH), obteniéndose entre 5 y 8 ml de sangre de cada animal. Esta maniobra deja al animal exangüe, muriendo por shock hipovolémico. Para la extracción de la misma se utilizaron jeringuillas heparinizadas con heparina al 1% ( Rovi<sup>®</sup> ).

Después de 15 minutos de centrifugación a 3500 rpm. se separa el sobrenadante y se transfiere a tubos de polipropileno estériles. Este suero fue congelado en nitrógeno líquido a -196°C y posteriormente almacenado en un congelador a - 80°C.

### **2.E.5. Recogida de muestras histológicas**

#### **2.E.5.a. Extracción de muestras de íleon**

Se obtuvo una muestra de íleon terminal, a 1 cm de la unión ileocecal, se eliminó su contenido intraluminal, se pesó en una balanza de precisión y a continuación se introdujo en tubos Eppendorf. Se

congeló inmediatamente en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  y posteriormente fue almacenado en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su estudio posterior.

#### **2.E.5.b. Extracción del Complejo Linfático Mesentérico Superior**

Los ganglios que componen el Complejo Linfático Mesentérico Superior (CLMS) en la rata (Olds y cols, 1979; Gautreaux y cols, 1994) se extirparon y se pesaron, y a continuación se congelaron en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  dentro de tubos Eppendorf. Posteriormente, se almacenaron en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su estudio posterior.

#### **2.E.5 c. Extracción esplénica**

Se extrajo el bazo y se determinó su peso. Se tomó una muestra que se introdujo en un tubo Eppendorf, que se conservó en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  y, posteriormente, en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su estudio posterior.

#### **2.E.5.d. Extracción del parénquima hepático**

Se procedió a la disección del hígado. Una vez extraído, se pesaron por separado sus lóbulos anteriores y posteriores, y se tomó una muestra del lóbulo medio derecho, que se transfirió a un tubo que contenía formol 10% para su posterior estudio histopatológico.

Otro fragmento de lóbulo medio derecho se introdujo en un tubo Eppendorf, que se congeló en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  y, posteriormente, en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su estudio posterior.

#### **2.E.6. Eliminación de los restos biológicos**

Una vez tomadas las muestras los restos de los animales y los tejidos desechados de las vísceras fueron depositadas en bolsas plásticas e introducidas en contenedores especiales.

La gestión de los restos biológicos (recogida, transporte y tratamiento de los mismos) se realizó a través de la empresa

CONSENUM, S. A. C/Rio Ebro, s/n. Polígono Industrial Finanzauto. Arganda del Rey (Madrid) que cumple con la normativa vigente: *Decreto 83/1999, de 3 junio, por el que se regulan las actividades de producción y gestión de los residuos biosanitarios y citotóxicos en la Comunidad de Madrid.*

## **2.F. TÉCNICAS ANALÍTICAS**

### **2.F.1 Determinación de la bilirrubina total y directa en suero**

*Método:*

Cuantitativo fotolorimétrico sobre muestra de plasma heparinizado.

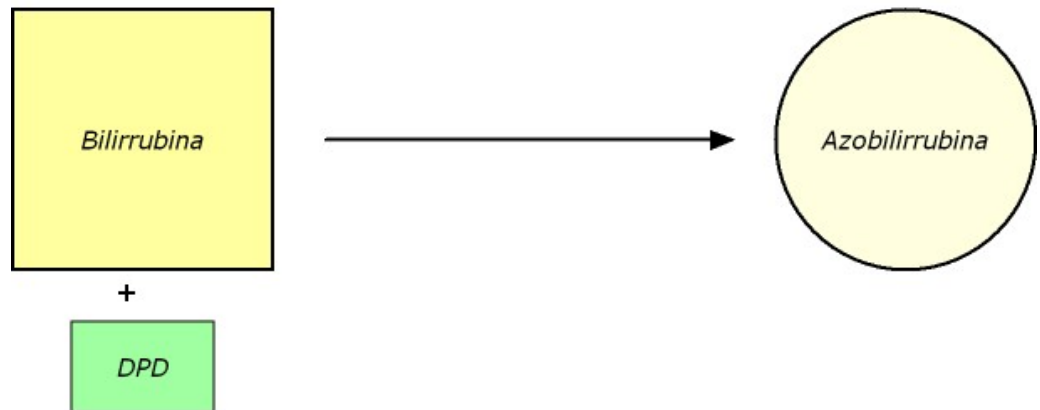
*Principio:*

Se utiliza una diazoreacción basada en el principio de Jendrassik y Gróf (Doumas y cols 1985). En medio ácido la bilirrubina conjugada reacciona con la sal DPD (Diclorofenil diazonio tetrafluoroborato ) para formar azobilirrubina (azopigmento). Esto es lo que se denomina bilirrubina directa (Figura 12).

Si a la muestra de plasma y reactivo añadimos una sustancia aceleradora (cafeína y agentes surfactantes) conseguimos que reaccione el total de la bilirrubina, denominando a la diferencia entre la total y la directa fracción indirecta ( no conjugada) (Figura 13).

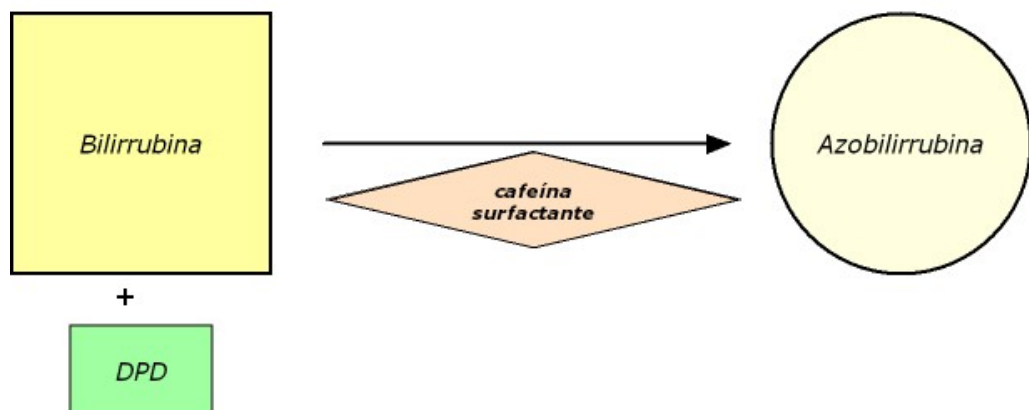
La concentración de bilirrubina presente en el plasma es proporcional a la concentración de azopigmento que se produce (Higgins y cols. 2006). Para la bilirrubina directa el aumento de la concentración de azopigmento produce un aumento proporcional de la absorbancia en la longitud de onda de 570nm, mientras que en el caso de la total la medida de la absorbancia se realiza en 540nm.

BILIRRUBINA DIRECTA (DPD )



**Figura 12.** Diazo-reacción de la bilirrubina conjugada de Jendrassik Gróf

BILIRRUBINA TOTAL (DPD )



**Figura 13.** Añadiendo sustancia aceleradora (cafeína y agentes surfactantes) conseguimos que reaccione el total de la bilirrubina.

**2.F.2. Determinación de alanin aminotransferasa (ALT) y de aspartato aminotransferasa (AST) en suero**

*Método:*

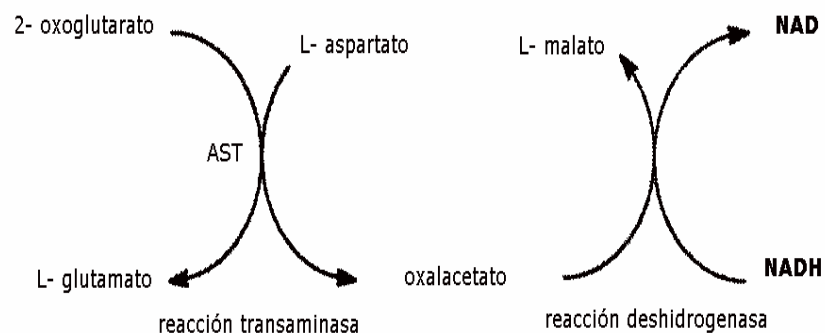
Test Cinético Espectrofotométrico de Ultravioleta Optimizado según estándar de la *International Federation for Clinical Chemistry (IFCC)*. Se realiza sobre una muestra de suero.

*Principio:*

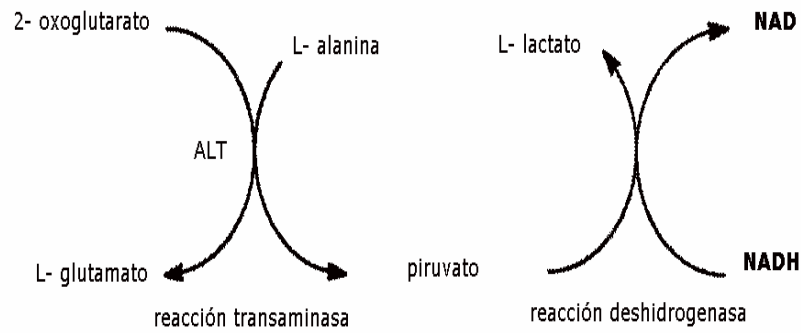
Se trata de unas enzimas que catalizan la reacción conversión de un aminoácido a un 2-oxoácido mediante la transferencia de grupos amino, actuando como coenzima el piridoxal-fostato (P5P). La actividad transaminasa se mide indirectamente cuantificando cambios en la concentración de NADH que ocurren en una reacción de dehidrogenación del 2-oxoácido al hidroxiaácido correspondiente.

La concentración de NADH se monitoriza mediante la absorbancia en la longitud de onda de 340nm. La disminución en la absorbancia por minuto ( $\Delta A / \text{min}$ ) es proporcional a los micromoles de sustrato transformado en ese periodo de tiempo, y por lo tanto, proporcional a la actividad de la transaminasa. (Figuras 14 y 15)

Debido a las diferencias entre laboratorios fue necesario realizar una estandarización de las medidas de actividad enzimática. Actualmente se utiliza el procedimiento de la IFCC. (Schuman y cols. 2002a, Schuman y cols. 2002b, Schuman y cols. 2006)



**Figura 14.** Reacción de dehidrogenación catalizada por la aspartato aminotransferasa (AST).



**Figura 15.** Reacción de deshidrogenación catalizada por la alanin aminotransferasa (ALT)

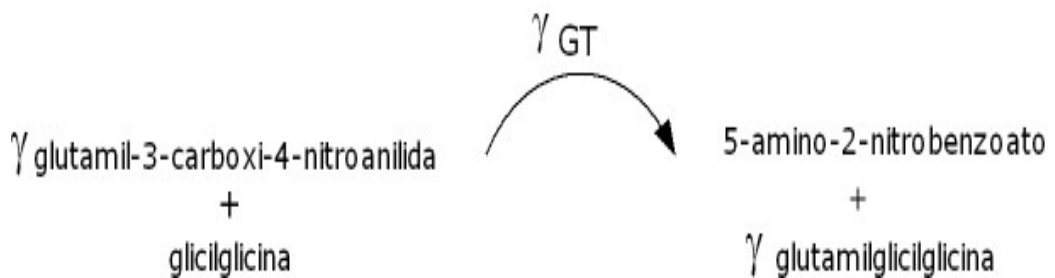
### 2.F.3. Determinación en suero de $\gamma$ glutamiltransferasa (GGT)

*Método:*

Cuantitativo fotocolorimétrico sobre muestra de suero.

*Principio:*

Se trata de una enzima que cataliza la transferencia de un grupo  $\gamma$ -glutamil de un substrato donante ( $\gamma$ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida) a un receptor (glicilglicina), dando lugar  $\gamma$ -glutamilglicilglicina y 5-amino-2-nitrobenzoato. El aumento de la concentración de éste último produce cambios en la absorbancia en una longitud de onda de 410 nm., siendo por tanto la misma directamente proporcional a la actividad enzimática de GGT. (Schuman y cols. 2002c) ( Panteghini M, 2006). (Figura 16)



**Figura 16.** Reacción de transferencia de un grupo  $\gamma$ -glutamil.

#### 2.F.4. Determinación de lactatodeshidrogenasa (LDH) en suero

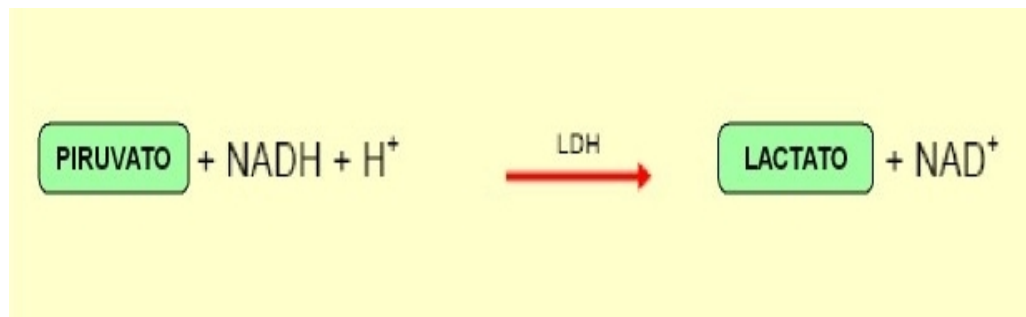
*Método:*

Test cinético espectrofotométrico de ultravioleta recomendado por el Comité Escandinavo de Enzimas (SCE).

*Principio:*

LDH es una enzima que cataliza la reacción de reducción del piruvato a lactato en un medio con pH neutro produciéndose en la misma una oxidación (consumo) de NADH. (Figura 17)

La concentración de NADH se monitoriza mediante la absorbancia en la longitud de onda de 340nm. La disminución en la absorbancia por minuto ( $\Delta A / \text{min}$ ) es proporcional a los micromoles de sustrato transformado en ese periodo de tiempo y por lo tanto proporcional a la actividad de la LDH. (*Scandinavian Committee on Enzymes, 1974*)



**Figura 17.** Reacción de reducción de piruvato a lactato.

#### 2.F.5 Determinación de fosfatasa alcalina (FA) en suero

*Método:*

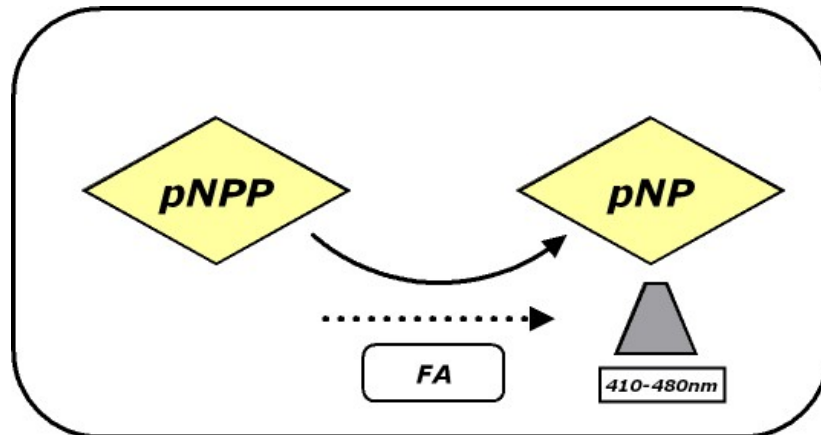
Test cinético fotolorimétrico según estándar de la *Internacional Federation for Clinical Chemistry (IFCC)*.

*Principio:*

La actividad enzimática de la fosfatasa alcalina (FA) se determina midiendo el grado de conversión del reactivo p-nitro-fenilfosfato (pNPP) a p-nitrofenol (pNP) en presencia de 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) como aceptor de fosfato. La reacción se desarrolla en

presencia de iones de  $Mg^{2+}$  y de  $Zn^{2+}$  manteniendo el pH a 10,4. (Figura 18)

La concentración de pNP se determina por cambios en la absorbancia en el espectro de 410 y 480 nm de longitud de onda (Tietz y cols. 1983) ( Panteghini, 2006).



**Figura 18.** Reacción de conversión del *p*-nitro-fenilfosfato (pNPP) a *p*-nitrofenol (pNP)

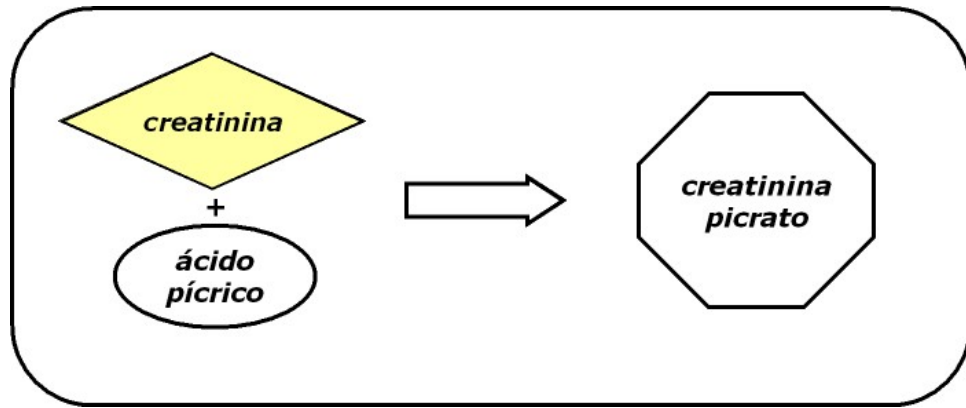
## 2. F.6. Determinación de creatinina en suero

*Método:*

Test químico cinético fotocolorimétrico en suero.

*Principio:*

Reacción de Jaffé. La creatinina en un medio alcalino reacciona con el ácido pícrico formando un producto de color amarillo-naranja que es visible en el espectro de longitud de onda de 520/800 nm. (Figura 19) La velocidad de cambio en la absorbancia es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. (Folin, 1904; Cook, 1971; Larsen , 1972; Lamb y cols 2006).



**Figura 19.** Reacción de Jaffé.

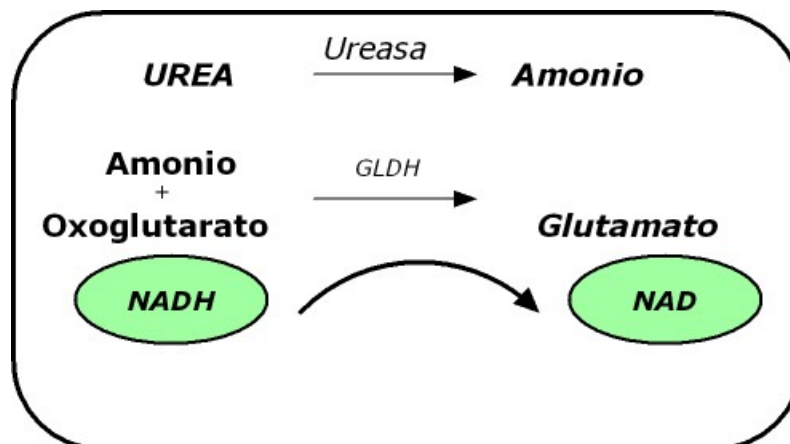
### 2.F.7. Determinación de urea en suero

*Método:*

Test enzimático cinético por espectrofotometría ultravioleta en suero.

*Principio:*

La urea es hidrolizada en presencia de agua y de ureasa dando lugar a un ión amonio y dióxido de carbono. El amonio producido en ésta primera reacción reacciona con 2-oxoglutarato y NADH dando lugar a glutamato y NAD<sup>+</sup> en presencia de GLDH. (Figura 20) El descenso en la concentración de NADH produce una disminución en la absorbancia por unidad de tiempo en la longitud de onda de 340 nm, que es proporcional a la concentración de urea. (Sampson y cols 1980 ; Lamb y cols 2006)



**Figura 20.** El amonio producto de la hidrólisis de la urea produce un descenso en la concentración de NADH.

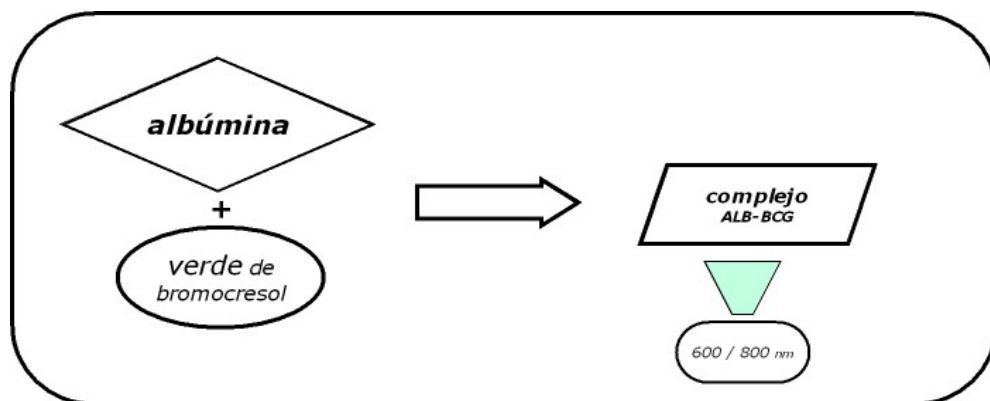
### 2.F.8. Determinación de albúmina sérica

*Método:*

Test fotocolorimétrico en suero.

*Principio:*

El reactivo verde de bromocresol reacciona con la albúmina formando un complejo de color verde. (Figura 21) Este complejo presenta absorbancia en 600/800nm. y por lo tanto los cambios en la misma son proporcionales a la concentración de albúmina en la muestra. (Dumas, 1971)



**Figura 21.** Reacción del verde de bromocresol con la albúmina para formar un complejo de color verde.

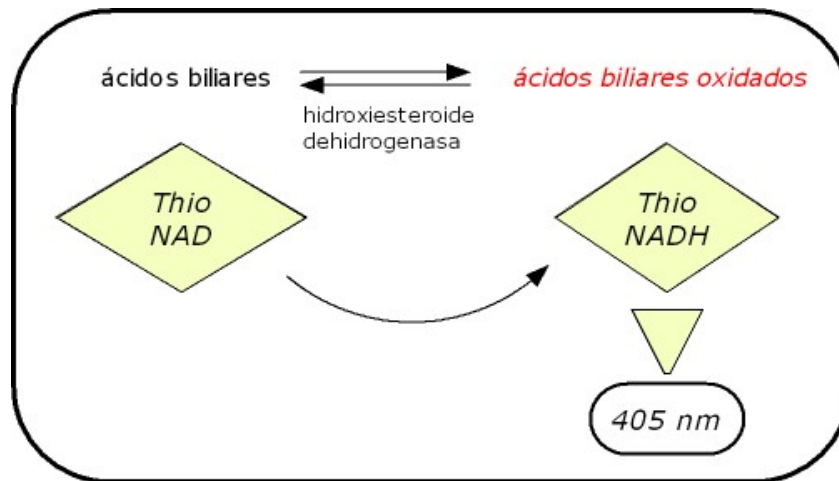
### 2.F.9. Determinación de ácidos biliares en suero

*Método:*

Test cinético fotocolorimétrico enzimático en suero.

*Principio:*

En una primera reacción los ácidos biliares son oxidados por la enzima 3- $\alpha$  hidroxisteroide dehidrogenasa, con la subsiguiente reducción del Thio-NAD a Thio-NADH. (Figura 22) La tasa de formación de éste último se determina midiendo los cambios en la absorbancia específica en 405 nm.



**Figura 22.** Oxidación de los ácidos biliares con la formación de Thio-NADH

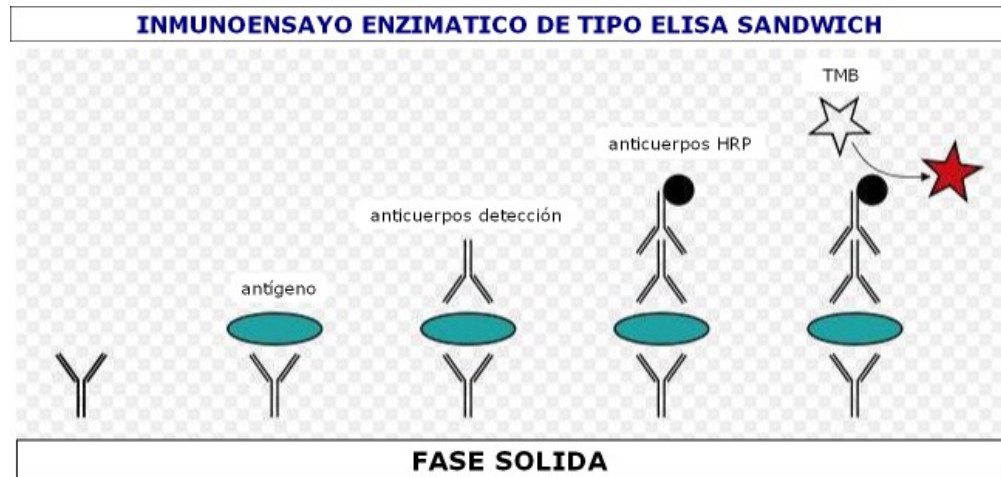
### 2.F.10. Determinación de Tiostatina o Proteína mayor ácida $\alpha 1$ ( $\alpha 1$ -MAP) en suero

*Método:*

Inmunoensayo enzimático tipo "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) en suero.

*Principio:*

Se añade la muestra de suero con el antígeno (Tiostatina de rata) a, una fase sólida (placa de microtitulación) a la que están unidos de forma inespecífica anticuerpos purificados frente a dicho antígeno (anticuerpos de captura). A continuación se lava la placa, y se añade una dilución que contiene anticuerpos específicos frente a  $\alpha 1$ -MAP (anticuerpos de detección). Se lava de nuevo, eliminando los anticuerpos no unidos, y se añaden anticuerpos marcados con la enzima "horseadish preoxidasa" (HRP). Entonces se forma un "sándwich" de fase sólida constituido por Anticuerpo-Antígeno-Anticuerpos-Enzima. A continuación se añade 3,3, 5,5 tetrametilbencidina (TMB) que actúa como sustrato de una reacción que cataliza la HRP y con la formación de un producto químico, que se determina mediante espectrofotometría a 405nm. (Figura 23) La cantidad del mismo es proporcional a la cantidad de antígeno (Tiostatina de rata) en la muestra.



**Figura 23.** Formación de un "sándwich" de fase sólida constituido por Anticuerpo-Antígeno-Anticuerpos-Enzima.

### 2.F.11. Determinación de Glicoproteína ácida $\alpha 1$ ( $\alpha 1$ -AGP) en suero

*Método:*

Inmunoensayo enzimático tipo "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) en suero.

*Principio:*

Es similar al descrito en el apartado anterior. En este caso el producto resultante se determina mediante espectrofotometría a 450nm., siendo la cantidad del mismo proporcional a la cantidad de antígeno ( $\alpha 1$ -AGP de rata) en la muestra.

### 2.F.12. Determinación de los niveles de proteínas en la mucosa-submucosa íleon y en el complejo linfático mesentérico superior

*Método:*

Químico espectrofotométrico. Se prepara una solución patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) a una concentración de 1 mg/ml en PBS. Posteriormente, se añaden a las cubetas de lectura del espectrofotómetro 2, 4, 8, 12, 16, 20  $\mu$ l de dicha solución, y se llevan a un volumen final de 800 $\mu$ l de PBS (es decir, añadiremos 798, 796, 792, 788, 784 y 780  $\mu$ l de PBS). Añadimos a todas las cubetas 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford (BIO-RAD Protein Assay) y dejamos actuar 5

minutos. Posteriormente, se procede a la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro Ultrospect III (Pharmacia) a 595 nm., calibrándolo en blanco sin proteína, que contiene 800 µl de PBS y 200 µl de reactivo de Bradford, y se realiza la curva patrón.

Para calcular la cantidad de proteína de las muestras de complejo linfático mesentérico superior (CLMS) e íleon, fue necesario hacer una dilución 1/10 en PBS, porque al estar muy concentradas, quedaban fuera de la curva patrón. Se extrapoló el valor de la absorbancia obtenida de la muestra problema sobre la curva patrón, y así se obtuvo la concentración de proteínas. Todas las muestras se valoraron como mínimo dos veces, y posteriormente se realizó la media aritmética de los valores obtenidos.

*Principio:*

La cantidad de proteínas presente en ambas muestras se cuantificó mediante el método Bradford, que está basado en los cambios de color que sufre el reactivo Bradford (Azul de Coomassie) cuando se une a residuos de proteínas, concretamente a aminoácidos básicos (principalmente arginina) y a aminoácidos aromáticos.

**2.F.13. Determinación de los niveles de Proteasa II (RMCP-II) en la mucosa-submucosa de íleon y en el complejo linfático mesentérico superior.**

*Método:*

La determinación se realiza mediante la técnica de inmunoensayo enzimático de tipo " *enzyme-linked immunosorbent assay* " (ELISA), utilizando el kit comercial *Rat Mast Cell Protease II (RMPC II) ELISA Test Kit* (Moredun Scientific Limited; Ref. MS- RM2).

Las muestras de tejido se introducen en tubos de propileno de 50ml que contienen una solución tampón de lisis estéril a 4° C (PBS-Tween 20 al 0,05%) a razón de 250 µl tampón por cada 0,5g de tejido. Posteriormente se realiza homogeneización mediante un dispositivo eléctrico durante 30 segundos. Una vez homogeneizadas se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido. El proceso de homogeneizado se repite 3 veces. A continuación las muestras son "sonicadas" 5 veces,

extrayéndose un sobrenadante que se conserva a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la determinación cuantitativa de las concentraciones de quimasa en el mismo.

*Principio:*

Es similar al descrito en apartados anteriores. En este caso el producto resultante se determina mediante espectrofotometría a 450nm. La concentración de RMCP-II se cuantificó por extrapolación de los valores obtenidos sobre la curva patrón de RMPC-II. La concentración final de RMPC-II se expresó como  $\mu\text{g}$  de RMPC-II por mg de proteína de la muestra. Se midió la concentración de proteína en la muestra mediante la técnica de Bradford, utilizando albúmina bovina como estándar.

**2.F.14. Determinación de los niveles de citoquinas en hígado, ileón, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos**

*Método:*

La determinación se realiza mediante la técnica de inmunoensayo enzimático de tipo " *enzyme-linked immunosorbent assay* " (ELISA), utilizando kits comerciales específicos para rata (BioNOVA Científica Ltd., Madrid, España).

*Homogeneización de los tejidos:*

Las muestras de tejido congelado se introdujeron en tubos de polipropileno (Falcon; Becton Dickinson, Lincoln Park, Estados Unidos) que contenían tampón de lisis a  $4^{\circ}\text{C}$  (10 ml de tampón/g de tejido). El tampón de lisis contiene fenilmetilsulfonil flúor (PMSF; Sigma Chemical Company), pepstatina A  $1\ \mu\text{g/ml}$  (Sigma Chemical Company), aprotinina (Sigma Chemical Company), antipaína (Sigma Chemical Company) y leuceptina en tampón fosfato a pH 7,2 con el 0,05% de azida sódica.

Las muestras se homogeneizaron 3 veces durante 30 s con un homogeneizador eléctrico (Polytron; Brinkmann Instruments, Westminster, Estados Unidos) a máxima velocidad.

Las muestras a continuación son "sonicadas" 5 veces, y se congela el sobrenadante a  $-80^{\circ}\text{C}$  para permitir la formación de agregados

macromoleculares. Tras su descongelación a 4° C se centrifugaron a 3.000 rpm. y se midió el volumen final de homogeneizado con una pipeta graduada.

Los homogeneizados se almacenaron a – 80 °C hasta la realización de la determinación cuantitativa de las citoquinas.

*Principio:*

Es similar al descrito en apartados anteriores. En este caso el producto resultante se determina mediante espectrofotometría

## **2.G. ESTUDIO MICROSCÓPICO E HISTOPATOLÓGICO**

Para su estudio histopatológico, se procesaron las muestras mediante técnicas de rutina para microscopía óptica:

### **2.G.1.Fijación**

La fijación de los tejidos es imprescindible para que las estructuras tisulares y celulares se preserven intactas, evitando así que los procesos autolíticos *postmortem* las modifiquen. Para ello los tejidos se introdujeron inmediatamente después de su extracción en formol tamponado al 10%, que tiene una penetración relativamente rápida en los mismos. El tiempo de fijación para este reactivo es de 12 a 24 horas.

### **2.G.2. Inclusión**

Tras el tallado macroscópico de los órganos, las piezas seleccionadas se incluyeron en parafina mediante un sistema automático, con temperatura y vacío controlado por ordenador (Histomatic 166 MP, Fisher).

Inicialmente las piezas se sumergen en una cubeta con agua destilada.

Dado que la parafina no es soluble en agua, previamente a la inclusión hay que deshidratar el tejido para que ésta pueda penetrar en el mismo. Durante este proceso de deshidratación progresiva, se

pasan las muestras por cubetas que contienen concentraciones crecientes de alcohol etílico: primero al 70%, después al 96% y por último alcohol absoluto (100%). El tejido se sumerge en cada cubeta 3 veces, durante 10 minutos cada vez, pasando después a la siguiente cubeta y repitiendo este proceso.

A continuación, se realiza el aclarado, que es un paso necesario para que se pueda incluir el tejido en parafina, ya que ésta tampoco es soluble en alcohol. El agente utilizado fue el xilol, debido a su rápida acción. De esta forma, se sustituye el alcohol etílico (deshidratante) por xilol (sustancia miscible con la parafina), para que la parafina se pueda disolver y penetrar en el tejido.

En la estación de inclusión, se procedió a la obtención de los bloques de parafina sólidos con la pieza de tejido en su interior. Para ello, se impregna el material en parafina blanda a 46°C durante 1 hora, tiempo tras el cual se realiza un segundo baño en parafina dura a 58°C durante 1 hora. Por último, se coloca la muestra en una cubeta, se vierte la parafina dura fundida en su interior, y se enfría en hielo.

### **2.G.3 Procesado de los cortes**

Se efectúa el corte con microtomo de parafina tipo Minot (Microm), obteniéndose secciones de 4 a 7  $\mu\text{m}$  de grosor. A continuación las secciones identificadas se pegan en un portaobjetos y se someten a un proceso de desparafinado. Para esto último se introducen en una estufa durante 30 min. a 60° y se somete a las preparaciones a tres baños de 3 a 5 minutos en xilol. Posteriormente para que los colorantes puedan actuar debemos rehidratar de forma progresiva mediante pases de 3 a 5 minutos en concentraciones decrecientes de alcohol (Absoluto, 96% y 70%) y finalmente en agua destilada.

### **2.G.4. Tinción**

Se llevó a cabo la tinción con las siguientes técnicas: Hematoxilina-Eosina, Giemsa y Rojo Sirio. Los protocolos para las mismas se indican a continuación:

#### **2.G.4.a Hematoxilina-Eosina**

Es una tinción general que nos proporciona una visión global de las estructuras tisulares. En general aplicada a células animales, los núcleos se tiñen de azul y el citoplasma se tiñe de rosa o rojo.

Los portaobjetos con las secciones desparafinadas se sumergieron en hematoxilina de Harris durante 10 minutos, y después se lavaron en agua destilada durante otros 10 minutos. A continuación se sumergieron en eosina unos segundos, se lavaron con agua destilada de nuevo, y se procedió a su deshidratación en alcoholes y montaje. Por último se realiza el montaje en permaslip.

#### **2.G. 4. b. Giemsa**

Esta tinción se ha utilizado para determinar la densidad y la degranulación de las células cebadas presentes en el hígado, íleon y ganglios linfáticos mesentéricos.

