

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author



**UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA
BARCELONATECH**

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial de Barcelona (ETSEIB)
Grupo de investigación en terapia de hipertermia localizada (FIMIM)
Modelado teórico y experimental para técnicas de ablación basada en energía (METABLATE)

2011-2014

Tesis doctoral

Valoración de la respuesta tisular tras la pancreatotomía media realizada con un dispositivo asistido por radiofrecuencia

Rita Quesada Diez

**Director: Dr. Fernando Burdío (UPF)
Co-directora: Dra. Elisabeth Engel (UPC)**

Esta tesis se presenta en la Universitat Politècnica de Catalunya
para el grado de Doctor en Ingeniería Biomédica

“Per els meus pares, la meva germana i
el meu company de viatge”.

“ El hombre nunca sabe de lo que es capaz hasta que lo intenta.”

Charles Dickens (1812-1870)

Agradecimientos

Tras 4 años de trabajo es el momento de dar las gracias a todos aquellos que en algún momento me han ayudado y han compartido conmigo penas y alegrías durante el transcurso de esta tesis.

Antes de todo, me gustaría dar las gracias a mis dos directores de tesis: Fernando Burdío y Elisabeth Engel. Gracias a Fernando por darme, des de la primera entrevista, la oportunidad de desarrollar en el grupo de investigación la tesina del máster y la tesis doctoral. Si no hubieses apostado por mi seguramente no habríamos desarrollado este trabajo. Por tu empeño y cabezonería “maña”. Aunque en algunos momentos me he “tirado de los pelos” no podría haber realizado el trabajo sin tu dirección. A ti Eli, gracias a por ser mi co-directora de tesis aún y la distancia, y por recibirme siempre con los brazos abiertos.

Quisiera agradecer también a Enrique Berjano, el apoyo que me ha dado a nivel científico, aportando siempre la visión más metódica y organizada cuando la necesitaba y por su increíble velocidad de respuesta. Darle las gracias por escucharme en mis momentos de desesperación y darme ánimos para tirar adelante. Dar las gracias también a Juan Carlos que en algún momento ha aguantado el “chaparrón tesil” y a todo el equipo de Apeiron Medical.

Mirando atrás, me gustaría dar las gracias a Anna Andaluz y a Xavier Moll, así como al resto del equipo de la facultad de veterinaria, Anna, Rosa, Félix, por ayudarme en todo lo relativo a los cerditos y por enseñarme tanto. Gracias a Anna por los almuerzos en el comedor de la facultad (como dice ella) y por ayudarme siempre en todo lo que ha podido. Gracias a Xavier por si mi traumatólogo privado. A ambos, por enseñarme a no tener miedo a pinchar a los cerdos de 140 kg.. aunque mejor con una palomilla y alargadera.. que me siguen impresionando! Gracias a

Rosa por dar calor a los cerditos en los momentos de PO, poniéndoles mantitas, o sueros calientes así como abrazarlos si ha hecho falta (tengo fotos!).

Gracias a las patóloga Dolors Fontdevila, por pegarme “rapapolvos científicos” y aguantar mi disgusto posterior. Pero sobretodo, por enseñarme la visión más crítica siempre acompañada por una sonrisa. Gracias a Mar Iglesias, por las consultas exprés de despacho y por todo lo que me ha enseñado.

Gracias a Raúl, por ayudarme tanto con el microscopio y la programación. Fuiste una luz en un túnel de confusión.

A las cirujas! Gracias a Marta Cáceres por sus super alegrías y positivismo, por los bombones en la taza de café, por las horas pinchado ratones y por las charlas dentro y fuera del despacho.

A tu Silvia!! Que no t'escapes!! Per les hores que hem passat plegades al despatx, per les notes de “Ànims campiona que ja ho tens...” per estar al meu costat en moments durs i compartir les meves alegries.. i per aguantar cada vegada que et distrec de la teva concentració! ;) ah, i per ajudar-me amb les coses que m'oblido quan no estic al despatx! Sempre em salves. També a l'Anna, que tot i que ara ja no estàs amb nosaltres i ets una super Consellera genètica hem passat moltes hores plegades, birres i riures! Al Dublinense (Dimitri)! Fernando te echa mucho de menos, pero nosotros también! Darte las gracias por todas las cirugías y necros compartidas; las mías! No las de tus cerditos, eh?! Jejejeje (ya tú sabes). A Patricia y a Lourdes.

Als meus biòlegs, que tot i que no hem tingut l'oportunitat de treballar plegats, si hem fet dinars i festes! Això sí se'ns dóna bé, eh?! Per les festes al Cangrejo i per fer-me riure tant! Especialment, a tu Xavi i Sergi! I a la resta de compis de “A comer”!

A les meves biòlogues que sempre estan al meu costat. Quina sort tinc! A la Gemma per ajudar-me a distreure'm cada divendres, a la Aida per preocupar-se tant i a la Zaida per compartir tants moments al meu costat, fins i tot via skype. Per ajudar-me a ser la jefa del photoshop i per acudir fins i tot els divendres a la tarda al meu rescat a la biblioteca! També agrair a la Criski, les birrilles fetes en aquest temps en que la tesis era el monotema i ens donàvem suport incondicional i "por creer tanto en mi". I a totes les amigues per estar sempre amb mi quan les he necessitat.

Y en especial,...

A mi padres porque siempre me han enseñado que "el qué la sigue la consigue" y que el que "algo quiere, algo le cuesta" aunque a mi me ha costado mucho tiempo! Gracias por enseñarme a trabajar duro y a ser constante. A mi padre por ayudarme a ser exigente con las cosas que hago y a mi madre, por ser la persona más trabajadora que conozco. Gracias por enseñarme y guiarme hasta lo que soy ahora. Sois un ejemplo para mi. A mi enana favorita. Perquè ets la més gran. Perquè tinc un tresor i perquè arribaràs on tu vulguis arribar. Gràcies per els carquinyolis sorpresa i per raptar-me en moments en que no tenia temps per res i per les visites sorpresa, els dinars a la platja, etc.

Finalment, però no menys especial, ans al contrari, vull dedicar part d'aquest treball al meu company de vida. A tu Pol, que portes anys recolzant-me i animant-me per tirar endavant amb la tesi doctoral (tot i no veure'm el pèl ni els caps de setmana). Sé que ha sigut difícil! Per fi acabo... Semblava que mai arribaria aquest moment, però tranquil, què no faré un segon doctorat, ni un altre màster (almenys durant un temps). Gràcies de debò! Gràcies per estar sempre al meu costat en els moments bons i en els dolents. Gràcies per intentar llegir la tesi tot i que havies de buscar moltes de les paraules, ... Vaja, ... Gràcies per tot.

| Resumen

Hoy en día la duodenopancreatectomía es el procedimiento estándar para el tratamiento del adenocarcinoma ductal y consiste en la anastomosis del remanente pancreático al estómago o yeyuno tras una transección corporocaudal. Sin embargo, la oclusión del ducto pancreático principal (mediante sutura, ligadura o pegamento) sigue siendo una buena opción en algunas circunstancias en las que el riesgo de fístula pancreática es elevado. Estudios recientes sugieren que la transección asistida por radiofrecuencia (RFAT) del páncreas distal es una técnica fácil y segura. El objetivo de ésta tesis es evaluar si la RFAT del ducto pancreático principal reduce el riesgo de pancreatitis necrótico hemorrágica y de fístula pancreática (POPF).

Para ello, se utilizaron dos modelos experimentales, murino y porcino, a los cuales se les realizó una RFAT del cuello del páncreas sin anastomosar el remanente pancreático. Treinta-y-dos ratas fueron sujetas al procedimiento con supervivencia de 3, 7, 15 y 21 días de postoperatorio (PO). Además, se consideraron otros dos grupos controles de 15 días de PO sujetos a toda operación excepto la transección pancreática (sham, n=3) y otros animales sometidos únicamente a manipulación preoperatoria (control, n=4). En modelo porcino, 13 animales fueron sometidos al mismo procedimiento pero con periodos de supervivencia de 1 y 6 meses (n= 8 y n= 5, respectivamente), y 11 especímenes pancreáticos se utilizaron como controles histológicos.

Histológicamente, ambos modelos mostraron la rápida atrofia del páncreas distal sin signos de pancreatitis necrótico hemorrágica y total preservación del páncreas proximal. El patrón de atrofia se caracterizó por una respuesta apoptótica que parece estimular un proceso de metaplasia acino-ductal que con el PO tardío (6 meses en modelo porcino) desencadena el reemplazo de los pseudoductos por tejido fibrótico y posterior metaplasia grasa. Con el PO se

Resumen

observó un aumento del área de insulina en el páncreas distal y proximal, aunque se identificó un aumento de agrupaciones de células β en el páncreas distal de ambas especies tras la transección. Bioquímicamente, se identificó un aumento significativo de amilasa en suero durante el PO inmediato que se estabilizó a valores basales a la semana. Se diagnosticaron 2 POPF grado A (bioquímicas) en modelo porcino y ninguna en modelo murino.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la RFAT del cuello del páncreas consigue un sellado eficiente del remanente pancreático y desencadena una atrofia exocrina total del páncreas distal sin signos de pancreatitis necrótico hemorrágica. Ésta técnica puede ser de especial interés en casos en que la anastomosis no esté recomendada.

Palabras clave: ablación por radiofrecuencia, pancreatitis necrótico hemorrágica, apoptosis, atrofia, ducto pancreático principal, ligadura del ducto.

| Abstract

The current approach to managing the distal pancreas after pancreaticoduodenectomy is to anastomose the stump to either the jejunum or the stomach. However, occlusion of the main pancreatic duct (usually sutured, ligated or glued), remains an option in certain circumstances, even if it does involve a greater risk of pancreatic fistula. Recent studies suggest that distal pancreatic transection by radiofrequency-assisted transection (RFAT) devices can seal the main pancreatic duct easily and safely. The goal of this thesis was to elucidate whether the RFAT of the main pancreatic duct may avoid the risk of both necrotizing pancreatitis and postoperative pancreatic fistula (POPF) formation.

Using murine and porcine experimental models, we performed a transection of the neck of the pancreas by RFAT without pancreatic anastomosis in both species. Thirty-two rats were subjected to the procedure and were killed at 3, 7, 15 and 21 days. Two additional control groups; sham operation (n=3) and user manipulation only (n=4) of 15 days of postoperative period (PO) were considered. On the porcine model, thirteen animals were subjected to the same procedure and killed at 1 and 6 months, and 11 pancreatic specimens were used such as histological controls.

Histologically, both models showed a rapid atrophy of the distal pancreas by apoptosis with no signs of necrotizing pancreatitis. The atrophic pattern of the distal pancreas was characterized by acinar-ductal metaplasia which was replaced by fibrotic and adipose tissue at long PO period (6 month in the porcine model). The insulin area increased over the PO in both proximal and distal pancreas, though we identified a significant increase of clusters of β -cells in the distal pancreas in both species after the transection. The proximal pancreas was totally preserved at all time of the PO. As a general finding, we observed biochemically a significant increase in serum amylase levels on the immediate PO which return to baseline levels in the following

Abstract

weeks. Two biochemical grade A POPF and a pseudocyst were diagnosed in the porcine model, while any POPF was observed in the murine model.

Overall, our results show that the RFAT of the neck of the pancreas achieved an efficient sealing of the stump of the pancreas and led to the complete exocrine atrophy of the distal remnant pancreas without leading to necrotizing pancreatitis. This technique could be considered as an alternative in difficult circumstances where anastomosis of the distal pancreatic stump is believed to be unwise.

Keywords: radiofrequency ablation, necrotizing pancreatitis, apoptosis, atrophy, main pancreatic duct, duct ligation.

INDICE

Capítulo 1 Fisiopatología y terapéutica del páncreas	1
1.1 Anatomía e histología del páncreas humano.....	3
1.2 Problema clínico: el cáncer de páncreas y su epidemiología	8
1.2.1 Epidemiología	8
1.3 Adenocarcinoma ductal	12
1.3.1 Descripción macroscópica e histológica	13
1.4 Tratamiento del cáncer de páncreas: Características y complicaciones	16
1.4.1 Duodenopancreatectomía	19
1.4.2 Pancreatectomía total.....	22
1.4.3 Ligadura del conducto de Wirsung y oclusión con pegamento	23
1.5 Problemas de tratamiento.....	26
1.5.1 Fístula pancreática	26
1.5.2 Pancreatitis	28
Capítulo 2 Nuevas tecnologías en el tratamiento quirúrgico del cáncer de páncreas	39
2.1 Dispositivos empleados en la cirugía pancreática	42
2.1.1 Electrobisturí de plasma	42
2.1.2 Harmonic scalpel	42
2.1.3 Cavitational Ultrasonic Surgical Aspirator (CUSA)	43
2.1.4 Ligasure	44
2.1.5 Endograpadoras (EndoGia).....	45
2.1.6 Tissuelink EndoSH 2.0	46
2.2 Uso de las corrientes de RF para el control hemostático y el sellado del tejido.....	48
2.2.1 Interacción de la RF con el tejido	49

2.2.2	Efecto térmico de la RF	50
2.3	Electrodo internamente refrigerado (Coolinside)	54
2.3.1.	Estudio y desarrollo del dispositivo	54
2.3.2.	Características y funcionamiento del dispositivo	58
2.4	Experiencias de la ablación por RF en el páncreas	61
Capítulo 3	Objetivos e hipótesis.....	65
3.1	Objetivo	67
3.2	Hipótesis.....	68
Capítulo 4	Material y métodos	69
4.1	Fase 1: Estudio sobre modelo murino.....	72
4.1.1	Modelo animal	72
4.1.2	Grupos experimentales.....	72
4.1.3	Cuidado preoperatorio	73
4.1.4	Técnica quirúrgica	74
4.1.5	Postoperatorio y necropsia	76
4.1.6	Estudio histopatológico	77
4.1.7	Variables de estudio	78
4.1.8	Análisis morfométrico.....	79
4.1.9	Análisis estadístico	80
4.2	Fase 2: Estudio sobre modelo porcino.....	82
4.2.1	Modelo animal	82
4.2.2	Grupos Experimentales	82
4.2.3	Cuidado preoperatorio	83
4.2.4	Técnica quirúrgica	84
4.2.5	Postoperatorio y necropsia	85

4.2.6	Estudio histopatológico	86
4.2.7	VARIABLES DE ESTUDIO.....	88
4.2.8	Análisis cuantitativo.....	88
4.2.9	Análisis estadístico.....	92
Capítulo 5	Resultados	93
5.1	Fase 1: Estudio sobre modelo murino.....	95
5.1.1	Estudios de supervivencia.....	95
5.1.2	Determinación bioquímica	96
5.1.3	Análisis histopatológico	97
5.1.4	Análisis inmunohistoquímico	101
5.1.5	Análisis morfométrico y cuantitativo	102
5.1.6	Análisis técnico del dispositivo	105
5.2	Fase 2: Estudio sobre modelo porcino	107
5.2.1	Estudios de supervivencia.....	107
5.2.2	Determinación bioquímica.....	109
5.2.3	Análisis histopatológico	114
5.2.4	Análisis inmunohistoquímico	120
5.2.5	Análisis morfométrico y cuantitativo	123
Capítulo 6	Discusión	131
Capítulo 7	Conclusiones	147
Capítulo 8	Bibliografía	151
Capítulo 9	Anexos.....	175
	Anexo 1: Información suplementaria.....	177
	Anexo 1-A: Macro para el Análisis morfométrico y cuantitativo en Fase 2.....	177

Anexo 1-B: Gráficas del comportamiento eléctrico del Coolinside durante la pancreatotomía en modelo murino	182
Anexo 1-C: Estadística sobre las diferencias entre D1 y D2 en el análisis morfométrico en modelo porcino	187
Anexo 2: Comunicaciones científicas relacionadas y publicaciones	188
Publicaciones relacionadas con la tesis	188
Publicaciones no relacionadas con la tesis	188
Anexo 3: Estudio posterior de nuestro estudio relacionados con la tesis	197

INDICE: Figuras y tablas

Figuras:

Figura 1 Esquema representativo de la anatomía del páncreas	3
Figura 2 Esquema representativo del páncreas macroscópico.....	5
Figura 3 Reconstrucción óptica de una inmunohistoquímica de un islote de Langerhans humana	6
Figura 4 Representación gráfica del número estimado de nuevos casos y muertes para los distintos tipos de neoplasia intestinal.....	9
Figura 5 Aspecto macroscópico de un adonocarcinoma	14
Figura 6 Ilustración de la evolución de las lesiones pre-neoplásicas intraepiteliales y las algunas de alteraciones genéticas más conocidas.....	15
Figura 7 Representación esquemática sobre la localización tumoral (punto rojo).....	16
Figura 8 Aspecto final del procedimiento Whipple con conservación del píloro tras la reconstrucción.....	20
Figura 9 Aspecto final de la extirpación total del páncreas o pancreatectomía total	22
Figura 10 Diferentes mecanismos por los cuales un cálculo biliar puede inducir pancreatitis .	31
Figura 11 Aspecto macroscópico e histológico de pancreatitis.....	35
Figura 12 Representación general de Harmonic Scalpel® (Ethicon)	43
Figura 13 Fotografía de la torre de aspiración y generador de CUSA y del dispositivo fungible de CUSA (Covidien).....	43
Figura 14 Generador de RF específico para conectar el Ligasure y los diferentes modelos de dispositivo.	44

Figura 15 EndoGia Universal con diferentes cargas.	46
Figura 16 Dispositivo Tissuelink EndoSH 2.0 de Medtronic.	47
Figura 17 Espectro electromagnético.....	48
Figura 18 Modelo teórico de elementos finitos (MEF) y resultados..	55
Figura 19 Representación del Coolinside; dispositivo asistido por RF	58
Figura 20 Conjunto de accesorios del dispositivo Coolinside en experimentación	59
Figura 21 Representación de la correcta manipulación del Coolinside para conseguir una resección sin hemorragia	60
Figura 22 Esquema anatómico del páncreas de rata.	73
Figura 23 Aspecto del páncreas durante y posterior a la transección	76
Figura 24 Esquema anatómico del páncreas del cerdo.....	85
Figura 25 Esquema representativo de la metodología aplicada en la cuantificación.	91
Figura 26 Curva de crecimiento en modelo murino durante el PO	96
Figura 27 Niveles de amilasa sérica preoperatoria y postoperatoria según el grupo experimental.....	97
Figura 28 Área de transección en modelo murino.....	99
Figura 29 Tinción de HE e inmunohistoquímica para K3, Ck7 e I.....	101
Figura 30 Contaje de células positivas para caspasa-3 activa en el páncreas proximal y distal.	102
Figura 31 Análisis cuantitativo de expresión de citoqueratina-7 (Ck7) en el páncreas proximal y distal.	103
Figura 32 Contaje celular de micro islotes y macro islotes (>1000µm ²).....	104
Figura 33 Representación gráfica del comportamiento eléctrico del dispositivo Coolinside durante la transección pancreática en un caso	106

Figura 34 Fotografías de macroscópicas y microscópicas de animal que falleció al 3er día de PO por una iatrogenia del colédoco y que fue excluido del estudio	109
Figura 35 Concentración de amilasa (U/L) en líquido peritoneal (LP) en el preoperatorio, al 3er día y en la pre-necropsia ; 1 y 6 meses.	112
Figura 36 Aspecto del margen de transección durante la intervención y al mes de PO.....	115
Figura 37 Reconstrucción fotográfica del margen de coagulación de uno de los animales del estudio al mes de PO.	115
Figura 38 Aspecto microscópico del conducto de Wirsung en caso de sellada completo y parcial	119
Figura 39 Aspecto macroscópico y microscópico del animal que presenta un pseudoquiste.....	120
Figura 40 Tinción de HE y Tricrómica de Masson e inmunohistoquímica de K3, Ck7 y I del páncreas proximal, del páncreas distal al mes de PO y a los 6 meses de PO.....	122
Figura 41 Área de expresión de citoqueratina-7 (Ck7) en mm ² por sección pancreática (proximal y distal) y grupo experimental.	125
Figura 42 Área expresión de insulina (I) en mm ² por sección pancreática; proximal y distal; al mes y a los 6 meses de PO; así como para los controles.	126
Figura 43 Figura representativa del tamaño medio de islote por sección pancreática y grupo experimental.....	128
Figura 44 Esquema representativo de la distribución de expresión de los diferentes tejidos por sección de páncreas proximal y distal para los diferentes grupos experimentales.....	130
Figura 45 Figura representativa del efecto térmico de la RF hacia el sellado de los ductos pancreáticos.....	143

Tablas:

Tabla 1 Clasificación de los tumores primarios epiteliales del páncreas propuesta por la OMS	10
Tabla 2 Clasificación TNM de los estadios del cáncer de páncreas	17
Tabla 3 Estadio de desarrollo tumoral en función de T, N y M	18
Tabla 4 Clasificación de fístula pancreática según la ISGPF	27
Tabla 5 Cambios macroscópicos y microscópico tras el aumento de temperatura.....	51
Tabla 6 Área media (A) y diámetro medio de islote (D) en las diferentes secciones pancreáticas	104
Tabla 7 Concentración de amilasa (U/L) y glucosa sérica (mg/dl) durante el pre y postoperatorio de los 12 cerdos.....	110
Tabla 8 Representación gráfica del comportamiento eléctrico del dispositivo Coolinside durante la transección pancreática en 25 casos	182
Tabla 9 Área de expresión de Ck7 para D1 y D2 (mm ²).....	187
Tabla 10 Área de expresión de I para D1 y D2 (mm ²).....	187
Tabla 11 Tamaño medio de los islotes para D1 y D2 (µm ²).	187
Tabla 12 Área total de la sección pancreática para D1 y D2 (cm ²).....	187

Abreviaturas

AEMPS: Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios

AJCC: American Joint Committee on Cancer

ASA: American Society Association

Asp175: Caspasa-3 activa

BSA: Albúmina de suero bovino

C27C9: Insulina

CEEA: Comité del Ético de Experimentación Animal

Ck7: Citoqueratina-7

CO_2 : Dióxido de carbono

CTRC: Quimotripsina C

DAB: Diaminobenzidina

DM: Diabetes mellitus tipo 1 y 2 (DM1 o DM2)

DMAH: Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya

ECG: Electrocardiograma

ETCO₂: Cantidad de dióxido de carbono liberado al final de la espiración

FE: Factor de error

HE: Hematoxilina eosina

IEP: Insuficiencia Exocrina del Páncreas

IHC: inmunohistoquímica

ISGPF: Grupo Internacional de Estudio de la Fístula Pancreática (Siglas en inglés)

K3: Caspasa 3

LP: Líquido peritoneal

LPD: Duodenopancreatectomía laparoscópica

MEF: Modelo de Elementos Finitos

OMS: Organización Mundial de la Salud

PA: Pancreatitis Aguda

PanIN: Lesiones Pre-neoplásicas Intraepiteliales

PC: Pancreatitis Crónica

PD: Duodenopancreatectomía o procedimiento de Whipple

PDX: Medio de montaje

PG: Pancreatogastrostomía

PO: Postoperatorio

POPF: Fístula pancreática postoperatoria

PRSS1: Gen proteasa, serina, 1 (tripsina 1)

RCK105: Anticuerpo monoclonal anti-citoqueratina

RF: Radiofrecuencia

RFA: Ablación por radiofrecuencia

RGB: Red-green-blue

ROI: Region de interés

SD: Sprague-Dawley

SEOM; Sociedad Española de Oncología Médica

SPINK1: Gen serina proteasa inhibidor Kazal-tipo 1

SpO₂: Saturación de oxígeno

TAC: Tomografía axial computerizada

TBS: Tris-buffered saline

TIGAR-O: Acrónimo de las causas principales de pancreatitis: Tóxico-metabólico, Idiopático, Genéticos, Autoinmune, Recurrencia y pancreatitis severa aguda o Obstructiva

TNM: Clasificación de propuesta por la AJCC de los estadios del cáncer de páncreas en función del desarrollo del tumor primario (T), la presencia de ganglios linfáticos regionales (N) y metástasis (M)

UAB: Universidad Autónoma de Barcelona

US: Ultrasonidos

Capítulo 1 | Fisiopatología y terapéutica del páncreas

1 | Fisiopatología y terapéutica del páncreas

1.1 Anatomía e histología del páncreas humano

El páncreas humano es una glándula compuesta, con una morfología aplanada y alargada de entre 12-20 cm de longitud que puede alcanzar un peso de 100 a 110 g en un adulto. Está compuesto por 4 regiones principales: cabeza, cuello, cuerpo y cola. La cabeza está localizada en el marco duodenal en el peritoneo de la pared abdominal posterior a la izquierda de la vena mesentérica superior y tiene una estructura lobular. El cuello es la porción más estrecha del páncreas que se extiende desde la cabeza hacia la izquierda y se une con el cuerpo, el cual conjuntamente con la cola tienen una dirección oblicua en el abdomen posterior que puede alcanzar la superficie gástrica del bazo (ver figura 1).

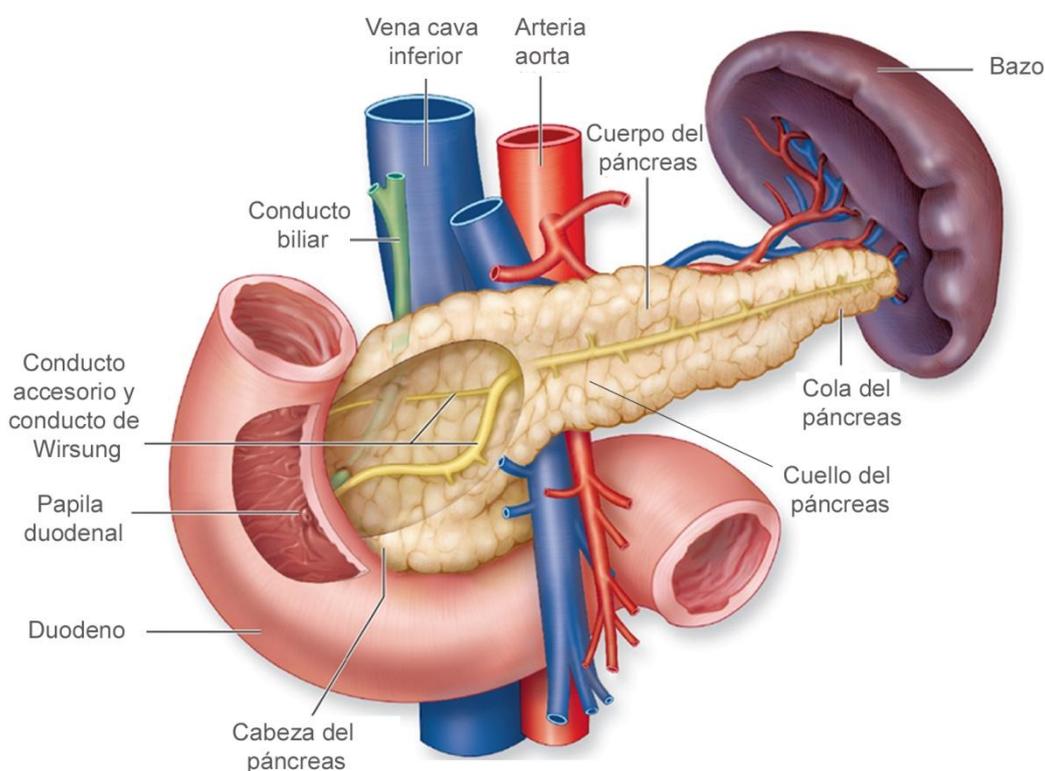


Figura 1 | Esquema representativo de la anatomía del páncreas. Se observa el conducto pancreático y su relación con bazo y duodeno. Modificada de masmusculo.com, accedido en junio 2014.

El páncreas tiene una abundante circulación derivada de ramas de las arterias celíaca y mesentérica superior. Por detrás del cuello, se encuentra la confluencia de la vena porta con las venas mesentérica superior y esplénica. El cuello se extiende hasta la rama pancreaticoduodenal anterosuperior de la arteria gastroduodenal y el cuerpo pasa por delante de la aorta, la arteria mesentérica superior, el pilar izquierdo del diafragma, la glándula suprarrenal izquierda y la vena esplénica.