Los portaobjetos con las secciones desparafinadas y rehidratadas se introducen en solución solución Giemsa al 20 % durante 45 minutos. A continuación se procede a su lavado con agua corriente durante 5 a 10 minutos y se deshidrata rápidamente mediante 2 pases rápidos en alcohol 70° y, 2 pases en alcohol de 96°. Se introduce en alcohol isopropílico. Se aclara en xilol y por último se realiza el montaje en permaslip.

#### **2.G.4. c. Rojo-Sirio**

Se utiliza para detectar la presencia de fibras de colágeno en un determinado tejido. Es probable que los grupos ácido sulfónico del F3BA interaccionen a ese PH con los grupos amino de los aminoácidos (grupos básicos) de lisina e hidroxiprolina de la molécula de colágeno.

El procedimiento es el siguiente:

Los portaobjetos con las secciones desparafinadas y rehidratadas se introducen en solución Rojo-Sirio durante 30 minutos. A continuación se aclara con agua durante 5 minutos. Se deshidrata rápidamente mediante 2 pases de dos minutos aproximadamente en alcohol

absoluto. Se aclaran con xilol mediante 2 pases de dos minutos cada uno y finalmente se realiza el montaje en permaslip.

#### **2.G. 5. Montaje**

Se procede a su montaje de las preparaciones colocando una gota del medio de montaje (bálsamo de Canadá o un medio sintético) sobre la sección tisular, apoyando y presionando sobre éste el cubreobjetos para eliminar las burbujas. Por último, se limpia el medio de montaje excedente y se deja secar.

#### **2.G.6. Estudio histomorfométrico de fibrosis en el parénquima hepático con tinción de Rojo Sirio**

Para valorar el grado de fibrosis en el tejido hepático se utilizó un sistema de análisis de imagen que cuantifica el colágeno del mismo midiendo en secciones histológicas el área teñida con Rojo Sirio.

Las imágenes microscópicas se captaron con una cámara Leica DC 300 acoplada a un microscopio Leica DM 5000B con pletina motorizada. Se digitalizó un área mínima de 15 mm<sup>2</sup> de tejido mediante la captación secuencial y automática de imágenes microscópicas obtenidas con el objetivo 10x. Para cuantificar el área teñida por el Rojo Sirio respecto al área total del tejido hepático se utilizó el software Leica Qwin. En ésta aplicación informática se desarrolló un procedimiento o rutina que incluyó la segmentación de cada una de las imágenes con el fin de obtener el área teñida por Rojo Sirio en valores numéricos. Así comparando el valor numérico del área teñida con Rojo Sirio respecto al valor numérico del área total analizada se obtiene el porcentaje de área ocupada por fibrosis del tejido hepático.

Una vez cuantificadas las áreas de la sección hepática teñidas con Rojo Sirio se crearon archivos con los resultados de los grupos de animales pseudoperados y de los animales CME para su posterior análisis estadístico.

## 2.H. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

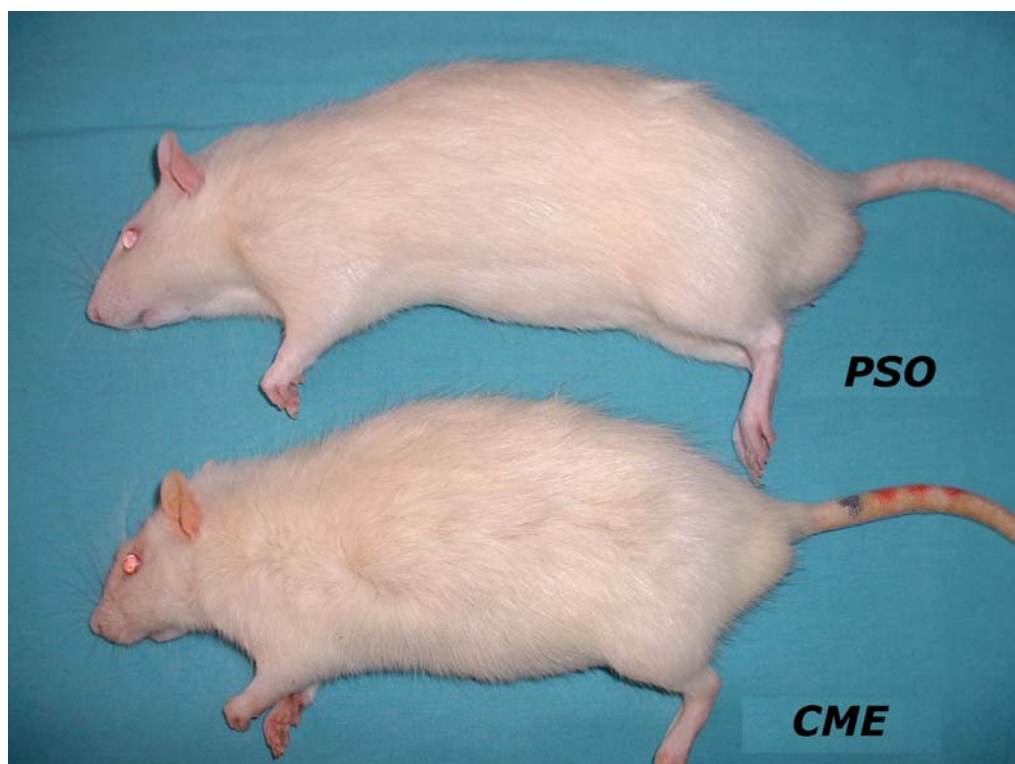
Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó la aplicación informática SPSS versión:15.0 para Windows® (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

En primer lugar, se realizó un estudio descriptivo de los resultados obtenidos, expresándolos mediante una medida de centralización (media aritmética) y una medida de dispersión (desviación estándar) ( $\bar{x} \pm DE$ ). Para la comparación de las variables cuantitativas entre los diferentes grupos de animales se utilizó el test de la t de Student para muestras independientes. Previamente, se había comprobado que las variables estudiadas se ajustaban a una distribución Normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , y  $p < 0,001$ .

## *IV. RESULTADOS*

## 1. SUPERVIVENCIA Y COMPLICACIONES POSTOPERATORIAS

De todos los animales que formaron parte del diseño experimental sobrevivieron 76 a las seis semanas del postoperatorio, 32 fueron pseudo-operados (PSO) y 44 con colestasis microquirúrgica extrahepática (CME). Los animales con CME presentaban ictericia y coluria intensas, así como acolia moderada (Figura 24).



**Figura 24** . Fotografía comparativa entre una rata del grupo Pseudo-operada (PSO) y otra del grupo con Colestasis (CME) al final del período de estudio, en la cual se observa la ictericia cutánea , en particular en las orejas , las extremidades y la cola.

## 2. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL

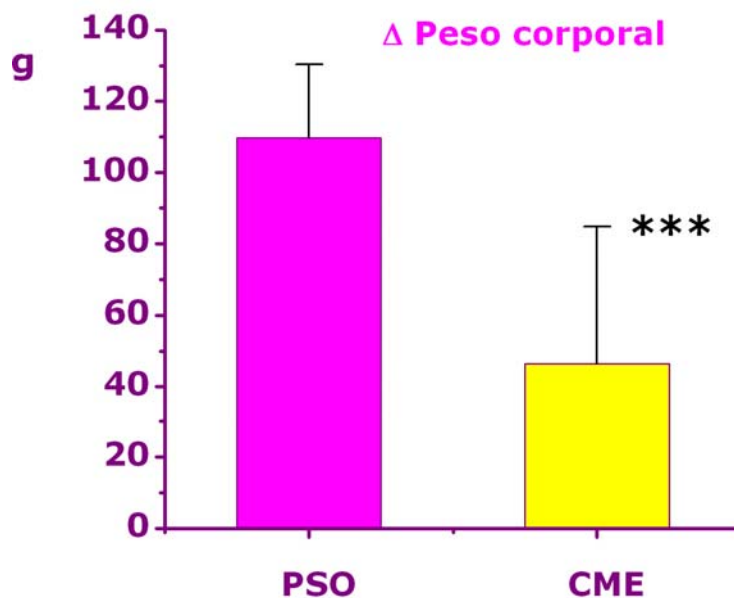
Los resultados correspondientes al peso corporal de los animales, tanto al inicio como al final del estudio, así como el incremento de peso corporal, se representan en la Tabla I. El incremento del peso corporal al final del período evolutivo es menor en las ratas del grupo CME que en las del grupo PSO (Tabla I) (Figura 25).

**Tabla I.** Peso corporal inicial (PCI;g), peso corporal final (PCF;g), e incremento de peso corporal ( $\Delta$  peso; g) en ratas pseudos-operadas (PSO), y con colestasis microquirúrgica extrahepática (CME).

Grupo	PCI	PCF	$\Delta$ Peso
<b>PSO</b> (n = 32)	<b>261,31</b> ± <b>17,15</b>	<b>371,07</b> ± <b>25,23</b>	<b>109,76</b> ± <b>20,56</b>
<b>CME</b> (n = 44)	<b>250,31</b> ± <b>29,91</b>	<b>296,71</b> ± <b>46,00</b>	<b>46,39 ***</b> ± <b>38,42</b>

$x \pm DE$

\*\*\*:  $p < 0,001$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO



**Figura 25.** El incremento del peso corporal ( $\Delta$  Peso) es menor en los animales con CME respecto a los animales del grupo PSO con un nivel de significación estadística del 99,9% (\*\*\*:  $p < 0,001$ ).

### 3. EVOLUCION DEL PESO HEPATICO

Se observa un aumento ( $p < 0,001$ ) del peso hepático en los animales con colestasis ( $14,01 \pm 3,35$ ) en relación a los animales pseudos-operados ( $11,72 \pm 1,31$ ) (Tabla II) (Figura 26).

La relación entre el peso hepático y el peso corporal final muestra un aumento ( $p < 0,001$ ) en los animales con CME ( $3,15 \pm 0,29$ ) respecto a los pseudos-operados ( $4,72 \pm 0,83$ ) (Tabla II) (Figuras 26)

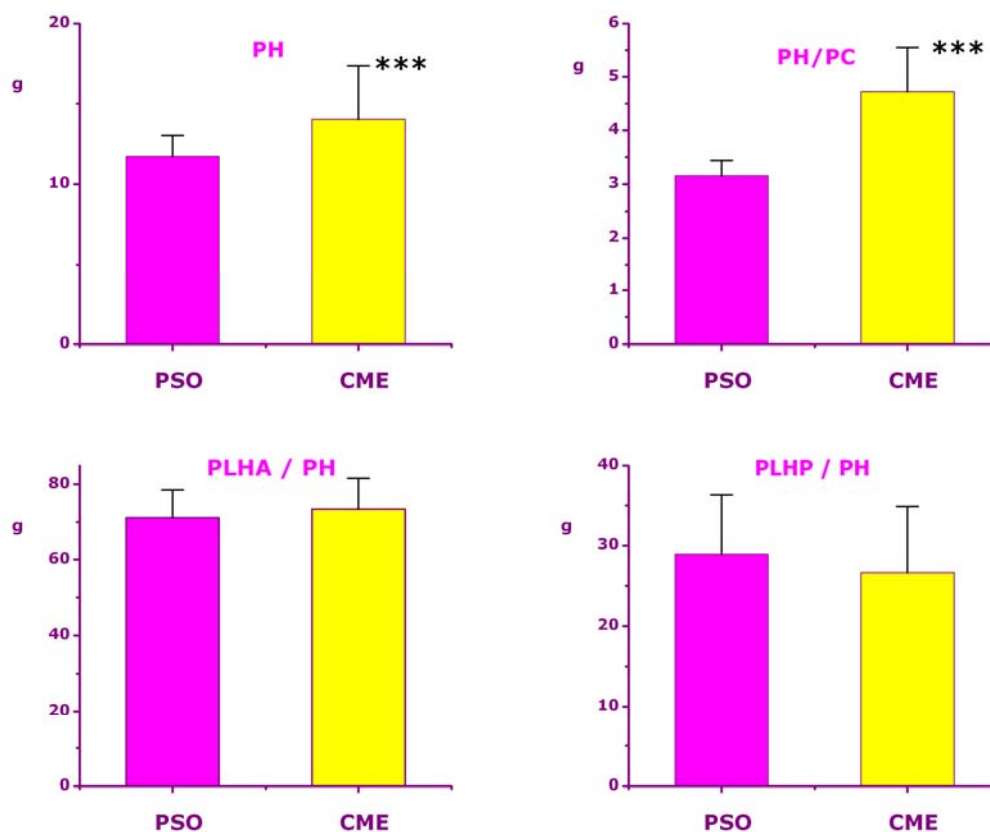
Sin embargo en lo que se refiere a la contribución al peso hepático total por parte de los lóbulos anteriores (LM + LLI) y posteriores (LLD + LC) (Figura 6) no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Tabla II) (Figuras 26 y 27).

**Tabla II.** Peso hepático (PH;g), Relación peso hepático / peso corporal x 100 (PH/PC; %), Relación peso lóbulos hepáticos anteriores / peso hepático x 100 (PLHA/PH; %), Relación peso lóbulos hepáticos posteriores / peso hepático x 100 (PLHP/PH; %), Relación peso lóbulos hepáticos posteriores / peso lóbulos hepáticos anteriores x 100 (PLHP/PLHA; %), en ratas pseudo-operadas (PSO), y con colestasis microquirúrgica extrahepática (CME).

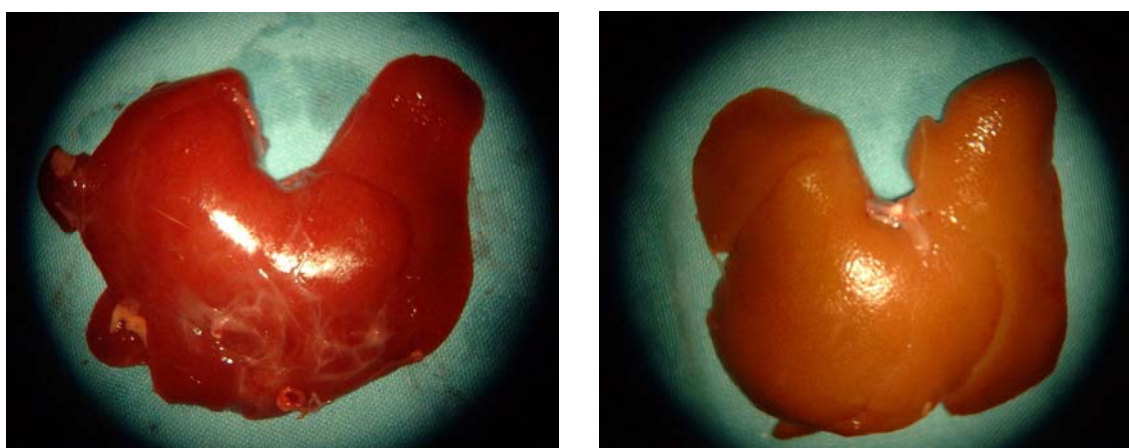
Grupo	PH	PH/PC (%)	PLHA/PH (%)	PLHP/PH (%)	PLHP/PLHA (%)
<b>PSO</b> (n= 32)	<b>11,72</b>	<b>3,15</b>	<b>71,10</b>	<b>28,90</b>	<b>42,02</b>
	$\pm$ <b>1,31</b>	$\pm$ <b>0,29</b>	$\pm$ <b>7,45</b>	$\pm$ <b>7,45</b>	$\pm$ <b>13,70</b>
<b>CME</b> (n = 44)	<b>14,01***</b>	<b>4,72***</b>	<b>73,38</b>	<b>26,62</b>	<b>38,04</b>
	$\pm$ <b>3,35</b>	$\pm$ <b>0,83</b>	$\pm$ <b>8,25</b>	$\pm$ <b>8,25</b>	$\pm$ <b>16,20</b>

$x \pm DE$

\*\*\*:  $p < 0,001$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo I



**Figura 26.** En los animales colestásicos (CME) se produce un aumento del peso hepático (PH) y de la relación de éste con el peso corporal (PH/PC) respecto a los animales del grupo pseudo-operado (PSO) con un nivel de significación estadística del 99,9% (\*\*\*: $p < 0,001$ ). En lo que se refiere a la contribución de los lóbulos anteriores y posteriores al PH no se observan diferencias.



(A)

(B)

**Figura 27.** Fotografía comparativa del aspecto macroscópico del hígado en una ratona del grupo de pseudo-operadas (A), y otra del grupo con colestasis (B). Se aprecia hepatomegalia, ictericia y aumento de la consistencia en el hígado colestásico.

#### 4. EVOLUCION DEL PESO ESPLÉNICO

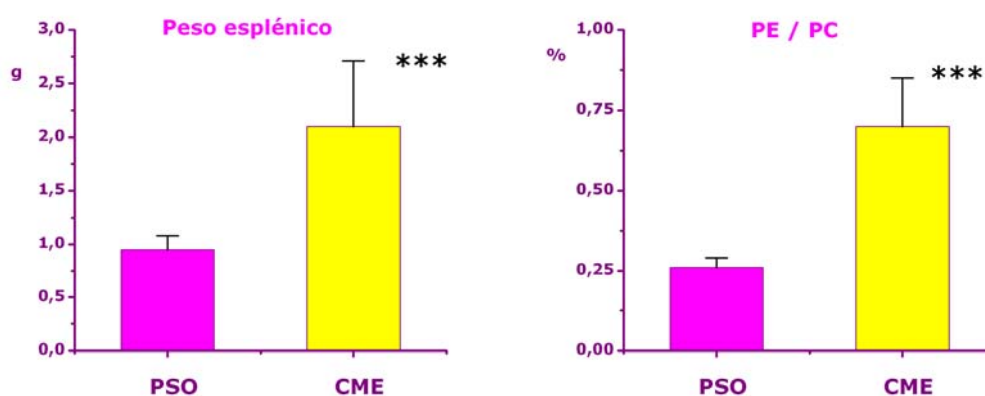
Todos los animales con colestasis mostraron esplenomegalia (Tabla III ) (Figuras 28 y 29). Igualmente la relación PE/ PC es mayor ( $p < 0,001$ ) en los animales colestásicos respecto a los pseudo-operados (Tabla 3) (Figura 28).

**Tabla III.** Peso esplénico (PE;g), Relación peso esplénico / peso corporal x 100 (PE/PC; %) en ratas pseudo-operadas (PSO), y con colestasis microquirúrgica extrahepática (CME).

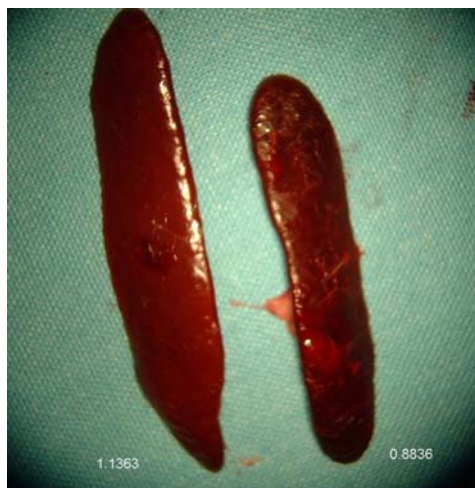
Grupo	PE	PE/PC(%)
<b>PSO</b> (n = 32)	<b>0,95</b> ± <b>0,13</b>	<b>0,26</b> ± <b>0,03</b>
<b>CME</b> (n = 44)	<b>2,10 ***</b> ± <b>0,61</b>	<b>0,70 ***</b> ± <b>0,15</b>

$x \pm DE$

\*:  $p < 0,001$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.



**Figura 28.** El peso esplénico (PE) y la relación del peso esplénico / peso corporal x 100 (PE/PC; %) es mayor en las ratas del grupo CME que en las del grupo PSO con un nivel de confianza del 99,9% (\*\*\*:  $p < 0,001$ ).



**Figura 29.** Fotografía comparativa del tamaño de un bazo de una rata con CME (peso de 1,13 g) y de otra pseudo-operada (peso 0,88g).

## 5. EVOLUCION DEL PESO TESTICULAR

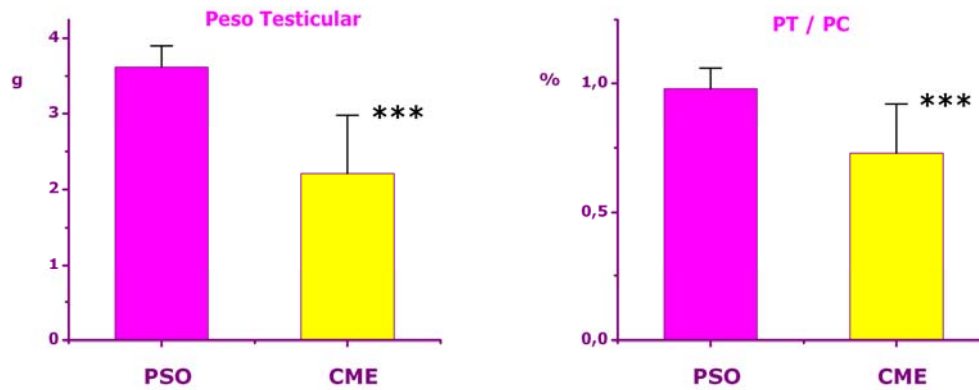
Se observa una disminución del peso testicular total (bilateral) y de la relación entre el peso testicular total (bilateral) y el peso corporal final en el grupo de animales con CME en relación a los animales pseudos-operados (Tabla IV) (Figuras 30 y 31).

**Tabla IV.** Peso testicular bilateral (PT;g), Relación peso testicular / peso corporal x 100 (PT/PC; %) en ratas pseudo-operadas (PSO), y con colestasis microquirúrgica extrahepática (CME).

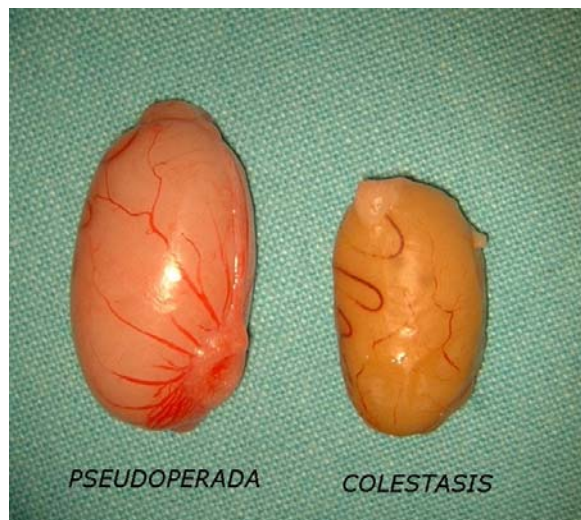
Grupo	PT	PT/PC(%)
<b>PSO</b> (n = 32)	<b>3,62</b> ± <b>0,28</b>	<b>0,98</b> ± <b>0,08</b>
<b>CME</b> (n = 44)	<b>2,21 ***</b> ± <b>0,77</b>	<b>0,73 ***</b> ± <b>0,19</b>

x ± DE

\*\*\*: P<0,001: valor estadísticamente significativo respecto al grupo I



**Figura 30.** El peso testicular y la relación del peso testicular / peso corporal x 100 (PT/PC; %) es menor en las ratas del grupo CME que las del grupo PSO con un nivel de confianza estadístico del 99,9% (\*:  $p < 0,001$ ).



**Figura 31.** Imagen comparativa del tamaño testicular en una rata del grupo de CME y otra del grupo Pseudo-operadas (PSO).

## 6. EVOLUCION DEL PESO RENAL

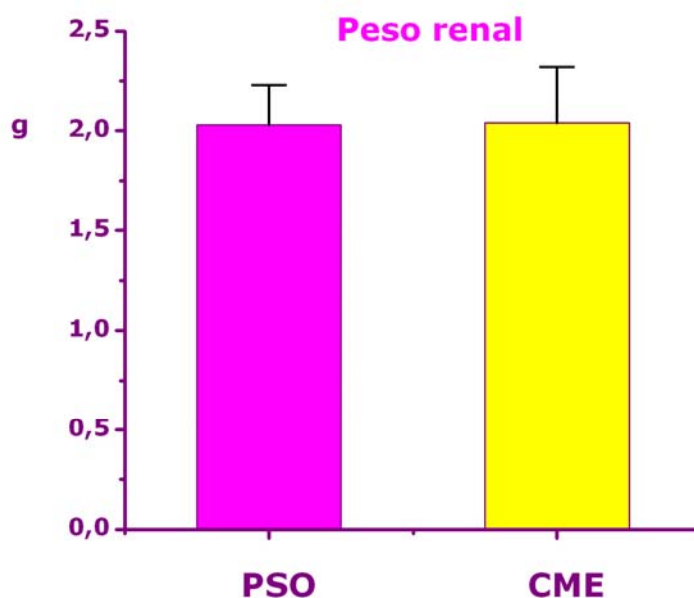
Aunque el peso renal absoluto es similar, la relación entre el peso renal total (bilateral) y el peso corporal final muestra un aumento estadísticamente significativo en los animales con CME respecto a los pseudo-operados (Tabla V) (Figuras 32 y 33).

**Tabla V.** Peso renal bilateral (PR;g), y Relación peso renal / peso corporal x 100 (PT/PC; %) en ratas pseudos-operadas (PSO), y con colestasis microquirúrgica extrahepática (CME).

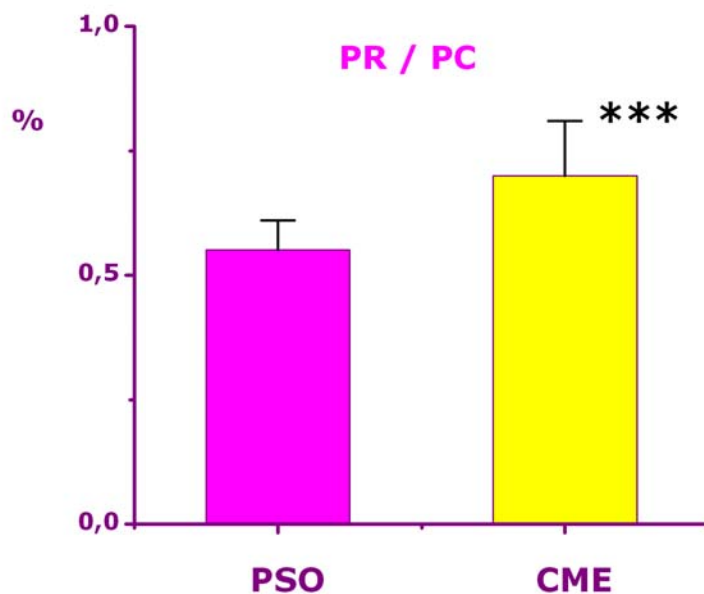
Grupo	PR	PR/PC(%)
<b>PSO</b> (n = 32)	<b>2,03</b> ± <b>0,20</b>	<b>0,55</b> ± <b>0,06</b>
<b>CME</b> (n = 44)	<b>2,04</b> ± <b>0,28</b>	<b>0,70 ***</b> ± <b>0,11</b>

x ± DE

\*: P<0,001: valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.



**Figura 32.** El peso renal de las ratas del grupo con CME no presenta diferencias estadísticamente significativas respecto al de las ratas del grupo PSO.



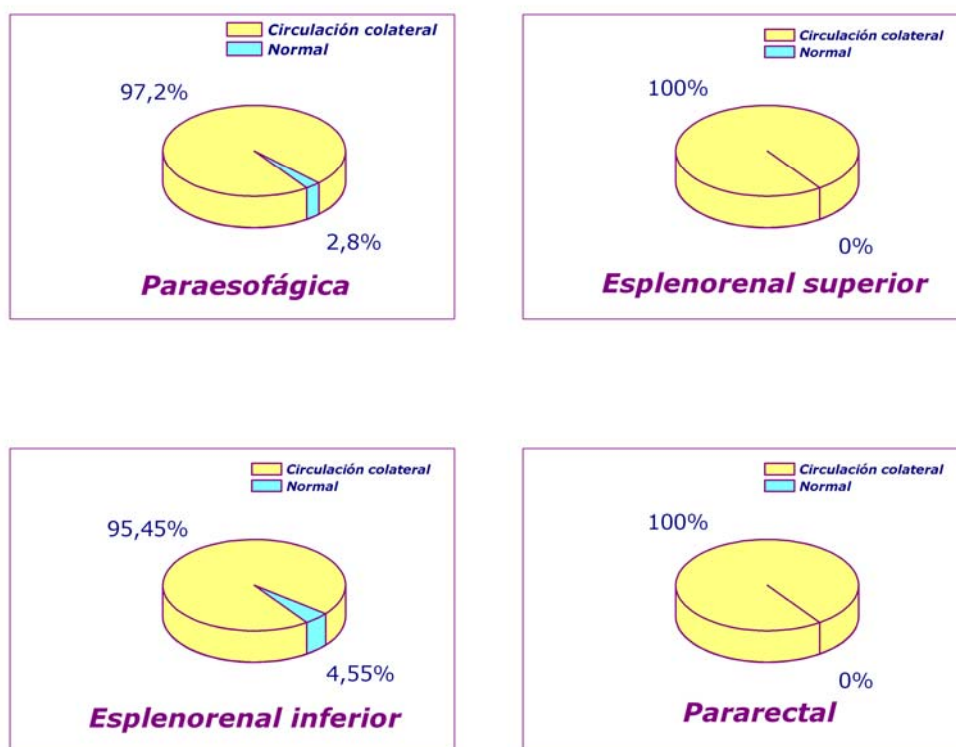
**Figura 33.** La relación del peso renal / peso corporal x 100 (PT/PC; %) en ratas CME es mayor que las ratas PSO con un nivel de confianza del 99,9%. (\*\*\*:  $p < 0,001$ ).

## 7. CIRCULACION COLATERAL VENOSA PORTOSISTÉMICA

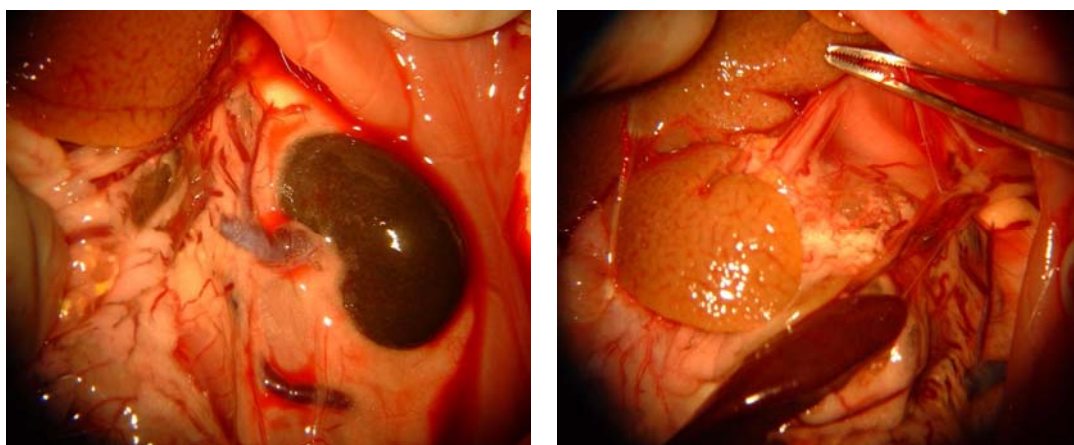
El desarrollo de circulación colateral portosistémica se produce en todas las áreas anatómicas exploradas (paraesofágica, esplenorenal y pararectal), y prácticamente en la totalidad de los animales con CME (Tabla VI) (Figuras 34 y 35).

**Tabla VI.** Circulación colateral portosistémica en ratas con colestasis microquirúrgica extrahepática (CME). Areas paraesofágica (PEs), esplenorenal superior (ER<sub>S</sub>), esplenorenal inferior (ER<sub>I</sub>), y pararectal (PRc).

Grupo	PEs		ER <sub>S</sub>		ER <sub>I</sub>		PRc	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>CME</b> (n = 44)	<b>43</b>	<b>97,2</b>	<b>44</b>	<b>100</b>	<b>42</b>	<b>95,45</b>	<b>44</b>	<b>100</b>



**Figura 34.** Circulación colateral portosistémica en las distintas áreas anatómicas de las ratas del grupo con CME..



(a)

(b)

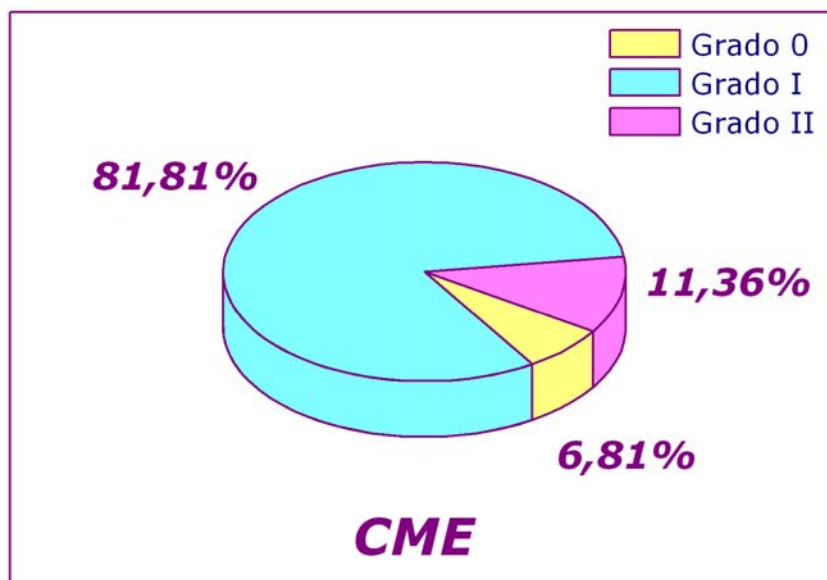
**Figura 35.** Imagen fotográfica en la que se observa la existencia de circulación colateral venosa **esplenorrenal (a)** y **paraesofágica (b)** en una rata con colestasis microquirúrgica extrahepática a las 6 semanas del postoperatorio.

## 8. VASCULOPATIA VENOSA MESENTERICA

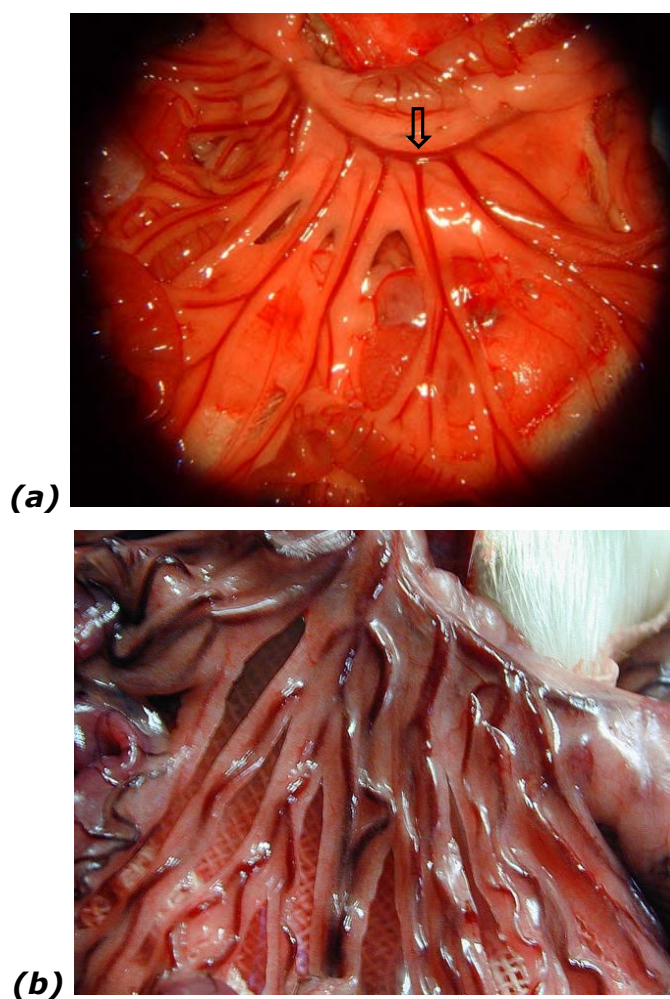
El grado de dilatación y tortuosidad de las ramas de la vena mesentérica superior, denominada vasculopatía venosa mesentérica, se observó en los animales sometidos a CME siendo la mayor parte de los casos de grado I (Tabla VII) (Figuras 36 y 37).