En el contexto de este estudio, la unidad formada por el extremo distal del conducto biliar, el duodeno y la cabeza del páncreas son de especial interés. El conducto biliar (colédoco) se localiza a la derecha de la arteria gastroduodenal, en la pared posterior del duodeno y que atraviesa la cabeza del páncreas y habitualmente se une con el conducto pancreático principal hasta alcanzar la papila duodenal. El conducto pancreático principal o Wirsung surge de ramificaciones de los lobulillos de la glándula en la cola del páncreas que se anastomosan hasta formar el conducto principal, con un rango que puede alcanzar de 0,8 a 4,8 mm de diámetro en la zona menos distal (ver figura 1). El Wirsung atraviesa la cola y el cuello localizado en el centro aproximadamente, hasta la confluencia con el colédoco, a nivel de cabeza, conocida como ampolla del conducto biliar. Su anatomía está caracterizada por la ausencia de tabique entre conductos, aunque en algún caso los conductos pueden desembocar separadamente en la papila o tener un tabique interpuesto. La bilis y secreciones pancreáticas desembocan en la ampolla de Vater en el duodeno [1].

También podemos diferenciar con frecuencia el conducto pancreático accesorio de Santorini, que comunica con el conducto principal. Éste se sitúa por delante del colédoco y desemboca en una papila menor con localización proximal a la ampolla de Vater.

Histológicamente el páncreas es una glándula compuesta formada por un 80% de tejido exocrino y un 2% de tejido endocrino (ver figura 2-A). Está formado por unos lobulillos que se conectan entre sí mediante unos tabiques de tejido conectivo que contienen los vasos sanguíneos, linfáticos, nervios y conductos exocrinos (18%) y no tiene cápsula fibrosa.

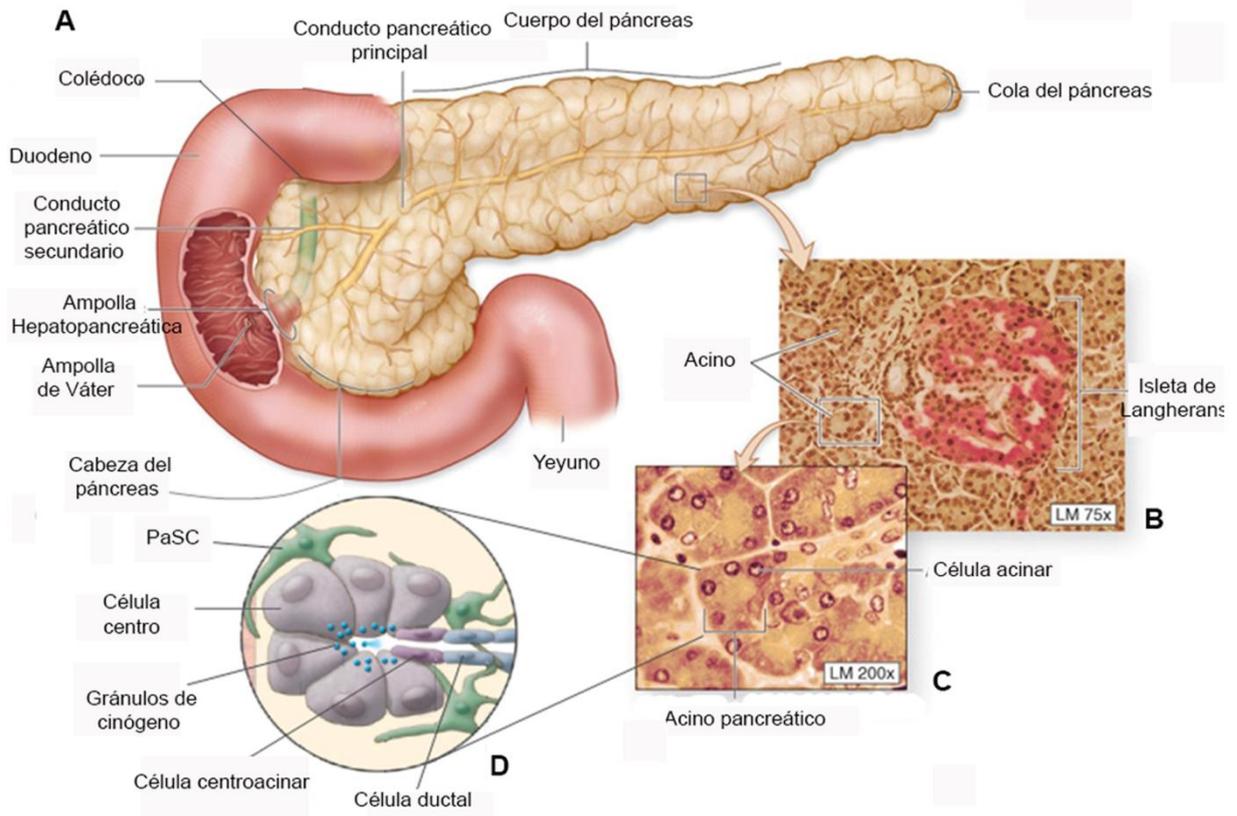


Figura 2 | Esquema representativo del páncreas macroscópico. (A) Organización estructural del páncreas donde se observa en detalle (B y C) el componente exocrino y endocrino del páncreas y (D) la estructura de los acinos. Modificada de Mescher *et al.* [2] y Omary, *et al.* [3].

La parte endocrina está formada por islotes de Langerhans, que entre otras funciones, secretan péptidos al corriente sanguíneo para regular el metabolismo de los carbohidratos. Cada islote tiene un diámetro de 0,2 mm y está separado del tejido exocrino circundante por fibras de tejido conectivo. Los islotes están rodeados e irrigados por un retículo capilar que aporta sangre a los

acinos (células exocrinas). Este sistema permite el efecto local de las hormonas en los acinos, en especial, el efecto de la insulina en el páncreas exocrino.

En cada islote de Langerhans se pueden diferenciar 4 tipos de células, cada una de las cuales produce una secreción hormonal específica: las células β (50%-80%) son productoras de insulina, las células α (5-20%) son productoras de glucagón, las células PP (10-35%) sintetizan un polipéptido pancreático, y las células D (5%) son productoras de somatostatina (ver figura 3). La distribución, así como la población de células α , β y D son diferentes entre especies. Un estudio publicado por Brissova *et al.* [4] muestra como en humanos, las células β se encuentran en el interior de los islotes y el resto de células las rodean periféricamente (figura 3).

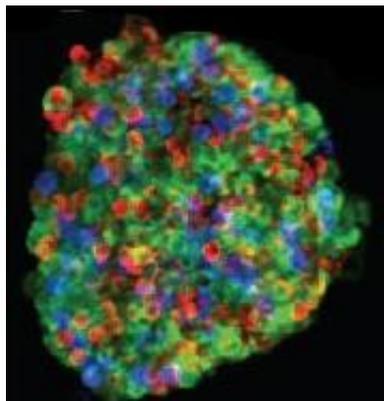


Figura 3 | Reconstrucción óptica de una inmunohistoquímica de un islote de Langerhans humana. Tinción verde= Células β , rojo=Células α , azul=Células D [4].

El componente exocrino está compuesto por agrupaciones de células acinares, conocidas como acinos, las cuales producen enzimas que ayudan en la digestión. Las células acinares que conforman el acino son células epiteliales altas, piramidales o cilíndricas que se apoyan en la lámina basal y convergen en una luz central (ver figura 2 B-C).

En estado inactivo, las células contienen numerosos gránulos de zimógeno que llenan la porción apical. Tras la ingesta de comida, las enzimas pancreáticas son secretadas a la luz

acinar, que está compuesta de unas microvellosidades que se unen entre células adyacentes e impiden el retorno de las secreciones desde el conducto hacia el espacio intercelular. Además, en el tejido exocrino también podemos encontrar células acinares y células estrelladas pancreáticas presentes en el espacio periacinar muy relacionadas con desórdenes del páncreas exocrino [3] (figura 2-D).

Las secreciones enzimáticas producidas son conducidas al conducto pancreático hasta desembocar en la papila de Vater donde se activan y ayudan en la digestión de alimentos.

En función del alimento ingerido, los humanos secretan hasta 3 litros de jugos pancreáticos diariamente. Estas secreciones contienen enzimas hidrolíticas, como la tripsina, quimiotripsina y colipasa, las cuales han de ser activadas en el lumen intestinal para la digestión de carbohidratos complejos, proteínas y lípidos. Sin embargo, existen otras enzimas que se segregan ya activas; como sucede con la α -amilasa (amilasa) y la lipasa. Entre otros elementos, podemos encontrar componentes inorgánicos como el agua, potasio, cloro o bicarbonato. El alto contenido de bicarbonato presente proporciona alcalinidad a la secreción, lo que evita la desnaturalización de las enzimas y estimula la actividad hidrolítica de las enzimas pancreáticas en el lumen intestinal.

1.2 Problema clínico: el cáncer de páncreas y su epidemiología

El cáncer de páncreas o neoplasia de páncreas se origina cuando un conjunto de células del cuerpo humano crecen sin control. Si las células tumorales se agrupan formando una masa única sin capacidad para invadir órganos vecinos o más alejados, nos encontramos frente a un tumor benigno. Por el contrario, un tumor es maligno (cáncer) cuando tiene la capacidad de invadir otros tejidos liberando parte de las células tumorales al torrente sanguíneo o linfático dando lugar a la formación de lesiones a distancia (metástasis).

1.2.1 Epidemiología

El cáncer de páncreas es la segunda neoplasia intestinal más frecuente y la cuarta causa de muerte por cáncer en todo el mundo, equivalente a entre el 6-7% de las muertes por cáncer. Actualmente el cáncer de páncreas representa el 3% de las neoplasias que afectan a hombres y a mujeres [5] (ver Figura 4).

Esta tasa tan elevada de mortalidad es producto de una enfermedad de diagnóstico tardío que da lugar a una baja tasa de supervivencia, en la cual menos del 20% de afectados llegan vivos al primer año y menos del 5% sobrevive a los 5 años del diagnóstico [6, 7]. Por lo tanto, aunque tiene una incidencia relativamente baja (78.000 nuevos casos anuales en Europa y 44.000 en Estados Unidos) es uno de los cánceres con mayor tasa de mortalidad (37.000 muertes en Estados Unidos) después del de colon, tanto en hombres como en mujeres. Ya en el 2001 [8], se estimaba que mundialmente el número de muertes por cáncer de páncreas era de alrededor de 213.000 personas, y estos números aumentan con la edad poblacional. Concretamente a

nivel nacional, cada año mueren alrededor de 2.400 varones y 2.000 mujeres por esta enfermedad.

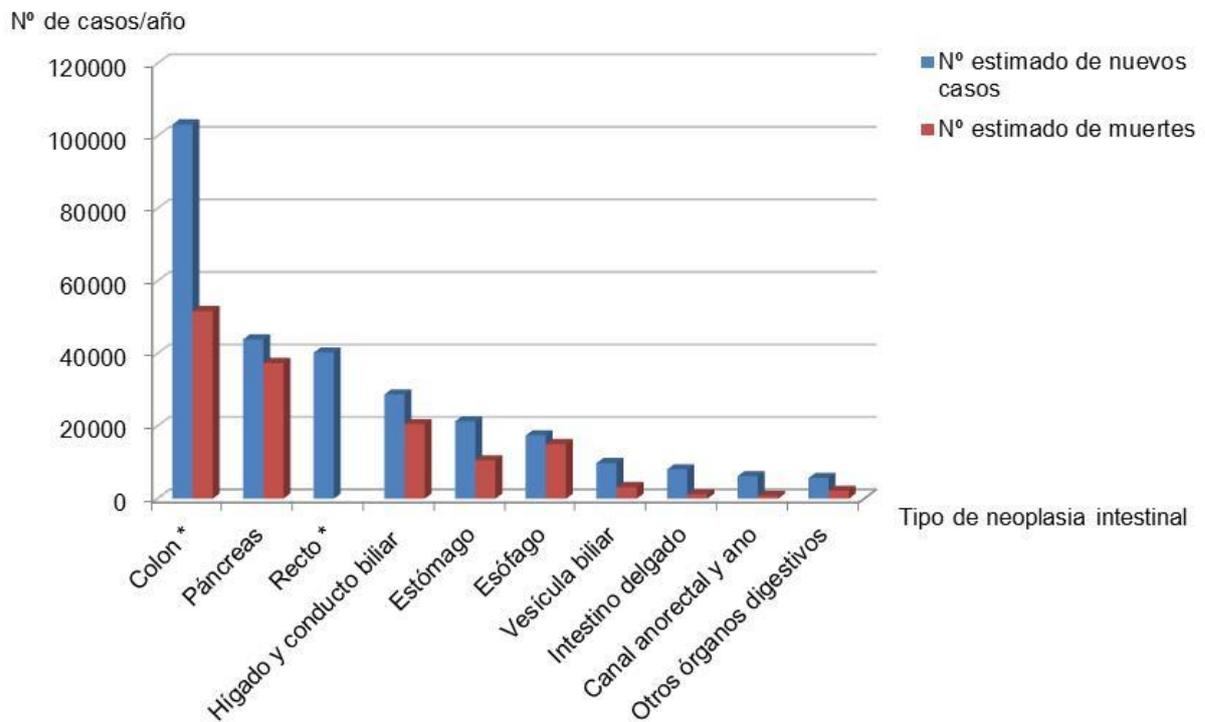


Figura 4 | Representación gráfica del número estimado de nuevos casos y muertes para los distintos tipos de neoplasia intestinal. Datos del 2012 en Estados Unidos [5].

Patológicamente, más del 95% de las neoplasias malignas se originan en los elementos exocrinos, denominándose adenocarcinomas y sólo el 1-2% corresponde a tumores endocrinos.

Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto una nueva clasificación de los tumores primarios epiteliales pancreáticos, que se resumen en la tabla 1 [9], La tabla no detalla las lesiones premalignas, así como tampoco otro tipo de tumores pancreáticos primarios no epiteliales.

Tabla 1 | Clasificación de los tumores primarios epiteliales del páncreas propuesta por la OMS [9].

Benignos	Cistoadenoma seroso
	Cistoadenoma acinar
Limítrofes	Neoplasia quística mucinosa con displasia moderada
	Neoplasia intraductal papilar mucinosa con displasia moderada
	Neoplasia sólida pseudopapilar
Malignos	Adenocarcinoma ductal
	Carcinoma de células acinares
	Cistoadenocarcinoma de células acinares
	Neoplasia intraductal papilar mucinosa asociada a un carcinoma invasivo
	Carcinoma mixto (ductal-neuroendocrino o acinar-neuroendocrino).
	Neoplasia quística mucinosa asociada a un carcinoma invasivo
	Pancreatoblastoma
	Cistadenocarcinoma seroso
	Neoplasia pseudopapilar-sólida
Neuroendocrino	Microadenoma neuroendocrino pancreático
	Tumor neuroendocrino
	Carcinoma neuroendocrino
	Carcinoide
	Gastrinoma
	Glucagonoma
	Insulinoma
	Somatostatina
	VIPoma

De entre los tumores malignos, el 90% de todos los casos presenta una histología compatible con un carcinoma de las células ductales o adenocarcinoma ductal. El presente estudio se centrará sobre este tipo de tumor al ser el de mayor incidencia.

1.3 Adenocarcinoma ductal

El adenocarcinoma ductal infiltrante es una neoplasia invasiva epitelial maligna con diferenciación glandular y sin componente predominante de otro tipo de carcinoma. La mayoría de los casos son diagnosticados en pacientes de entre 60 y 80 años de edad [10], aunque se han dado casos en pacientes por debajo de los 40 años de edad [11]. Se conoce que hay ciertos factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, como son el hecho de ser fumador, tener antecedentes familiares de cáncer de páncreas, diabetes o la obesidad [12, 13].

La sintomatología más frecuente incluye dolor epigástrico que irradia hacia la espalda, pérdida de peso, ictericia, náuseas y en un 10% episodios de diarrea, espasmos, trombosis o pancreatitis aguda [14]. En algunos casos la aparición de diabetes en pacientes de edad avanzada también se ha asociado al diagnóstico de adenocarcinoma ductal [15].

La alta tasa de mortalidad asociada al cáncer de páncreas es principalmente debido a la fase avanzada en que se diagnostica la neoplasia y porque no hay herramientas sensibles y específicas para detectar la enfermedad en una etapa anterior. Más del 80% de los pacientes con cáncer pancreático tienen enfermedad metastásica localmente avanzada o a distancia en el momento del diagnóstico, lo que comporta que estos pacientes dejen de ser operables. Incluso si el cáncer de páncreas se diagnostica temprano y se puede llevar a cabo la resección quirúrgica con intención curativa, casi todos los pacientes desarrollan recurrencia local y/o metástasis a distancia después de la cirugía [16]. Por desgracia, las modalidades terapéuticas convencionales como quimio-radiación han tenido un impacto mínimo y la supervivencia a largo plazo de los pacientes con cáncer pancreático no ha mejorado en las últimas cinco décadas [17].

En muchos casos, la tasa de supervivencia de otras neoplasias intraepiteliales; como el cáncer colorectal, pulmón, pecho, cérvix, etc.; ha aumentado gracias a la identificación temprana de lesiones incluso en un estado pre-invasivo [18]. Es por ello, que recientemente los patólogos han centrado sus esfuerzos en el análisis de las lesiones pre-neoplásicas intraepiteliales.

A pesar de que no existe un análogo a la prueba de Papanicolau en el cáncer de páncreas, si existen otros análogos a cánceres epiteliales, en los que se ha evidenciado una progresión histológica bien definida entre precursores tumorales, resultando en una neoplasia invasiva. Estudios recientes han demostrado que estas lesiones pre-neoplásicas presentan alteraciones genéticas que se observan también en neoplasias invasivas, lo que sugieren ser sus precursores.

1.3.1 Descripción macroscópica e histológica

Macroscópicamente, la mayoría de adenocarcinomas ductales forman masas poco definidas de tejido fibrótico que adquieren un color blanco amarillento con el tejido circundante oscuro (figura 5-A). En algunos casos se puede dar necrosis y degeneración quística (figura 5-B) produciendo ruptura ductal con formación de pseudoquiste [19].

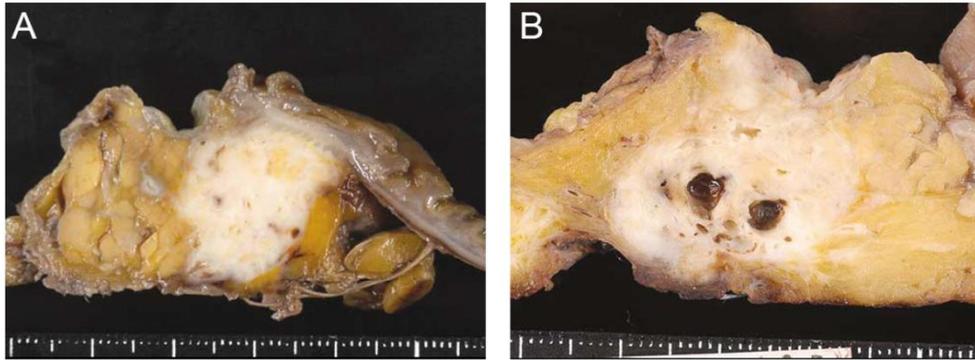


Figura 5 | Aspecto macroscópico de un adonocarcinoma. Sección transversal de un (A) adenocarcinoma ductal infiltrante y un (B) adenocarcinoma con degeneración quística [19].

Microscópicamente, tal y como se define previamente, el adenocarcinoma ductal infiltrante es una neoplasia invasiva epitelial maligna con diferenciación glandular y sin componente predominante de otro tipo de carcinoma.

Recientemente, se ha establecido una nomenclatura internacional para las lesiones pre-neoplásicas intraepiteliales (PanIN) en función del grado de diferenciación y estructura nuclear. Las PanIN se caracterizan por ser lesiones microscópicas de menos de 5 mm localizadas en los ductos pancreáticos. Estas lesiones pueden ser papilares o planas, compuestas por células cuboidales con diferente producción de mucina. Se diferencian 4 tipos de lesiones, incluyendo PanIN-1A y PanIN-1B (de bajo grado), PanIN-2 (grado intermedio), PanIN-3 (de alto grado), reflejando una progresión en el grado histológico hasta resultar en un adenocarcinoma ductal infiltrante.

Actualmente, se conoce que las lesiones neoplásicas intraepiteliales están asociadas a unos cambios genéticos determinados. La figura 6 resume algunas de estas alteraciones.

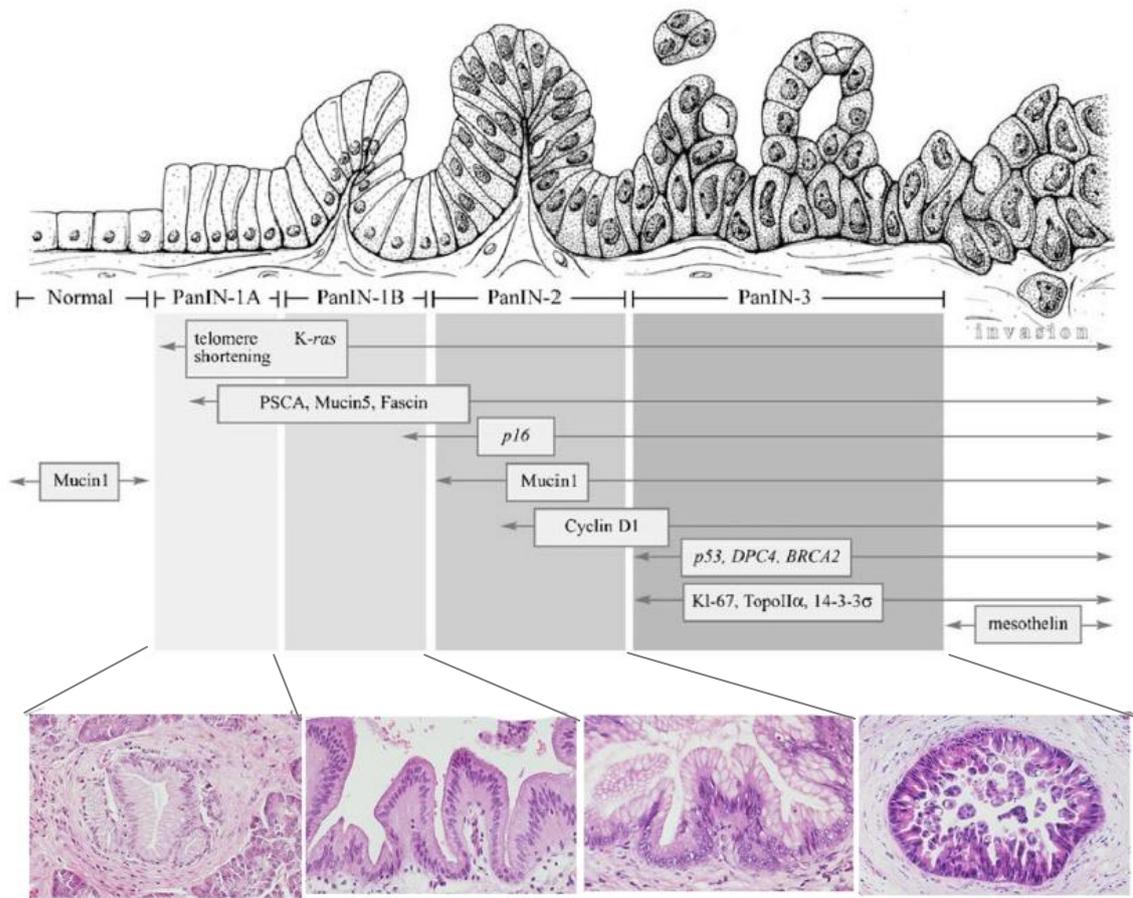


Figura 6 | Ilustración de la evolución de las lesiones pre-neoplásicas intraepiteliales y las algunas de alteraciones genéticas más conocidas. Adaptada de Maitra *et al.* [20]

1.4 Tratamiento del cáncer de páncreas: Características y complicaciones

El tratamiento quirúrgico del cáncer de páncreas se divide en dos tipos de procedimientos técnicamente distintos:

- Aquellos realizados para reseccionar, o dicho de otro modo, extirpar los tumores localizados en la cabeza del páncreas. El tratamiento básico es la duodenopancreatectomía; un procedimiento complejo asociado a altas tasas de morbi-mortalidad, y por ello son el objetivo principal de este estudio (figura 7-A).
- Aquellos realizados para extirpar tumores situados en la porción del cuerpo y cola del páncreas, asociados a tasas de morbi-mortalidad mucho menores y fuera del objeto de este estudio (figura 7-B). Básicamente se trata de pancreatectomías corporocaudales.

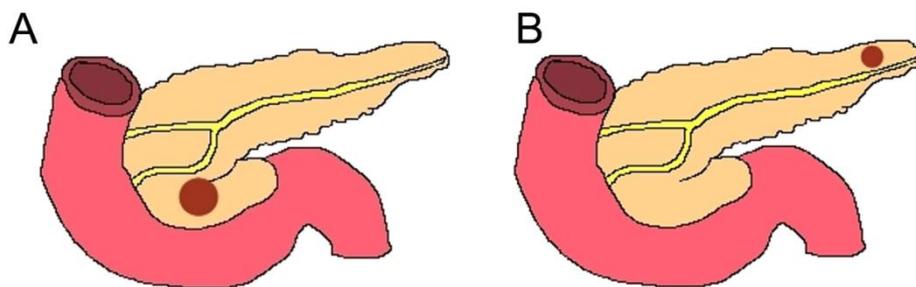


Figura 7 | Representación esquemática sobre la localización tumoral (punto rojo). (A) Tumor en la cabeza del páncreas. (B) Tumor en la cola.

Actualmente la pancreatectomía o resección quirúrgica del páncreas es el único tratamiento potencialmente curativo para tumores localizados en la cabeza del páncreas. Sin embargo, cuando nos encontramos frente al diagnóstico de un cáncer de páncreas es importante definir la resecabilidad del mismo, es decir, la posibilidad de ser extirpado con éxito.

El American Joint Committee on Cancer (AJCC) designó los estadios del cáncer de páncreas mediante la clasificación TNM; T (tumor), N (ganglios), y M (metástasis); con objeto de definir su resecabilidad (ver Tabla 2 y 3) [21].

Tabla 2 | Clasificación TNM de los estadios del cáncer de páncreas. Se distingue según el desarrollo del tumor primario (T), la presencia de ganglios linfáticos regionales (N) y metástasis (M) [21].

Codificación	Características
Tumor primario (T)	
TX	No se puede evaluar el tumor primario.
T0	No hay prueba de un tumor primario.
Tis	Carcinoma in situ. ^b
T1	El tumor se limita al páncreas, ≤ 2 cm en su dimensión mayor.
T2	El tumor se limita al páncreas, > 2 cm en su dimensión mayor.
T3	El tumor se extiende más allá del páncreas, pero no hay compromiso del tronco celíaco o la arteria mesentérica superior.
T4	El tumor compromete el tronco celíaco o la arteria mesentérica (tumor primario irresecable).
Ganglios linfáticos regionales (N)	
NX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.
N0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
N1	Metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
Metástasis a distancia (M)	
M0	No hay metástasis a distancia.
M1	Metástasis a distancia.

Tabla 3 | Estadio de desarrollo tumoral en función de T, N y M [21].

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
III	T4	Cualquier N	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

En función de las características del tumor podemos definir tres situaciones que condicionarán el tratamiento a aplicar:

- Tumores resecables: Son aquellos tumores con crecimiento local, en los que la resección permite la extirpación completa del tumor.
- Tumores localmente avanzados: Aquellos que son diagnosticados cuando están afectando vasos próximos, arterias o venas importantes y en los que la cirugía no permite la eliminación total de la enfermedad por la persistencia de ganglios.
- Tumores metastásicos: En este caso, la presencia de metástasis en otros órganos como hígado, peritoneo, epiplón o cualquier otra cavidad extraabdominal implica que la cirugía esté totalmente contraindicada.

En el caso en que el diagnóstico sea de tumores localmente avanzados o metastásicos, existen tratamientos paliativos al dolor, la obstrucción duodenal o la ictericia como son la colocación de prótesis, algún tipo de cirugía y la radio/quimioterapia. Este último tratamiento puede ayudar en

el 40% de los tumores no resecables, como tratamiento neoadyuvante a posteriores pancreatectomías y puede aumentar la supervivencia de los pacientes.