**Tabla VII.** Vasculopatía venosa mesentérica de grado 0 (ausente), grado I (secundaria al clampaje de la vena mesentérica superior) y grado II (espontánea) en ratas con colestasis microquirúrgica extrahepática (CME).

Grupo	Grado 0		Grado I		Grado II	
	n	%	n	%	n	%
<b>CME</b> (n = 44)	<b>3</b>	<b>6,81</b>	<b>36</b>	<b>81,81</b>	<b>5</b>	<b>11,36</b>



**Figura 36.** Grados de vasculopatía venosa mesentérica en las ratas del grupo con CME



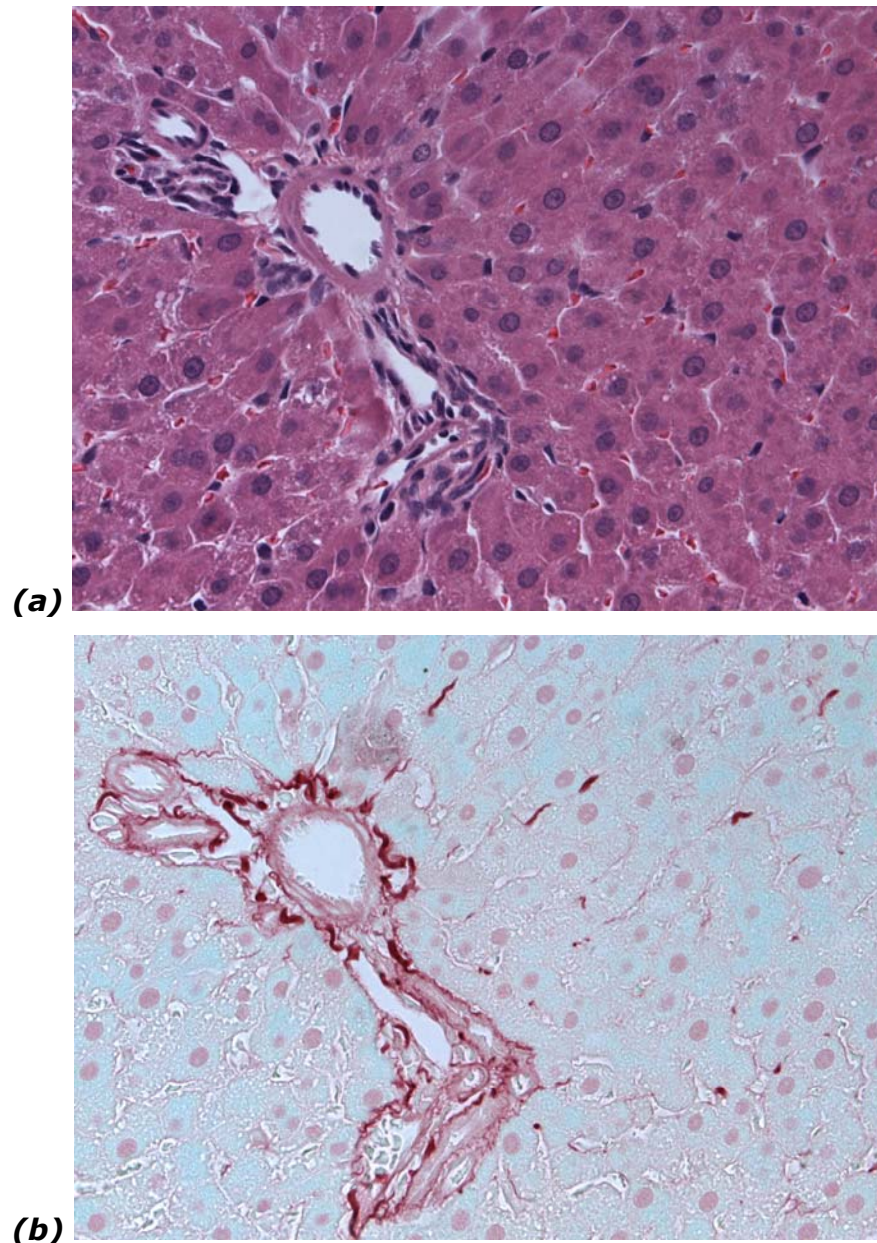
**Figura 37.** Vascularización venosa mesentérica:

**(a)** Rata pseudo-operada en la que se observan la vena mesentérica superior (flecha) y sus ramas.

**(b)** Rata con CME en la que se aprecia vasculopatía de grado I, con dilatación y tortuosidad tras el clampaje la vena mesentérica superior.

## 9. HISTOLOGIA HEPÁTICA

En los animales del grupo pseudo-operado el estudio histológico hepático demuestra la existencia de una arquitectura tisular normal, sin alteraciones significativas (Figura 38).



**Figura 38.** Imágenes histológicas obtenidas de parénquima hepático en ratas del grupo PSO (pseudo-operado).

**(a)** Hígado en el que se identifica un espacio porta y parte del lobulillo con características morfológicas normales. (Tinción Hematoxilina-Eosina, objetivo 40x).

**(b)** Fotografía procedente de tejido hepático en la que se identifica un espacio porta con características morfológicas normales. (Tinción Rojo Sirio, objetivo 40x).

En los animales con colestasis (CME) el estudio histológico hepático permite objetivar una importante alteración arquitectural. Se produce una intensa proliferación ductular, que substituye amplias zonas de parénquima hepatocitario como consecuencia de una necrosis submasiva de éste último.

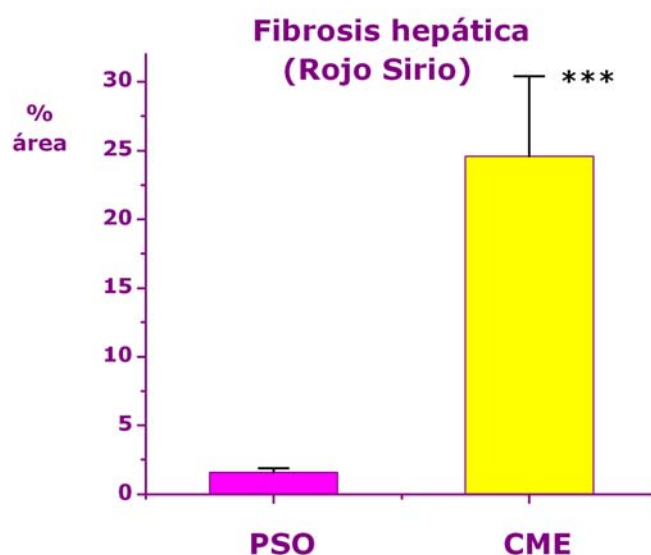
Es característica la presencia de una fibrosis periductal muy marcada, siendo posible cuantificar la misma mediante la técnica de Rojo Sirio y un sistema analizador de imágenes ( Material y Métodos). (Tabla VIII)(Figuras 39 y 40). Se aprecian hepatocitos apoptóticos y otros con anisonucleosis con mínima esteatosis microvesicular. No se observan colangitis ni signos de inflamación aguda. Se pueden identificar macrófagos con lipofucsina y células cebadas con gránulos (Figuras 40 y 41).

**Tabla VIII.** Estudio cuantitativo de fibrosis hepática (% área teñida con Rojo Sirio) en ratas pseudos-operadas (PSO), y con colestasis (CME).

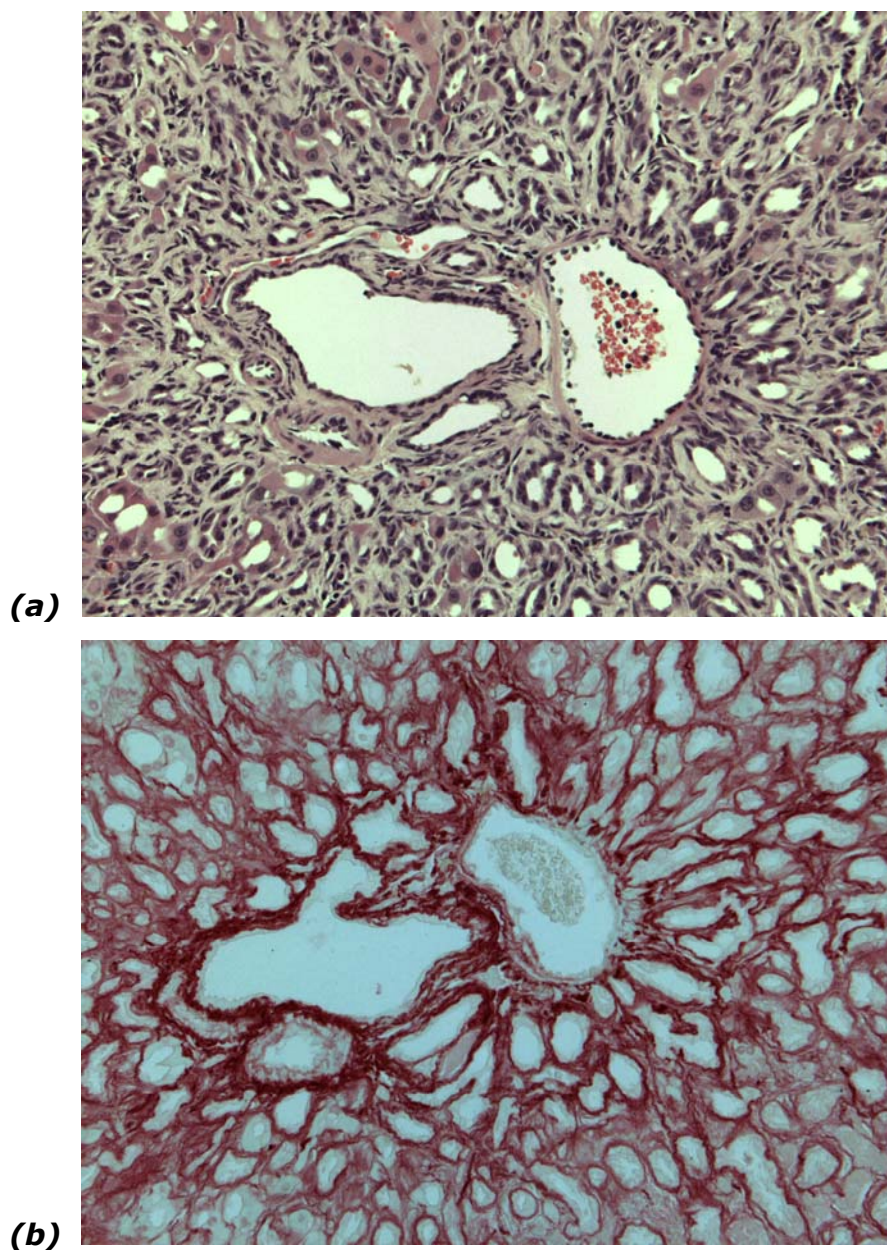
<b>Grupo</b>	<b>(% area Rojo Sirio)</b>
<b>PSO</b> <b>(n = 13)</b>	<b>1,59</b> <b>±</b> <b>0,31</b>
<b>CME</b> <b>(n = 20)</b>	<b>24,58***</b> <b>±</b> <b>5,81</b>

$x \pm DE$

\*\*\*:  $p < 0,001$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.



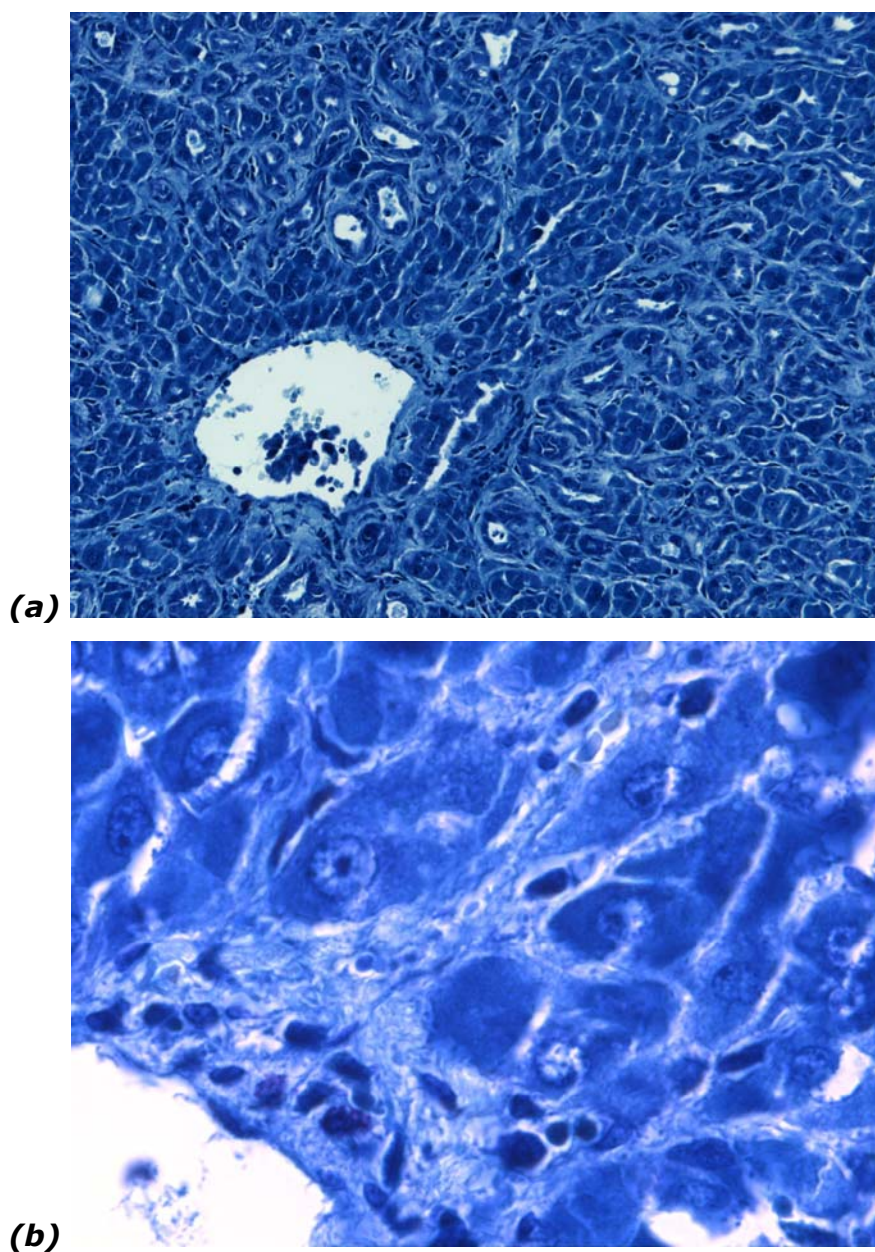
**Figura 39.** El porcentaje (%) de área teñida con Rojo Sirio (fibrosis) en ratas con colestasis (CME) es mayor que en el grupo pseudo-operado (PSO) (\*\*\*:  $p < 0,01$ ).



**Figura 40.** Imágenes histológicas obtenidas de parénquima hepático en ratas del grupo con CME. Se objetivan los cambios característicos:

**(a)** Parénquima hepático en gran parte substituido por una intensa proliferación ductular y con escasos hepatocitos atrapados en la misma. (Tinción Hematoxilina-Eosina, objetivo 20x).

**(b)** Imagen fotográfica hepática en la que se aprecia una fibrosis periductal muy marcada. (Tinción de Rojo Sirio, objetivo 20x).



**Figura 41.** Imágenes histológicas obtenidas del parénquima hepático en una rata con CME a las 6 semanas del postoperatorio.

**(a)** Parénquima hepático con presencia de células cebadas. (Tinción de Giemsa, objetivo 20x).

**(b)** Fotográfica del parénquima hepático en la que se aprecia la presencia de dos células cebadas granuladas. (Tinción de Giemsa, objetivo 100x).

## 10. BIOQUIMICA SANGUINEA

Los resultados de las pruebas bioquímicas de parámetros propios de lesión hepatobiliar muestran que las diferencias entre los animales con colestasis (CME) y los pseudoperados (PSO) son estadísticamente significativas ( $p < 0,001$  y  $p < 0,05$ ) en todos los parámetros analizados, a excepción de las concentraciones sanguíneas de creatinina (Tablas IX y X) (Figuras 42 y 43).

**Tabla IX.** Concentraciones séricas de Albúmina (ALB; mg/dl), Urea (UREA; mg/dl), Creatinina (CREAT; mg/dl), Ácidos biliares (ACBIL;  $\mu\text{mol/l}$ ), Bilirrubina Total (BT; mg/dl) y Bilirrubina Directa (BD; mg/dl) y en ratas pseudos-operadas (PSO), y en ratas con colestasis microquirúrgica extrahepática (CME) a las seis semanas de postoperatorio.

Grupo	ALB (mg/dl)	UREA (mg/dl)	CREAT (mg/dl)	ACBIL ( $\mu\text{mol/l}$ )	BT (mg/dl)	BD (mg/dl)
PSO (n = 30)	2,44 ± 0,35	35,80 ± 5,15	0,52 ± 0,06	8,93 ± 3,77	0,10 ± 0,03	0,01 ± 0,01
	1,12 *** ± 0,33	52,65 * ± 44,43	0,50 ± 0,14	59,64 *** ± 36,73	7,69 *** ± 2,21	3,99 *** ± 1,19

$\bar{x} \pm DE$

\*:  $P < 0,05$ : valor estadísticamente significativo respecto al PSO.

\*\*\*:  $P < 0,001$ : valor estadísticamente significativo respecto al PSO.

**Tabla X.** Concentraciones séricas de Aspartato aminotransferasa (AST; U/I), Alanina aminotransferasa (ALT; U/I), Cociente AST/ALT,  $\gamma$  Glutamilttransferasa ( $\gamma$  GT; U/I ) Fosfatasa alcalina (FA; U/I), y Lactatodeshidrogenasa (LDH; U/I) en ratas pseudoperadas (PSO), y en ratas con colestasis microquirúrgica extrahepática (CME) a las seis semanas de postoperatorio.

Grupo	AST(U/I)	ALT(U/I)	AST/ALT	$\gamma$ GT(U/I)	FA(U/I)	LDH(U/I)
PSO (n = 30)	79,10	44,10	1,79	1,00	137,78	494,48
	±	±	±	±	±	±
	15,92	16,61	0,63	0,00	34,48	161,05
CME (n = 44)	474,93 ***	100,75 ***	4,71 ***	35,22 ***	482,46 ***	1349,82 *
	±	±	±	±	±	±
	422,89	57,11	1,32	22,11	134,21	1916,64

$x \pm DE$

\*:  $P < 0,05$ : valor estadísticamente significativo respecto al PSO

\*\*\*:  $P < 0,001$ : valor estadísticamente significativo respecto al PSO

## 11. PROTEINAS DE FASE AGUDA EN SANGRE

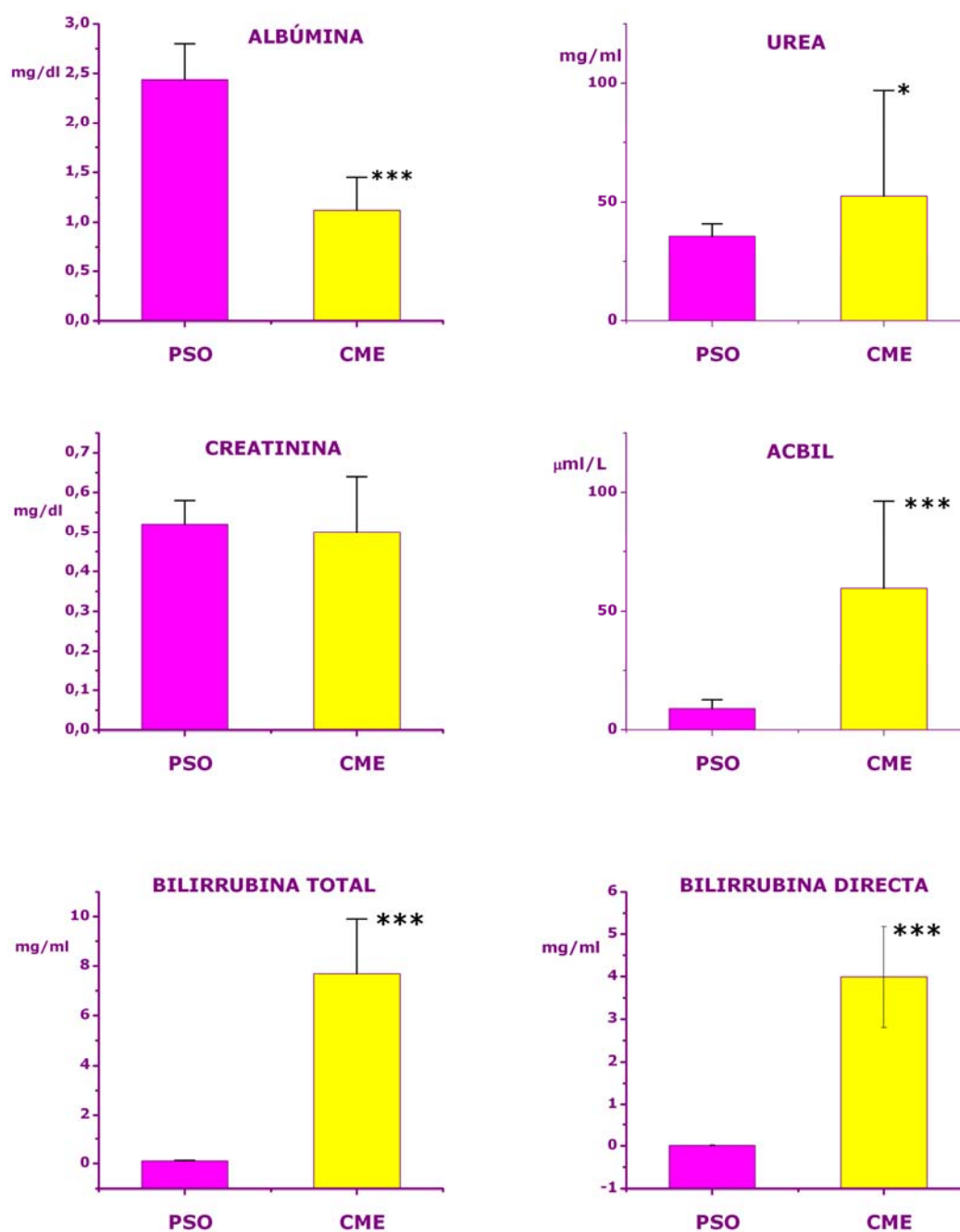
La concentración sanguínea de *Proteína mayor ácida  $\alpha 1$*  (también conocida como *Tiostatina*) aumenta de forma estadísticamente significativa en el grupo de animales con CME respecto al grupo PSO ( $p < 0,001$ ) (Tabla XI) (Figura 44a). De igual forma los animales del grupo de CME presentan unos niveles mayores de  $\alpha 1$ -Glicoproteína ácida que los del grupo de pseudoperadas (Tabla XI) (Figura 44b).

**Tabla XI.**  $\alpha 1$ -Mayor Acid Protein ( $\alpha 1$ -MAP ;mg/ml) y  $\alpha 1$ -Glicoproteína ácida ( $\alpha 1$ -AGP, mg/ml) en ratas pseudoperadas (PSO), y sometidas a colestasis microquirúrgica extrahepática (CME).

Grupo	( $\alpha 1$ -MAP) mg/ml	( $\alpha 1$ -AGP) mg/ml
PSO (n = 30)	0,09	0,07
	±	±
	0,02	0,02
CME (n = 44)	0,37 ***	0,38 ***
	±	±
	0,12	0,13

$x \pm DE$

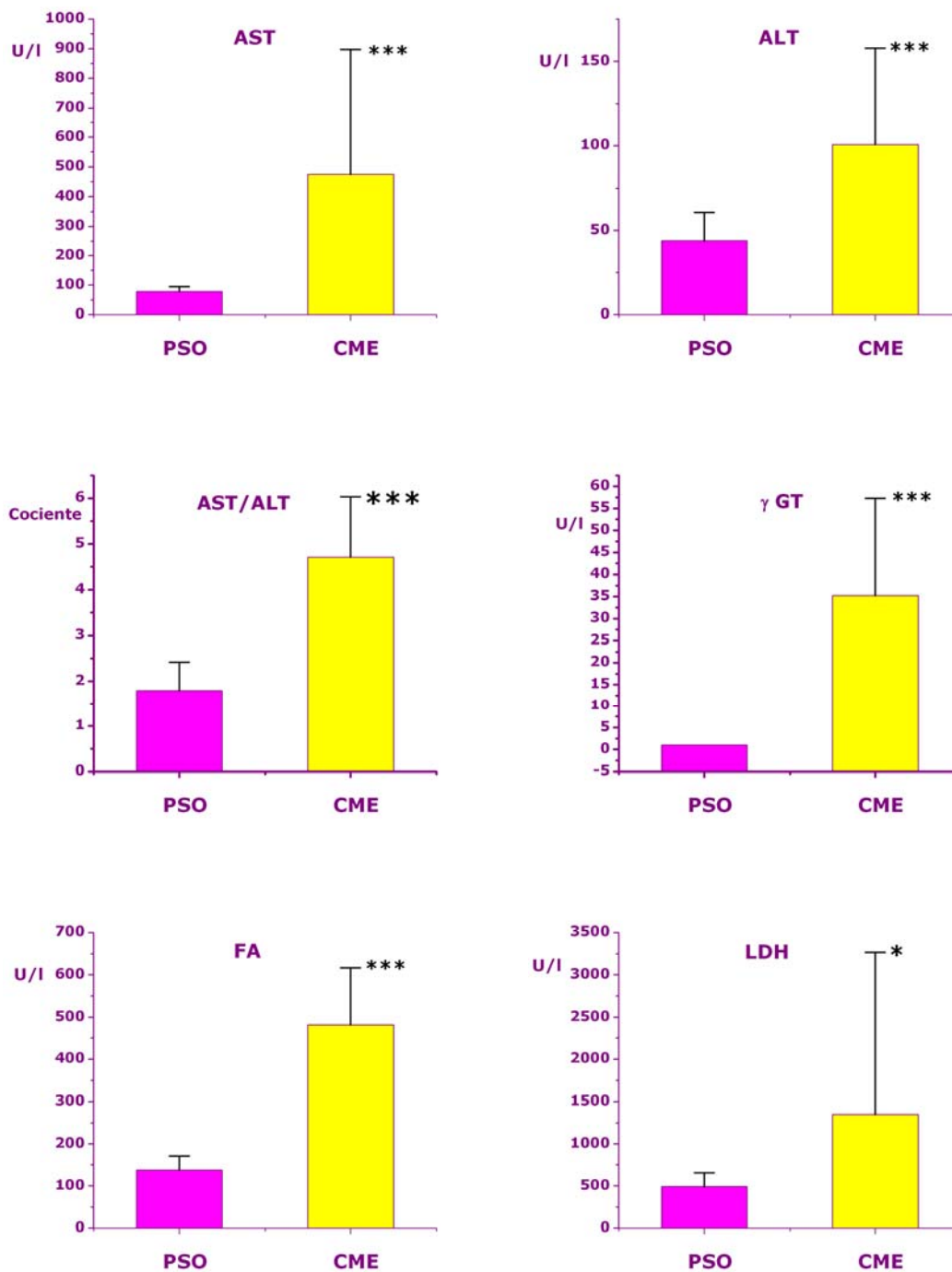
\*\*\*:  $P < 0,001$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO



**Figura 42.** Concentración sérica de Albúmina (ALB; mg/dl), Urea (UREA; mg/dl), Creatinina (CREAT; mg/dl), Acidos biliares (ACBIL; µmol/l), Bilirrubina Total (BT; g/dl) y Bilirrubina Directa (BD; mg/dl) en ratas pseudo-operadas (PSO), y en ratas con colestasis (CME).

\*:  $p < 0,05$  : valor estadísticamente significativa respecto del grupo PSO.

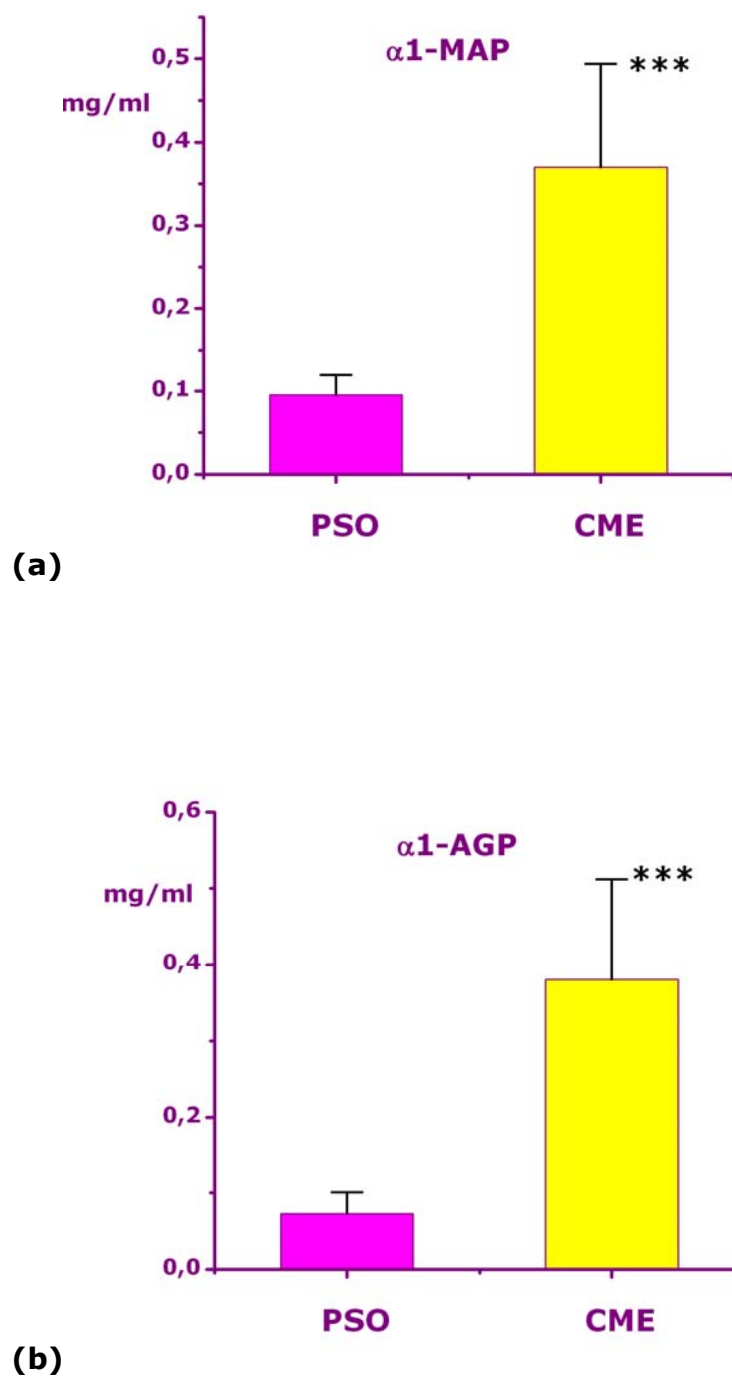
\*\*\*:  $P < 0,001$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.



**Figura 43.** Concentración sérica de Aspartato aminotransferasa (AST; U/I), Alanina aminotransferasa (ALT; U/I), Cociente AST/ALT,  $\gamma$  glutamiltransferasa ( $\gamma$ GT; U/I) Fosfatasa alcalina (FA; U/I), y Lactatodeshidrogenasa (LDH; U/I) en ratas pseudoperadas (PSO), y en ratas con colestasis (CME).

\*:  $p < 0,05$  : valor estadísticamente significativa respecto del grupo PSO.

\*\*\*:  $P < 0,001$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.



**Figura 44.** Incremento en la concentración en sangre de la Proteína mayor ácida  $\alpha 1$  ( $\alpha 1$ -MAP) (mg/ml) **(a)** y de la  $\alpha 1$ -Glicoproteína ácida ( $\alpha 1$ -AGP) (mg/ml) **(b)** en ratas con colestasis (CME) en relación con las ratas del grupo pseudo-operado (PSO).

\*:  $p < 0,001$  : valor estadísticamente significativa respecto del grupo PSO.

## 12. CITOQUINAS EN TEJIDOS ESPLÁCNICOS

### 12.A. Niveles tisulares de TNF- $\alpha$

Los animales a los que se realizó colestasis microquirúrgica extrahepática (CME) tienen una concentración de TNF- $\alpha$  menor en el hígado, y mayor en el íleon y el complejo linfático mesentérico superior que los del grupo pseudo-operado (PSO). Por el contrario en el bazo no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla XII) (Figura 45).

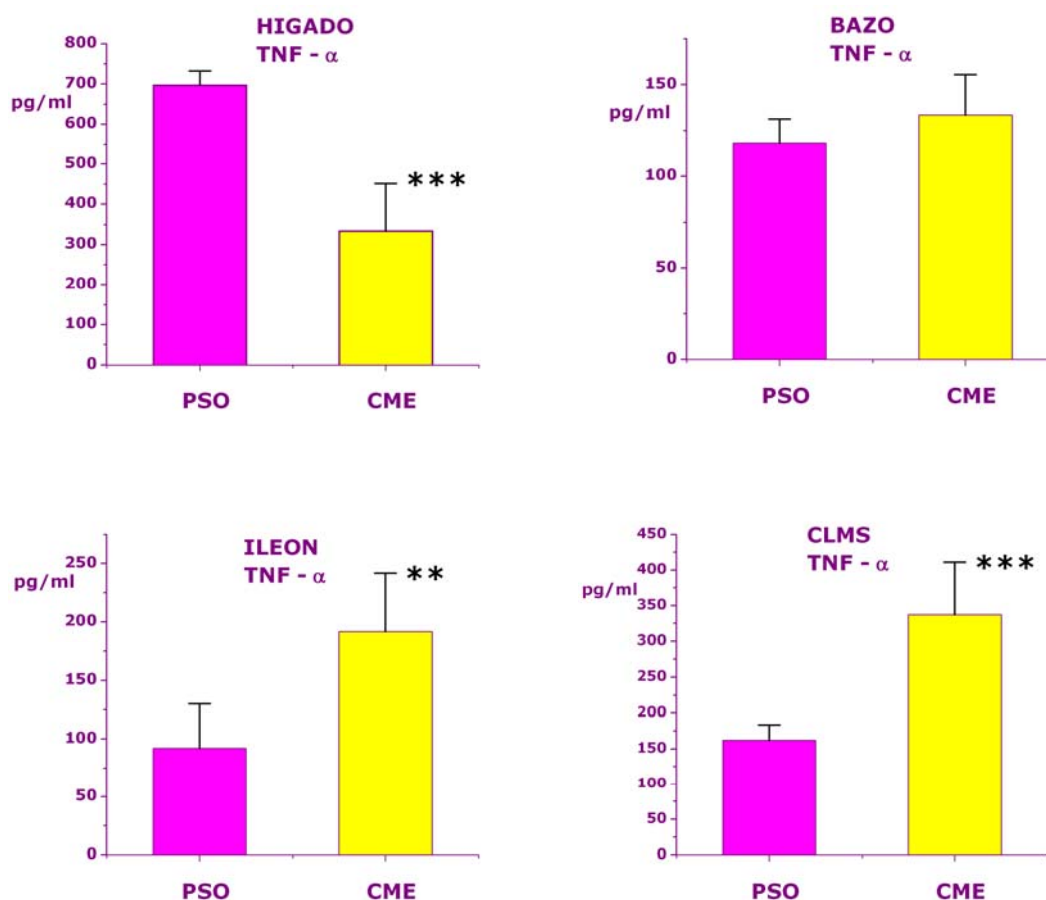
**Tabla XII.** Concentración de TNF- $\alpha$  (pg/ml) en: hígado, bazo, íleon y complejo linfático mesentérico superior (CLMS) de ratas pseudo-operadas (PSO), y con colestasis microquirúrgica extrahepática (CME).

Grupo	HIGADO (pg/ml)	BAZO (pg/ml)	ILEON (pg/ml)	CLMS (pg/ml)
PSO (n = 6)	696,57	118,25	91,99	161,75
	± 36,42	± 13,16	± 38,24	± 22,01
CME (n = 6)	334,33***	133,48	191,65**	337,13***
	± 117,05	± 22,12	± 50,07	± 73,76

x ± DE

\*\* :  $P < 0,01$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.

\*\*\* :  $p < 0,001$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.



**Figura 45.** La concentración de TNF- $\alpha$  (pg/ml) en las ratas con CME es menor en el hígado, y mayor en ileon y complejo linfático mesentérico superior (CLMS) que en las ratas PSO. Por el contrario en el bazo no hay diferencias.

\*\* :  $P < 0,01$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.

\*\*\* :  $p < 0,001$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.

## 12.B. Niveles tisulares de Inteleuquina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

Los animales a los que se realizó CME tienen una concentración de IL-1 $\beta$  menor en el hígado, y mayor en el íleon y el complejo linfático mesentérico superior que los del grupo PSO. En el bazo no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla XIII) (Figura 46).

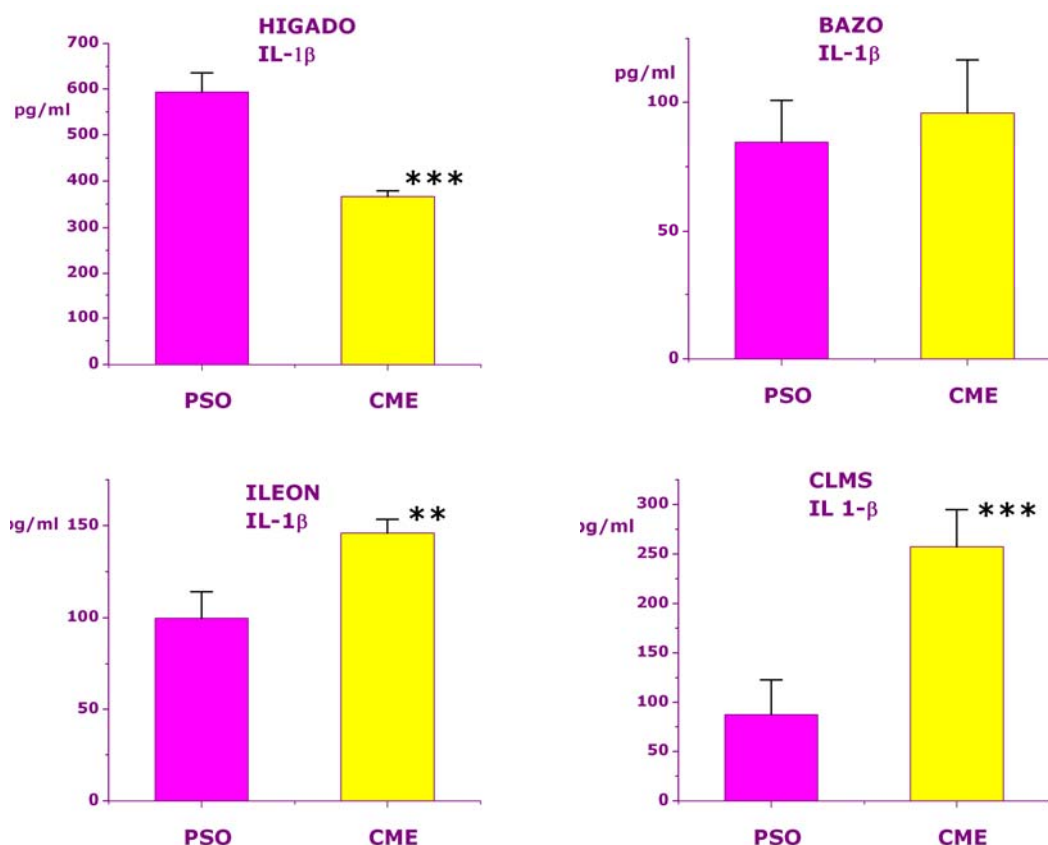
**Tabla XIII.** Concentración de IL-1 $\beta$  (pg/ml) en hígado, bazo, íleon y complejo linfático mesentérico superior (CLMS) de ratas pseudoperadas (PSO), y con colestasis microquirúrgica extrahepática (CME).

Grupo	HIGADO (pg/ml)	BAZO (pg/ml)	ILEON (pg/ml)	CLMS (pg/ml)
PSO (n = 5)	593,88	84,43	99,67	87,69
	± 41,94	± 16,35	± 14,69	± 35,29
CME (n = 5)	366,73***	95,91	146,07**	257,36***
	± 11,79	± 20,76	± 7,47	± 37,50

$\bar{x} \pm DE$

\*\* :  $P < 0,01$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.

\*\*\* :  $p < 0,001$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.



**Figura 46.** La concentración de IL-1 $\beta$  (pg/ml) en las ratas con CME es menor en el hígado, y mayor en íleon y complejo linfático mesentérico superior (CLMS) que en las ratas PSO. Por el contrario en el bazo no hay diferencias.

\*\* :  $P < 0,01$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.

\*\*\* :  $p < 0,001$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.

### 1.2.C. Niveles tisulares de Interleuquina 4 (IL-4)

Los animales a los que se realizó colestasis microquirúrgica extrahepática (CME) tienen una concentración de IL-4 menor en el hígado, y mayor en el íleon y el complejo linfático mesentérico superior respecto a los animales PSO (pseudoperados). En el bazo no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla XIV) (Figura 47).

**Tabla XIV.** Concentración de IL-4 (pg/ml) en hígado, bazo, íleon y complejo linfático mesentérico superior (CLMS) de ratas pseudoperadas (PSO), y con colestasis microquirúrgica extrahepática (CME)

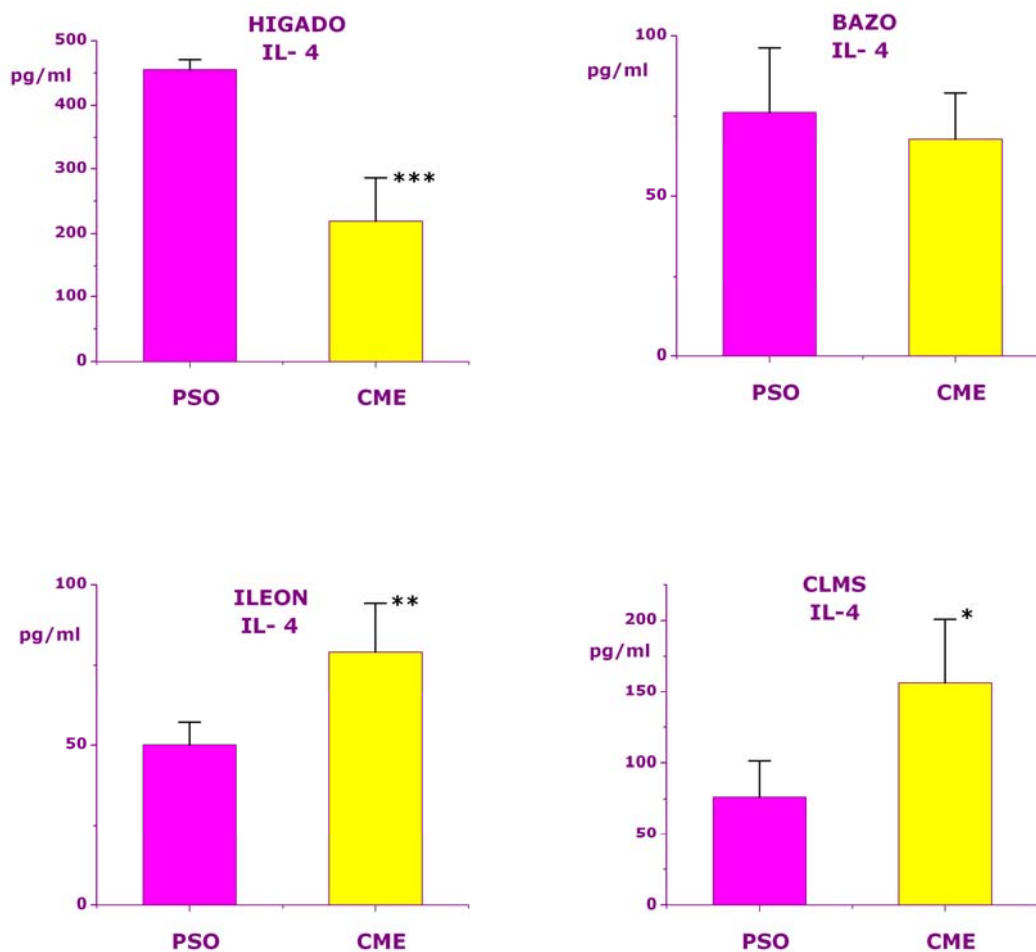
Grupo	HIGADO (pg/ml)	BAZO (pg/ml)	ILEON (pg/ml)	CLMS (pg/ml)
<b>PSO</b> (n = 5)	<b>455,30</b>	<b>76,25</b>	<b>50,11</b>	<b>76,29</b>
	± <b>15,45</b>	± <b>20,03</b>	± <b>6,99</b>	± <b>25,12</b>
<b>CME</b> (n = 5)	<b>219,89 ***</b>	<b>67,86</b>	<b>79,11 **</b>	<b>156,48 *</b>
	± <b>66,40</b>	± <b>14,40</b>	± <b>15,11</b>	± <b>44,38</b>

$\bar{x} \pm DE$

\*:  $p < 0,05$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.

\*\* :  $p < 0,01$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.

\*\*\*:  $p < 0,001$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.



**Figura 47.** La concentración de IL-4 (pg/ml) en las ratas con CME es menor en el hígado, y mayor en ileon y complejo linfático mesentérico superior (CLMS) que en las ratas PSO. Por el contrario en el bazo no hay diferencias.

\*:  $p < 0,05$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.

\*\* :  $p < 0,01$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.

\*\*\*:  $p < 0,001$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.

#### 12.D. Niveles tisulares de Inteleuquina 10 (IL-10)

Los animales a los que se realizó colestasis microquirúrgica extrahepática (CME) tienen una concentración de IL-10 menor en el hígado, y mayor en el ileon y el complejo linfático mesentérico superior respecto de las ratas del grupo pseudo-operado (PSO). En el bazo no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla XV) (Figura 48).

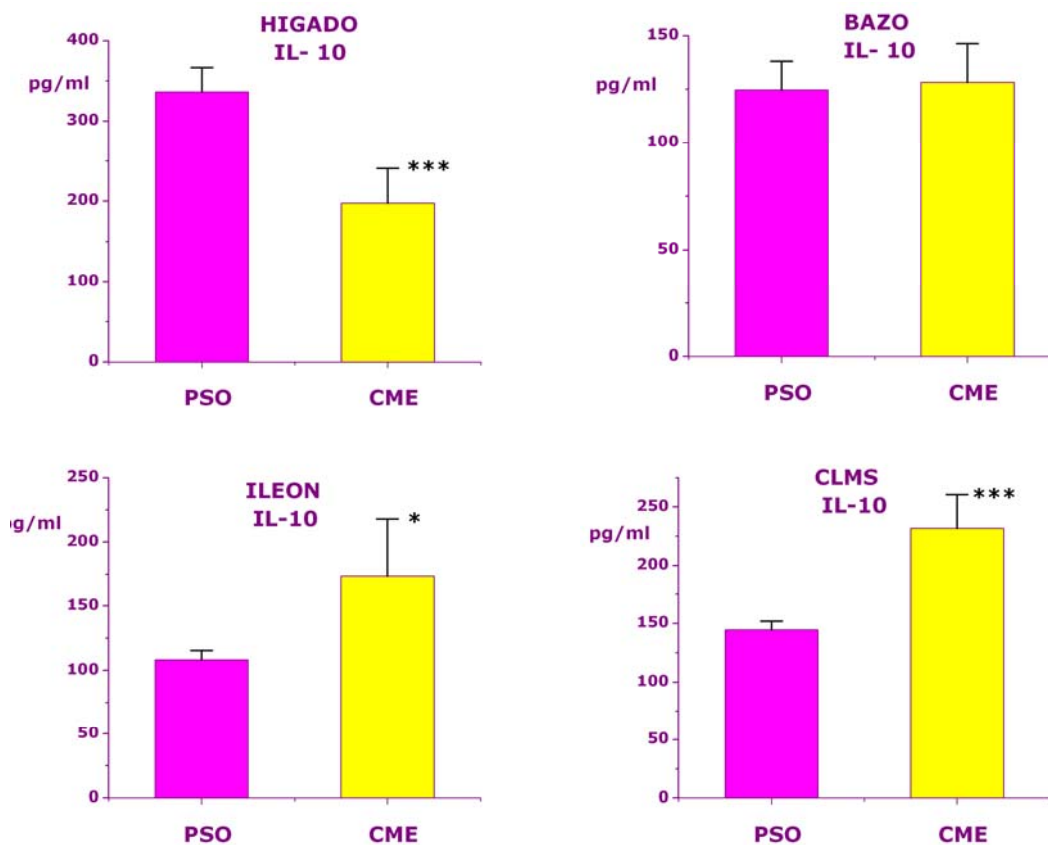
**Tabla XV.** Concentración de IL-10 (pg/ml) en hígado, bazo, íleon y complejo linfático mesentérico superior (CLMS) en ratas pseudoperadas (PSO), y en ratas sometidas a colestasis microquirúrgica extrahepática (CME)

Grupo	HIGADO (pg/ml)	BAZO (pg/ml)	ILEON (pg/ml)	CLMS (pg/ml)
PSO (n = 5)	336,27 ± 30,41	124,79 ± 13,28	108,40 ± 6,78	144,50 ± 7,47
CME (n = 5)	197,20*** ± 43,66	128,37 ± 18,01	173,69* ± 44,24	231,73*** ± 28,89

$\bar{x} \pm DE$

\*:  $p < 0,05$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.

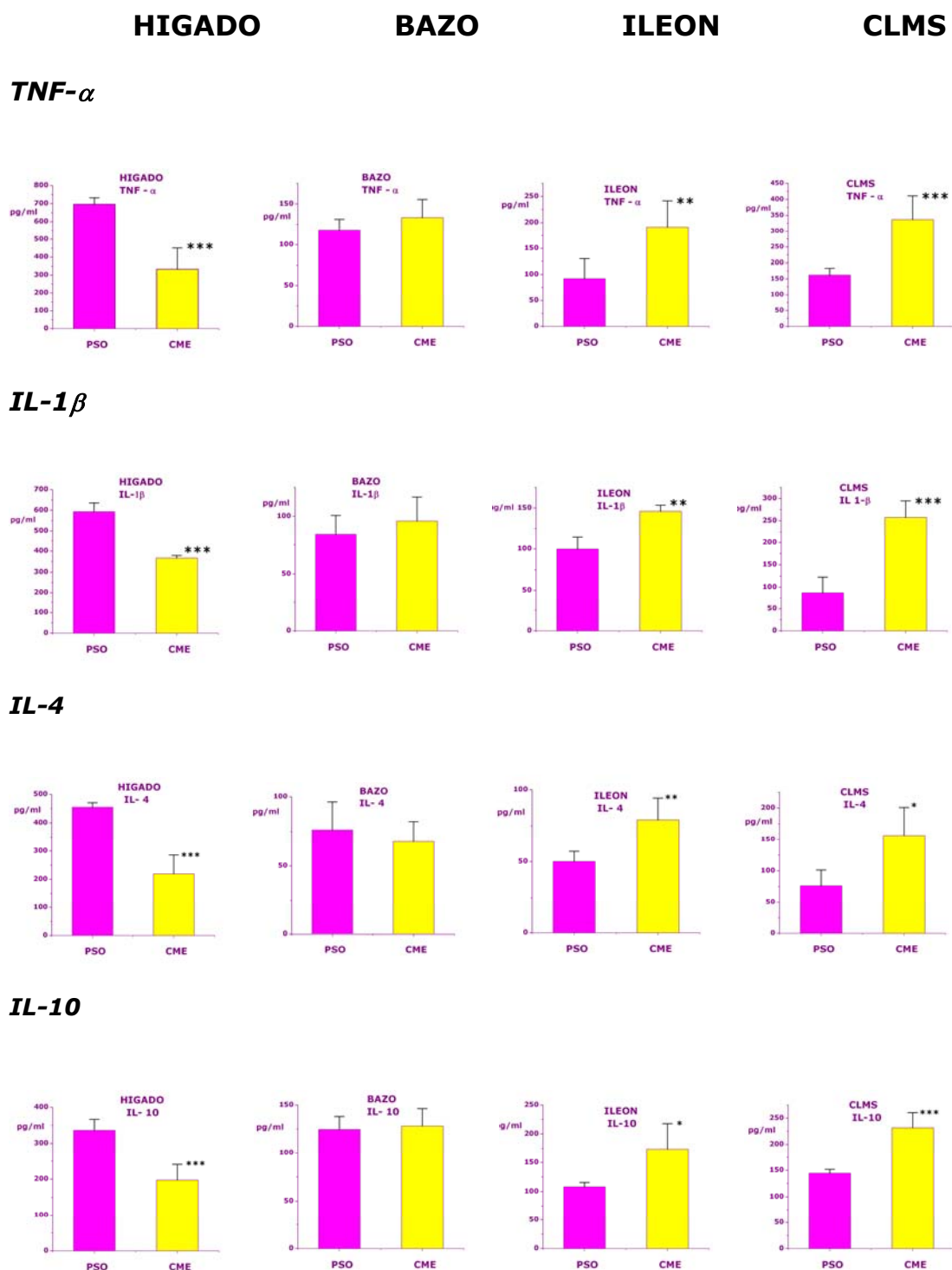
\*\*\*:  $p < 0,001$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.



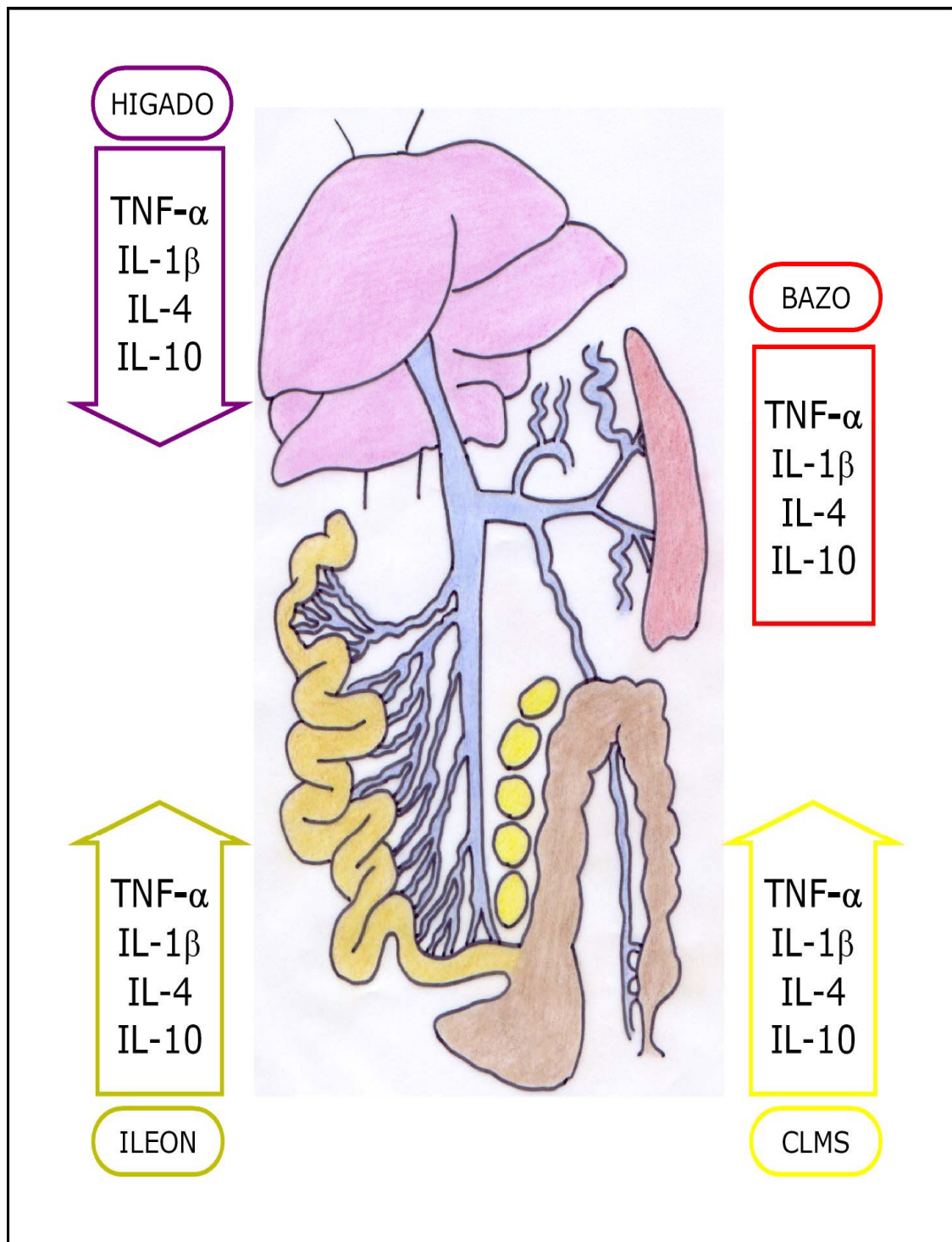
**Figura 48.** La concentración de IL-10 (pg/ml) en las ratas con CME es menor en el hígado, y mayor en íleon y complejo linfático mesentérico superior (CLMS) que en las ratas PSO. Por el contrario en el bazo no hay diferencias.

\*:  $p < 0,05$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.

\*\*\*:  $p < 0,001$ : valor estadísticamente significativo respecto al grupo PSO.



**Figura 49.** Resumen gráfico de las concentraciones de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, e IL-10 en hígado, bazo, íleon y complejo linfático mesentérico superior en las ratas del grupo pseudo-operado (PSO) y en ratas del grupo con colestasis microquirúrgica extrahepática (CME).



**Figura 50.** Resumen gráfico comparativo de las concentraciones de las citoquinas proinflamatorias ( TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) y antiinflamatorias( IL-4, e IL-10) en hígado, bazo, íleon y complejo linfático mesentérico (CLMS) en ratas del grupo con CME en relación con las ratas del grupo PSO a las 6 semanas de evolución postoperatoria.

### 13. NIVELES DE QUIMASA EN ILEON Y EN COMPLEJO LINFATICO MESENTERICO SUPERIOR

La concentración en íleon de la quimasa Rat Mast Cell Protease de tipo II (RMCP-II), una proteasa específica de las células cebadas presentes en las mucosas de la rata, no presenta diferencia estadísticamente significativa en el grupo de animales con colestasis microquirúrgica extrahepática (CME) respecto al grupo de animales pseudo-operados (PSO) (Tabla XVI) (Figura 51). Del mismo modo tampoco se aprecian variaciones estadísticamente significativas en la concentración tisular de RMCP-II en el CLMS entre ambos grupos (Tabla XVII) (Figura 51).

**Tabla XVI.** Quimasa RMCP-II (ng/mg proteína) en el íleon en las ratas del grupo pseudo-operadas (PSO), y en ratas del grupo con colestasis microquirúrgica extrahepática (CME).

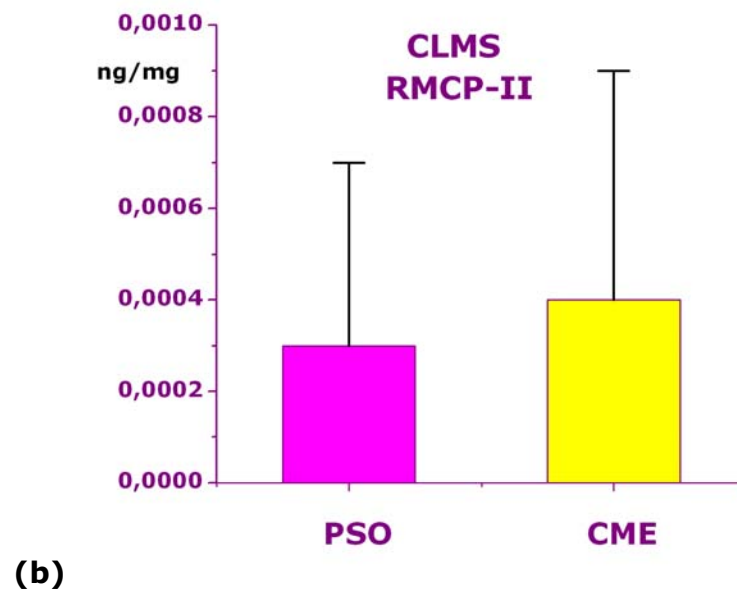
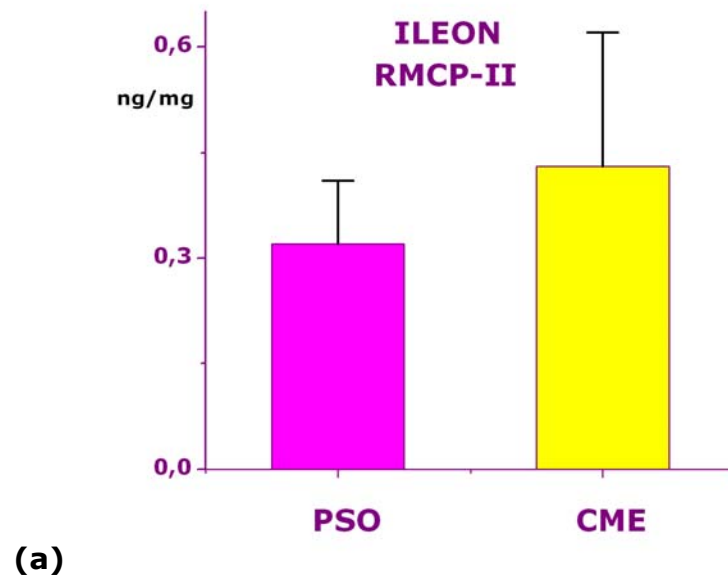
Grupo	ILEON
PSO (n = 10)	0,32 ± 0,09
CME (n = 23)	0,43 ± 0,19

x ± DE

**Tabla XVII.** Quimasa RMCP-II (ng/mg proteína) en el complejo linfático mesentérico superior (CLMS) en las ratas del grupo pseudo-operadas (PSO), y en ratas del grupo con colestasis microquirúrgica extrahepática (CME).

Grupo	CLMS
PSO (n = 12)	0,0003 ± 0,0004
CME (n = 20)	0,0004 ± 0,0005

x ± DE



**Figura 51.** La concentración (ng/mg proteína) de RMCP-II en íleon **(a)** y complejo linfático mesentérico superior (CLMS) **(b)** en ratas del grupo con colestasis microquirúrgica extrahepática (CME) es similar a la existente en los animales del grupo pseudo-operados (PSO).

*V.DISCUSIÓN*

En este trabajo experimental, que se ha realizado utilizando el modelo de colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata, se podría considerar que el resultado más importante es el hallazgo de la existencia de una diferente concentración de citoquinas, proinflamatorias Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub> así como antiinflamatorias, entre distintos organismos y tejidos espláncnicos (Figura 49).

Estas alteraciones se han encontrado en un periodo evolutivo considerado crónico en este modelo experimental y, por esta razón, los hallazgos podrían ser de mayor interés para comprender los mecanismos patogénicos que se producen en la evolución a largo plazo de la colestasis obstructiva (Li y Crawford , 2004).

En particular, se ha propuesto que las alteraciones espláncnicas y sistémicas secundarias a hepatopatías crónicas, podrían ser de naturaleza inflamatoria (Aller y cols, 2007a). Al inicio de su evolución, la hipertensión portal que originan, causaría una respuesta inflamatoria, tanto espláncnica como sistémica, de pequeña intensidad o bajo grado, la cual se agravaría progresivamente coincidiendo con la sucesiva pérdida de la función hepática (Aller y cols, 2007a; Aller y cols, 2007b). Por lo tanto, en la presente discusión, los resultados obtenidos respecto de los valores de citoquinas tisulares espláncnicas, se intentarían correlacionar tanto con el grado de hipertensión portal como con el grado de insuficiencia hepática.

Estudios previos en este modelo experimental de colestasis microquirúrgica, han permitido valorar el grado de insuficiencia hepática, en un periodo evolutivo más precoz (4 semanas). Comparando las alteraciones encontradas en dicho periodo con las del presente trabajo (6 semanas) se ha observado que a mayor tiempo de evolución, es más intensa la hepatomegalia, así como aumentan las concentraciones plasmáticas de fosfatasas alcalinas, bilirrubina total, AST, ALT y gammaglutamiltranspeptidasa (Sánchez-Patan y cols., "en prensa"). Por esta razón, a más larga evolución, mayor grado de insuficiencia hepática se produce y, por tanto, más útil es el modelo experimental para el estudio de la insuficiencia hepática crónica.

Aunque en ratas con ligadura y sección del colédoco se ha descrito el desarrollo de fibrosis-cirrosis biliar entre 4 y 6 semanas del postoperatorio

(Kountouras y cols, 1984), también se produce una intensa proliferación biliar pero rara vez ambas alteraciones morfológicas son causantes de las alteraciones de la arquitectura hepática propias de la cirrosis (Kountouras y cols, 1984; Abrales y cols, 2006). A su vez, en las ratas con colestasis microquirúrgica también se ha demostrado a las 4 semanas de evolución la existencia de fibrosis asociada a intensa proliferación de conductos biliares. En estos animales también se observa en el parénquima hepático la coexistencia de inflamación crónica y apoptosis moderada de hepatocitos (Sánchez Patan y cols., "en prensa"). Sin embargo, tanto a las 4 semanas de evolución, como a las 6 semanas del postoperatorio en que se han estudiado en el presente trabajo, los hígados no presentan la desestructuración hepática propia de la cirrosis. Aunque esta última serie, es de más larga evolución y se ha constatado que poseen mayor grado de fibrosis hepática, la inexistencia de cirrosis nos permite etiquetar el modelo de colestasis microquirúrgica como un modelo de fibrosis biliar a las seis semanas de evolución postoperatoria.

En este sentido este nuevo modelo de fibrosis hepática puede ser útil para el ensayo de terapias antifibrogénicas y, por esta razón, se realizó la determinación morfológica de la fibrogénesis con la tinción del rojo sirio (Iredale, 2007).

La lesión hepática secundaria a colestasis extrahepática es el factor principal desencadenante de una activación de la respuesta inflamatoria que, a su vez, estimularía la activación de las células estrelladas hepáticas para la secreción de colágeno fibrilar que culminaría con el desarrollo de fibrosis (Henderson e Iredale, 2007; Iredale , 2007). También colaboran en la producción de fibrosis los fibroblastos localizados en el espacio portal y perivenoso central. En la actualidad se considera que estos tres tipos celulares (células estrelladas hepáticas, fibroblastos portales y fibroblastos pericentrales) se transforman en miofibroblastos activados que son realmente las células hepáticas productoras de fibrosis. Por transdiferenciación, otras células epiteliales y endoteliales también pueden transformarse en miofibroblastos (Iredale, 2007; Schuppau y Afdhal, 2008).

Entre los múltiples factores que se han descrito como estimuladores de la transformación miofibroblástica destaca TGF- $\beta$  (Gressner y cols, 2002).

---

Esta citoquina desempeña, en general, una acción fundamental en la fibrogenesis (Seyhan y cols, 2006; Reish y Eriksson, 2008). TGF- $\beta$  es producido por múltiples tipos celulares y estimula la producción de matriz extracelular por los miofibroblastos (Iredale, 2007). A su vez, los miofibroblastos activados también liberan TGF- $\beta$ , creando un círculo vicioso en la fibrogénesis hepática (Rockey, 2006). La interrelación entre la inmunidad y la fibrosis hepática, es objeto general de interés en cirugía ya que también los estadios de curación de las heridas incluye inflamación, proliferación, remodelación de la matriz extracelular y formación de cicatriz (Singer y Clark, 1999; Reiss y Eriksson, 2008). En este sentido, también la fibrosis hepática representa la sustitución de tejido lesionado por una cicatriz (Schuppan y Afdhal, 2008).

En ratas con ligadura y sección del colédoco se ha demostrado que una de las sustancias estimulantes de la producción de TGF- $\beta_1$  es el sistema renina-angiotensina-aldosterona. Así el bloqueo de receptores de angiotensina (AT<sub>1</sub>) reduce la producción de TGF- $\beta_1$  y tiene efectos antifibróticos (Paizis y cols, 2002). Similares efectos se consiguen con la inhibición del enzima conversor de angiotensina (ACE) (Karimian y cols, 2007).

La colestasis también causa deficiente producción de factor de crecimiento hepático (HGF). Así, en ratones con ligadura y sección del colédoco, la necrosis del parénquima es suprimida por la administración de HGF (Li y cols, 2007).

Sin embargo, la relación entre inflamación y fibrosis es tan estrecha que son patologías interrelacionables (Aller y cols, 2006). En la fibrosis hepática esta relación la sugiere tanto la producción por los miofibroblastos de quimioquinas y citoquinas, como por ejemplo TGF- $\beta$ , como su función presentadora de antígeno para la estimulación de células "asesinas naturales" ("*natural killer*", NKT), y células T, CD<sub>8</sub> y CD<sub>4</sub> (Winau y cols, 2008). Asimismo, la transferencia de células T CD<sub>8</sub> de animales fibróticos a normales causaría activación de las células estrelladas hepáticas, con secreción de TGF- $\beta$  y producción de colágeno (Safadi y cols, 2004; Winau y cols, 2008).

Aunque la fibrosis es una de las complicaciones hepáticas de la colestasis, la mayoría de los autores en la actualidad hacen particular hincapié en su íntima asociación con la proliferación biliar, que puede llegar a representar en ratas con colestasis extrahepática entre 50 y 60% del parénquima hepático (Aller y cols, 2004a). Por lo tanto, la reparación hepática en la colestasis obstructiva es un proceso mixto de fibrosis y proliferación epitelial, similar al que se instaura en la piel para la reparación de las heridas (Lawrence, 1998). En ratas con ligadura y sección del colédoco a las 6 semanas de evolución se ha descrito que la fibrosis hepática se desarrolla en íntima relación con la proliferación ductular y, así se constituyen finos tabiques fibróticos de disposición periductular, esto es, alrededor de conductos y conductillos biliares. El conjunto de reacción fibro-ductular post-colestasis extrahepática experimental se ha definido como una cirrosis micronodular (Beaussier y cols, 2007).