Sin embargo, la enfermedad se manifiesta de forma tardía y es por ello que sólo entre un 5 y un 25% de los tumores, según la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), son susceptibles del tratamiento quirúrgico con una media de supervivencia de entre 11 y 20 meses. Algunos estudios realizados en centros de alto con alto volumen han reportado tasas de supervivencia a 5 años de hasta un 15-20% en pacientes que se han sometido a resección [22].

En el caso en que sea posible la resecabilidad del tumor, existen tres técnicas quirúrgicas posibles: la duodenopancreatectomía, la pancreatectomía total y la obstrucción del conducto pancreático.

1.4.1 Duodenopancreatectomía

El adenocarcinoma ductal es el cáncer pancreático exocrino más común, tal y como hemos comentado anteriormente y entre el 80 y el 90% de los tumores están localizados en la cabeza de la glándula, tal y como publican algunas series de resección quirúrgica [6]. Por ello, aunque en función de la localización del tumor pancreático el cirujano puede decidirse por uno u otro procedimiento, la operación estándar es la duodenopancreatectomía o “procedimiento de Whipple” (PD). La figura 8 muestra el aspecto final de una duodenopancreatectomía tras la reconstrucción.

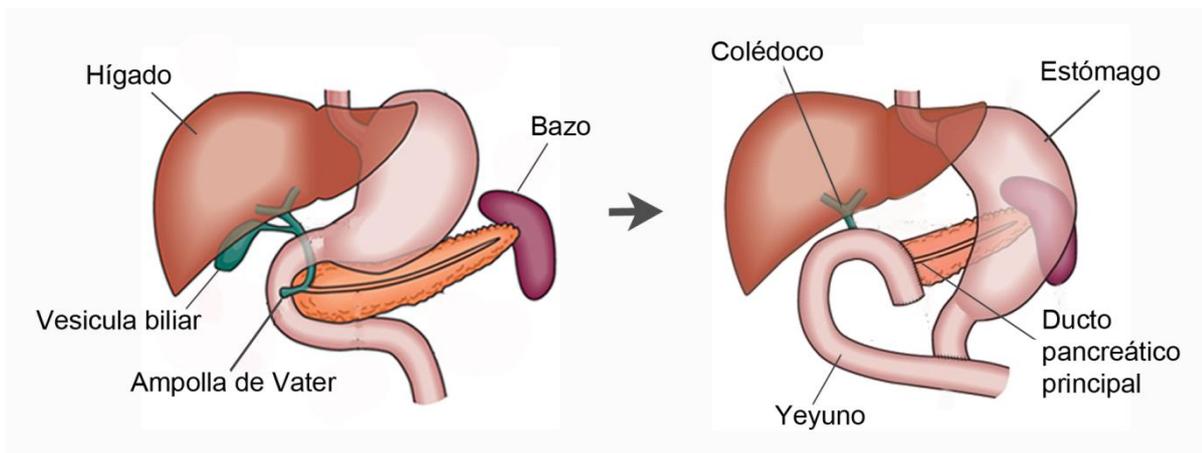


Figura 8 | Aspecto final del procedimiento Whipple con conservación del píloro tras la reconstrucción.

Esta intervención se caracteriza por la resección de la cabeza del páncreas, la vesícula biliar, parte del duodeno y del yeyuno proximal así como de una pequeña parte del estómago. Existen estudios randomizados [23-25] que comparan la resección Whipple estándar con otro tipo de procedimiento llamado “Whipple con conservación del píloro” en el cual no se extirpa la parte inferior del estómago (píloro) pero no existe consenso sobre que técnica da mejores resultados. Además, algunos grupos japoneses sugieren que la extirpación de los ganglios linfáticos cercanos del páncreas no aumenta la morbilidad en el postoperatorio (PO) y puede disminuir la posibilidad de recurrencia [26].

Tras la extirpación se realiza la anastomosis del páncreas con el duodeno (pancreatoyeyunal) mediante técnicas *end-to-end* (unión del conducto pancreático con el colédoco) o *duct-to-mucosa* (unión del conducto a la mucosa duodenal), con o sin implantación de una prótesis, con objeto de que las enzimas pancreáticas digestivas, la bilis y el contenido del estómago fluyan hacia el intestino delgado durante la digestión (ver figura 8). Schlitt *et al.* [27] en un estudio randomizado entre anastomosis, sugieren que la tasa de mortalidad es menor al aplicar *duct-to-mucosa*. La anastomosis gástrica; en lugar de la duodenal; caracteriza la *pancreatogastrostomía* (PG) la cual es una variante de la PD. Algunos estudios sugieren que la

tasa de morbi-mortalidad asociada a la PG es similar o incluso menor que la PD [28, 29], debido a que se produce una neutralización de las enzimas pancreáticas por el ácido gástrico [30]. Sin embargo, este factor que puede reducir el índice de morbilidad asociado a fístula pancreática, supone a su vez un inconveniente ya que está asociado a problemas de insuficiencia exocrina [31].

La PD es un procedimiento muy exigente y requiere de una disección muy precisa alrededor de los vasos portales y mesentéricos, así como tres anastomosis distintas. Es por eso que se ha observado correlación entre la tasa de mortalidad de hasta 3 a 5 veces mayor en los centros de bajo volumen (definidos por menos de 5 casos/año) en comparación con los centros que realizan 20 o más casos anuales con tasas de mortalidad de hasta el 5% [22, 32].

A pesar de la disminución en mortalidad, la tasa de morbilidad es aún muy elevada situada entre el 30% y el 65% [33-38]. Está asociada principalmente a la aparición de fístula pancreática por fugas, que de acuerdo con los últimos estudios publicados, varía entre el 0-25% en función de la definición utilizada [36-38]. El absceso abdominal y la hemorragia son secuelas comunes de la fuga en la anastomosis, que ha estado asociada con una tasa de mortalidad incluso mayor al 40%. Otras complicaciones asociadas son la pancreatitis en el páncreas remanente que puede producir hemorragia y sepsis. Aunque los avances en cirugía han reducido las fugas en las anastomosis bilioentérica a menos de 5% [39], las fugas en las anastomosis pancreatocólicas todavía ocurren en un alto porcentaje de los casos y es más común cuando el conducto pancreático es pequeño (menor o igual a 3 mm) y la glándula es muy blanda [40].

A pesar de que éste procedimiento tiene como objetivo principal la preservación de la función exocrina e endocrina, la frecuente estenosis de la anastomosis ductal o gástrica, así como la atrofia secundaria del páncreas remanente [41] (equivalente al 30-50% del páncreas) o la

alteración de factores neuro-hormonales, comportan problemas de malabsorción y digestivos al año de la cirugía [42].

1.4.2 Pancreatectomía total

Como alternativa a la duodenopancreatectomía se propuso la pancreatectomía total [43] con objeto de extraer más tejido maligno y evitar la anastomosis pancreatoyeyunal. Sin embargo, los resultados sugieren que el índice de morbi-mortalidad no disminuye significativamente, alcanzando de valores de hasta el 28%. Además, la extirpación total del páncreas comporta una desventaja adicional: la insuficiencia exocrina obligada con una diabetes abrupta [44, 45]. La figura 9 muestra la reconstrucción tras una pancreatectomía total.

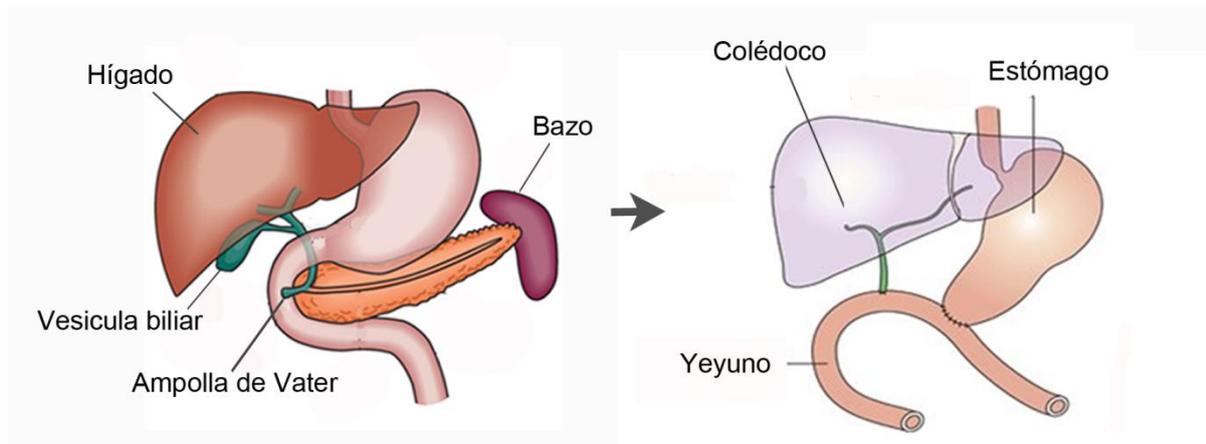


Figura 9 | Aspecto final de la extirpación total del páncreas o pancreatectomía total.

1.4.3 Ligadura del conducto de Wirsung y oclusión con pegamento

La ligadura del conducto pancreático, parcial o total, así como la oclusión con pegamento, es una técnica que se ha empleado desde hace muchos años con diferentes objetivos a lo largo de la historia.

En el contexto de la cirugía pancreática, la ligadura del conducto la propuso por primera vez en 1935, Whipple *et al.* [46] como método para controlar el remanente pancreático tras la duodenopancreatectomía. Posteriormente, Brunschwig [47] publicó una pequeña serie de 3 casos, todos ellos libres de fístula pancreática en la que se empleaba la ligadura del ducto pancreático en lugar de la anastomosis. Pero no fue hasta en 1971, que Goldsmith *et al.* [48] publicó el estudio más importante en que comparaba la eficiencia de la anastomosis y la ligadura tras realizar una PD con índices de fístula pancreática similares para ambos procedimientos.

La ligadura del ducto quedó en desuso hasta los años 90 en que se publicaron de nuevo algunas revisiones sobre la aplicación de ligadura para evitar la anastomosis pancreática. Sin embargo, aunque la mayoría de los estudios relacionaba la ligadura del ducto a índices de fístula mayores [49], había otros estudios retrospectivos en controversia, con valores de incidencia similares entre procedimientos [50, 51].

Gall *et al.* [52] validaron clínicamente la idea de Gebhardt *et al.* [53], los cuales emplearon en modelo canino una solución alcohólica de prolamina (Ethibloc) para desencadenar la atrofia exocrina del páncreas tras la obstrucción del conducto sugiriendo preservación de la viabilidad endocrina. Esta sustancia radiopaca, de moderada viscosidad durante su manipulación e inyección, se solidificaba y reabsorbía a los 11 días, y conllevó a la dehiscente eliminación de la anastomosis pancreaticoyeyunal durante años. Hasta el momento, se han desarrollado

distintos pegamentos; un ejemplo de ellos es Tissucol (Baxter, España) el cual se trata de un pegamento con solución de fibrina que tiene un efecto protector de las células β .

La oclusión del ducto con pegamentos condujo a la disminución de la tasa de mortalidad y morbilidad asociada. No obstante, tal y como sugieren dos estudios randomizados recientes [54, 55], las tasa de complicaciones es todavía muy elevada y algunos estudios alertan del riesgo de pancreatitis hemorrágica si la inyección del pegamento se hace a altas presiones [56]. Además, algunos autores sugieren que la aparición de fístula pancreática en casos en que se produce un mal sellado o ante el bloqueo del conducto principal, incluso de manera transitoria, está asociada al aumento de presión y la secreción de jugo pancreático por canalículos secundarios [57].

Fuera del contexto quirúrgico, ambas técnicas de oclusión ductal, son conocidas por su capacidad de producir atrofia del tejido exocrino, evitando así el dolor al paciente en casos de pancreatitis crónica [58]. Además, desde 1977 se han realizado múltiples estudios experimentales para evaluar los cambios histológicos exocrinos y endocrinos asociados a la atrofia pancreática [56, 59-63], así como su posible aplicación a la regeneración de islotes en casos de diabetes.

A pesar de que el mecanismo patogénico de la diabetes mellitus tipo 1 y 2 (DM1 o DM2) es diferente, en ambos casos se produce un descenso en el número de células β que comporta una pérdida de la capacidad para producir insulina [64, 65]. En ésta última década, se han publicado múltiples estudios experimentales que asocian la ligadura total del ducto [66-70], la oclusión temporal [71-80] por pegamento o celofán y la pancreatectomía parcial (incluyendo resección de la cabeza o de la cola) [81-84]; al aumento de masa endocrina. Además, se han realizado estudios genéticos que han demostrado la gran capacidad regenerativa de las células β , incluso tras la ablación casi total del tejido endocrino en el páncreas [69, 70, 85-90]. A pesar

de que algunos estudios sugieren que la regeneración de células β se produce por la replicación de células pre-existentes [65, 68, 80, 82, 84, 85, 91-93], otros estudios sugieren que las células β pueden transdiferenciarse de células acinares [94-96], células ductales [68, 87, 88, 97-99] o incluso otro tipo de células endocrinas como células α [69, 70, 86].

Sin embargo no existe un consenso en la afectación de la función endocrina, ya que algunos autores sugieren que la viabilidad de los islotes de Langerhans no se ve afectada por la oclusión del conducto pancreático [100-104], aunque otros estudios mantiene que la oclusión ductal produce posible deterioro secundario de la función endocrina, desencadenando la aparición de diabetes [55, 67, 105, 106].

1.5 Problemas de tratamiento

Tal y como se detalla en los apartados anteriores, aunque existe gran diversidad de técnicas para reducir el índice de morbilidad asociado a la cirugía del cáncer de páncreas, no existe ninguna técnica capaz de prevenir la aparición de fugas siendo esta una de las complicaciones más frecuentes y graves.

A continuación, se describen en detalle las dos complicaciones más frecuentes; la fístula pancreática y la pancreatitis, que son objeto de estudio de la presente Tesis.

1.5.1 Fístula pancreática

Entendemos como fístula una comunicación anormal (congénita, patológica o quirúrgica) que va de una capa epitelial a otra, y cómo fuga; un fluido que se escapa mediante un orificio o superficie abierta [38]. En nuestro caso concreto, una fístula pancreática es una comunicación anormal entre el epitelio ductal pancreático y otra superficie epitelial que contiene un derivado pancreático rico en enzimas. Sin embargo, la fístula pancreática postoperatoria (POPF) representa el fracaso de la anastomosis o incluso el fracaso del sellado de parénquima pancreático tras una pancreatectomía izquierda o central, la enucleación, y/o trauma. En este caso, se produce una fuga en los ductos pancreáticos hacia la cavidad abdominal y no necesariamente a otra superficie con epitelio (por ejemplo, a través de un drenaje quirúrgico).