Un patrón histopatológico similar se ha encontrado en el presente trabajo experimental, en un mismo periodo evolutivo (6 semanas) si bien utilizando un modelo de colestasis extrahepática microquirúrgica (Figura 40). La íntima relación entre proliferación ductular biliar y la fibrosis en la colestasis extrahepática experimental puede ser atribuida a la localización periductal y periductular que adoptan los miofibroblastos (Beaussier y cols, 2007) y en la clínica humana también ha sido descrita en la hepatitis C crónica (Clouston y cols, 2005). Es posible que los colangiocitos proliferantes estimulen la quimioatracción de miofibroblastos mediante la producción de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Kinnan y cols, 2000). Por el contrario, también se ha propuesto que los miofibroblastos peribiliares podrían regular la proliferación de colangiocitos por ejemplo mediante la expresión de ecto-nucleosido-trifosfato-difosfohidrolasa (NTPDase2) (Jhandier y cols, 2005). Esta interrelación fibro-ductular en la colestasis extrahepática experimental es de gran importancia desde el punto de vista terapéutico ya que es posible plantear terapias antifibrogénicas que podrían también regular la intensa proliferación biliar y viceversa (Kininman y Housset, 2002). Asimismo, ambas respuestas la fibrogénica y la proliferativa epitelial biliar, podrían tener mecanismos etiopatogénicos fundamentados en la respuesta inflamatoria que se instaura

ante la agresión colestásica. En este supuesto la respuesta inflamatoria inicial en los tractos portales y en los espacios Disse, en tanto que constituyentes del espacio intersticial del hígado, causaría la estimulación conjunta de epitelio y mesénquima en la colestasis extrahepática experimental.

Uno de los mecanismos etiopatogénicos por lo que la respuesta inflamatoria puede inducir fibrosis y proliferación ductular en el hígado colestásico es mediante la producción de estrés oxidativo. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) además de sus nocivos efectos, están implicadas en la señalización y activación de múltiples mecanismos celulares. En particular, en las enfermedades hepáticas se ha evidenciado que existe una estrecha relación entre la producción de radicales libres, y/o la alteración de los mecanismos antioxidativos de defensa, y las alteraciones morfo-funcionales que se producen (Loguercio & Federico, 2003; Conde de la Rosa y cols, 2008).

En la transdiferenciación celular que causa la formación de miofibroblastos también se ha demostrado la influencia del estrés oxidativo. Así el TGF- $\beta$  induce actividad NADPH (nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato) oxidasa que, a su vez, produce especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la transdiferenciación de células hepáticas estrelladas en miofibroblastos. A su vez, los miofibroblastos son células que está provistas de elevada capacidad antioxidante, con altos niveles de actividad superóxido dismutasa y con altas concentraciones de glutatión, por lo que parece pueden contrarestar el efecto nocivo del estrés oxidativo dependiente de NADPH (Proell y cols, 2007; Carmona-Cuenca y cols, 2007). Por lo tanto, una consecuencia del estrés oxidativo que la inflamación causa en los hígados colestásicos podría ser la instauración de un eficaz mecanismo defensivo antioxidante representado por un nuevo fenotipo celular, esto es el miofibroblasto.

Un sentido similar, esto es, defensivo podría poseer también la proliferación ductular biliar post-colestasis extrahepática experimental. La instauración de estrés oxidativo es precoz tras ligadura y sección del colédoco en la rata. A los siete días de evolución ya disminuye la actividad antioxidante hepática y se altera el metabolismo hepatocitario, con una

---

disminución de la actividad microsomal y peroxisomal, que causaría la disminución de la beta-oxidación de ácidos grasos y la alteración del metabolismo lípido (Orellana y cols, 1997; Portincasa y cols, 2007; Kilicoglu y cols, 2008). La formación de ROS causaría peroxidación lipídica y apoptosis hepatocitaria (Assimakopoulos y cols, 2007; Barrera y cols, 2008).

Las ROS también han sido implicadas en la estimulación de las células de Kupffer asociada al TNF- $\alpha$  (Melgert y cols, 2001). A su vez, el estrés oxidativo en células de Kupffer también es causa de apoptosis en los hepatocitos.

En respuesta al estrés oxidativo se instaurarían mecanismos de supervivencia en el epitelio, y el menoscabo hepatocitario se compensaría con la excesiva proliferación epitelial biliar. La intensa proliferación biliar que caracteriza la colestasis extrahepática microquirúrgica invade las zonas 1 y 2 de Rapaport, pero no la zona 3 o periportal (Aller y cols, 2004b) y, por esta razón, la proliferación ha sido considerada como atípica (Alvaro y cols, 2007).

Un de los mecanismos celulares que se pone en funcionamiento en respuesta al estrés oxidativo es la vía de señalización del factor nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B). Este además también es activado por citoquinas inflamatorias como el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ , así como por la endotoxina (LPS) (Flohe y cols, 1997; Conde de la Rosa y cols, 2008). Se ha descrito que éste factor de transcripción antagoniza la muerte hepatocitaria al influir en el equilibrio entre señales pro- y antiapoptóticas. El NF- $\kappa$ B inhibe la acumulación de ROS inducida por el TNF- $\alpha$ , que normalmente media en la activación prolongada de la quinasa N-terminal c-Jun (JNK) y por tanto la muerte celular (Sakon y cols, 2003). La inhibición de la actividad del NF- $\kappa$ B induce la apoptosis en los hepatocitos, lo que indica su papel en la transcripción de los genes antiapoptóticos.

La colestasis extrahepática induce la replicación del DNA de forma precoz y transitoria, con una gran actividad DNA alfa-polimerasa a los 4 días de evolución. Sin embargo, a los 7 días el nivel de dicho enzima es inferior al correspondiente a los animales control. Por lo tanto, la respuesta proliferativa que se asemeja a la que sufre el hígado cuando regenera post-

---

hepatectomía, es tan sólo temporal en las fases evolutivas iniciales de la colestasis extrahepática experimental (Terasaki y cols, 1991).

En este modelo experimental es posible que otros mecanismos favorezcan la proliferación a largo plazo. Así se ha demostrado que los hepatocitos periportales aumentan la expresión de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) (Tanaka y cols, 2007). Asimismo, el acúmulo de ácidos biliares secundario a la colestasis puede favorecer la proliferación de colangiocitos (Heuman y Bajaj 1994; Xia y cols, 2006). Por último, la hiperproducción de quimioquinas y factores de crecimiento por el hígado de ratas con ligadura y sección del colédoco promueve el reclutamiento de células madre derivadas de la médula ósea (Xu y cols, 2008). Asimismo el suero colestásico es capaz de inducir la diferenciación de células madre de la médula ósea en células similares a fibroblastos (Cai y cols, 2004). El acumulo de células ductulares inmaduras en el hígado colestásico de ratas indicaría la existencia de una inhibición de sus apoptosis así como de estímulos favorecedores de su proliferación, independientemente de su origen (Omenetti y cols, 2008).

Este nuevo epitelio biliar proliferante quizá pueda verse favorecido por la disminución de la concentración de citoquinas proinflamatorias hepáticas. La disminución en la producción de citoquinas también puede ser secundaria al nuevo fenotipo que adopten las células proliferantes, capaz de producir neuropéptidos y hormonas neuroendocrinas (Nelson y cols, 2006; Mombeini y cols, 2006). A su vez, la hiperproducción de péptidos opioides por el epitelio biliar proliferante potencia la activación de células estrelladas hepáticas y el acumulo de colágeno (Ebrahimkhani y cols, 2006). Sin embargo, el hígado colestásico es dinámico y en tanto que la máxima proliferación biliar acontece en la primera semana de evolución en la colestasis extrahepática experimental, el proceso fibrogénico es más tardío (Campbell y cols, 2004; Kojima y cols, 2004; Lazaridis y cols, 2004). Por lo tanto, se ha propuesto la hipótesis de que la producción de péptidos opioides endógenos por el hígado colestásico, inicialmente podría limitar la gran reacción proliferativa que tiene lugar y en estadios más tardíos favorecería la activación del proceso fibrogénico, en tanto que similar al que

---

se produce en la reparación de una herida si persiste la agresión, esto es, la obstrucción biliar (Marzioni y cols, 2007).

La equiparación del hígado colestásico con la evolución de una herida, es de gran interés conceptual, porque es posible la transferencia de información entre estas dos áreas de investigación. Así considerando que a más larga evolución el proceso de remodelación hepática en animales con colestasis microquirúrgica favorece la fibrosis, en detrimento de la proliferación biliar, la disminución en la concentración de citoquinas, tanto proinflamatorias Th<sub>1</sub> (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) y Th<sub>2</sub> (IL-4) como antiinflamatorias (IL-10) podría sugerir la existencia de una disminución de la actividad metabólica inflamatoria que favorecería la fibrosis hepática y con ella la producción de un tejido con menores necesidades energéticas. Así a menor vitalidad tisular se reducen los requerimientos metabólicos. A este respecto, no solo la fibrosis que rodea los ductos proliferantes, sino los propios colangiocitos que lo forman poseen una reducida capacidad metabólica, como refleja su reducida actividad citocromooxidasa (Lopez y cols, 1999).

Si se considera que la inflamación hepática secundaria a colestasis obstructiva tiene por finalidad la reparación es posible que el estudio de las citoquinas implicadas mejore el conocimiento de los mecanismos etiopatogénicos que inducen sucesivamente el predominio de la proliferación de colangiocitos y de la respuesta fibrogénica. Ya que el estudio realizado de la concentración de citoquinas en el hígado de ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica representa su contenido en la totalidad del parénquima hepático, la disminución encontrada podría reflejar una reducción de su síntesis y/o almacenamiento. Aunque las citoquinas estudiadas pueden ser sintetizadas por distintos tipos celulares, epitelio, endotelio y leucocitos entre otros, nuestro interés se ha centrado en las células cebadas ya que su número aumenta de forma considerable en el parénquima hepático cuando existe un proceso inflamatorio (Franceschini y cols, 2006).

En el hígado de ratas con resección microquirúrgica de la vía biliar, a las 4 semanas de evolución, se ha demostrado que se produce un incremento significativo de las células cebadas, adoptando una disposición alrededor de

los ductos biliares proliferantes y en íntima relación con los septos fibrosos (Aller y cols., en prensa).

Las células cebadas pueden sintetizar una gran variedad de citoquinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-25, TNF- $\alpha$ , IL-15, IL-16, IL-18 e IL-25), así como quimioquinas y factores de crecimiento y hematopoyéticos (Factores de crecimiento de colonias granulocito-macrófagos (GM-CSF), factor de células pluriopotenciales (SCF), TGF- $\beta$ , VEGF, factor de crecimiento nervioso (NGF)), también proteasas, heparinas e histamina (Metz y cols, 2007; Hu y cols, 2007). Se explica así la versatilidad funcional de las células cebadas, las cuales no sólo pueden iniciar y estimular la inflamación, sino también especificar el tipo de respuesta inflamatoria, inhibirla o limitarla (Metz y cols, 2007).

En la colestasis extrahepática, las células cebadas han sido implicadas en la capilarización sinusoidal, un proceso mediante el cual el endotelio sinusoidal se transforma en un endotelio propio de capilares y, por esta razón, los sinusoides hepáticos se asemejan a capilares ya que incluso poseen membrana basal continua, formada por colágeno (Franceschini y cols, 2006). Pero las células cebadas no solo se acumulan en el hígado durante la evolución de la colestasis, sino también cuando la colestasis es revertida por recanalización biliar. En este último caso, la recanalización del colédoco previamente ligado, causa un abrupto y transitorio incremento del número de células cebadas en el hígado, asociado a una disminución rápida del número de ductos biliares e incremento de células epiteliales biliares apoptóticas (Takeshita & Shibayama, 2005). Asimismo en pacientes con colangitis secundaria por obstrucción del colédoco, se observa un elevado número de células cebadas que infiltran la pared del colédoco, la cual sufre colangitis esclerosante (Gulubova & Vlaykova, 2004).

Las células cebadas activadas producen abundante IL-6, una citoquina que protagoniza en el hígado la respuesta de fase aguda (Plaut y cols, 1989). Su incrementada producción por las células cebadas del hígado colestásico, explicaría las elevadas concentraciones plasmáticas de glicoproteína ácida  $\alpha_1$  y de tiostatina (Tabla 11, Figura 44) las ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica. En ratas con colestasis por ligadura y sección de colédoco, la administración intraperitoneal de LPS

causa un incremento significativo de la concentración plasmática de glicoproteína ácida  $\alpha_1$  y de bapto globina; así como produce elevada mortalidad (Nielsen y cols, 2006). Las proteínas de fase aguda tienen distintas funciones, así glicoproteína ácida  $\alpha_1$  posee una función antiinflamatoria (Hocheppied y cols, 2003) en tanto que tiostatina ( $\alpha_2$  MAP) es un inhibidor de proteínasa plasmática y, por lo tanto, protege contra la autodegradación proteolítica (Fey & Gauldie, 1990). El incremento plasmático de glicoproteína ácida  $\alpha_1$  y tiostatina en la colestasis microquirúrgica de la rata también podría ser secundaria a la estimulación de LPS, procedente de la traslocación bacteriana intestinal, que induciría la producción de IL-6 y, en consecuencia, la síntesis prioritaria de proteínas de fase aguda en detrimento de la síntesis de albúmina. Por lo tanto, en este modelo de fibrosis colestásica hepática, la respuesta de fase aguda constituiría un mecanismo defensivo contra el proceso inflamatorio hepático causante de la reacción fibroproliferativa. En este supuesto, el incremento de células cebadas en la colestasis obstructiva favorecería la respuesta de fase aguda antiinflamatoria, mediante la hiperproducción de IL-6.

Aunque la cirugía hepática se asocia con mayor riesgo si existe colestasis, estudios en roedores con colestasis obstructiva han demostrado que la colestasis protege al hígado de la agresión tanto por isquemia, como por inflamación (Georgiev y cols, 2007). Asimismo, la colestasis no suprime la regeneración hepática post-hepatectomía (Weinbren, 1953), ni la capacidad proliferativa de los hepatocitos secundaria a la obstrucción del flujo portal (Mizuno y cols, 1996).

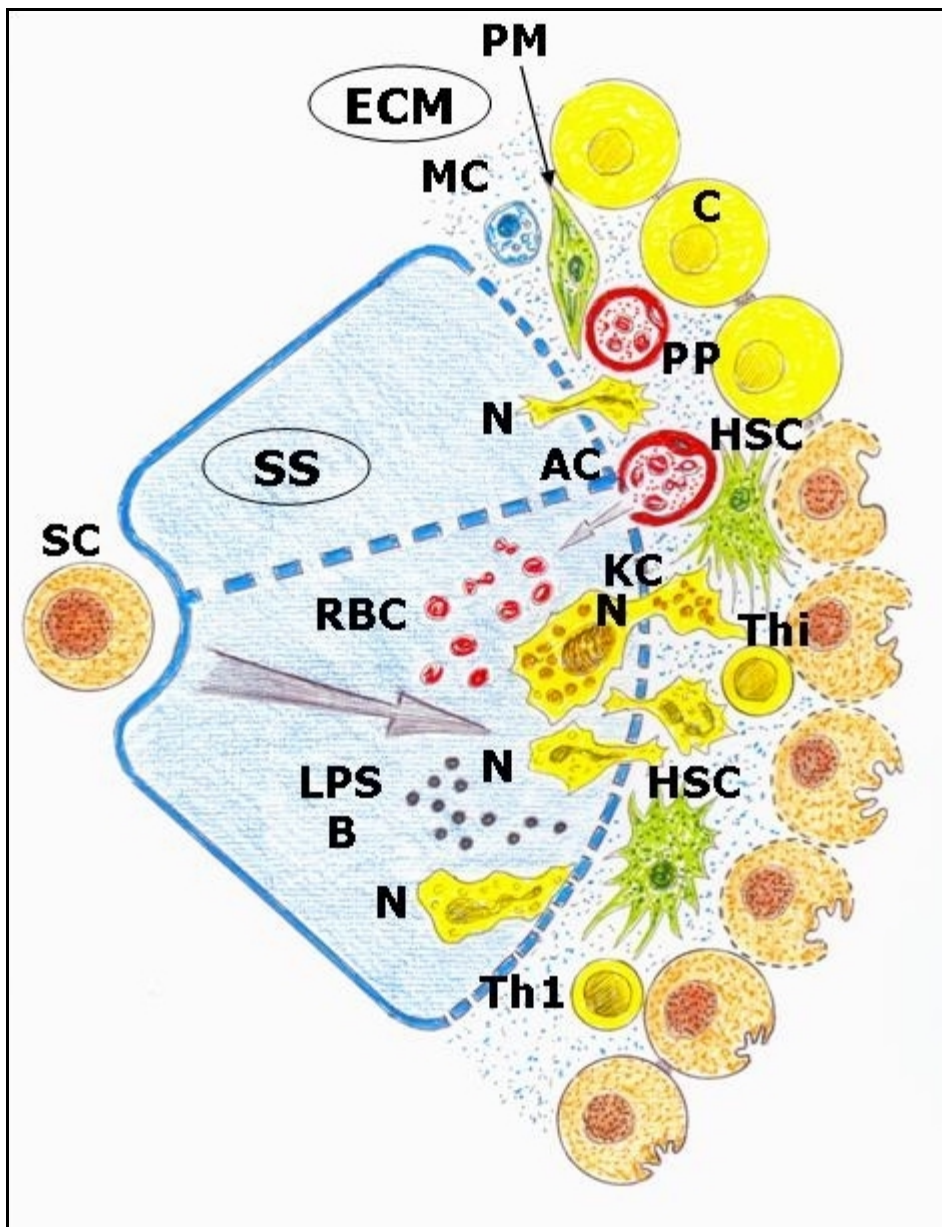
En la capacidad del hígado colestásico para generar una eficaz respuesta antiinflamatoria, así como proliferativa, podrían estar implicadas las células cebadas, lo que sugiere que a lo largo del proceso inflamatorio que conduce a una intensa respuesta fibrótica, éstas células podrían sufrir sucesivos cambios fenotípicos, obedeciendo a los diferentes tipos de estímulos que reciben. En este supuesto, se explicaría que su actividad proinflamatoria inicial se torne antiinflamatoria y pro-mitótica y, por último, induzca una acción remodeladora (Metz y cols, 2007). Por lo tanto, una vez más, el proceso que culmina en fibrosis hepática, sería un proceso dinámico similar a la cicatrización y mediado por células cebadas, e incluiría las tres fases

---

que se consideran comunes a ambos procesos, esto es, inflamación, síntesis de matriz extracelular y remodelación tisular (Franceschini , 2006).

En los procesos de remodelación fibrótica que acompañan a la inflamación crónica, se ha identificado como uno de los principales reguladores a los linfocitos T de tipo Th<sub>2</sub>. Las células Th<sub>2</sub> producen citoquinas como son IL-4, IL-5, IL-13 e IL-21, que realizan diversas actividades en la regulación de la remodelación tisular y la fibrosis (Wynn, 2008) . La IL-4, junto con otras citoquinas Th<sub>2</sub>, así IL-9, IL-10 e IL-13, son conocidos factores de crecimiento de las células cebadas y responsables, parcialmente, de su hiperplasia. La capacidad de IL-4 para promover la proliferación y diferenciación de células cebadas se ha demostrado en roedores y humanos (Smith & Rennick, 1986; Boyce, 2003). Sin embargo, otras acciones de IL-4 respecto de células cebadas, son también posibles, dependiendo de ciertas circunstancias, así mecanismos dependientes de IL-4, también pueden inducir apoptosis de células cebadas y suprimir su desarrollo (Hu y cols, 2007).

Ya que la inflamación hepática colestásica, es un proceso dinámico las citoquinas implicadas en su producción también pueden sufrir modificaciones evolutivas. Por lo tanto, en una fase proinflamatoria inicial, con predominio de factores que induzcan la proliferación de células cebadas (SCF, IL-3, IL-4, IL-9, IL-10 e IL-13) se pueden asociar citoquinas Th<sub>1</sub> como son JNF- $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e incluso TGF- $\beta$ . Este tipo de interrelación de distintos tipos de citoquinas durante la evolución de la respuesta inflamatoria se ha descrito en otros procesos crónicos como el asma (Doherty & Broide, 2007). Por lo tanto, la cronicidad de los procesos inflamatorios obliga a un estudio pormenorizado durante la evolución para desentrañar el mecanismo por el que actúan los diversos mediadores implicados. Puesto que ambos tipos de citoquinas Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub> pueden influir en la evolución del hígado colestásico, los resultados obtenidos en el presente trabajo experimental obligan a ser muy cautos en su interpretación.



**Figura 52.** La inflamación hepática colestásica es un proceso dinámico que sufre modificaciones evolutivas interrelacionándose distintos tipos de respuestas.

La ictericia obstructiva en roedores se ha descrito que produce elevación plasmática precoz (3 días) de IL<sub>6</sub>, la cual se mantiene a los 5 días de evolución (Fujiwara y cols, 2001) y se asocia con inflamación portal mediada por TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y con reclutamiento de neutrófilos (Donner y cols, 2007). La colestasis obstructiva en este periodo precoz (7 días) ya origina la diferenciación de dos poblaciones diferentes de hepatocitos, esto es, una periportal con patrón de colestasis y una población normal

perivenosa central . esta heterogeneidad favorece el cambio de la formación de bilis a la zona 3, en tanto que el fenotipo colestásico de los hepatocitos periportales puede mejorar la agresión hepatocitaria en esta población (Donner y cols, 2007).

La apoptosis hepatocelular es el resultado en esta fase de la acumulación de bilis, sales biliares y colesterol (Trauner y cols, 1998). Sin embargo, también el incremento de citoquinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  que se incrementan significativamente en el plasma favorecen el daño tisular en la colestasis obstructiva experimental (Cindoruk y cols, 2007). A su vez, la activación de PPAR $\alpha$  (receptor alfa de activador de la proliferación de peroxisomas) que modula el metabolismo de colesterol y suprime la síntesis de ácidos biliares, produce la disminución plasmática de bilirrubina, enzimas hepáticos (AST, ALT, ALP, GGT), TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y ácidos biliares, así como el grado de inflamación portal y necrosis hepática en ratas con ligadura y sección de colédoco a los 7 días del postoperatorio. Por esta razón se considera que la inducción de PPAR $\alpha$  reduce la inflamación post-colestasis obstructiva, mediante la inhibición de sus mediadores (Cindoruk y cols, 2007), y mediante el aumento de la síntesis de enzimas antioxidantes y, por tanto, reduciendo el estrés oxidativo y la fibrosis (Toyama y cols, 2004). También se ha demostrado que el hígado de las ratas con colestasis produce gran incremento de TNF- $\alpha$  en respuesta a LPS, sugiriéndose que esta alteración podría ser causada por la sensibilización de las células de Kupffer a endotoxina (O'Neil y cols, 1997).

Por el contrario, la transferencia génica de hormona estimulante de melanocitos alfa (MSH- $\alpha$ ) reduce significativamente la inflamación hepática en la colestasis experimental precoz (7 días) asociado a disminución de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e iNOS (mRNA), marcadores de dicha inflamación. Se atribuye esta respuesta a la inhibición por MSH- $\alpha$  de las células de Kupffer y de las células estrelladas hepáticas en el hígado con colestasis obstructiva (Wang y cols, 2008).

Otros factores que pueden favorecer la evolución precoz de la colestasis obstructiva experimental son la esplenectomía y la administración de antibióticos. En particular, la esplenectomía incrementa la producción de IL-10 una citoquina antiinflamatoria (Hong y cols, 2007). Se explica así

---

también la implicación de la esplenomegalia en la respuesta inflamatoria esplácnica en la colestasis obstructiva experimental y en particular en la inflamación hepática. En el ratón la colestasis extrahepática produce un rápido incremento plasmático de IL-10, a las 24 horas de evolución, con disminución posterior. El incremento continuo de IL-10 que produce la esplenectomía durante la primera semana de evolución, se asocia con gran disminución del estrés oxidativo en neutrófilos circulantes y disminución del grado de necrosis. Asimismo, la esplenectomía reduce las elevadas concentraciones plasmáticas de  $\gamma$ -IFN que produce la colestasis obstructiva en el ratón. Por esta razón, se ha propuesto que la agresión hepática en la colestasis es consecuencia de una respuesta esplénica, quizá producida por bacterias/endotoxina y/o NO, pero dependiente de  $\gamma$ -IFN. A su vez, esta respuesta nociva sería suprimida por el aumento de IL-10, quizá generada por los linfocitos Th<sub>2</sub> de la mucosa intestinal, secundario a esplenectomía (Hong y cols., 2007).

Por el contrario, la administración de antibióticos (estreptomicina y penicilina) a ratones con colestasis obstructiva aunque suprime la expresión hepática de iNOS y la producción de especies reactivas de oxígeno por neutrófilos circulantes, causa la muerte de los animales durante la primera semana de evolución. Esta alta mortalidad ha sido atribuida al agravamiento del síndrome hepatorenal que sufren estos animales por la insuficiencia hepática y la hiperbilirrubinemia (Hong y cols, 2007). Estos resultados sugieren que la administración de antibióticos en este modelo experimental puede modificar la respuesta inflamatoria esplácnica ya que producen cambios en la flora intestinal, reduciendo el número de bacterias entéricas.

Las variaciones en las concentraciones plasmáticas de citoquinas en la colestasis extrahepática experimental son oscilantes durante la evolución (Plebani y cols, 1999; Hong y cols, 2007). Por ejemplo, TNF posee un patrón fluctuante con altos valores plasmáticos a las 12 h, disminución durante el 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> día del postoperatorio e incrementos aislados en los días 8 y 14. A su vez, las concentraciones plasmáticas de IL-6 son máximas en el postoperatorio inmediato pero disminuyen progresivamente hasta alcanzar la normalidad (Plebani y cols, 1999).

La concentración plasmática de citoquinas se correlaciona con la correspondiente hepática en ratas con ligadura y sección del colédoco a los 28 días de evolución. Así incrementos plasmáticos de NTF- $\alpha$  e IL-10 se asocian con significativas elevaciones hepáticas. Sin embargo en el hígado disminuyen las concentraciones de IL-6 e IFN- $\gamma$  respecto de animales pseudooperados (Fernández-Martínez y cols, 2006). Asimismo, indetectables concentraciones de IL-1 $\beta$  en plasma, se asocian con significantes incrementos hepáticos en ratas con colestasis extrahepática de la citada evolución. Ya que TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son citoquinas implicadas en la producción de fibrosis, asociadas a TGF- $\beta$ 1, ambas contribuirían a la perpetuación de la cirrosis hepática (Simpson y cols, 1997; Fernández-Martínez y cols, 2006). Sin embargo, en la colestasis obstructiva a largo plazo en la rata, la disminución de  $\gamma$ -IFN hepática y plasmática, se ha atribuido a la inhibición que produce IL-10. En este sentido, se ha propuesto que el incremento de IFN- $\gamma$ , una citoquina de tipo Th<sub>1</sub>, podría ser regulada por IL-10, una citoquina de tipo Th<sub>2</sub> durante la evolución de las enfermedades hepáticas (Fernández-Martínez y cols, 2006). Esta interrelación entre citoquinas de tipos Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub> podría favorecer a las últimas, si se tiene en cuenta que el hígado exhibe un perfil de secreción de citoquinas que favorece la polarización Th<sub>2</sub>. En particular, células dendríticas hepáticas tienen deficiente secreción de IL-12 lo que favorece la polarización Th<sub>2</sub>. Asimismo, células dendríticas co-cultivadas con células epiteliales biliares de rata, estimulan células T alogénicas a secretar IL-4 e IL-10, en vez de IFN- $\gamma$  (Cabillic y cols, 2006). Esta modulación de la producción de citoquinas Th<sub>2</sub>, que también se ha encontrado en células dendríticas in vivo podría contribuir a la respuesta inmune especializada del hígado (Goddard y cols; De Creus y cols; Cabillic y cols, 2006).

También el incremento de las citoquinas inflamatorias en ratas con colestasis obstructiva causan la inducción de Mrp3, una proteína de transporte de los hepatocitos que ejerce una destacada función citoprotectora (Bohan y cols, 2003).

En modelos experimentales de colangitis crónica, utilizando una toxina que lesiona los conductos biliares, se ha demostrado que la evolución con fibrosis y proliferación ductular se asocia con un perfil hepático de

---

citoquinas dominante tipo Th<sub>1</sub> (Tjandra y cols, 2000). Los autores de este trabajo consideraban que la producción hepática de citoquinas y, en particular, la polarización ya Th<sub>1</sub> o Th<sub>2</sub> estaría muy influenciada por el medio ambiente creado por las células productoras de citoquinas, así como por la intensidad del estímulo para la producción de citoquinas. En este modelo de colangitis crónica ante el predominio de la producción de citoquinas Th<sub>1</sub> en el hígado, los autores preconizaban un tratamiento con IL-10 o con anticuerpos anti-IL-12 que suprimiría la liberación de citoquinas Th<sub>1</sub> (Tjandra y cols, 2000).

La obstrucción biliar también causa la producción hepática de quimioquinas, con infiltración por neutrófilos (Saito y Maher, 2000). A las 3 horas de ligadura y sección del colédoco en la rata se produce la infiltración por neutrófilos que ha sido atribuida a la producción de quimioquinas por el epitelio biliar (Saito y Maher, 2000). Las células inflamatorias son reclutadas por el hígado durante la colestasis por quimioquinas C-C, como MCP-1 (Saito y Maher, 2000). Tanto MIP-2 como MCP-1 ejercen un efecto nocivo hepático ya que estimulan la liberación de Kupffer y los neutrófilos (Sprenger y cols, 1997). Por esta razón, la administración de glucocorticoides a ratas con ligaduras y sección del colédoco reduce la infiltración de neutrófilos ya que modula la producción de quimioquinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-8 y MCP-1, aunque no rescatan al parénquima hepático de la lesión colestásica (Hsieh y cols, 2006).

Los neutrófilos que infiltran el hígado en la colestasis obstructiva experimental se acumulan en las regiones periportales y tras activarse degranulan y liberan una metaloproteinasa de matriz (MMP)-8 que, sin embargo, eleva su actividad cuando la vía biliar es descomprimida. Por esta razón se ha propuesto que MMP-8 de neutrófilos puede desempeñar un papel antifibrogénico. Ya que MMP-8 degrada principalmente colágeno I, su acción podría ser beneficiosa durante la recuperación del hígado colestásico (Harty y cols, 2005).

La variabilidad en la producción hepática de citoquinas también puede ser atribuida a la elevada sensibilidad del hígado a la agresión por las bacterias o sus toxinas, cuando sufre colestasis (Lechner y cols, 1998). Asimismo, la infección y la sepsis son habituales acompañantes de la colestasis (Geier y

---

cols, 2006). Una de las causas de esta interrelación es el deficiente aclaramiento de endotoxinas por las células de Kupffer en ratas con ligadura y sección del colédoco (Kennedy y cols, 1999). Lipopolisacáridos son endotoxinas liberadas en la circulación por translocación bacteriana intestinal en la colestasis experimental y estimulan la producción por células de Kupffer y otros macrófagos de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. A su vez, estas citoquinas están implicadas en la alteración de la secreción biliar. En particular TNF- $\alpha$  es un mediador importante de este efecto patológico ya que inhibe la expresión de acuaporina (AQP)-8, una molécula que a nivel intracelular redistribuye el dominio canalicular biliar, incrementando la permeabilidad canalicular osmótica del agua y, por lo tanto, facilitando su movimiento osmótico (Lehmann y cols, 2008). La endotoxina también menoscaba la capacidad hepática de las ratas cirróticas para sintetizar urea (Nielsen y cols, 2007). Estas alteraciones producidas por LPS, son de particular interés por su relación íntima con la producción de citoquinas proinflamatorias tipo Th<sub>1</sub>. así la administración de LPS a ratas con colestasis obstructiva produce gran incremento en la producción de TNF- $\alpha$  en hígado y bazo. Se ha propuesto que el incremento de la producción hepatoesplénica de TNF- $\alpha$  es secundaria al aumento de la sensibilidad de los macrófagos a endotoxina en la ictericia obstructiva (O'Neill, 1997).

Se ha demostrado que lipoproteína de alta densidad reconstituida (rHDL) reduce el efecto de LPS en TNF- $\alpha$  así como en las alteraciones hemodinámicas que caracterizan el modelo de colestasis en la rata por ligadura y sección del colédoco (Ramírez, 2004). Ya que rHDL también restaura la actividad eNOS hepática, disminuye las concentraciones plasmáticas de TNF- $\alpha$ , así como los niveles plasmáticos y hepáticos de LPS proteína de unión (LBP) y reduce la presión portal, en dicho modelo experimental, tratado con LPS, se ha concluido que son las propiedades antiinflamatorias en ratas cirróticas las responsables de la atenuación de efectos patológicos que se asocian a la colestasis obstructiva experimental cuando se administra LPS (Thabut y cols, 2007).

Aunque la colestasis aumenta el número de células inflamatorias, como linfocitos T y B y monocitos-macrófagos, reduce la expresión de los correspondientes marcadores de activación celular y, por tanto, el resultado

---

es la reducida respuesta de las células inflamatorias creando un estado de inmunosupresión. La disminuida respuesta de las células inflamatorias se considera relacionada con la hiperproducción de especies reactivas de oxígeno o estrés oxidativo, y con la reducida actividad fagocitaria de estas células. Esta inmunodeficiencia no solo es revertida por el drenaje biliar en la ictericia obstructiva experimental, sino también por tratamiento con anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  (Padillo y cols, 2007).

El estrés oxidativo es un mecanismo etiopatogénico de primer orden en la colestasis extrahepática experimental (Wright y cols, 2007), lo que se ha demostrado por los efectos beneficiosos de los tratamientos con antioxidantes (Liu y cols, 2001; Soylyu y cols, 2006; Cruz y cols, 2007). Sin embargo, el tratamiento con antioxidantes (vitaminas E y C) aunque atenúa el desarrollo de la fibrosis hepática, no mejora la lesión necroinflamatoria en ratas con ligadura y sección de colédoco (Soylyu y cols, 2006).

Sin embargo, el hígado colestásico es más resistente que el normal a la agresión isquémica. Así, cuando se somete a isquemia se reduce la lesión hepática, se altera la actuación de NF- $\kappa$ B, se inhibe la transcripción de TNF- $\alpha$  y se reduce la respuesta inflamatoria respecto del parenquima hepático normal (Georgiou y cols, 2007). Se ha considerado que este efecto protector estaría mediado por un factor sistémico que no sería bilirrubina.

También el hígado colestásico de la rata mantiene una capacidad para la producción de proteínas de fase aguda, similar al hígado normal. Por lo tanto, su contribución en la respuesta de fase aguda es normal (Nielsen y cols, 2006).

A su vez, la respuesta inflamatoria hepática no siempre tiene un signo irreversiblemente adverso. Así, en ratas con colestasis extrahepática la expresión de quimioattractante de neutrófilos inducido por citoquina (CINC)-1 y de ICAM-1, que son necesarias para el reclutamiento de neutrófilos y para la adhesión firme de las células inflamatorias al endotelio y su posterior diapedesis (Ishihara y cols, 2006), producen la infiltración del hígado ocupando principalmente los tractos portales en íntima relación con las células epiteliales biliares proliferantes y con las áreas de fibrosis. Se ha demostrado que los macrófagos hepáticos activan la producción de CINC-1 e ICAM-1 favoreciendo el reclutamiento de neutrófilos en los tractos

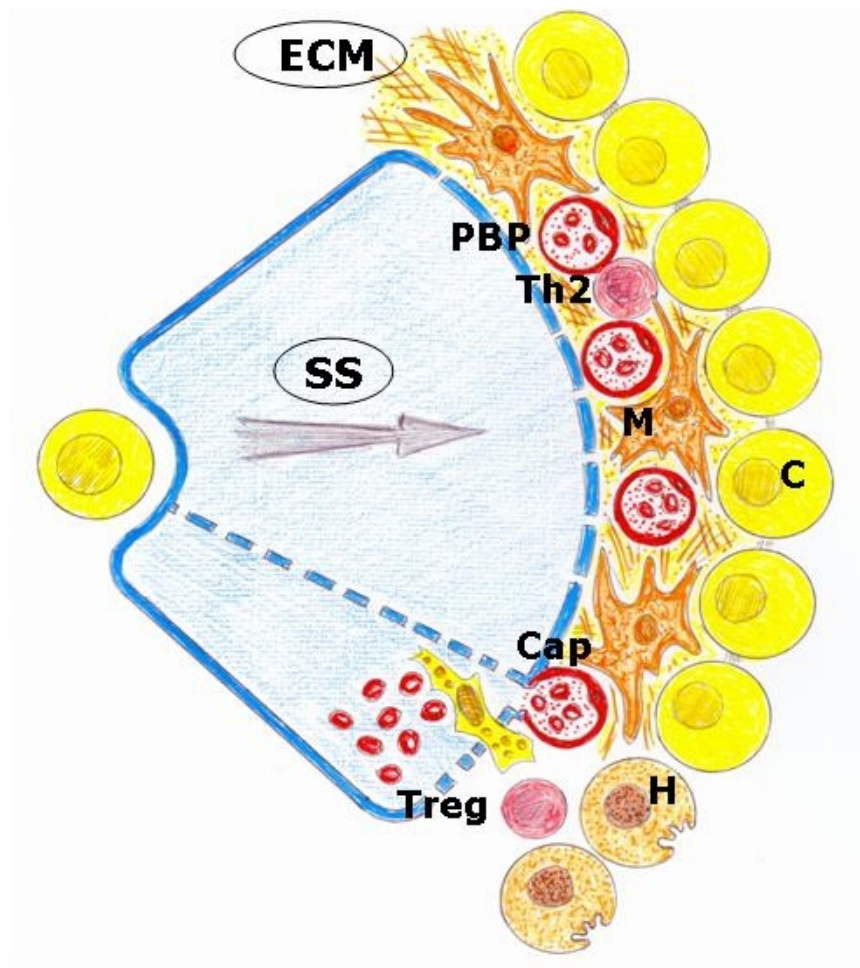
---

portales del hígado colestásico, los cuales pueden ejercer una función antifibrótica ya que mediante la liberación de enzimas (metaloproteinasas de matriz) degradan la matriz extracelular formada. Así, tras recanalización de la vía biliar de ratas colestásicas, la depleción de los macrófagos hepáticos reduce la infiltración por neutrófilos y, por tanto, retrasa la reparación (Roggin y cols, 2000; Harty y cols, 2005; Harty y cols, 2008).

La ictericia también es un importante mediador de la respuesta inflamatoria hepática en la colestasis extrahepática experimental. La bilirrubina se produce por la reducción de la biliverdina por la biliverdina-reductasa (Schmidt, 1975). Entre sus propiedades biológicas destacan sus acciones beneficiosas como son la antioxidante, antiapoptótica, antimutagénica e inmunomoduladora (Vitek y Shwertner, 2007; Bulmer y cols, 2008). Por ejemplo, en ratones con endotoxemia, la bilirrubina se ha demostrado que por su administración monodosis es capaz de ejercer un importante efecto antioxidante así como una intensa actividad antiinflamatoria (Moseley, 1999). En particular, en la sepsis, la hiperbilirubinemia precede a los hemocultivos positivos en dos tercios de los casos (Marrero y cols, 2003). Estos resultados sugieren que la función inmunoreguladora de bilirrubina influye en la evolución de la respuesta inflamatoria esplácnica y sistémica secundaria a la colestasis extrahepática experimental.

La proliferación biliar en la colestasis extrahepática de la rata se asocia con una intensa proliferación del plexo peribiliar (Gaudio y cols, 1996) y se ha considerado un intento del epitelio de restaurar la secreción biliar normal (Beaussier y cols, 2005). La íntima relación entre la proliferación biliar y del plexo peribiliar indicaría el efecto nocivo que la isquemia arterial ejercería en el epitelio biliar, durante la evolución de la colestasis extrahepática experimental. Sin embargo, la proliferación biliar es capaz, sin producir importante fibrosis, de restaurar la función biliar cuando se asocia isquemia arterial (Beaussier y cols, 2005). Estos resultados sugieren que existe una relación patogénica entre colangiocitos y células endoteliales, la cual mediaría los cambios adaptativos de éstas células durante la evolución de la colestasis. Sin embargo, la información que existe respecto al aporte vascular arterial del hígado en situaciones patológicas, es muy limitada. La

isquemia arterial hepática se ha demostrado que reduce la producción de VEGF-A por los colangiocitos en ratas con ligadura y sección del colédoco. Por lo tanto, factores que favorezcan la isquemia arterial hepática dificultarían la proliferación biliar y activarían la apoptosis (Gaudio y cols, 2006). Ya que la inflamación portal y la fibrosis periductular en la colestasis extrahepática de la rata son estimuladas por la proliferación de los colangiocitos, mediante la secreción de citoquinas y quimioquinas que activan las células estrelladas hepáticas, si se asocia isquemia arterial hepática se reduce el grado de necrosis, de inflamación portal y de fibrosis periductular (Grappone y cols, 1999; Gaudio y cols, 2006).



**Figura 53.** La inflamación portal y la fibrosis periductular en la colestasis extrahepática de la rata es estimulada por los colangiocitos mediante la secreción de citoquinas que activan las células estrelladas.

Por lo tanto, en este modelo experimental de colestasis obstructiva, la prevención del estrés oxidativo y de la respuesta inflamatoria reduce el daño hepático (Karaman y cols, 2006; Yilmaz y cols, 2007), sin embargo, ambas respuestas patogénicas también desempeñan un papel beneficioso, cuya utilización puede ayudar en el planteamiento de nuevos tipos de terapias que permitan la reversibilidad de las alteraciones histológicas.

Puesto que uno de los más importantes empleos que podría tener el modelo de colestasis microquirúrgica en la rata es el ensayo de terapias antifibrogénicas, en el presente trabajo se ha estudiado mediante la tinción del Rojo Sirio (Iredale, 2007), el grado de fibrosis. Estudios previos en este modelo experimental han demostrado que el grado de fibrosis utilizando este método de tinción del colágeno, es más específico que la determinación del índice de actividad histológica de Knodel (Sánchez-Patán y cols. *Microsurgery* "en prensa"). Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman la validez de este modelo experimental de colestasis microquirúrgica para el estudio, profilaxis y tratamiento de la fibrogénesis hepática colestásica.

En el hígado normal las células cebadas están en íntima relación con los tractos portales y están implicadas en las respuestas inmunológicas así como en el mantenimiento y reparación del tejido conectivo. En ratas con colestasis de larga evolución se produce hiperplasia de células cebadas hepáticas con degranulación. Aunque esta alteración no coincide con el inicio de la fibrosis hepática, sin embargo acontece cuando se produce una significativa síntesis y organización de los elementos que constituyen la matriz extracelular. Por esta razón, se ha propuesto que las células cebadas hepáticas, mediante la liberación de mediadores profibrogénicos, podrían contribuir a las alteraciones fibróticas que se producen en la cirrosis biliar (Rioux y cols, 1996). Sin embargo, las proteasas producidas por células cebadas también podrían aumentar la resistencia hepática a toxinas endógenas como sucede en la clínica humana (Metz y Maurer, 2007) en cuyo caso, destacaría su capacidad antiinflamatoria o bien produciendo inmunotolerancia en la colestasis extrahepática experimental. La reducida concentración de citoquinas proinflamatorias en estos animales podría sugerir dicha posibilidad.

---

La hipertensión portal es una complicación de la colestasis extrahepática en la rata y se ha considerado de tipo sinusoidal (Abralde y cols, 2006). Tanto la colestasis macroquirúrgica como microquirúrgica en la rata producen circulación hiperdinámica y desarrollo de circulación colateral portosistémica (Lee y cols, 1986; Sikuler y cols, 2004; Aller y cols, 2004).

La hipertensión portal es un síndrome clínico que se define por la elevación patológica de la presión sanguínea en el sistema venoso portal (Moreau y Lebré, 2006). Se manifiesta clínicamente con ascitis, encefalopatía portosistémica y varices hemorrágicas y, frecuentemente, es causa de muerte (Mahl y Groszmann, 1990). Estas complicaciones de la hipertensión portal en la clínica humana también son propias de las ratas con colestasis extrahepática si bien ocurren con un periodo evolutivo significativamente más reducido.

Se ha propuesto que la hipertensión portal sería causante de una inflamación de bajo grado esplácnica y sistémica y, por esta razón, las alteraciones histológicas y bioquímicas que se producen durante su evolución se han considerado como mecanismos etiopatogénicos de dicha respuesta inflamatoria (Aller y cols, 2007a). En este sentido, los resultados del presente trabajo experimental referente a las concentraciones de citoquinas en el intestino delgado (íleon) y ganglios linfáticos mesentéricos de ratas con colestasis de larga evolución, parecen avalar dicha hipótesis.

El tracto gastrointestinal sufre de inmediato el incremento de la presión venosa portal que causaría una redistribución del flujo sanguíneo en su pared, con aumento en la muscularis mucosa y disminución en la mucosa. La hipoxia de la mucosa intestinal se ha atribuido a la vasoconstricción arteriolar, en tanto que en la muscularis mucosa se produciría vasodilatación arteriolar (Davis y Gore, 1985). En consecuencia, la agresión isquémica con posible incidencia del fenómeno de isquemia revascularización, asociado al aumento de la presión en las vénulas postcapilares, serían los factores que inicialmente desencadenarían la respuesta inflamatoria intestinal cuando se produce hipertensión portal. La hipoxia en la mucosa intestinal causa estrés oxidativo y nitrosativo, así como favorece la expresión de factor inducible de hipoxia (HIF)-1 que, a su vez, estimula la expresión de genes que responden a la hipoxia. Por este

---

mecanismo se facilitaría la supervivencia de las células cuando sufren privación de oxígeno ya que el metabolismo celular se adapta a las condiciones de falta de oxígeno que impone la hipertensión portal (Davies y Tripathi, 1993).

Como consecuencia del fenómeno de isquemia-revascularización intestinal, en las fases evolutivas iniciales de la hipertensión portal se produciría estrés oxidativo y nitrosativo con edema e infiltración por neutrófilos. Esta respuesta exudativa también la sufriría el peritoneo, produciendo derrame exudativo intra y extraperitoneal, este último infiltrando el espacio retroperitoneal de las ratas con hipertensión portal. La naturaleza inflamatoria de esta respuesta se ha sugerido por la inhibición que produce budesonida, un fármaco esteroideo antiinflamatorio (Vega de Ceniga y cols, 2003). Ya que budesonida también posee un efecto antiinflamatorio en la respuesta alérgica a los alérgenos, por inhibición de factores de transcripción reguladores de esta respuesta inflamatoria, como son AP-1 y NF- $\kappa$ B (Barnes, 2001), se ha propuesto que en la inflamación secundaria a hipertensión portal también podrían participar mediadores y mecanismos similares (Vega de Ceniga y cols, 2003).

En este sentido, se ha demostrado que Ketotifeno, un fármaco estabilizador de la membrana de células cebadas (Grant y cols, 1990) reduce la presión portal, el número de células degranuladas en el ciego y la concentración de proteasa de células cebadas de rata (RMCP)-II en los ganglios linfáticos mesentéricos de ratas con hipertensión portal prehepática (Aller y cols, 2007c). Entre los mediadores liberados por células cebadas que pueden causar vasodilatación y edema, por aumento de la permeabilidad vascular, destacan histamina y serotonina (Galli y cols, 2005). También las proteasas de células cebadas pueden regular el tono del lecho vascular esplácnico y producir degradación de la matriz extracelular con edema. En particular, RMCP-II que es un mediador específico de la degradación de células cebadas de la mucosa, puede modular la función vascular por su capacidad para convertir angiotensina I en angiotensina II, un poderoso vasoconstrictor que produce isquemia de la mucosa pero que también causa aumento de la permeabilidad y favorece el reclutamiento de células inflamatorias en los tejidos (Galli y cols, 2005).

---

Angiotensina II y RMCP-II por sus acciones patológicas en la mucosa intestinal, también podrían ser causantes de traslocación bacteriana a los ganglios linfáticos mesentéricos, donde activarían el quimiotactismo para células cebadas, agravando así la respuesta inflamatoria esplácnica (Stenton y cols, 1998).

La demostración del incremento de células cebadas en intestino delgado y ganglios linfáticos de ratas con hipertensión portal prehepática (Diez-Arias y cols, 2001) permite suponer que estas células están implicadas en las alteraciones intestinales secundarias al aumento de presión portal aunque su función podría ser ambivalente, esto es, ya perjudicial o beneficiosa (Farhadi y cols, 2007; Hu y cols, 2007).

El sistema inmunitario intestinal constituye la parte más extensa y compleja del sistema inmunitario. En el intestino, los múltiples mecanismos de defensa existentes, comprenden principalmente enzimas digestivos, flora intestinal, epitelio intestinal y el tejido linfoide asociado al intestino (GALT: *Gut-Associated Lymphoid Tissue*). GALT, se divide en dos compartimientos, el organizado, constituido por folículos linfoides aislados, folículos linfoides asociados o placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos, y el difuso, integrado por poblaciones de linfocitos integrados en el epitelio (linfocitos intraepiteliales) o en la lámina propia intestinal (linfocitos de lámina propia) (Mowat, 2003; Ramiro-Puig y cols, 2008).

En particular, los linfocitos T, activados por células que tienen capacidad para presentar antígenos, pueden diferenciarse en linfocitos Th<sub>1</sub>, productores de IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\alpha$ , linfocitos Th<sub>2</sub>, productores de IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, linfocitos Th<sub>17</sub>, productores de IL-17 e IL-6 y linfocitos T reguladores (Treg) productores de IL-10 y TGF- $\beta$  (Ramiro-Puig y cols, 2008). Las células presentadoras de antígenos, una capacidad que poseen las células cebadas, una vez activadas pueden migrar a los ganglios linfáticos mesentéricos (Elson y cols, 2005; Bischoff y Krämer, 2007). Las células cebadas suelen estar en contacto con la superficie epitelial y con los vasos sanguíneos y nervios intestinales. Por lo tanto, son un importante componente de la respuesta inmune innata de la mucosa intestinal (Dror y cols, 2000). Así, ante la agresión parietal intestinal se activan y degranulan o bien tras activación migran a los ganglios linfáticos mesentéricos y su

---

función puede ser doble, esto es, partícipe de la respuesta inflamatoria intestinal o bien en tanto que componente del mecanismo de defensa intestinal puede realizar una respuesta protectora (Farhadi y cols, 2007). La IL-3 es requerida por células cebadas de roedores para sufrir hiperplasia en respuesta a diversos estímulos. Además, las citoquinas IL-4, IL-9, IL-10 e IL-3, también denominadas factores de crecimiento de células cebadas tienen acciones sinérgicas favoreciendo su proliferación y diferenciación en presencia de IL-3. Otros factores que promueven el desarrollo de células cebadas son PGE<sub>2</sub>, un factor inflamatorio inducido por LPS en macrófagos, TNF- $\alpha$ , ya que su deficiencia causa apoptosis de células cebadas, IL-6, que promueve su diferenciación. A su vez, IFN- $\gamma$  suprime la activación y desarrollo de células cebadas en roedores (Hu y cols, 2007). Estas acciones de citoquinas en las células cebadas son variables dependiendo del ambiente bioquímico y la concentración relativa de cada una de ellas. Así, IL-4, es una citoquina Th<sub>2</sub> multifuncional que asociada a IL-10 favorece el crecimiento de células cebadas, en tanto que asociada a IL-13 puede causar su apoptosis y suprimir el desarrollo (Hu y cols, 2006).

En las ratas con colestasis extra hepática el incremento de citoquinas proinflamatorias de tipo Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub> en el intestino delgado y ganglios linfáticos mesentéricos sugiere la existencia de una respuesta inflamatoria esplácnica. Los estímulos que pueden originarla son diversos. En primer término la obstrucción biliar favorece la traslocación bacteriana intestinal y causa endotoxemia (Ding y cols, 1993). A su vez, el empleo prolongado de antibióticos, erradica la microflora intestinal normal e incrementa la concentración sérica de bilirrubina (Vitek y cols, 2005). La ictericia obstructiva experimental también es causante de la estimulación en la mucosa intestinal de linfocitos Th<sub>2</sub> que producen IL-10 y, por consiguiente, incremento de la secreción de IgA. A su vez IFN- $\gamma$  procedente de esplenocitos activados podría suprimir la secreción intestinal de IL-10 por linfocitos Th<sub>2</sub> y, por lo tanto, agravar la respuesta inflamatoria (Hong, 2007).

El estrés oxidativo de la mucosa intestinal en ratas con colestasis extrahepática, se considera un importante factor en la producción de lesiones tanto intestinales como hepáticas. Por esta razón, todos los

---

tratamientos antioxidantes mejoran la función de la barrera intestinal y protegen al hígado de la lesión por colestasis (Assimakopoulos y cols, 2007a; Portincasa y cols, 2007).

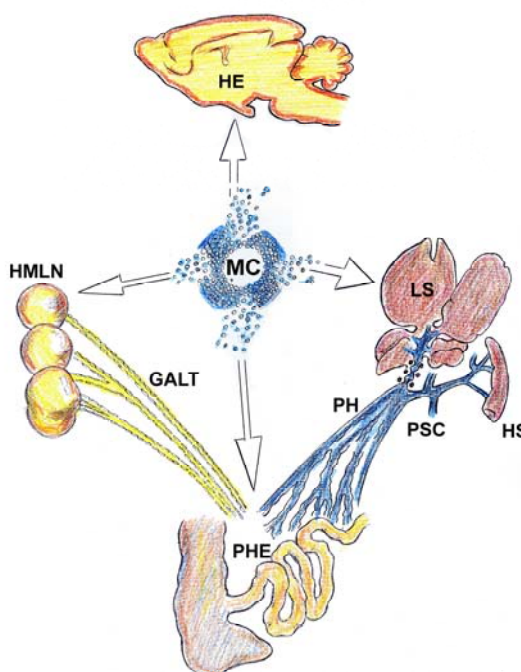
TNF- $\alpha$  es una citoquina proinflamatoria implicada en la traslocación bacteriana desde el intestino a los ganglios linfáticos en ratas cirróticas. Se ha demostrado que la administración de anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  disminuye en estos animales la incidencia de traslocación bacteriana intestinal (Frances y cols, 2007).

Las células cebadas tienen la capacidad de almacenar TNF- $\alpha$  presintetizado y, por tanto, pueden espontáneamente liberar esta citoquina cuando son activadas en la colestasis experimental, ya por estrés oxidativo, endotoxina o bacterias que translocan desde la luz intestinal. Por lo tanto, el exceso de células cebadas en el intestino y en los ganglios linfáticos, secundario a hipertensión portal, podría favorecer la liberación de grandes cantidades de TNF- $\alpha$ . Se ha considerado que TNF- $\alpha$  causa vasodilatación, mediada por PGI<sub>2</sub> y NO (Gordon y Galli, 1990). En este caso, la liberación de TNF- $\alpha$  por las células cebadas participaría en el desarrollo de la circulación hiperdinámica que sufren las ratas con colestasis obstructiva.

En el síndrome de circulación hiperdinámica que se produce en la hipertensión portal cirrótica, participan tanto la disminución de las resistencias vasculares periféricas, como del territorio esplácnico (Gatta y cols, 2008). La esplenomegalia es constante en la hipertensión portal en la rata con colestasis obstructiva. Sin embargo, la congestión no es la única causa de esplenomegalia, ya que otros mecanismos incluso inmunológicos participan en su producción. Las ratas con ligadura y sección del colédoco presentan circulación intraesplénica hipodinámica, asociada con disminución de TNF- $\alpha$  y fosforilación de eNOS, así como incremento en la expresión de VEGF (Yamaguchi y cols, 2007). En ratas con colestasis extrahepática, se ha demostrado que los esplanocitos poseen una respuesta inmune alterada. La inmunosupresión demostrada en la respuesta de injerto contra huésped, se inicia a las 2 semanas de la ligadura y sección de colédoco y persiste a las 6 semanas del postoperatorio (Chaignaud y cols, 1994). Los valores de citoquinas proinflamatorias en el bazo de los animales con colestasis en el presente trabajo experimental, ya que no sufren alteraciones significativas

respecto de los animales pseudo-operados, también sugieren la existencia de una pobre respuesta inmune esplénica. Sin embargo, se ha descrito que en ratones coletásicos la producción de IFN- $\gamma$  por los esplenocitos activados podría suprimir la secreción intestinal de IL-10 por linfocitos de tipo Th<sub>2</sub>, agravando o manteniendo la inflamación tanto intestinal como hepática (Hong y cols, 2007). Ya que estos hallazgos corresponden a una fase evolutiva precoz (7 días) es posible que no puedan extrapolarse a fases evolutivas consideradas crónicas en estos modelos experimentales de colestasis extrahepática.

El aumento de la densidad de células cebadas en los ganglios linfáticos mesentéricos de ratas con hipertensión portal, se ha sugerido que podría ser secundario a su migración desde el intestino inflamado. A su vez, la activación de las células cebadas en los ganglios linfáticos mesentéricos podrían colaborar en la producción de adenitis mesentérica, así como constituir una fuente de mediadores inflamatorios localizada entre el tracto gastrointestinal y la circulación sanguínea sistémica (Prieto y cols, 2005).



**Figura 54.** El aumento de la densidad de células cebadas en los ganglios linfáticos mesentéricos podría colaborar en la producción de adenitis mesentérica y además constituir una fuente de mediadores inflamatorios.

---

La histamina es sintetizada y almacenada en las vesículas de células cebadas (Galli y cols, 2005) y modula la respuesta inmune mediante la estimulación de cuatro subtipos de receptores (Ogasawara y cols, 2006). Se ha especulado con la posibilidad de que el contenido de histamina en el bazo pudiera atenuar la respuesta inmunológica actuando en receptores de linfocitos T, macrófagos y células cebadas. Incluso el alto contenido de histamina esplénica podría alterar el balance Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> actuando en receptores de histamina en los linfocitos T (Ogasawara y cols, 2006).

Se ha descrito en ratas con resección intestinal una disminución en la producción por células esplénicas de IFN- $\gamma$ , una citoquina de tipo Th<sub>1</sub>, en tanto que la producción de IL-4 no se modifica y, por esta razón, se produce una variación del balance Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> hacia la subpoblación Th<sub>2</sub>. Los autores también encuentran una hiperproducción de IL-6, una citoquina que se produce siempre que existe estrés quirúrgico y que estimula en hígado e intestino la producción de reactantes de fase aguda, como  $\alpha_1$ -MAP, proteína ácida inmunosupresora (IAP) y proteína C reactiva entre otras (Murata y cols., 1990). Ya que IAP modula la expresión de antígeno CD4 por linfocitos, el incremento de la producción de IL-6 podría ser uno de los factores causantes de supresión de la función linfocitaria, con depleción de células TCD4<sup>+</sup> o potenciación de la respuesta por células Th<sub>2</sub>. A su vez, la depresión de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en el GALT aumentaría la traslocación bacteriana intestinal (Gautreaux y cols, 1995; Murakami y cols, 2007).

La hipertensión portal en la rata a las seis semanas de evolución causa enteropatía hipertensiva portal que se caracteriza por el aumento del número y diámetro de los vasos sanguíneos submucosos, el cual se correlaciona con el grado de infiltración por células cebadas (Diez Arias, 2001). La hiperactividad angiogénica es la causa de esta alteración estructural y entre otros factores se ha atribuido a la excesiva liberación de mediadores proangiogénicos por las células cebadas intestinales (Prieto y cols, 2005).

La capacidad que tienen las células cebadas para sintetizar diferentes mediadores implicados en la respuesta inflamatoria podría explicar que estas células participen en diferentes fases evolutivas de la hipertensión portal. En particular, en las fases tardías la producción de histamina y

---

heparina promueve la angiogénesis , así como la proliferación fibromuscular en la pared intestinal (Aller y cols, 2007c). Asimismo, histamina puede favorecer la producción de VEGF a través de la estimulación de receptores H<sub>2</sub> (Ghosh y cols, 2001) y las células cebadas pueden liberar VEGF y otros factores de crecimiento en la mucosa y submucosa intestinal de las ratas con hipertensión portal, que modularían así el proceso angiogénico esplácnico (Aller y cols , 2007b).

En la hipertensión portal experimental el proceso de remodelación esplácnico también incluye la hiperplasia de células caliciformes a lo largo del tracto gastrointestinal (Corcuera y cols, 2005; Sanchez-Patan y cols, 2006). Ya que la hiperplasia de células caliciformes con hipersecreción de moco es una alteración característica de la remodelación del tracto respiratorio en los procesos inflamatorios crónicos (Chung, 2001; Okayama y cols, 2007) se ha propuesto que la alteración inflamatoria crónica intestinal en la hipertensión portal experimental podría tener mecanismos etiopatogénicos similares (Aller y cols, 2007b).

En esta fase crónica de la hipertensión portal las células cebadas también podrían desempeñar una acción inmunosupresora, ya suprimiendo o terminando la respuesta inmune, lo que facilitaría la remodelación. Así se ha descrito que las células cebadas inducen la tolerancia a injertos de piel (Lu y cols, 2006). También en la enfermedad inflamatoria intestinal se ha encontrado que en las áreas de inflamación activa esta disminuida la densidad de células cebadas (King y cols, 1992).

En el presente trabajo experimental no se han encontrado variaciones significativas en las concentraciones de RMCP-II en ileon ni en ganglios linfáticos mesentéricos. Las células cebadas de los roedores tienen dos fenotipos, el mucoso (MMC) y el de tejido conectivo (CTMC) que distinguen la localización anatómica (Befus y cols, 1988). A su vez, cada subtipo posee proteasas específicas que los identifican. En las ratas MMC contiene RMCP-II, en tanto que CTMC contienen una proteasa distinta denominada RMCP-I (Woodbury y cols, 1980). Por lo tanto, en ratas con colestasis microquirúrgica el incremento de células cebadas en intestino delgado y ganglios linfáticos mesentéricos, podría ser realizado a expensas de CTMC lo que explicaría la no detección de RMCP-II por exclusión.

El fenotipo CTMC en el intestino y ganglios linfáticos mesentéricos de ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica, puede mediar la respuesta inflamatoria leucocitaria, ya que produce quimioquinas, que favorecen su reclutamiento (Schramm y Thorlacius, 2004). Tras ser activadas, las células cebadas también producen metabolitos del ácido araquidónico, como leucotrienos (LTC<sub>2</sub> y LTD<sub>4</sub>) y prostaglandinas (PGD<sub>2</sub>) (Raud , 1989) y múltiples citoquinas, como IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 y TNF- $\alpha$ . Los resultados obtenidos en el presente trabajo respecto de la concentración de citoquinas intestinales y en ganglios linfáticos mesentéricos, sugiere que coexiste un incremento de citoquinas proinflamatorias de tipos Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub>. Estos resultados son similares a los encontrados por otros autores en la respuesta inflamatoria alérgica del tracto respiratorio donde coexisten incrementos de IL-4 e IL-10 (Th<sub>2</sub>) con incremento de la concentración de TNF- $\alpha$  (Th<sub>1</sub>) (Drazen y cols, 1996; Yamashita y Nakayama, 2008). Se explica así también porque en humanos LPS es un factor de riesgo con asmáticos. Se ha demostrado que LPS activa células cebadas mediante TLR4 (Toll Receptor) (Okumura y cols, 2003). A su vez, linfocitos Th<sub>2</sub> podría producir IL-4 que activarían células cebadas. Incluso, es posible que los niveles de LPS, determinen el tipo de respuesta inflamatoria ya que altas concentraciones de LPS produce una respuesta Th<sub>1</sub> que es específica del antígeno, en tanto que bajas concentraciones de LPS causan sensibilización Th<sub>2</sub> (Eisenbarth y cols, 2002). Por lo tanto, es posible que en la enteropatía hipertensiva portal ambos tipos de respuesta inflamatoria, Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub> interactúen en cuyo caso debería ser considerada mixta. La comprensión de los mecanismos etiopatogénicos implicados en este tipo de respuestas inflamatorias facilitará el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Kato y Scheleimer, 2007). Asimismo, otras patologías gastrointestinales mediadas por mastocitos podrían también beneficiarse terapéuticamente (Scott y cols, 1975; Siegert S. y cols, 2004; Patnaik y cols, 2007).

Por último, en este modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica se podría considerar que ambos factores, esto es, insuficiencia hepática crónica y enteropatía inflamatoria, se asocian agravando la evolución del proceso inflamatorio sistémico. Se explicaría así

la elevada mortalidad a corto plazo si los animales no son tratados con antibióticos y vitamina K. En este supuesto, la participación de las células cebadas en la evolución de la respuesta inflamatoria permitiría inmunomodular el proceso ya que ante estímulos nocivos es capaz de ajustar la respuesta con gran especificidad, favoreciendo o restringiendo la inflamación (Galli y cols, 2005).

## *VI. CONCLUSIONES*

1. La colestasis microquirúrgica en la rata con resección de la vía biliar extrahepática es una alternativa válida a la colestasis macroquirúrgica por ligadura y sección del colédoco, para la potenciación de un modelo experimental de colestasis obstructiva a largo plazo.
1. Este nuevo modelo experimental de colestasis extrahepática cursa a largo plazo con ictericia, circulación colateral portosistémica, insuficiencia hepática crónica, respuesta de fase aguda y ascitis.
2. El estudio morfométrico hepático realizado, ha permitido determinar el grado de fibrosis. Se obtienen así un resultado que es de interés para la utilización ulterior de este modelo en el ensayo de terapias antifibrogénicas.
3. Las concentraciones de citoquinas de tipo Th<sub>1</sub> (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) y Th<sub>2</sub> (IL-4 e IL-10) presentan una disminución hepática con incremento progresivo en bazo, intestino delgado y ganglios linfáticos. Esta heterogeneidad en su distribución reflejaría la existencia de diferentes mecanismos patogénicos interrelacionados.

*VII. BIBLIOGRAFÍA*

- Abraldes JG, Pasarín M, García-Pagán JC. Animal models of portal hypertension. *World J Gastroenterol*. 12:6577-84. 2006.
- Adair-Kirk TL, Senior RM. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*. 40: 1101-10. 2008
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Cell –cell adhesion and the extracellular matrix . En: *Molecular biology of the cell*. Edit. Garland Publishing , Inc. New York. Chapter 12: 673-715. 1983.
- Akimoto T, Hayashi N, Adachi M, Kobayashi N, Zhang XJ, Ohsuga M, Katsuta Y. Viability and plasma vitamin K levels in the common bile duct-ligated rats. *Exp Anim*. 54: 155-61. 2005.
- Albillos A, de-la-Hera A, Alvarez-Mon M. Serum lipopolysaccharide-binding protein prediction of severe bacterial infection in cirrhotic patients with ascites. *Lancet* 363: 1608-10, 2004.
- Albrecht M, Frungieri MB, Kunz L, Rämisch R, Meineke V, Köhn FM, Mayerhofer A. Divergent effects of the major mast cell products histamine, tryptase and TNF-alpha on human fibroblast behaviour. *Cell Mol Life Sci*. 62: 2867-76. 2005.
- Aller MA, Lorente L, Alonso S, Rodríguez G, Arias J. Different types of response to hepatic arterial ischemia in rats with cholestasis. *Surg Res Commun* 14: 269-80, 1993.
- Aller MA, Lorente L, Tovar J, Rodríguez J, Betriu C, Ortega L, Arias J. Modelos experimentales : Colestasis extrahepática. En: *Cirugía Hepática Experimental* . Arias J, Lorente L, Aller MA, Rodríguez J, Alonso MS, Trobo JI, Durán H. Edit. Kronos. Zaragoza: 283-315. 1993.
- Aller MA, Lorente L, Alonso MS, Arias J. A model of cholestasis in the rat, using a microsurgical technique. *Scand J Gastroenterol*. 28: 10-14. 1993.
- Aller MA, Durán MC, Tovar JA, Lorente L, Arias J. Colestasis Extrahepática. En: Rodríguez G, Lorente L, Rodríguez JB, Alonso MS, Durán HJ, Durán MC, Aller MA, Arias J. *Microcirugía experimental*. Nueva Editorial Médica. Madrid. 2000.
- Aller MA, Diéguez B, Nava MP, Cuesta P, Sánchez M, Durán H, Llamas MA, Arias J. Tipos evolutivos de hipertensión portal prehepática en la rata. *An Med Int* 19:341-51. 2002.