De acuerdo a la literatura, el índice de fístula pancreática varía entre el 0 y el 25% en función de la definición empleada [36-38]. Recientemente, ante la falta de un criterio universal, un Grupo Internacional de Estudio de la Fístula Pancreática (ISGPF) ha establecido una definición estándar que parece haberse establecido como tal. Se considera POPF cuando el nivel de

amilasa en el drenaje tienen una concentración de amilasa tres veces superior al valor normal en suero a partir del tercer día de PO. Además, se ha establecido una clasificación de los niveles de fístula pancreática que se resume en la tabla 4.

Tabla 4 | Clasificación de fístula pancreática según la ISGPF. Se considera signos de infección cuando la temperatura es $>38^{\circ}\text{C}$, hay leucocitosis, eritema localizado endurecimiento o descarga purulenta. Se considera readmisión hasta 30 días después del alta hospitalaria. Tabla adaptada de Bassi *et al.* [38]

	No POPF	Grado A	Grado B	Grado C
Nivel de amilasa en drenaje	< 3 veces superior al nivel de amilasa en suero	> 3 veces superior al nivel de amilasa en suero	> 3 veces superior al nivel de amilasa en suero	> 3 veces superior al nivel de amilasa en suero
Condiciones clínicas	Buen estado	Buen estado	Normalmente buen estado	Mal estado
Requieren de tratamiento	No	No	Pueden requerirlo	Sí
Obtención de imagen (por US o TAC)	No	No	A veces	Sí
Drenaje persistente (> 3 semanas)	No	No	A veces	Sí
Signos de infección	No	No	Puede manifestar signos	Sí
Readmisión	No	No	A veces	Sí
Sepsis	No	No	No	Sí
Re-intervención	No	No	No	Sí
Muerte relacionada con la fístula	No	No	No	A veces

Los factores de riesgo asociados a la aparición de fístula pancreática están directamente relacionados con el estado y las enfermedades del páncreas y/o de la región periampular. El principal factor a tener en cuenta es la consistencia del páncreas. En una serie de casi 2.000

duodenopancreatectomías [107], se observó que un páncreas blando estaba asociado a una tasa de fístulas del 22,6%; diez veces mayor al riesgo de fístula pancreática frente a un páncreas de consistencia intermedia o duro. Además, existen otras publicaciones [33, 34, 36] que han descrito índices de fístula pancreática mayores en presencia de páncreas blandos. Es por ese motivo que se ha aceptado que los páncreas fibróticos en pacientes que han sufrido pancreatitis crónicas facilitan la anastomosis enteropancreática, mientras que un páncreas blando la dificulta.

El tamaño del conducto pancreático se considera el segundo factor de riesgo para la predicción fístula. Esto se debe a que los conductos pancreáticos pequeños no dilatados; de un diámetro menor o igual a 3 mm; predisponen a los pacientes a la aparición de una fístula pancreática por fallos en la anastomosis, en comparación con el de los pacientes con conductos dilatados [33, 34, 36]. Un estudio randomizado reciente [108] asocia índices de fístula pancreática (mayoritariamente de grado B) de hasta el 42% tras la PD en pacientes de riesgo, los cuales están caracterizados por tener un páncreas blando y conducto de Wirsung fino (<3 mm).

Otras enfermedades relacionadas con factores de riesgo incluyen la resección de lesiones patológicas como el carcinoma ampular o duodenal, el colangiocarcinoma distal, la neoplasia intraductal papilar mucinosa, la neoplasia mucinosa de páncreas, tumores benignos de los islotes, los adenomas duodenales y el aumento de la producción de jugo pancreático [107].

1.5.2 Pancreatitis

La pancreatitis; o inflamación el páncreas; se produce por la activación de las enzimas pancreáticas en el páncreas y no en el intestino delgado, como sucede en condiciones

normales. Cuando se produce una reacción inflamatoria súbita, se habla de pancreatitis aguda. En cambio, cuando la inflamación es progresiva, se define como pancreatitis crónica.

La pancreatitis aguda (PA) es una de las enfermedades gastrointestinales que causa más ingresos hospitalarios en los Estados Unidos. La incidencia en la pancreatitis aguda parece haber aumentado notablemente estos años y en la mayoría de series se encuentra entre 13-45 personas por cada 100.000 habitantes [109-111], aunque ésta incidencia muestra amplias variaciones según el país o las áreas consideradas [112]. En el caso de la pancreatitis crónica (PC), la incidencia y prevalencia es menor que la PA, establecida entre 5-12 personas por cada 100.000 habitantes [111, 113] y 50/100.000 habitantes [34, 114]. La PC afecta significativamente la calidad de vida de los pacientes al estar asociada a dolor abdominal, al empeoramiento de otras enfermedades y/o a la aparición de insuficiencia exocrina e endocrina que acaba resolviéndose en la cicatrización del páncreas.

A continuación se describen en detalle las características de la PA y la PC.

1.5.2.1 Pancreatitis aguda

La pancreatitis aguda se produce por la inflamación del páncreas por activación enzimática intrínseca. Se relaciona con una amplia gama de asociaciones etiológicas, hallazgos patológicos y cursos clínicos. La media de edad de presentación de la población afectada es de 55 años y en la mayoría de los casos se encuentra entre los 30 y 70 años, no obstante puede darse a cualquier edad; aunque es rara en la infancia [112].

La pancreatitis aguda ha sido asociada con diversos agentes etiológicos, lo cual no implica necesariamente la presencia de una relación causa-efecto en cada caso particular. Las causas asociadas principales se diferencian entre obstructivas y no obstructivas.

- Obstructivas: Se distinguen 3 tipos en función de la localización.

(a) Localización biliar: La presencia de cálculos biliares es la causa más común de PA [115], con prevalencias del 7% en Estados Unidos [116].

(b) Localización intestinal: Se puede dar por íleo intestinal, obstrucción mecánica, divertículo duodenal, gastroduodenostomía o yeyunostomía.

(c) Localización pancreática: Por presencia de un adenocarcinoma pancreático o litiasis pancreática.

- No obstructivas: Se conoce que el alcohol, el tabaco y la obesidad son factores de riesgo para el desarrollo de PA [115]. En concreto, el aumento de incidencia en obesidad es un factor de riesgo que contribuye a la formación de cálculos biliares [117]; y por tanto a la incidencia de PA. También se ha descrito que las personas celíacas [118], con inflamación intestinal, lupus erimatoso u otras enfermedades tienen mayor riesgo de sufrir pancreatitis.

A pesar de que se conoce que la presencia de cálculos biliares es la mayor causa de PA, no se ha establecido la causa directa de pancreatitis. Con ese objetivo, ya desde 1901, Opie *et al.* [119] plantearon múltiples estudios experimentales para conocer como el paso de cálculos biliares al colédoco producía inflamación pancreática. Actualmente, se contemplan 3 teorías. Una de ellas, sugiere que la obstrucción del conducto pancreático por la presencia de un cálculo biliar puede comportar el bloqueo de la secreción pancreática. Esto puede inducir la pancreatitis (ver figura 10-A); con indiferencia de si la vía biliar está también ocluida; aunque en éste caso se aumentaría la gravedad (ver figura 10-C). La segunda hipótesis, tal y como muestra la figura 10-B, plantea que la obstrucción de la papila por un cálculo biliar puede crear una comunicación entre el colédoco y el conducto de Wirsung, permitiendo así el flujo retrógrado de bilis al conducto pancreático e inducir así la pancreatitis [120, 121]. Sin embargo, posteriormente, se observó que la anatomía bilio-pancreática del conducto en la papila no

permite el reflujo hacia el conducto pancreático detrás de un cálculo biliar impactado [122-125]. Además, otros estudios posteriores han demostrado que en algunos modelos animales la obstrucción transitoria del flujo de páncreas es suficiente para inducir la pancreatitis aguda [125]. La tercera posible causa de PA y la más aceptada es que un cálculo biliar, un edema o una reacción inflamatoria, puede causar una obstrucción del ducto pancreático. En ese caso, la continua secreción de jugo pancreático se iría acumulando en el interior hasta comportar hipertensión del ducto y la ruptura de ductos intrapancreáticos y extravasación en el páncreas de jugos pancreáticos ricos en enzimas [121].

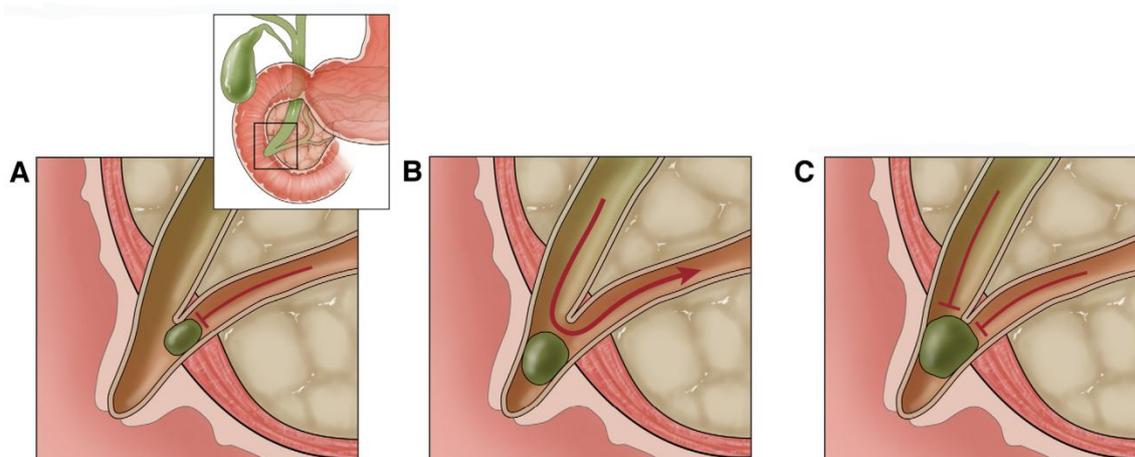


Figura 10 | Diferentes mecanismos por los cuales un cálculo biliar puede inducir pancreatitis. (A) El cálculo biliar obstruye el conducto pancreático y se produce un reflujo de jugo pancreático, (B) también podría bloquear la papila y permitir el flujo retrógrado de bilis en el conducto pancreático aunque no es posible anatómicamente (c) o bloquear el colédoco y el conducto pancreático, por lo que se agrava la situación. Modificada de Lerch, *et al.* [120]

Para el diagnóstico de la PA se deben cumplir tres factores: (1) dolor abdominal (dolor persistente agudo, dolor epigástrico que puede irradiar hacia la espalda), (2) niveles de lipasa o amilasa superiores a 3 veces el valor basal e (3) identificación en imagen mediante tomografía axial computerizada (TAC). Éste último factor puede no ser necesario si hay presencia de dolor y actividad enzimática alta.

De acuerdo al sistema de clasificación clinicopatológico establecido en Atlanta en 1992 [126], se consideran dos tipos de PA: la pancreatitis intersticial edematosa; que afecta al 85% de los pacientes, y la pancreatitis necrosante (ver figura 11-B), que incluye al 15% restante [127-134]. Además, se diferencian tres categorías en función de la severidad de la PA, el diagnóstico por la imagen con TAC y la presencia o ausencia de colecciones peripancreáticas. A continuación se describen brevemente éstas dos variantes de PA:

1.5.2.1.1 Pancreatitis intersticial edematosa

La pancreatitis intersticial edematosa abarca entre el 80-90% de las presentaciones y está asociada a bajas tasas de mortalidad, inferiores al 2%. Se caracteriza porque los pacientes sufren una inflamación del páncreas debido a un edema inflamatorio y a menudo la grasa peri-pancreática suele mostrar algunos cambios inflamatorios (ver figura 11-C). En algunos casos, también puede identificarse alguna colección peripancreática, pero normalmente los síntomas clínicos de éste tipo de pancreatitis, considerada la más leve, se resuelven dentro de la primera semana [135].

1.5.2.1.2 Pancreatitis necrótica

Entre un 5-10% de los pacientes presenta pancreatitis necrosante que se manifiesta por la necrosis del parénquima pancreático y/o del tejido peripancreático, aunque raramente se produce la necrosis del tejido peripancreático por si sola (ver figura 11-D). Esta forma de pancreatitis corresponde clínicamente a la sintomatología más grave o severa, ya que la necrosis puede extenderse a toda la glándula y a estructuras adyacentes, y clínicamente puede dar lugar a complicaciones sistémicas [126, 136]. Además, la pancreatitis necrosante también está asociada a índices de morbi-mortalidad más elevados y a complicaciones

locales; cómo acumulación aguda de líquido peripancreático, pseudoquiste pancreático, colección de tejido necrótico o bolas de necrosis.

En los casos más severos la diseminación de enzimas pancreáticas y sustancias vasoactivas hacia el peritoneo genera una peritonitis y si se produce el paso a la circulación general se puede producir un fallo orgánico múltiple. En los mejores casos, la necrosis pancreática y peripancreática puede permanecer estéril, o infectarse y el tratamiento es diferente para cada situación.

La infección de la necrosis pancreática es la complicación local más grave en el curso de la PA, se puede instaurar a partir de la segunda semana de evolución, y es la causa del 40% de la mortalidad [130, 131, 137-145]. A pesar de que se han realizado múltiples estudios para evaluar el efecto beneficioso de la profilaxis antibiótica [139, 140, 146-150], la recomendación no puede establecerse de manera categórica, y los estudios tampoco sugieren una correlación entre la extensión de necrosis, el riesgo de infección y duración de la sintomatología [131, 151-153].

1.5.2.2 Complicaciones asociadas a la pancreatitis aguda

Según la clasificación de Atlanta [126], se debe diferenciar entre pancreatitis intersticial edematosa sin complicaciones y la pancreatitis aguda con complicaciones locales. El tipo de complicaciones asociadas puede ser: *colección de fluido peripancreático agudo*, que se caracteriza por una colección de fluido sin evidencia de pared inflamatoria llamada *pseudoquiste pancreático*. Otra de las posibles complicaciones es una *colección de necrosis aguda* resultante de la complicación de la pancreatitis intersticial edematosa y de la pancreatitis necrosante, y *la bola de necrosis* que consiste en una bola de tejido necrótico encapsulada. A

continuación se describen en detalle las 2 complicaciones locales más interesantes para el análisis del estudio: el pseudoquiste y el absceso pancreático.