- Aller MA, Arias JL, Nava MP, Arias J. Posttraumatic inflammation is a complex response based on the pathological expression of the nervous, immune, and endocrine functional systems. *Exp Biol Med (Maywood)*. 229: 170-81. 2004.
- Aller MA, Duran M, Ortega L, Arias JL, Nava MP, Prieto I, Arias J. Comparative study of macro- and microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat. *Microsurgery* 24: 442-7, 2004.
- Aller MA, Nava MP, Arias JL, Duran M, Prieto I, Llamas MA, Arias J. Microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat: a long-term study. *J Invest Surg* 17: 99-104, 2004.
- Aller MA, Arias JL, Sanchez-Patan F, Arias J. The inflammatory response: an efficient way of life. *Med Sci Monit* 12: 225-34, 2006.
- Aller MA, Arias JL, Cruz A, Arias J. Inflammation: a way to understanding the evolution of portal hypertension. *Theor Biol Med Model*.4: 44-68. 2007a.
- Aller MA, Arias JL, Arias J. The mast cell integrates the splanchnic and systemic inflammatory response in portal hypertension. *J Transl Med*. 5: 44-58. 2007b.
- Aller Ma, Sánchez-Patán F, Cuellar C, Rodero M, Nava MP, Saavedra Y, Anchuelo R, Vergara P, Arias J. Ketotifen reduce las alteraciones esplácnicas en la hipertensión portal prehepática experimental: implicación de las células cebadas. *Gastroenterol Hepatol* 30(suppl. 1): 150-151, 2007c.
- Alpini G, McGill JM, Larusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Hepatology*. 35: 1256-68. 2002.
- Alvaro D, Mancino MG, Glaser S, Gaudio E, Marzioni M, Francis H, Alpini G. Proliferating cholangiocytes: a neuroendocrine compartment in the diseased liver. *Gastroenterology*. 132: 415-31. 2007.
- Andrew D, Craig AD. Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. *Nat Neurosci*. 4: 72-7. 2001.
- Arias J, Lorente L, Aller MA, Rodríguez J. Anatomía e histología hepática : Morfología y función. En: *Cirugía Hepática Experimental* . Arias J, Lorente

- L, Aller MA, Rodríguez J, Alonso MS, Trobo JI, Durán H. Edit. *Kronos*. Zaragoza: 99-125. 1993.
- Arias JI, Aller MA, Arias J. The use of inflammation by tumor cells. *Cancer*. 104: 223-8. 2005.
- Arias JI, Aller MA, Sánchez-Patan F, Arias J. Inflammation and cancer: is trophism the link?. *Surg Oncol*. 2006 Dec;15(4):235-42.
- Arias JI, Aller MA, Arias J. Cancer cell: using inflammation to invade the host. *Mol Cancer*. 6:29. 2007.
- Armbrust T, Batusic D, Ringe B, Ramadori G. Mast cells distribution in human liver disease and experimental rat liver fibrosis. Indications for mast cell participation in development of liver fibrosis. *J Hepatol*. 26: 1042-54. 1997.
- Armstrong CP, Dixon JM, Taylor TV, Davies GC. Surgical experience of deeply jaundiced patients with bile duct obstruction. *Br J Surg*. 71: 234-8. 1984.
- Assimakopoulos SF, Vagianos CE, Patsoukis N, Georgiou C, Nikolopoulou V, Scopa CD. Evidence for intestinal oxidative stress in obstructive jaundice-induced gut barrier dysfunction in rats. *Acta Physiol Scand*. 180: 177-85. 2004.
- Assimakopoulos SF, Maroulis I, Patsoukis N, Vagenas K, Scopa CD, Georgiou CD, Vagianos CE. Effect of antioxidant treatments on the gut-liver axis oxidative status and function in bile duct-ligated rats. *World J Surg*. 31: 2023-32. 2007a.
- Assimakopoulos SF, Scopa CD, Vagianos CE. Pathophysiology of increased intestinal permeability in obstructive jaundice. *World J Gastroenterol*. 13: 6458-64. 2007b.
- Au SR, Au K, Saggars GC, Karne N, Ehrlich HP. Rat mast cells communicate with fibroblasts via gap junction intercellular communications. *J Cell Biochem*. 100: 1170-7. 2007.
- Aubé C, Moal F, Oberti F, Roux J, Croquet V, Gallois Y, Argaud C, Caron C, Calès P. Diagnosis and measurement of liver fibrosis by MRI in bile duct ligated rats. *Dig Dis Sci*. 52: 2601-9. 2007.
- Azouz A, Razzaque MS, El-Hallak M, Taguchi T. Immunoinflammatory responses and fibrogenesis. *Med Electron Microsc*. 37: 141-8. 2004.

- Bachelet I, Levi-Schaffer F, Mekori YA. Mast cells: not only in allergy. *Immunol Allergy Clin North Am.* 26: 407-25. 2006.
- Ballatori N, Christian WV, Lee JY, Dawson PA, Soroka CJ, Boyer JL, Madejczyk MS, Li N. OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology.* 42: 1270-9. 2005.
- Barnes PJ. Molecular mechanisms of corticosteroids in allergic diseases. *Allergy.* 56: 928-36. 2001.
- Barón V, Hernández J, Noyola M, Escalante B, Muriel P. Nitric oxide and inducible nitric oxide synthase expression are downregulated in acute cholestasis in the rat accompanied by liver ischemia. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 127: 243-9. 2000.
- Barrera G, Pizzimenti S, Dianzani MU. Lipid peroxidation: control of cell proliferation, cell differentiation and cell death. *Mol Aspects Med.* 29: 1-8. 2008.
- Bartlett AH, Hayashida K, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Mol Cells.* 24: 153-66. 2007.
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 115: 209-18. 2005.
- Bayer I, Ellis H. Jaundice and wound healing: an experimental study. *Br J Surg.* 63: 392-6. 1976.
- Beck PL, Lee SS. Vitamin K1 improves survival in bile-duct-ligated rats with cirrhosis. *J Hepatol.* 23: 235. 1995.
- Befus D, Fujimaki H, Lee TD, Swieter M. Mast cell polymorphisms. Present concepts, future directions. *Dig Dis Sci.* 33: 16S-24S. 1988.
- Benedetti A, Di Sario A, Marucci L, Svegliati-Baroni G, Schteingart CD, Ton-Nu HT, Hofmann AF. Carrier-mediated transport of conjugated bile acids across the basolateral membrane of biliary epithelial cells. *Am J Physiol.* 272: G1416-24. 1997.
- Bergasa NV, Talbot TL, Alling DW, Schmitt JM, Walker EC, Baker BL, Korenman JC, Park Y, Hoofnagle JH, Jones EA. A controlled trial of naloxone infusions for the pruritus of chronic cholestasis. *Gastroenterology.* 102: 544-9. 1992.

- Bergasa NV, Jones EA. The pruritus of cholestasis. *Semin Liver Dis* 13: 319-27, 1993.
- Bergasa NV, Sabol SL, Young WS, Kleiner DE, Jones EA. Cholestasis is associated with preproenkephalin mRNA expression in the adult rat Liver. *Am J Physiol* 268: 346-54, 1996.
- Bergasa NV. The pruritus of cholestasis. *J Hepatol.* 43:1078-88. 2005.
- Bergasa NV. Update on the treatment of the pruritus of cholestasis. *Clin Liver Dis.* 12: 219-34. 2008.
- Bergasa NV. Pruritus in primary biliary cirrhosis: pathogenesis and therapy. *Clin Liver Dis.* 12: 385-406. 2008.
- Beaussier M, Wendum D, Fouassier L, Rey C, Barbu V, Lasnier E, Lienhart A, Scoazec JY, Rosmorduc O, Housset C. Adaptative bile duct proliferative response in experimental bile duct ischemia. : *J Hepatol.* 42: 257-65. 2005.
- Beaussier M, Wendum D, Schiffer E, Dumont S, Rey C, Lienhart A, Housset C. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries. *Lab Invest.* 87:292-303. 2007.
- Bergheim I, Guo L, Davis MA, Duvéau I, Arteel GE. Critical role of plasminogen activator inhibitor-1 in cholestatic liver injury and fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 316: 592-600. 2006.
- Bischofs IB, Schwarz US: Cell organization in soft media due to active mechano sensing. *Proc Natl Acad Sci.* 100: 9274-9279. 2003.
- Bischoff SC, Krämer S. Human mast cells, bacteria, and intestinal immunity. *Immunol Rev.* 217: 329-37. 2007.
- Bissell DM. Assessing fibrosis without a Liver biopsy: are we there yet? *Gastroenterology* 127: 1847-9, 2004.
- Black DM, Behrns KE. A scientist revisits the atrophy-hypertrophy complex: hepatic apoptosis and regeneration. *Surg Oncol Clin N Am.* 11: 849-64. 2002.
- Bogert PT, LaRusso NF. Cholangiocyte biology. *Curr Opin Gastroenterol.* 23: 299-305. 2007.
- Bogorad RL, Ostroukhova TY, Orlova AN, Rubtsov PM, Smirnova OV. Long isoform of prolactin receptor predominates in rat intrahepatic bile ducts

- and further increases under obstructive cholestasis. *J Endocrinol.* 188: 345-54. 2006.
- Bohan A, Chen WS, Denson LA, Held MA, Boyer JL. Tumor necrosis factor alpha-dependent up-regulation of Lrh-1 and Mrp3(Abcc3) reduces liver injury in obstructive cholestasis. *J Biol Chem.* 278: 36688-98. 2003.
- Boyce JA. Mast cells: beyond IgE. *J Allergy Clin Immunol.* 111: 24-32. 2003.
- Boyer JL. New perspectives for the treatment of cholestasis: lessons from basic science applied clinically. *J Hepatol.* 46: 365-71. 2007.
- Brunengraber H, Roe CR. Anaplerotic molecules: current and future. *J Inherit Metab Dis.* 29: 327-31. 2006.
- Bulmer AC, Ried K, Blanchfield JT, Wagner KH. The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutat Res.* 658: 28-41. 2008.
- Buscher HP, Miltenberger C, McNelly S, Gerok W. The histoautoradiographic localization of taurocholate in rat after bile duct ligation. Evidence for ongoing secretion and reabsorption processes. *J Hepatol* 8: 181-91. 1989.
- Byrne JA, Strautnieks SS, Mieli-Vergani G, Higgins CF, Linton KJ, Thompson RJ. The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology.* 123: 1649-58. 2002.
- Cabillic F, Rougier N, Basset C, Lecouillard I, Quelvennec E, Toujas L, Guguen-Guillouzo C, Corlu A . Hepatic environment elicits monocyte differentiation into a dendritic cell subset directing Th2 response. *J Hepatol.* 44: 552-9. 2006.
- Cai YF, Zhen ZJ, Min J, Fang TL, Chu ZH, Chen JS. Selection, proliferation and differentiation of bone marrow-derived liver stem cells with a culture system containing cholestatic serum in vitro. *World J Gastroenterol.* 10: 3308-12. 2004.
- Campbell KM, Sabla GE, Bezerra JA . Transcriptional reprogramming in murine liver defines the physiologic consequences of biliary obstruction . *J. Hepatol.* 40: 14-23. 2004.
- Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology.* 39: 273-8. 2004.

- Cantor JO, Nadkarni PP. Hyaluronan: the Jekyll and Hyde molecule. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 5: 257-60. 2006.
- Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Deneef C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol* 36: 200-9, 2002.
- Castaing D, Houssin D, Bismuth H. Anatomy of the liver and portal system of the rat. En : *Hepatic and portal surgery of the rat*. Edit. Masson. Paris. 27-46. 1980.
- Chaignaud BE, White JG, Nie CH, Grogan JB, Scott-Conner CE. Splenocytes from bile duct ligated rats do not elicit a normal immune response in the intact host. *Am Surg* 60: 7-11. 1994.
- Chan C-C, Wang S-S, Lee FY, Chang FY, Lin HC, Hou MC, Huang MC, Lee SD: Effects of endothelin-1 on portal-systemic collaterals of common bile duct-ligated cirrhotic rats. *Eur J Clin Invest*. 34:290-296. 2004.
- Chen B, Fu B: A model for charged molecule transport in the interstitial space. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* . 1:55-58. 2005.
- Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl*. 34: 50s-59s. 2001.
- Cindoruk M, Kerem M, Karakan T, Salman B, Akin O, Alper M, Erdem O, Unal S. Peroxisome proliferators-activated alpha agonist treatment ameliorates hepatic damage in rats with obstructive jaundice: an experimental study. *BMC Gastroenterol*. 7:44. 2007.
- Clements WD, O'Rourke DM, Rowlands BJ, Ennis M. The role of mast cell activation in cholestatic pruritus. *Agents Actions*. 41: 30-1. 1994.
- Clements WD, Parks R, Erwin P, Halliday MI, Barr J, Rowlands BJ. Role of the gut in the pathophysiology of extrahepatic biliary obstruction. *Gut*. 39: 587-93. 1996.
- Clouston AD, Powell EE, Walsh MJ, Richardson MM, Demetris AJ, Jonsson JR. Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. *Hepatology*. 41: 809-18. 2005.
- Conde de la Rosa L, Moshage H, Nieto N. Estrés oxidativo hepatocitario y hepatopatía alcohólica. *Rev Esp Enferm Dig*. 100: 156-63. 2008.

- Costa AMA, Tuchweber B, Lamireau T, Yousef IM, Balabaud C, Rosenbaum J, Desmouliere A: Role of apoptosis in the remodeling of cholestatic liver injury following release of the mechanical stress. *Virchow Arch.* 442: 372-380. 2003.
- Cook JGH. Creatinine assay in the presence of protein. *Clin Chim Acta.* 32: 485-6. 1971.
- Corcuera MT, Nava MP, Angulo A, Aller MA, Gómez-Aguado F, Casado I, Alonso MJ and Arias J. Splanchnic remodeling secondary to experimental prehepatic portal hypertension. *Ann. Med. Int.* 22: 317–322. 2005.
- Crawford JM. Development of the intrahepatic biliary tree. *Semin Liver Dis.* 22: 213-26. 2002.
- Cruz A, Túnez I, Martínez R, Muñoz-Castañeda JR, Ramírez LM, Recio M, Ochoa L, Arjona A, Montilla P, Muntané J, Padillo FJ. Melatonin prevents brain oxidative stress induced by obstructive jaundice in rats. *J Neurosci Res.* 85: 3652-6. 2007.
- Cuenca J, Martin-Sanz P, Alvarez-Barrientos AM, Bosca L, Goren N: Infiltration of inflammatory cells plays an important role in matrix metalloproteinase expression and activation in the heart during sepsis. *Am J Pathol.* 169: 1567-1576. 2006.
- Davis MJ, Gore RW. Capillary pressures in rat intestinal muscle and mucosal villi during venous pressure elevation. *Am J Physiol.* 249: H174-87. 1985.
- Davies PF, Tripathi SC. Mechanical stress mechanisms and the cell. An endothelial paradigm. *Circ Res.* 72: 239-45. 1993.
- Day AJ, de la Motte CA. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation?. *Trends Immunol.* 26: 637-43. 2005.
- DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, Thompson CB. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 19345-50. 2007.
- De Creus A, Abe M, Lau AH, Hackstein H, Raimondi G, Thomson AW. Low TLR4 expression by liver dendritic cells correlates with reduced capacity to activate allogeneic T cells in response to endotoxin. *J Immunol.* 174: 2037-45. 2005.

- Denson LA, Bohan A, Held MA, Boyer JL. Organ-specific alterations in RAR alpha:RXR alpha abundance regulate rat Mrp2 (Abcc2) expression in obstructive cholestasis. *Gastroenterology*. 123: 599-607. 2002.
- Desmoulière A, Darby I, Costa AM, Raccurt M, Tuchweber B, Sommer P, Gabbiani G. Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest*. 76: 765-78. 1997.
- De Vos R, Desmet VJ. Morphologic changes of the junctional complex of the hepatocytes in rat liver after bile duct ligation. *Br J Exp Pathol*. 59: 220-7. 1978.
- Dietrich CG, Geier A, Salein N, Lammert F, Roeb E, Oude Elferink RP, Matern S, Garton C. Consequences of bile duct obstruction on intestinal expression and function of multidrug resistance-associated protein 2. *Gastroenterology*. 126: 1044-53. 2004.
- Diez-Arias JA, Aller MA, Palma MD, Arias JL, Muñoz E, Sánchez M, Arias J. Increased duodenal mucosa infiltration by mast cells in rats with portal hypertension. *Dig Surg*. 18: 34-40. 2001.
- Ding JW, Andersson R, Norgren L, Stenram U, Bengmark S. The influence of biliary obstruction and sepsis on reticuloendothelial function in rats. *Eur J Surg*. 158: 157-64. 1992.
- Ding JW, Andersson R, Soltesz V, Willén R, Bengmark S. The role of bile and bile acids in bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *Eur Surg Res*. 25: 11-19. 1993.
- Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med*. 8: 445-54. 2004.
- Doherty T, Broide D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Curr Opin Immunol*. 19: 676-80. 2007.
- Donner MG, Schumacher S, Warskulat U, Heinemann J, Häussinger D. Obstructive cholestasis induces TNF-alpha- and IL-1 -mediated periportal downregulation of Bsep and zonal regulation of Ntcp, Oatp1a4, and Oatp1b2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 293: G1134-46. 2007.
- Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 31: 87-96. 1971.

- Doumas BT, Kwok-Cheung PP, Perry BW, Jendrzczak B, McComb RB, Schaffer R, Hause LL. Candidate Reference Method for determination of total bilirubin in serum: Development and validation. *Clin Chem* 31:1779-89. 1985.
- Drazen JM, Arm JP, Austen KF. Sorting out the cytokines of asthma. *J Exp Med*. 183: 1-5. 1996.
- Dror Y, Leaker M, Caruana G, Bernstein A, Freedman MH. Mastocytosis cells bearing a c-kit activating point mutation are characterized by hypersensitivity to stem cell factor and increased apoptosis. *Br J Haematol*. 108: 729-36. 2000.
- Durán Poveda M. Colestasis extrahepática microquirúrgica: estudio evolutivo en la rata. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. 1998.
- Ebrahimkhani MR, Kiani S, Oakley F, Kendall T, Shariftabrizi A, Tavangar SM, Moezi L, Payabvash S, Karoon A, Hoseininik H, Mann DA, Moore KP, Mani AR, Dehpour AR. Naltrexone, an opioid receptor antagonist, attenuates liver fibrosis in bile duct ligated rats. *Gut*. 55: 1606-16. 2006.
- Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med*. 196: 1645-51. 2002.
- Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev*. 206: 260-76. 2005.
- Evanko SP, Tammi MI, Tammi RH, Wight TN: Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv Drug Deliv Rev* 2007, 59:1351-1365.
- Farrell DJ, Hines JE, Walls AF, Kelly PJ, Bennett MK, Burt AD. Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases. *Hepatology*. 22: 1175-81. 1995.
- Farhadi A, Fields JZ, Keshavarzian A. Mucosal mast cells are pivotal elements in inflammatory bowel disease that connect the dots: stress, intestinal hyperpermeability and inflammation. *World J Gastroenterol*. 13: 3027-30. 2007.
- Fattinger K, Funk C, Pantze M, Weber C, Reichen J, Stieger B, Meier PJ. The endothelin antagonist bosentan inhibits the canalicular bile salt export

- pump: a potential mechanism for hepatic adverse reactions. *Clin Pharmacol Ther.* 69: 223-31. 2001.
- Fernández-Martínez E, Pérez-Alvarez V, Tsutsumi V, Shibayama M, Muriel P. Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat. *Exp Toxicol Pathol.* 58: 49-58. 2006.
- Fey GH, Gauldie J. The acute phase response of the liver in inflammation. *Prog Liver Dis.* 9: 89-116. 1990.
- Fickert P, Fuchsbichler A, Wagner M, Zollner G, Kaser A, Tilg H, Krause R, Lammert F, Langner C, Zatloukal K, Marschall HU, Denk H, Trauner M. Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology.* 127: 261-74. 2004.
- Flohé L, Brigelius-Flohé R, Saliou C, Traber MG, Packer L. Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic Biol Med.* 22: 1115-26. 1997.
- Folin O. Beitrag zur chemie des kreatinins und kreatins im hame. *Physiol Chem.* 41: 223-42. 1904.
- Frances R, Chiva M, Sánchez E, Gonzalez-Navajas JM, Llovet T, Zapater P, Soriano G, Muñoz C, Balazó J, Perez-Mateo M, Song X-Y, Guarner C, Such J: Bacterial translocation is downregulated by anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody administration in rats with cirrosis and ascites. *J Hepatol.* 46:797-803. 2007.
- Franceschini B, Ceva-Grimaldi G, Russo C, Dioguardi N, Grizzi F. The complex functions of mast cells in chronic human liver diseases. *Dig Dis Sci.* 51: 2248-56. 2006.
- Friedman SL. Reversibility of hepatic fibrosis and cirrhosis--is it all hype? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 4: 236-7. 2007.
- Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev.* 88: 125-72. 2008.
- Fujiwara Y, Shimada M, Yamashita Y, Adachi E, Shirabe K, Takenaka K, Sugimachi K. *Cytokine.* 13:188-91. 2001.
- Galli SJ. Mast cells and basophils. *Curr Opin Hematol* 7: 32-9, 2000.

- Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol.* 23: 749-86. 2005.
- García-Moreno LM, Angeles Aller M, Conejo NM, Gómez MA, Marti;n FR, Arias J, Arias JL. Brain Ag-NOR activity in cholestatic rats with hepatic encephalopathy. *Hepatol Res.* 24: 275-281. 2002.
- García-Moreno LM, Conejo NM, González-Pardo H, Aller MA, Nava MP, Arias J, Arias JL. Evaluation of two experimental models of hepatic encephalopathy in rats. *Braz J Med Biol Res.* 38: 127-32. 2005.
- Garcia-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 18: 353-72. 2004.
- Gatta A, Bolognesi M, Merkel C. Vasoactive factors and hemodynamic mechanisms in the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *Mol Aspects Med.* 29: 119-129. 2008.
- Gaudio E, Onori P, Pannarale L, Alvaro D. Hepatic microcirculation and peribiliary plexus in experimental biliary cirrhosis: a morphological study. *Gastroenterology.* 111: 1118-24. 1996.
- Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Franchitto A, Onori P, Ueno Y, Marzioni M, Fava G, Venter J, Reichenbach R, Summers R, Alpini G. Administration of r-VEGF-A prevents hepatic artery ligation-induced bile duct damage in bile duct ligated rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 291: G307-17. 2006.
- Gautreaux MD, Deitch EA, Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract to various segments of the mesenteric lymph node complex. *Infect Immun.* 62: 2132-4. 1994.
- Gautreaux MD, Gelder FB, Deitch EA, Berg RD. Adoptive transfer of T lymphocytes to T-cell-depleted mice inhibits *Escherichia coli* translocation from the gastrointestinal tract. *Infect Immun.* 63: 3827-34. 1995.
- Gehring S, Dickson EM, San Martin ME, van Rooijen N, Papa EF, Harty MW, Tracy TF Jr, Gregory SH. Kupffer cells abrogate cholestatic liver injury in mice. *Gastroenterology.* 130: 810-22. 2006.
- Geier A, Dietrich CG, Voigt S, Kim SK, Gerloff T, Kullak-Ublick GA, Lorenzen J, Matern S, Garton C. Effects of proinflammatory cytokines on rat

- organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis. *Hepatology*. 38: 345-54. 2003.
- Geier A, Fickert P, Trauner M. Mechanisms of disease: mechanisms and clinical implications of cholestasis in sepsis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 3: 574-85. 2006.
- Georges PC, Hui JJ, Gombos Z, McCormick ME, Wang AY, Uemura M, Mick R, Janmey PA, Furth EE, Wells RG. Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 293: G1147-54. 2007.
- Georgiev P, Navarini AA, Eloranta JJ, Lang KS, Kullak-Ublick GA, Nocito A, Dahm F, Jochum W, Graf R, Clavien PA. Cholestasis protects the liver from ischaemic injury and post-ischaemic inflammation in the mouse. *Gut*. 56: 121-8. 2007.
- Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, Clavien PA. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg*. 95: 646-56. 2008.
- Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M. Apoptosis in liver diseases--detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit*. 11: RA337-45. 2005.
- Ghosh AK, Hirasawa N, Ohuchi K. Enhancement by histamine of vascular endothelial growth factor production in granulation tissue via H(2) receptors. *Br J Pharmacol*. 134: 1419-28. 2001.
- Goddard S, Youster J, Morgan E, Adams DH. Interleukin-10 secretion differentiates dendritic cells from human liver and skin. *Am J Pathol*. 164: 511-9. 2004.
- Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature*. 346: 274-276. 1990.
- Grant SM, Goa KL, Fitton A, Sorkin EM. Ketotifen. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in asthma and allergic disorders. *Drugs*. 40: 412-48. 1990.
- Grappone C, Pinzani M, Parola M, Pellegrini G, Caligiuri A, DeFranco R, Marra F, Herbst H, Alpini G, Milani S. Expression of platelet-derived

- growth factor in newly formed cholangiocytes during experimental biliary fibrosis in rats. *J Hepatol.* 31: 100-9. 1999.
- Greaves MW, Khalifa N. Itch: more than skin deep. *Int Arch Allergy Immunol.* 135: 166-72. 2004.
- Greaves MW. Recent advances in pathophysiology and current management of itch. *Ann Acad Med Singapore.* 36: 788-92. 2007
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci.* 7: d793-807. 2002.
- Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp Hepatol.* 6: 7. 2007.
- Gruber BL. Mast cells in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep.* 5:147-53. 2003.
- Gujral JS, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice. *Hepatology.* 38: 355-63. 2003.
- Gulubova MV, Vlaykova TI. Mast cells in human bile duct obstruction . *J Mol Histol.* 35: 791-801. 2004.
- Haas E. 50 Diagnostic Special Stains for Surgical Pathology. Edit. JB Lippincott and Company, Philadelphia. USA. 1981.
- Harry D, Anand R, Holt S, Davies S, Marley R, Fernando B, Goodier D, Moore K. Increased sensitivity to endotoxemia in the bile duct-ligated cirrhotic Rat. *Hepatology.* 30: 1198-205. 1999.
- Harty MW, Huddleston HM, Papa EF, Puthawala T, Tracy AP, Ramm GA, Gehring S, Gregory SH, Tracy TF Jr. Repair after cholestatic liver injury correlates with neutrophil infiltration and matrix metalloproteinase 8 activity. *Surgery.* 138: 313-20. 2005.
- Harty MW, Papa EF, Huddleston HM, Young E, Nazareth S, Riley CA, Ramm GA, Gregory SH, Tracy TF Jr. Hepatic macrophages promote the neutrophil-dependent resolution of fibrosis in repairing cholestatic rat livers. *Surgery.* 143: 667-78. 2008.
- Heathcote EJ. Diagnosis and management of cholestatic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 5: 776-82. 2007.

- Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin Sci (Lond)*. 112: 265-80. 2007.
- Heuman DM, Bajaj R. Ursodeoxycholate conjugates protect against disruption of cholesterol-rich membranes by bile salts. *Gastroenterology*. 106: 1333-41. 1994.
- Higgins T, Beutler E, Doumas BT. Hemoglobin, Iron, and Bilirubin. En: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis Fourth Edition*. Edit. Elsevier Saunders. St.Louis. Missouri. USA. 1165 –1208. 2006.
- Hocheplied T, Berger FG, Baumann H, Libert C. Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev*. 14: 25-34. 2003.
- Hofmann AF. Biliary secretion and excretion in health and disease: current concepts. *Ann Hepatol*. 6: 15-27. 2007.
- Holmberg JT, Hederström E, Ihse I. A method to prevent recanalization of the transected bile duct in the rat. *Scand J Gastroenterol*. 20: 428-32. 1985.
- Hong JY, F Sato E, Hiramoto K, Nishikawa M, Inoue M. Mechanism of Liver Injury during Obstructive Jaundice: Role of Nitric Oxide, Splenic Cytokines, and Intestinal Flora. *J Clin Biochem Nutr*. 40: 184-93. 2007.
- Hsieh CS, Wang PW, Lee SY, Huang CC, Chang NK, Chen CM, Wu CL, Wang HC, Chuang JH. Glucocorticoid pretreatment suppresses chemokine expression and inflammatory cell infiltration in cholestatic rats receiving biliary intervention. *J Pediatr Surg*. 41: 1669-75. 2006.
- Hu ZQ, Zhao WH, Shimamura T, Galli SJ. Interleukin-4-triggered, STAT6-dependent production of a factor that induces mouse mast cell apoptosis. *Eur J Immunol*. 36: 1275-1284. 2006.
- Hu ZQ, Zhao WH, Shimamura T. Regulation of mast cell development by inflammatory factors. *Curr Med Chem*. 14: 3044-50. 2007.
- Huang YT, Hsu YC, Chen CJ, Liu CT, Wei YH. Oxidative-stress-related changes in the livers of bile-duct-ligated rats. *J Biomed Sci*. 10: 170-8. 2003.
- Hunt DR, Allison ME, Prentice CR, Blumgart LH. Endotoxemia, disturbance of coagulation, and obstructive jaundice. *Am J Surg*. 144: 325-9. 1982.

- 
- Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 110: 673-87. 2002.
- Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology*. 128: 138-46. 2005.
- Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J*. 20: 811-27. 2006.
- Inoue K, Koizumi S, Fuziwara S, Denda S, Inoue K, Denda M. Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 291: 124-9. 2002.
- Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest*. 117: 539-48. 2007.
- Ishihara K, Yamaguchi Y, Uchino S, Furuhashi T, Yamada S, Kihara S, Mori K, Ogawa M. ICAM-1 signal transduction in cells stimulated with neutrophil elastase. *Dig Dis Sci*. 51: 2102-12. 2006.
- Jeong WI, Lee CS, Park SJ, Chung JY, Jeong KS. Kinetics of macrophages, myofibroblasts and mast cells in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhosis. *Anticancer Res*. 22: 869-77. 2002.
- Jhandier MN, Kruglov EA, Lavoie EG, Sévigny J, Dranoff JA. Portal fibroblasts regulate the proliferation of bile duct epithelia via expression of NTPDase2. *J Biol Chem*. 280: 22986-92. 2005.
- Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 23: 435-61. 2007.
- Jones EA, Bergasa NV. Why the cholestasis patients itch? *Gut* 38: 644-5, 1996.
- Jungermann K, Kietzmann T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr*. 16: 179-203. 1996.
- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 11: 447-455. 1979.
- Kanno N, LeSage G, Glaser S, Alvaro D, Alpini G. Functional heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *Hepatology* 31: 555-61, 2000.

- Karaman A, Iraz M, Kirimlioglu H, Karadag N, Tas E, Fadillioglu E. Hepatic damage in biliary-obstructed rats is ameliorated by leflunomide treatment. *Pediatr Surg Int.* 22: 701-8. 2006.
- Karimian G, Mohammadi-Karakani A, Sotoudeh M, Ghazi-Khansari M, Ghobadi G, Shakiba B. Attenuation of hepatic fibrosis through captopril and enalapril in the livers of bile duct ligated rats. *Biomed Pharmacother.* Article in Press. 2007.
- Kato A, Schleimer RP. Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol.* 19: 711-20. 2007.
- Katsuta Y, Zhang XJ, Ohsuga M, Akimoto T, Komeichi H, Shimizu S, Inami T, Miyamoto A, Satomura K, Takano T. Hemodynamic features of advanced cirrhosis due to chronic bile duct ligation. *J Nippon Med Sch* 72: 217-25. 2005.
- Kennedy JA, Clements WD, Kirk SJ, McCaigue MD, Campbell GR, Erwin PJ, Halliday MI, Rowlands BJ. Characterization of the Kupffer cell response to exogenous endotoxin in a rodent model of obstructive jaundice. *Br J Surg.* 86: 628-33. 1999.
- Kennedy JA, Lewis H, Clements WD, Kirk SJ, Campbell G, Halliday MI, Rowlands BJ. Kupffer cell blockade, tumour necrosis factor secretion and survival following endotoxin challenge in experimental biliary obstruction. *Br J Surg* 86:1410-4, 1999.
- Kennett EC, Davies MJ. Degradation of matrix glycosaminoglycans by peroxynitrite/peroxynitrous acid: evidence for a hydroxyl-radical-like mechanism. *Free Radic Biol Med.* 42: 1278-89. 2007.
- Kershenovich SD, Weissbrod AB. Liver fibrosis and inflammation. A review. *Ann Hepatol* 2: 159-63, 2003.
- Kilicoglu B, Gencay C, Kismet K, Serin Kilicoglu S, Erguder I, Erel S, Sunay AE, Erdemli E, Durak I, Akkus MA. The ultrastructural research of liver in experimental obstructive jaundice and effect of honey. *Am J Surg.* 195: 249-56. 2008.
- Kinet JP. The essential role of mast cells in orchestrating inflammation. *Immunol Rev.* 217: 5-7. 2007.

- Kinnman N, Hultcrantz R, Barbu V, Rey C, Wendum D, Poupon R, Housset C. PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. *Lab Invest.* 80: 697-707. 2000.
- Kinnman N, Housset C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. *Front Biosci.* 7:496-503. 2002.
- King T, Biddle W, Bhatia P, Moore J, Miner PB Jr. Colonic mucosal mast cell distribution at line of demarcation of active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci.* 37: 490-5. 1992.
- Kojima K, Hosokawa M, Kobayashi K, Tainaka H, Chiba K. Microarray analysis of hepatic gene expression during long-term cholestasis induced by common bile duct ligation in rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 115-116:63-75. 2004.
- Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol.* 12: 7413-20. 2006.
- Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 65: 305-11, 1984.
- Kubes P, Kanwar S, Niu XF, Gaboury JP. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. *FASEB.* 7: 1293-9. 1993.
- Kuhlmann WD, Peschke P. Hepatic progenitor cells, stem cells, and AFP expression in models of liver injury. *Int J Exp Pathol* 87: 343-59, 2006.
- Kullak-Ublick GA, Beuers U, Paumgartner G. Hepatobiliary transport. *J Hepatol.* 32: 3-18. 2000.
- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology.* 126: 322-42. 2004.
- Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci.* 18: 65-70. 2003.
- Lamb E, Newman DJ, Price C.P. Kidney Function Test . *En Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis Fourth Edition.* Edit. Elsevier Saunders. St Louis. Missouri. USA. 797–835. 2006.

- Lautt WW. Relationship between hepatic blood flow and overall metabolism: the hepatic arterial buffer response. *Fed Proc.* 42: 1662-6. 1983.
- Lawrence WT. Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg.* 25: 321-40. 1998.
- Lazaridis KN, Pham L, Tietz P, Marinelli RA, deGroen PC, Levine S, Dawson PA, LaRusso NF. Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest* 100: 2714-21, 1997.
- Lazaridis KN, Strazzabosco M, Larusso NF. The cholangiopathies: disorders of biliary epithelia. *Gastroenterology.* 127: 1565-77. 2004.
- Larsen K. Creatinine assay in the presence of protein with LKB 8600 reaction rate analyser. *Clin Chim Acta.* 38: 475-6. 1972.
- Lechner AJ, Velasquez A, Knudsen KR, Johanns CA, Tracy TF Jr, Matuschak GM. Cholestatic liver injury increases circulating TNF-alpha and IL-6 and mortality after Escherichia coli endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med.* 157: 1550-8. 1998.
- Lee J, Azzaroli F, Wang L, Soroka CJ, Gigliozzi A, Setchell KD, Kramer W, Boyer JL. Adaptive regulation of bile salt transporters in kidney and liver in obstructive cholestasis in the rat. *Gastroenterology.* 121: 1473-84. 2001.
- Lee SS, Girod C, Braillon A, Hadengue A, Lebrec D. Hemodynamic characterization of chronic bile duct-ligated rats: effect of pentobarbital sodium. *Am J Physiol.* 25: G176-80. 1986.
- Lee-Parritz D. Animal care and maintenance. *Surg Res.* 47-61. 2001.
- Lefkowitz JH. Hepatobiliary pathology. *Curr Opin Gastroenterol* 22: 198-208, 2006.
- Lehmann GL, Carreras FI, Soria LR, Gradilone SA, Marinelli RA. LPS induces the TNF-alpha-mediated downregulation of rat liver aquaporin-8: role in sepsis-associated cholestasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 294: G567-75. 2008.
- Levy R, Schlaeffer F, Keynan A, Nagauker O, Yaari A, Sikuler E. Increased neutrophil function induced by bile duct ligation in a rat model. *Hepatology.* 17: 908-14. 1993.

- Li MK, Crawford JM. The pathology of cholestasis. *Semin Liver Dis.* 24:21-42. 2004.
- Li T, Yang Z. Research progress of vasculopathy in portal hypertension. *World J Gastroenterol.* 11: 6079-84. 2005.
- Li WG, Hu SX, Xue BD, Jiang ZG, Huang ZQ. Observation of hepatohilar peribiliary vascular plexus with complete absence of hepatic artery blood supply in rats. *Transplant Proc.* 39: 3424-8. 2007.
- Li Z, Mizuno S, Nakamura T. Antinecrotic and antiapoptotic effects of hepatocyte growth factor on cholestatic hepatitis in a mouse model of bile-obstructive diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 292: 639-46. 2007.
- Liu TZ, Lee KT, Chern CL, Cheng JT, Stern A, Tsai LY. Free radical-triggered hepatic injury of experimental obstructive jaundice of rats involves overproduction of proinflammatory cytokines and enhanced activation of nuclear factor kappaB. *Ann Clin Lab Sci.* 31: 383-90. 2001.
- Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med.* 34: 1-10. 2003.
- López L, Begega A, Arias JL, Lorente L, Aller MA, Durán Poveda M, Arias J.. Citocromo Oxidasa Hepática en Ratas con Colestasis Microquirúrgica y con Anastomosis Portocava. *Rev Esp Enferm Dig.* 91: 365-73. 1999.
- López-Lázaro M. HIF-1: hypoxia-inducible factor or dysoxia-inducible factor? *FASEB J.* 20: 828-32. 2006.
- Lorente L, Arias J, Aller MA, Durán H. Anatomía e histología hepática: Anatomía. En: *Cirugía Hepática Experimental* . Arias J, Lorente L, Aller MA, Rodríguez J, Alonso MS, Trobo JI, Durán H. Edit. Kronos. Zaragoza: 41-94. 1993.
- Lorente L, Aller MA, Duran HJ, Cejalvo D, Lloris JM, Arias J. Extrahepatic biliary anatomy in Wistar rats. *Surg Res Comm* 17: 31-38, 1995.
- Lu LF, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K, Scott ZA, Coyle AJ, Reed JL, Van Snick J, Strom TB, Zheng XX, Noelle RJ. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature.* 31: 997-1002. 2006.
- Mahl TC, Groszmann RJ. Pathophysiology of portal hypertension and variceal bleeding. *Surg Clin North Am.* 70: 251-66. 1990.

- Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 43: 31-44, 2006.
- Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev.* 83: 337-76. 2003.
- Marrero J, Martinez FJ, Hyzy R. Advances in critical care hepatology. *Am J Respir Crit Care Med.* 168: 1421-6. 2003.
- Marzioni M, Glaser S, Francis H, Marucci L, Benedetti A, Alvaro D, Taffetani S, Ueno Y, Roskams T, Phinizy JL, Venter J, Fava G, Lesage GD, Alpini G. Autocrine/paracrine regulation of the growth of the biliary tree by the neuroendocrine hormone serotonin. *Gastroenterology.* 128: 121-37. 2005.
- Marzioni M, Fava G, Benedetti A. Nervous and Neuroendocrine regulation of the pathophysiology of cholestasis and of biliary carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 22: 3471-80, 2006.
- Marzioni M, Svegliati Baroni G, Alpini G, Benedetti A. Endogenous opioid peptides and chronic liver disease: from bedside to bench. *J Hepatol.* 46: 583-6. 2007.
- Masyuk TV, Ritman EL, LaRusso NF. Quantitative assessment of the rat intrahepatic biliary system by three-dimensional reconstruction. *Am J Pathol* 158: 2079-88, 2001.
- Matsunaga Y, Kawasaki H, Terada T. Stromal mast cells and nerve fibers in various chronic liver diseases: relevance to hepatic fibrosis. *Am J Gastroenterol.* 94: 1923-32. 1999.
- Matsunaga Y, Terada T. Mast cell subpopulations in chronic inflammatory hepatobiliary diseases. *Liver.* 20: 152-6. 2000.
- Mc Neil HP, Austen KF. Biology of the mast cell. En: Samter's Immunologic Diseases. MM Frank, KF Austen, HN Claman, ER Unanue, Edit. Little Brown and company. New York. USA. 185-204. 1995.
- Melgert BN, Olinga P, Van Der Laan JM, Weert B, Cho J, Schuppan D, Groothuis GM, Meijer DK, Poelstra K. Targeting dexamethasone to Kupffer cells: effects on liver inflammation and fibrosis in rats. *Hepatology.* 34: 719-28. 2001.

- Metz M, Grimbaldston MA, Nakae S, Piliponsky AM, Tsai M, Galli SJ. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol Rev.* 217: 304-28. 2007.
- Metz M, Maurer M. Mast cells--key effector cells in immune responses. *Trends Immunol.* 28: 234-41. 2007.
- Minter RM, Fan MH, Sun J, Niederbichler A, Ipaktchi K, Arbabi S, Hemmila MR, Remick DG, Wang SC, Su GL. Altered Kupffer cell function in biliary obstruction. *Surgery* 138: 236-45, 2005.
- Miyoshi H, Rust C, Guicciardi ME, Gores GJ. NF-kappaB is activated in cholestasis and functions to reduce liver injury. *Am J Pathol.* 158: 967-75. 2001.
- Mizuno S, Nimura Y, Suzuki H, Yoshida S. Portal vein branch occlusion induces cell proliferation of cholestatic rat liver. *J Surg Res.* 60: 249-57. 1996.
- Moazzam FN, Brems JJ, Yong SL, Filkins JP, Fisher SG, Holt DR, Gamelli RL, Ding JW. Endotoxin potentiates hepatocyte apoptosis in cholestasis. *J Am Coll Surg* 194: 731-39, 2002.
- Moezi L, Shafaroodi H, Sarkar S, Emami-Razavi SH, Sanatkar M, Mirazi N, Dehpour AR. Involvement of nitrenergic and opioidergic systems in the hypothermia induced by cholestasis in rats. *Pathophysiology.* 13: 227-32. 2006.
- Mombeini T, Roushanzamir F, Jorjani M, Pourpak Z, Gaskari SA, Mehr SE, Dehpour AR. Alteration in specific opioid-receptor labeling on peripheral blood leukocytes of bile duct-ligated rat. *Pathophysiology.* 13: 111-7. 2006.
- Moreau R, Lebrec D. Molecular and structural basis of portal hypertension. *Clin Liver Dis.* 10: 445-57. 2006.
- Mori V, Bartoloni St Omer F. On the behavior of mast cells in experimental cholestatic hepatopathy caused by ligation of the common bile duct. *Arch De Vecchi Anat Patol.* 47: 1089-98. 1966.
- Morita Y, Yoshidome H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Takeuchi D, Mitsuhashi N, Iida A, Miyazaki M. Excessive inflammation but decreased immunological response renders liver susceptible to infection in bile duct ligated mice. *Surg Res.* 146: 262-70. 2008.

- Morwood SR, Nicholson LB. Modulation of the immune response by extracellular matrix proteins. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 54: 367-74. 2006.
- Moseley RH: Sepsis and cholestasis. *Clin Liver Dis*. 3: 465-475. 1999.
- Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 3: 331-41. 2003.
- Muddu AK, Guha IN, Elsharkawy AM, Mann DA. Resolving fibrosis in the diseased liver: translating the scientific promise to the clinic. *Int J Biochem Cell Biol*. 39: 695-714. 2007.
- Murakami M, Sato N, Sato N, Nakamura T, Masunaga H. Changes in lymphocyte phenotypes and cytokine production by surgical stress in a rat small intestinal resection model. *J Clin Biochem Nutr*. 40: 216-20. 2007.
- Myron Johson A. Amino Acids, Peptides, and Proteins. En *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis Fourth Edition*. Edit. Elsevier Saunders St Louis. Missouri. USA. 533–595. 2006.
- Nakanuma Y, Hosono M, Sanzen T, Sasaki M. Microstructure and development of the normal and pathologic biliary tract in humans, including blood supply. *Microsc Res Tech* 38: 552-70, 1997.
- Napoli J, Prentice D, Niinami C, Bishop GA, Desmond P, McCaughan GW. Sequential increases in the intrahepatic expression of epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, and transforming growth factor beta in a bile duct ligated rat model of cirrhosis. *Hepatology*. 26: 624-33. 1997.
- Nathanson MH, Boyer JL. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology*. 14: 551-66. 1991.
- Nelson L, Vergnolle N, D'Mello C, Chapman K, Le T, Swain MG. Endogenous opioid-mediated antinociception in cholestatic mice is peripherally, not centrally, mediated. *J Hepatol*. 44: 1141-9. 2006.
- Nielsen SS, Grøfte T, Tygstrup N, Vilstrup H. Synthesis of acute phase proteins in rats with cirrhosis exposed to lipopolysaccharide. *Comp Hepatol*. 5:3. 2006.

- Nielsen SS, Grøfte T, Tygstrup N, Vilstrup H. Cirrhosis and endotoxin decrease urea synthesis in rats. *Hepatol Res.* 37: 540-7. 2007.
- Ni Y, Lukito G, Marchal G, Cresens E, Yu J, Petré C, Baert AL, Fevery J. Potential role of bile duct collaterals in the recovery of the biliary obstruction: Experimental study in rats using microcholangiography, histology, serology and magnetic resonance imaging. *Hepatology* 20: 1557-66, 1994.
- O'Connor MJ. Mechanical biliary obstruction. A review of the multisystemic consequences of obstructive jaundice and their impact on perioperative morbidity and mortality. *Am Surg.* 51: 245-51. 1985.
- Ogasawara M, Yamauchi K, Satoh Y, Yamaji R, Inui K, Jonker JW, Schinkel AH, Maeyama K. Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: organic cation transporters as a histamine transporter and histamine metabolism. *J Pharmacol Sci.* 101: 24-30. 2006.
- Ohara N, Schaffner T, Reichen J: Structure-function relationship in secondary biliary cirrhosis in the rat. Stereologic and hemodynamic characterization of a model. *J Hepatol.* 17: 155-162. 1993.
- Okayama Y, Ra C, Saito H. Role of mast cells in airway remodeling. *Curr Opin Immunol.* 19: 687-93. 2007.
- Okumura S, Kashiwakura J, Tomita H, Matsumoto K, Nakajima T, Saito H, Okayama Y. Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and FcεRI. *Blood.* 102: 2547-54. 2003.
- Olds RJ, Olds JR. A colour atlas of the rat- dissection guide. Edit. Wolfe Medical Publications LTD. London. UK. 51. 1979.
- Omenetti A, Popov Y, Jung Y, Choi SS, Witek RP, Yang L, Brown KD, Schuppan D, Diehl AM. The Hedgehog Pathway Regulates Remodeling Responses to Biliary Obstruction in Rats. *Gut.* (en prensa). 2008.
- O'Neil S, Hunt J, Filkins J, Gamelli R. Obstructive jaundice in rats results in exaggerated hepatic production of tumor necrosis factor-α and systemic and tissue tumor necrosis factor-α levels after endotoxin. *Surgery.* 122: 281-6. 1997

- Orellana M, Avalos N, Abarca M, Valdés E. Microsomal and peroxisomal fatty acid oxidation in bile duct ligated rats: a comparative study between liver and kidney. *Gen Pharmacol.* 28: 525-9. 1997.
- Padillo FJ, Cruz A, Segura-Jiménez I, Ruiz-Rabelo J, Vázquez-Ezquerria MR, Perea-Alvarez MD, Peña J, Briceño J, Muntané J. Anti-TNF-alpha treatment and bile duct drainage restore cellular immunity and prevent tissue injury in experimental obstructive jaundice. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 20: 855-60. 2007.
- Pain JA, Bailey ME. Measurement of operative plasma endotoxin levels in jaundiced and non-jaundiced patients. *Eur Surg Res.* 19: 207-16. 1987.
- Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW. Upregulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat Liver. *Gastroenterology* 123: 1667-76, 2002.
- Panteghini M, Bais R, W.van Solinge W. Enzymes. En: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis Fourth Edition.* Edit. Elsevier Saunders St Louis. Missouri. USA . 597 – 643. 2006.
- Pasha TM, Lindor KD. Diagnosis and therapy of cholestatic Liver disease. *Med Clin North Am* 80: 995-1019, 1996.
- Patnaik MM, Rindos M, Kouides PA, Tefferi A, Pardanani A. Systemic mastocytosis: a concise clinical and laboratory review. *Arch Pathol Lab Med.* 131: 784-91. 2007.
- Paumgartner G, Beuers U. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology.* 36: 525-31. 2002.
- Paumgartner G, Beuers U. Mechanisms of action and therapeutic efficacy of ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease. *Clin Liver Dis.* 8: 67-81. 2004.
- Paumgartner G. Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets. *World J Gastroenterol.* 12: 4445-51. 2006.
- Plaut M, Pierce JH, Watson CJ, Hanley-Hyde J, Nordan RP, Paul WE. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature.* 339:64-7. 1989.

- Plebani M, Panozzo MP, Basso D, De Paoli M, Biasin R, Infantolino D. Cytokines and the progression of liver damage in experimental bile duct ligation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 26: 358-63. 1999.
- Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med*. 21: 49-98. 2000.
- Portincasa P, Grattagliano I, Testini M, Caruso ML, Wang DQ, Moschetta A, Calamita G, Vacca M, Valentini AM, Renna G, Lissidini G, Palasciano G. Parallel intestinal and liver injury during early cholestasis in the rat: modulation by bile salts and antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 42: 1381-91. 2007.
- Posner MC, Burt ME, Stone MD, Han BL, Warren RS, Vydellingum NA, Brennan MF. A model of reversible obstructive jaundice in the rat. *J Surg Res*. 48: 204-10. 1990.
- Prieto I, Aller MA, Santamaría L, Nava MP, Madero R, Pérez-Robledo JP, Arias J. Prehepatic portal hypertension produces increased mast cell density in the small bowel and in mesenteric lymph nodes in the rat. *J Gastroenterol Hepatol*. 20: 1025-31. 2005
- Proell V, Carmona-Cuenca I, Murillo MM, Huber H, Fabregat I, Mikulits W. TGF-beta dependent regulation of oxygen radicals during transdifferentiation of activated hepatic stellate cells to myofibroblastoid cells. *Comp Hepatol*. 6:1. 2007.
- Protheroe SM, Kelly DA. Cholestasis and end-stage liver disease. *Baillieres Clin Gastroenterol*. 12: 823-41. 1998.
- Ramadori G, Saile B. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest*. 84: 153-9. 2004a
- Ramadori G, Saile B. Inflammation, damage repair, immune cells, and liver fibrosis: specific or nonspecific, this is the question. *Gastroenterology*. 127: 997-1000. 2004b.
- Ramírez MJ, Ibáñez A, Navasa M, Casals E, Morales-Ruiz M, Jiménez W, Arroyo V, Rodés J. High-density lipoproteins reduce the effect of endotoxin on cytokine production and systemic hemodynamics in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatol*. 40: 424-30. 2004.

- Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. The bowel: a key component of the immune system. *Rev Esp Enferm Dig.* 100: 29-34. 2008.
- Ramm GA, Carr SC, Bridle KR, Li L, Britton RS, Crawford DH, Vogler CA, Bacon BR, Tracy TF. Morphology of liver repair following cholestatic liver injury: resolution of ductal hyperplasia, matrix deposition and regression of myofibroblasts. *Liver.* 20: 387-96. 2000.
- Raud J. Intravital microscopic studies on acute mast cell-dependent inflammation. *Acta Physiol Scand Suppl.* 578: 1-58. 1989.
- Reish RG, Eriksson E. Scar treatments: preclinical and clinical studies. *J Am Coll Surg.* 206: 719-30. 2008.
- Rhodes JM, Simons M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J Cell Mol Med.* 11: 176-205. 2007.
- Rioux KP, Sharkey KA, Wallace JL, Swain MG: Hepatic mucosal mast cell hyperplasia in rats with secondary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 23: 888-895. 1996.
- Rius M, Nies AT, Hummel-Eisenbeiss J, Jedlitschky G, Keppler D. Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology.* 38: 374-84. 2003.
- Roberts SK, Ludwig J, Larusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Gastroenterology.* 112: 269-79. 1997.
- Rockey DC. Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. *Clin Liver Dis.* 10: 459-79. 2006a.
- Rockey DC. New therapies in hepatitis C virus and chronic liver disease: antifibrotics. *Clin Liver Dis.* 10:881-900. 2006b.
- Rodríguez J. Anestesia. En: Arias J, Aller MA, Lorente L, Rodríguez J, De Pedro JA, Brandau D, Durán H. *Trasplante experimental de órganos.* Edit. Garsí. Madrid. 65-8. 1989.
- Rodríguez-Garay EA. Cholestasis: human disease and experimental animal models. *Ann Hepatol.* 2: 150-8. 2003.
- Roeb E, Purucker E, Breuer B, Nguyen H, Heinrich PC, Rose-John S, Matern S. TIMP expression in toxic and cholestatic Liver injury in rat. *J Hepatol* 27: 535-44, 1997.

- Roggin KK, Papa EF, Kurkchubasche AG, Tracy TF Jr. Kupffer cell inactivation delays repair in a rat model of reversible biliary obstruction. *J Surg Res.* 90: 166-73. 2000.
- Safadi R, Ohta M, Alvarez CE, Fiel MI, Bansal M, Mehal WZ, Friedman SL. Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 cells and attenuation by transgenic interleukin-10 from hepatocytes. *Gastroenterology.* 127: 870-82. 2004.
- Saito JM, Maher JJ. *Gastroenterology.* Bile duct ligation in rats induces biliary expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant. 118: 1157-68. 2000.
- Sakon S, Xue X, Takekawa M, Sasazuki T, Okazaki T, Kojima Y, Piao JH, Yagita H, Okumura K, Doi T, Nakano H. NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J.* 22: 3898-909. 2003.
- Samson EJ, Baird MA, Burtis CA, Smith EM, Witte DL, Bayse DD. A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: optimization and evaluation of the AACC Study Group on urea candidate reference method. *Clin Chem.* 26: 816-26. 1980.
- Samuel I: Bile and pancreatic juice exclusion activates acinar stress kinases and exacerbates gallstone pancreatitis. *Surgery.* 143: 434-440. 2008.
- Sanchez-Patan F, Aller MA, Corcuera MT, Vara E, Casado I, Gomez F, Garcia C, Alonso MJ, Arias J. Chronic inflammatory portal hypertensive enteropathy in the rat. *Cir Esp.* 80: 162-167. 2006.
- Sánchez Patan F, Anchuelo R, Corcuera MT, Casado I, Gómez-Aguado F, Aller MA, Cruz A, Alonso MJ, Arias J. Biliar fibrosis in microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat. *Microsurgery.* En prensa.
- Saxena R, Theise ND, Crawford JM. Microanatomy of the human liver- exploring the hidden interfaces. *Hepatology.* 30: 1339-46. 1999.
- Schaffner F, Bachini PG, Hutterer F, Schanbeck HH, Sarkozi L, Denk H, Popper H. Mechanism of cholestasis. Structural and biochemical changes in the Liver and serum in rats after bile duct ligation. *Gastroenterology* 60: 888-97. 1971.
- Schaffner F, Popper H: Classification and mechanism of cholestasis. In: *Liver and biliary disease. Pathophysiology. Diagnosis. Management.*

- London. Edited by Wright R, Alberti KGMM, Karran S, Millward-Sadler GH: W.B. Saunders Company Ltd. 296-323. 1979.
- Schmidt R, McDonagh AF: The enzymatic formation of bilirubin. *Ann NY Acad Sci.* 244: 533-552. 1975.
- Schmelz M. A neural pathway for itch. *Nat Neurosci.* 4: 9-10. 2001.
- Schramm R, Thorlacius H: Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation: inhibitory mechanisms of glucocorticoids. *Inflamm Res.* 53: 644-652. 2004.
- Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Ferard G, Ferrero CA, Franck PF, Gella FJ, Hoelzel W, Jorgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kristiansen N, Lessinger JM, Linsinger TP, Misaki H, Panteghini M, Pauwels J, Schiele F, Schimmel HG, Weidemann G, Siekmann L; International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase. *Clin Chem Lab Med.* 40: 718-24. 2002.
- Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Ferard G, Ferrero CA, Franck PF, Gella FJ, Hoelzel W, Jorgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kristiansen N, Lessinger JM, Linsinger TP, Misaki H, Panteghini M, Pauwels J, Schiele F, Schimmel HG, Weidemann G, Siekmann L; International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. *Clin Chem Lab Med.* 40: 725-33. 2002.
- Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Ferard G, Ferrero CA, Franck PF, Gella FJ, Hoelzel W, Jorgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kristiansen N, Lessinger JM, Linsinger TP, Misaki H, Panteghini M, Pauwels J, Schiele F, Schimmel HG, Weidemann G, Siekmann L; International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. IFCC primary reference

- procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of gamma-glutamyltransferase. Clin Chem Lab Med. 40: 734-8. 2002.
- Schumann G, Aoki R, Ferrero CA, Ehlers G, Ferard G, Gella FJ, Jorgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kytzia HJ, Lessinger JM, Miller WG, Nagel R, Pauwels J, Schimmel H, Siekmann L, Weidemann G, Yoshida K, Ceriotti F. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. Clin Chem Lab Med. 44: 1146-55. 2006.
- Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. Lancet. 371: 838-51. 2008.
- Schwörer H, Hartmann H, Ramadori G. Relief of cholestatic pruritus by a novel class of drugs: 5-hydroxytryptamine type 3 (5-HT<sub>3</sub>) receptor antagonists: effectiveness of ondansetron. Pain. 61: 33-7. 1995.
- Scott BB, Hardy GJ, Losowsky MS. Involvement of the small intestine in systemic mast cell disease. Gut. 16: 918-24. 1975.
- Sedlacek N, Jia JD, Bauer M, Herbst H, Ruehl M, Hahn EG, Schuppan D: Proliferating bile duct epithelial cells are a major source of connective tissue growth factor in rat biliary fibrosis. Am J Pathol. 158: 1239-1244. 2001.
- Selye H: On the mechanism through which obstructive jaundice influences inflammatory processes. Ann Rheum Dis. 13: 102-108. 1954.
- Semenza GL: Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer. 3: 721-732. 2003.
- Seyhan H, Hamzavi J, Wiercinska E, Gressner AM, Mertens PR, Kopp J, Horch RE, Breitkopf K, Dooley S J. Liver fibrogenesis due to cholestasis is associated with increased Smad7 expression and Smad3 signaling Cell Mol Med. 10: 922-32. 2006.
- Sherlock S: Cholestasis. In: Diseases of the liver and biliary System. 8<sup>o</sup> Edition. Edited by: Sherlock S. London: Blackwell Scientific Publications; 248-272. 1989.
- Sherlock S, Dooley J. Diseases of the liver and biliary system. 10th Edition. Blackwell Science Ltd. Oxford. 201-216. 1997.

- Shivakumar P, Campbell KH, Sabla GE, Miethke A, Tiao G, McNeal MM, Ward RL, Bezerra JA: Obstructive of extrahepatic bile ducts by lymphocytes is regulated by IFN-gamma in experimental biliary atresia. *J Clin Invest* . 114: 322-329. 2004.
- Shukla SA, Veerappan R, Whittimore JS, Miller LE, Youngberg GA. Mast cell ultrastructure and staining in tissue. En: *Mast Cells. Methods and Protocols*. Krishnaswamy G. and Chi DS. Edit. Human Press Inc. Totowa. New Jersey USA. 63-76. 2006.
- Sicklick JK, Choi SS, Bustamante M, McCall SJ, Hernandez-Perez E, Huang J, Li Y-X, Rojkind M, Diehl AM: Evidence for epithelial-mesenchymal transitions in adult liver cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 291:G575-G583. 2006.
- Siegert SI, Diebold J, Ludolph-Hauser D, Löhrs U. Are gastrointestinal mucosal mast cells increased in patients with systemic mastocytosis?. *Am J Clin Pathol*. 122: 560-5. 2004.
- Sikuler E, Buchs AE, Yaari A, Keynan A. Hemodynamic characterization of conscious and ketamine-anesthetized bile duct-ligated rats. *Am J Physiol*. 260: G161-6. 1991.
- Simpson KJ, Finlayson ND. Clinical evaluation of liver disease. *Baillieres Clin Gastroenterol*. 9: 639-59. 1995.
- Simpson KJ, Lukacs NW, Colletti L, Strieter RM, Kunkel SL. Cytokines and the liver. *J Hepatol*. 29: 512-3. 1998.
- Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 341: 738-46. 1999.
- Smith CA, Rennick DM. Characterization of a murine lymphokine distinct from interleukin 2 and interleukin 3 (IL-3) possessing a T-cell growth factor activity and a mast-cell growth factor activity that synergizes with IL-3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:1857-61. 1986.
- Sokol RJ, Devereaux MW, O'Brien K, Khandwala RA, Loehr JP. Abnormal hepatic mitochondrial respiration and cytochrome C oxidase activity in rats with long-term copper overload. *Gastroenterology*. 105: 178-87. 1993.

- Slott PA, Liu MH, Tavoloni N. Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology*. 99: 466-77. 1990.
- Soroka C, Zollner G, Mennone A, Ballatori N, Trauner M, and Boyer JL. The heteromeric organic solute transporter, Ost alpha-Ost beta, is up-regulated in the liver of patients with primary biliary cirrhosis (PBC) and variably induced in rat and mouse cholangiocytes following bile duct ligation (BDL). *Hepatology* 42: 414A. 2005.
- Soylu AR, Aydogtu N, Basaran UN, Altaner S, Tarcin O, Gedik N, Umit H, Tezel A, Dokmeci G, Galoglu H, Ture M, Kutlu K, Kaymak K: Antioxidants vitamins E and C attenuate hepatic fibrosis in biliary obstructed rats. *World J Gastroenterol*. 12: 6835-6841. 2006.
- Sprenger H, Kaufmann A, Garn H, Lahme B, Gemsa D, Gressner AM. Induction of neutrophil-attracting chemokines in transforming rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology*. 113: 277-85. 1997.
- Stenton GR, Vliagoftis H, Befus AD. Role of intestinal mast cells in modulating gastrointestinal pathophysiology. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 81: 1-11. 1998.
- Stern R, Asari AA, Sugahara KN: Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol*. 85: 699-715. 2006.
- Strazzabosco M, Spirlí C, Okolicsanyi L. Pathophysiology of the intrahepatic biliary epithelium. *J Gastroenterol Hepatol*. 15: 244-53. 2000.
- Sugihara A, Tsujimura T, Fujita Y, Nakata Y, Terada N. Evaluation of role of mast cells in the development of liver fibrosis using mast cell-deficient rats and mice. *J Hepatol*. 30: 859-67. 1999.
- Sung JJ, Go MY. Reversible Kupffer cell suppression in biliary obstruction is caused by hydrophobic bile acids. *J Hepatol*. 30: 413-8. 1999.
- Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI. Sirius Red F3BA as a stain for connective tissue. *Arch Pathol*. 78: 69-72. 1964.
- Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A. Innate immune response and hepatic inflammation. *Semin Liver Dis*. 27: 339-50. 2007.
- Sztrymf B, Libert JM, Mougeot C, Lebrec D, Mazmanian M, Humbert M, Herve P: Cirrhotic rats with bacterial translocation have higher incidence

- and severity of hepatopulmonary syndrome. *J Gastroenterol Hepatol.* 20: 1538-1544. 2005.
- Tahan G, Tarcin O, Tahan V, Eren F, Gedik N, Sahan E, Biberoglu N, Guzel S, Bozbas A, Tozun N, Yucel O.
- The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology. Recommended methods for the determination of four enzymes in blood. *Scand J Clin Lab Invest* . 291-306. 1974.
- The effects of N-acetylcysteine on bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. *Dig Dis Sci.* 52: 3348-54. 2007.
- Takeshita A, Shibayama Y. Role of mast cells in hepatic remodeling during cholestasis and its resolution: relevance to regulation of apoptosis. *Exp Toxicol Pathol.* 56:273-80. 2005.
- Tanaka Y, Chen C, Maher JM, Klaassen CD. Kupffer cell-mediated downregulation of hepatic transporter expression in rat hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation.* 82: 258-66. 2006.
- Tanaka A, Tsuneyama K, Mikami M, Uegaki S, Aiso M, Takikawa H. Gene expression profiling in whole liver of bile duct ligated rats: VEGF-A expression is up-regulated in hepatocytes adjacent to the portal tracts. *J Gastroenterol Hepatol.* 22: 1993-2000. 2007.
- Terasaki M, Kuriki H, Nimura Y, Shionoya S, Kojima K, Yoshida S. Induction of DNA replication and cell growth in rat liver by obstructive jaundice. *Jpn J Cancer Res.* 82: 170-5. 1991.
- Thabut D, Tzai KA, Bonnefont-Rousselot D, Aller M, Farges O, Guimont MC, Tellier Z, Guicharo C, Ogier-Denis E, Poynard T, Moureau R, Le Brec D: High-density lipoprotein administration attenuates liver proinflammatory response, restores liver endothelial nitric oxide synthase activity, and lowers portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007, 46:1893-1906.
- Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, Kumar A, Crawford JM. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology.* 30: 1425-33.1999.
- Tietz NW, Rinker AD, Shaw LM. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes Part 5. IFCC method for alkaline

- phosphatase (orthophosphoric-monoester phosphohydrolase, alkaline optimum, EC 3.1.3.1). *J Clin Chem Clin Biochem.* 21: 731-48. 1993.
- Tjandra K, Sharkey KA, Swain MG. Progressive development of a Th1-type hepatic cytokine profile in rats with experimental cholangitis. *Hepatology.* 31: 280-90. 2000.
- Tomioka M, Iinuma H, Okinaga K. Impaired Kupffer cell function and effect of immunotherapy in obstructive jaundice. *J Surg Res.* 92: 276-82.
- Tovar Gallego JA. Estudio de dos modelos experimentales de ictericia obstructiva: macroquirúrgica y microquirúrgica. Tesis Doctoral . Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. 1997.
- Toyama T, Nakamura H, Harano Y, Yamauchi N, Morita A, Kirishima T, Minami M, Itoh Y, Okanoue T. PPAR $\alpha$  ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 324: 697-704. 2004.
- Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med.* 339: 1217-27. 1998.
- Trauner M, Fickert P, Stauber RE. Inflammation-induced cholestasis. *J Gastroenterol Hepatol.* 14: 946-59. 1999.
- Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev.* 83: 633-71. 2003.
- Trauner M, Wagner M, Fickert P, Zollner G. Molecular regulation of hepatobiliary transport systems: clinical implications for understanding and treating cholestasis. *J Clin Gastroenterol.* 39: S111-24. 2005.
- Twycross R, Greaves MW, Handwerker H, Jones EA, Libretto SE, Szepietowski JC, Zyllicz Z. Itch: scratching more than the surface. *QJM.* 96: 7-26. 2003.
- van den Heuvel MC, Gouw AS, Boot M, Slooff MJ, Poppema S, de Jong KP. The finest branches of the biliary tree might induce biliary vascularization necessary for biliary regeneration. *J Hepatol.* 44: 947-55. 2006.
- Vega De Céniga M, Valdés F, Aller MA, Nava MP, Chivato T, Arias J. Budesonide ameliorates early portal hypertension in the rat: possible antiexudative splanchnic action. *Inflammopharmacology.* 11: 211-22. 2003.

- Vítek L, Zelenka J, Zadinová M, Malina J. The impact of intestinal microflora on serum bilirubin levels. *J Hepatol.* 42: 238-243. 2005.
- Vítek L, Schwertner HA. The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem.* 43: 1-57. 2007.
- Wang G, Shen H, Rajaraman G, Roberts MS, Gong Y, Jiang P, Burczynski F. Expression and antioxidant function of liver fatty acid binding protein in normal and bile-duct ligated rats. *Eur J Pharmacol.* 560: 61-8. 2007.
- Wang CC, Lin JW, Lee LM, Lin CM, Chiu WT, Pai HT, Hung KS. Alpha-melanocyte-stimulating hormone gene transfer attenuates inflammation after bile duct ligation in the rat. *Dig Dis Sci.* 53: 556-63. 2008.
- Waseem T, Duxbury M, Ito H, Ashley SW, Robinson MK: Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Surgery* 143: 334-342. 2008.
- Waynforth and P.A. Flecknell. *Experimental and surgical technique in the rat.* Edit. Academic Press. San Diego. USA. 1992.
- Weinbren K. The effect of bile duct obstruction on regeneration of the rat's liver. *Br J Exp Pathol.* 34: 280-9. 1953.
- Winau F, Quack C, Darmoise A, Kaufmann SH. Starring stellate cells in liver immunology. *Curr Opin Immunol.* 20: 68-74. 2008.
- Wolfhagen FH, Sternieri E, Hop WC, Vitale G, Bertolotti M, Van Buuren HR. Oral naltrexone treatment for cholestatic pruritus: a double-blind, placebo-controlled study. *Gastroenterology.* 113: 1264-9. 1997.
- Wong-Riley MT. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci.* 12: 94-101. 1989.
- Woodbury RG, Neurath H. Structure, specificity and localization of the serine proteases of connective tissue. *FEBS Lett.* 114: 189-96. 1980.
- Woolf GM, Vierling JM. Disappearing intrahepatic bile ducts: the syndromes and their mechanisms. *Semin Liver Dis.* 13: 261-75. 1993.
- Wright G, Davies NA, Shawcross DL, Hodges SJ, Zwingmann C, Brooks HF, Mani AR, Harry D, Stadlbauer V, Zou Z, Williams R, Davies C, Moore KP, Jalan R. Endotoxemia produces coma and brain swelling in bile duct ligated rats. *Hepatology.* 45: 1517-26. 2007.

- Wynn TA . Cellular and molecular mechanisms of fibrosis . J Pathol. 214: 199-210. 2008.
- Xia X, Francis H, Glaser S, Alpini G, LeSage G. Bile acid interactions with cholangiocytes. World J Gastroenterol. 12: 3553-63. 2006.
- Xu J, Deng X, Demetriou AA, Farkas DL, Hui T, Wang C. Factors released from cholestatic rat livers possibly involved in inducing bone marrow hepatic stem cell priming. Stem Cells Dev. 17: 143-55. 2008.
- Yamaguchi S, Kawanaka H, Yoshida D, Maehara Y, Hashizume M. Splenic hemodynamics and decreased endothelial nitric oxide synthase in the spleen of rats with liver cirrhosis. Life Sci. 80: 2036-2044. 2007.
- Yamashiro M, Kouda W, Kono N, Tsuneyama K, Matsui O, Nakanuma Y. Distribution of intrahepatic mast cells in various hepatobiliary disorders. An immunohistochemical study. Virchows Arch. 433: 471-9. 1998.
- Yamashita M, Nakayama T. Progress in allergy signal research on mast cells: regulation of allergic airway inflammation through toll-like receptor 4-mediated modification of mast cell function. J Pharmacol Sci. 106: 332-5. 2008.
- Yilmaz M, Ara C, Isik B, Karadag N, Yilmaz S, Polat A, Coban S, Duzova H. The effect of aminoguanidine against cholestatic liver injury in rats. Cell Biochem Funct. 25: 625-32. 2007.
- Yosipovitch G, Greaves MW, Schmelz M. Itch. Lancet. 361: 690-4. 2003.
- Yung S, Chan TM: Glycosaminoglycans and proteoglycans: overlooked entities? Perit Dial Int 27: S104-109. 2007.
- Zimmermann A, Zhao D, Reichen J. Myofibroblasts in the cirrhotic rat liver reflect hepatic remodeling and correlate with fibrosis and sinusoidal capillarization. J Hepatol. 30: 646-52. 1999.
- Zollner G, Fickert P, Zenz R, Fuchsbichler A, Stumptner C, Kenner L, Ferenci P, Stauber RE, Krejs GJ, Denk H, Zatloukal K, Trauner M. Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. Hepatology. 33: 633-46. 2001.
- Zollner G, Wagner M, Fickert P, Geier A, Fuchsbichler A, Silbert D, Gumhold J, Zatloukal K, Kaser A, Tilg H, Denk H, Trauner M. Role of nuclear receptors and hepatocyte-enriched transcription factors for Ntcp

repression in biliary obstruction in mouse liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 289: G798- G805. 2005.