1.5.2.2.1 Pseudoquiste pancreático

En cuanto a las complicaciones locales, entre un 30-50% de los pacientes suelen desarrollar colecciones líquidas de forma precoz, en las primeras 48 h del inicio de la enfermedad. Éstas son ricas en jugo y enzimas pancreáticas y se localizan en el área peripancreática como resultado de una reacción exudativa a la inflamación del páncreas. En general, se extienden por el retroperitoneo y se caracterizan por carecer de pared propia [112]. Su curso clínico suele ser hacia la resolución espontánea en el 50% de los casos, pero en el 15% persiste y llegan a encapsularse formando pseudoquistes. La presencia de una pared de granulación y fibrosis bien definida es lo que diferencia básicamente un pseudoquiste de una colección de fluido peripancreático agudo [154-156]. En ocasiones, el crecimiento de estas colecciones es rápido durante las primeras semanas de evolución y pueden producir síntomas, como dolor persistente tras cada intento de reiniciar la ingesta oral, o signos de infección (fiebre y leucocitosis).

1.5.2.2.2 Absceso pancreático

El absceso pancreático es la consecuencia de una necrosis pancreática limitada con licuefacción e infección secundaria. Por tanto, su contenido fundamental es pus, pero también tiene cantidades variables de restos necróticos semisólidos. En general, se desarrolla tardíamente en el curso de la PA, a partir de la quinta semana y su mortalidad es muy baja si se trata adecuadamente. El absceso pancreático debe tratarse en cuanto se detecte, ya que hay riesgo de sepsis si se prolonga el momento de su drenaje [112].

1.5.2.3 Pancreatitis crónica

La pancreatitis crónica (PC) se define como una inflamación continua que comporta cambios morfológicos irreversibles asociados a una destrucción progresiva del tejido exocrino. Histológicamente, los cambios comportan un cambio en la estructura lobulillar, por infiltración de tejido fibroso e inflamatorio, pérdida acinar, deformación de los ductos e incluso cambios en la composición de los islotes, lo que resulta en la pérdida de función exocrina y en algunos casos en la endocrina [68, 157-163] (ver figura 11-A y 11-B).

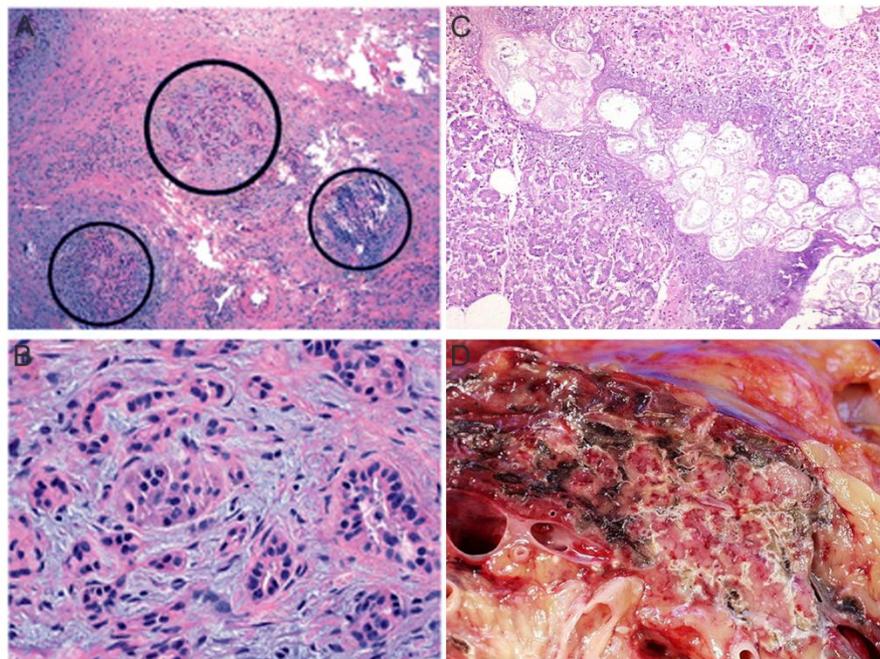


Figura 11 | Aspecto macroscópico e histológico de pancreatitis. (A) Menor (100x) y (B) mayor aumento (600x) de la organización lobulillar de los ductos en la pancreatitis crónica (círculos, HE); (C) pancreatitis aguda, con infiltración de neutrófilos y necrosis adiposa (HE, 100x) y (D) pancreatitis aguda necrosante de origen biliar. Adaptación de webpathology.com y Bellizzi *et al.* [164].

Tal y como se detalla en el punto 1.5.2, la incidencia anual y prevalencia de la PC, es menor que en la PA, sin embargo la PC afecta significativamente la calidad de vida de los pacientes al estar asociada a dolor abdominal.

El diagnóstico de la PC puede basarse en criterios histológicos o morfológicos, o la combinación de ambos [163, 165, 166]. La disfunción no puede ser un criterio único de diagnóstico ya que los tests no pueden diferenciar entre PC y la insuficiencia exocrina sin pancreatitis asociada. El diagnóstico, sin embargo, está claro cuando se observan calcificaciones en el parénquima pancreático y dilatación ductal, presentes en estados avanzados de la enfermedad. No obstante éste diagnóstico, es menos evidente en estadios más tempranos [167].

Los avances genéticos y tecnológicos han mejorado la identificación de los factores de riesgo que pueden comportan el desarrollo de PC. Actualmente, de acuerdo a la clasificación TIGAR-O [166] los mayores riesgos están asociados a causas tóxico-metabólicas; como el consumo de alcohol, tabaco, hipercalcemia, insuficiencia renal crónica, etc. También se identifican causas idiopáticas y genéticas; ya que existe predisposición genética a sufrir pancreatitis hereditaria [168] por la alteración de genes cuyos productos participan en la cascada enzimática de la tripsina (como *PRSS1*, *SPINK1* y *CTRC*) [169, 170]. Además, existen otros factores como enfermedades autoinmunes; ej. la hypergammaglobulemia [171]; recurrentes brotes de pancreatitis aguda severa [168, 172, 173] o causas obstructivas que se consideran de riesgo para el desarrollo de PC.

Para nuestro estudio, es interesante valorar en detalle la pancreatitis crónica obstructiva la cual algunos estudios la asocian a una patología diferente de pancreatitis [172]. Cualquier obstrucción parcial o completa; puede producir la compresión o inflamación del tejido pancreático, lo que provoca un aumento de presión en los ductos eferentes y por tanto la dilatación proximal al punto de obstrucción, la aparición de atrofia acinar y al reemplazo de parénquima exocrino por tejido fibrótico [160]. Existen algunos estudios que han asociado la PC obstructiva a traumas, tumores, disfunciones del esfínter de Oddi o la escisión pancreática;

sin embargo algunos estudios también sugieren que los cambios histológicos y funcionales pueden ser reversibles si se identifican en fase temprana [162, 174].

La insuficiencia exocrina del páncreas (IEP) es una de las causas más importantes de problemas digestivos y la mayor complicación de la PC. La digestión normal requiere la estimulación adecuada de la secreción pancreática, la producción suficiente de enzimas digestivas, así como un sistema de conductos sin obstrucción ni reducción de flujo y la adecuada mezcla de jugo pancreático con los alimentos ingeridos. El fallo en cualquiera de estos pasos puede resultar en IEP, y ocasionar esteatorrea, pérdida de peso y algunas complicaciones relacionadas con la desnutrición; tales como la osteoporosis [175]. Di Magno *et al.* [176] demostraron que la esteatorrea no ocurre hasta que la lipasa se reduce entre el 5-10% respecto el flujo normal, pero en las situaciones en que la función exocrina se reduce, la habilidad en la digestión de grasas es el factor determinante que causará las complicaciones clínicas y sintomatología más relevante. Esto sucede, porque la lipasa, es la enzima más lipolítica de entre las enzimas digestivas y la menos estable en el lumen gastrointestinal [177]. El diagnóstico de IEP tiene como tratamiento un cambio de hábitos en el consumo de alcohol y dieta, así como la administración oral de enzimas pancreáticas durante las comidas, para compensar la falta de enzimas endógenas [175].

Otras de las complicaciones asociadas a pacientes con PC es la aparición de pseudoquistes u obstrucciones biliares. En estos casos, cuando se identifican pseudoquistes sin complicaciones asociadas, la endoscopia es la primera opción terapéutica; pero en los casos en que también existe una obstrucción biliar, entonces la cirugía se establece como una de las mejores opciones [178]. Sólo en los casos en que los pacientes sufren de un dolor abdominal severo y existe una posible complicación local, se considera la cirugía como un tratamiento paliativo que tiene como objetivo secundario la preservación de la función exocrina e endocrina.

**Capítulo 2 | Nuevas tecnologías en el tratamiento quirúrgico
del cáncer de páncreas**

2 | Nuevas tecnologías en el tratamiento quirúrgico del cáncer de páncreas

Aunque la laparoscopia se ha convertido en una práctica aceptada con resultados muy positivos en un amplio campo quirúrgico, el papel de esta técnica en la cirugía pancreática no ha sido ampliamente aceptada y está en actual debate. Las indicaciones y los resultados asociados a la complejidad de estas maniobras están en controversia, por consiguiente sólo algunos centros a nivel mundial han implantado esta nueva técnica en duodenopancreatectomías [179-181].

La primera duodenopancreatectomía laparoscópica (LPD) fue descrita por Gagner *et al.* en 1994 [182]. Desde entonces, se han publicado aproximadamente 300 procedimientos considerando también laparoscopia mano-asistida y asistida por robot [183-192]. Este bajo número de procedimientos es sin duda, un reflejo de la opinión de los cirujanos, por la limitación inherente de la instrumentación actual.

Es por ello que, actualmente se están utilizando de manera combinada nuevos dispositivos médicos alternativos al bisturí y la sutura, la mayoría de los cuales están basados en diferentes fuentes de energía para una aplicación laparoscópica o abierta.

La finalidad de estos dispositivos es mejorar el sellado del conducto pancreático y minimizar la hemorragia durante la transección del parénquima pancreático. Aunque cada una de estas alternativas tiene ventajas y desventajas lo recomendable es tener acceso a todas ellas y utilizar el más apropiado en función de la pancreatectomía y el paciente.

La siguiente sección resume algunos de los dispositivos médicos utilizados en la transección del parénquima pancreático, empleando todos ellos fuentes de energía muy diversas.

2.1 Dispositivos empleados en la cirugía pancreática

2.1.1 Electrobisturí de plasma

El electrobisturí de plasma es un dispositivo común en el quirófano ya que permite una rápida hemostasia al alcanzar temperaturas de hasta 210°C. A diferencia del electrobisturí convencional, éste no está en contacto directo con el tejido, sino que la energía eléctrica del bisturí se transmite a través de un haz de argón ionizado insuflado por el equipo y crea una chispa que se debe a la diferencia de voltaje entre el tejido y el electrodo activo.

2.1.2 Harmonic scalpel

Harmonic scalpel (Ethicon Endo-Surgery, Cincinnati, OH, USA) funciona como una tijera ultrasónica la cual emite mediante dos hojas longitudinales vibraciones de hasta 55,5 kHz; siendo capaz de diseccionar parénquima pancreático generando temperaturas de hasta 100°C (ver figura 12). Este efecto térmico produce la coagulación del tejido evitando su sangrado. Además, su diseño incorpora un mecanismo de sierra en el sentido de las hojas que permite cortar el tejido cuando ha alcanzado su límite elástico [193]. Aunque este dispositivo está siendo muy utilizado en pancreatomecías laparoscópicas para seccionar el parénquima pancreático, no es capaz de sellar completamente el conducto pancreático lo que comporta en muchos casos su combinación con el CUSA (ver apartado 2.1.3) o la posterior sutura del conducto [180, 182, 194]. Además, se ha empleado en algunos estudios para la disección de la cabeza del páncreas reduciendo la hemorragia [195].



Figura 12 | Representación general de Harmonic Scalpel® (Ethicon). Se observa en detalle la pinza activa.

2.1.3 Cavitationl Ultrasonic Surgical Aspirator (CUSA)

Este es otro dispositivo basado en ultrasonidos CUSA (Covidien, Valleylab, Tyco Healthcare, Boulder, CO, USA). Presenta el mismo funcionamiento que el bisturí harmónico y permite la cavitación del tejido e incorporar un sistema de aspiración. La figura 13 muestra la torre de este dispositivo con el fungible. Comúnmente se utiliza de manera puntual en operaciones abiertas para mayor control del cirujano en la disección de vasos u otras estructuras [196, 197].

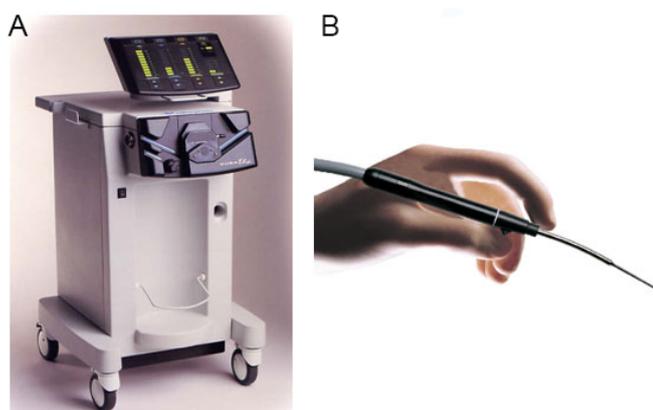


Figura 13 | Fotografía de la torre de aspiración y generador de CUSA y del dispositivo fungible de CUSA (Covidien).

Actualmente la casa Söring (Söring GmbH, Quickborn, Germany) está comercializando una variante de éste dispositivo que incorpora coagulación, aunque

intermitente a la cavitación. Por el momento no existen casos publicados en que se haya utilizado este dispositivo.

2.1.4 Ligasure

Ligasure (Valley Lab, Tyco Healthcare, Boulder, CO, USA) fue diseñado principalmente para el sellado de vasos sanguíneos, sin embargo se ha utilizado en algunas cirugías de páncreas, como en pancreatomecías distales [198]. Este dispositivo funciona por la combinación de presión mecánica ejercida por los electrodos, y la emisión bipolar de corrientes de radiofrecuencia que producen la desnaturalización y contracción del colágeno y la elastina presentes en los vasos sanguíneos, facilitando así su sellado. Aunque se ha empleado en alguna duodenopancreatectomía [199-202]; normalmente se emplea durante la disección y en pancreatomecías distales, proporcionando una mejora en la técnica. Actualmente, se está realizando un ensayo clínico para valorar la eficacia del dispositivo en PD [203].

La figura 14 muestra el generador del Ligasure con todos sus modelos para cirugía abierta y laparoscópica.

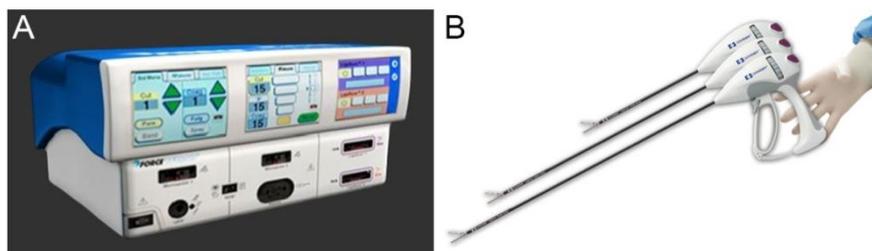


Figura 14 | Generador de RF específico para conectar el Ligasure (A) y los diferentes modelos de dispositivo (B).

2.1.5 Endograpadoras (EndoGia)

Las EndoGias (Covidien, Valley Lab, Tyco Healthcare, Boulder, Co, USA) funcionan como grapadoras quirúrgicas que pueden ser utilizadas tanto en cirugía abierta (laparotomía) como en laparoscopia. Aunque son muy utilizadas en pancreatectomías distales, incluso con refuerzo de sutura, su uso está asociado a un índice significativo de fístula pancreática por fuga de hasta un 32% [204].

En el 2011 se publicó un estudio multicéntrico randomizado [205] en el que se analizaron 352 pacientes con tumores localizados en el cuerpo o cola fueron sometidos a una pancreatectomía distal en la que se realizó la sección pancreática con sutura mecánica (n=177) o mediante sutura manual (n=175). No se observaron diferencias en el índice de fístula pancreática (32% y 28% para los pacientes tratados con sutura mecánica o sutura manual, respectivamente) ni en la mortalidad, aunque sí se produjo un caso de muerte en el grupo sutura manual. El estudio sugería que el uso de la endograpadora en la transección pancreática tras una pancreatectomía distal no reduce el índice de fístula pancreática en comparación con la sutura manual. Posiblemente porque en las técnicas basadas en la compresión externa del parénquima pancreático, los conductos no pueden soportar la presión intraductal de páncreas dando lugar a un elevado porcentaje de fístulas pancreática.

Recientemente, se ha publicado una serie de 12 casos [184] en los que ha realizado la sección y el cierre temporal del remanente pancreático en duodenopancreatectomías laparoscópicas con grapadora para evitar el sangrado y la fuga de jugos pancreáticos durante la manipulación previo a la anastomosis. Sin embargo, este no se considera un procedimiento estandarizado.



Figura 15 | EndoGia Universal con diferentes cargas.

2.1.6 Tissuelink EndoSH 2.0

Tissuelink Endo SH 2.0 (Medtronic Advanced Energy, LLC, Inc. Portsmouth, USA) es un dispositivo monopolar que combina la radiofrecuencia (RF) y solución salina para proporcionar un sellado hemostático del tejido blando, para aplicaciones en hígado, páncreas y riñón.

Concretamente, el EndoSH2.0 es un dispositivo que utiliza la RF combinada con suero salino para la transección de tejido. Éste incorpora un sistema para la conducción continua de suero salino en la punta del electrodo que facilita la transferencia de la energía entre el dispositivo y el tejido manteniendo un contacto continuo y una mejor disipación térmica (ver figura 16). El dispositivo permite la transección del tejido y el sellado de los vasos con mayor control hemostático, por lo que es un dispositivo muy utilizado en la cirugía hepática.

Recientemente Rostas *et al.* [206] publicaron un estudio retrospectivo en el que se sugería que el uso del EndoSH 2.0 era seguro para la división y el sellado del páncreas en una pancreatometomía distal, con un índice de complicaciones del 6,1% y una tasa de POPF del 3%. Otros estudios in vivo en modelo porcino para pancreatometomías distales parecen tener buenos resultados tras disminuir el índice de fístula pancreática. Sin embargo, estos mismos estudios recalcan que la dispersión de salino caliente puede dañar estructuras adyacentes suponiendo un riesgo para el paciente [207].



Figura 16 | Dispositivo Tissuelink EndoSH 2.0 de Medtronic.

2.2 Uso de las corrientes de RF para el control hemostático y el sellado del tejido

La radiofrecuencia en aplicaciones quirúrgicas está bien definida y ocupa la porción del espectro electromagnético comprendido entre 300 kHz y 3 MHz (ver figura 17).

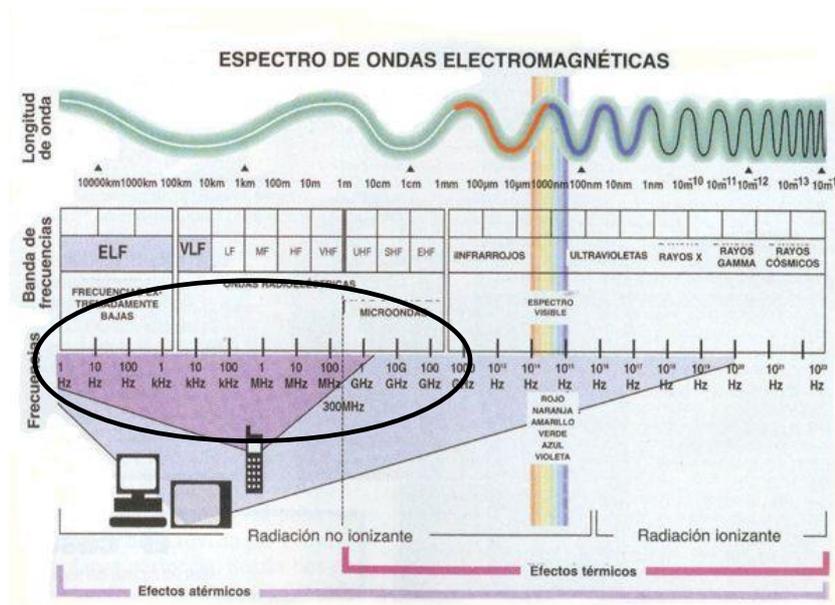


Figura 17 | Espectro electromagnético. El círculo indica las bandas del espectro consideradas RF.

La aplicación de la RF en la resección de parénquimas tiene como origen la ablación por radiofrecuencia. Fue Weber *et al.* [208] en 2002 quien empleó de manera pionera electrodos diseñados para la ablación por radiofrecuencia con el objetivo de conseguir un área de coagulación para la posterior sección del hígado de manera exangüe. Tras este autor, múltiples estudios han desarrollado dispositivos que tienen como principio físico la ablación por RF para la transección posterior en tejidos tan diversos como riñón, hígado y páncreas. Algunos de ellos se han comentado en la sección 2.1.

En la ablación monopolar por radiofrecuencia, el paciente forma parte de un circuito eléctrico cerrado compuesto por el generador, el electrodo y electrodos dispersivos (placas dispersivas)

situados en la piel del paciente. En el tejido contiguo al electrodo activo (de pequeña área $<1 \text{ cm}^2$) se concentra la mayor densidad de corriente y por consiguiente se produce la lesión. En cambio en el tejido contiguo a los electrodos dispersivos (de gran superficie; $>500 \text{ mm}^2$) la densidad de corriente es muy baja y el efecto térmico es nulo.

Cuando los electrodos están en contacto con la piel, el generador crea una diferencia de potencial alterna entre ambos electrodos.

2.2.1 Interacción de la RF con el tejido

En la ablación por RF (RFA) se utilizan frecuencias superiores a 100 kHz (de 500 kHz). En este caso, la propagación de la RF en medios biológicos varía en función de la conductividad de los tejidos que depende mayormente de su contenido en iones y agua. Además, cuando se emplean estas altas frecuencias, el campo eléctrico que se establece por los electrodos cambia cada $2 \mu\text{s}$ ($1/500 \text{ kHz}$) lo que implica el desplazamiento rápido de los iones presentes en el tejido. Este desplazamiento conocido como “agitación térmica” comporta la producción de calor, sin embargo no produce la estimulación eléctrica ya que no permite que el potencial de membrana de las células alcance el potencial umbral [209].

El efecto producido por agitación térmica queda limitado al tejido contiguo de los electrodos hasta una profundidad de unos 2 mm , en cambio el calor producido por el electrodo se disipa por el tejido por conducción hasta alcanzar el equilibrio térmico. Si el tejido es muy conductor entonces la impedancia será menor y se calentará menos el tejido; sin embargo la disipación eléctrica será mayor y aumentará el tamaño de la zona coagulada y el riesgo de dañar estructuras adyacentes.

Matemáticamente este comportamiento se puede modelar con la “Bioheat equation” [210, 211]

(1) la cual modela el fenómeno térmico que se produce en el tejido al aplicar RF:

$$\rho \cdot c \cdot \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla \cdot (k \nabla T) + q - Q_p \quad (1)$$

Siendo, ρ , c , k la densidad, el calor específico y la conductividad térmica del tejido, respectivamente. El término q equivale a la fuente de calor en función del generador de RF y viene dado por la siguiente expresión:

$$Q = J \cdot E \quad (2)$$

Donde J es la densidad de corriente (A/m^2) y E la intensidad de campo eléctrico (V/m). Finalmente, el término Q_p (3) corresponde a la pérdida de calor por perfusión sanguínea que se resuelve en función del coeficiente de transferencia térmica (H_{bl}), la temperatura de la sangre (T_{bl}).

$$Q_p = H_{bl} \cdot (T - T_{bl}) \quad (3)$$

2.2.2 Efecto térmico de la RF

El daño térmico causado por la RF depende no solamente de la temperatura alcanzada en los tejidos sino también del tiempo de exposición.

La siguiente tabla recoge los cambios macroscópicos y microscópicos más significativos:

Tabla 5 | Cambios macroscópicos y microscópicos tras el aumento de temperatura.

Temperatura	Cambios macroscópicos	Cambios microscópicos
< 55°C	Cambios mínimos	Inicio del daño celular
60-65°C	Color blanquecino	Coagulación, desnaturalización del colágeno y necrosis tisular
65° a 90° C.	Cambios extensos de color y aspecto brillante	Desecación y desnaturalización de las proteínas
90-100°C	Formación de vapor, encogimiento	Vaporización y desecación
>100°C	Coloración oscura	Carbonización del tejido

Los mecanismos homeostáticos celulares pueden soportar temperaturas de hasta 42°C, aunque tras exposiciones a 42°C durante varias horas se puede producir la muerte celular en algunos tejidos. Normalmente, conforme aumenta la temperatura, menor tiempo de exposición se necesita para producir la muerte celular y necrosis coagulativa; por tanto se puede ajustar el comportamiento a una curva exponencial en función de la temperatura y el tiempo de exposición [212]. Por ejemplo, con una temperatura de 46°C se necesitan 8 minutos de exposición para alcanzar muerte celular y con una temperatura de 51°C solo se necesitan 2 minutos [213].

Entre los 42 y 45°C las células son más susceptibles a los daños provocados por mecanismos externos (por ejemplo radiaciones o quimioterapia), mientras a partir de los 45°C se empiezan a producir daños estructurales irreversibles [214]. Estos daños se deben a la desnaturalización de proteínas de la membrana celular, del citoplasma, de los enzimas mitocondriales y de los ácidos nucleicos [215, 216].

Durante la aplicación de la RF los tejidos se suelen calentar de forma paulatina, pero por encima de los 60°C la muerte celular es casi instantánea y en las zonas que están íntimamente en contacto con el extremo activo del electrodo se puede alcanzar hasta los 100°C produciendo necrosis coagulativa y vaporización de los tejidos [217].

Inicialmente, las proteínas citoplasmáticas se desnaturalizan y el componente lipídico de la membrana celular se mezcla y se destruye, así como los ácidos nucleicos [215, 216]. Las altas temperaturas producen la destrucción completa del tejido incluyendo la microvascularización y vasos de hasta 3 mm de diámetro. Además, se ha visto que a temperatura establecidas entre 42-44°C las células no necrosadas activarán procesos apoptóticos para provocar su propia muerte [218-221].

Con un aumento de la temperatura por encima de 100°C, alrededor del extremo activo del electrodo se produce la desecación de los tejidos, y se forma una escara carbonizada íntimamente unida a la superficie del electrodo (fenómeno que se puede observar al utilizar el bisturí eléctrico convencional). El tejido desecado y la escara de carbonización actúan como un aislante provocando un aumento más o menos brusco de la impedancia eléctrica. Esto puede producir la interrupción del circuito ya que el generador no puede administrar más energía lo que comporta la no progresión de la ablación [215]. Para solucionar este inconveniente y si se quiere un volumen de coagulación mayor, es interesante controlar la deposición de energía (disminuyendo la intensidad de corriente) para adquirir máxima densidad sin sobrecalentamiento.

Tal y como hemos comentado anteriormente, la RF es capaz de coagular todos los tejidos en función de su conductividad, incluidos los vasos sanguíneos de diámetros pequeños. Sin embargo, en su proximidad, la irrigación sanguínea en vasos grandes produce un efecto de

refrigeración que evita la trombosis de éste y dificulta la destrucción del tejido próximo al vaso [222].

2.3 Electrodo internamente refrigerado (Coolinside)

Nuestro grupo de investigación ha diseñado y estudiado un dispositivo monopolar asistido por RF que permite la simultánea resección y coagulación del parénquima hepático y renal (Coolinside®, Apeiron Medical, Valencia, España).

2.3.1. Estudio y desarrollo del dispositivo

El estudio y desarrollo de este dispositivo ha pasado por diferentes fases hasta la actualidad.

- Fase de desarrollo y testado computacional: Una de las fases iniciales del desarrollo del dispositivo fue el estudio teórico mediante un Modelo de Elementos Finitos (MEF) en el que se evaluaba el funcionamiento de diferentes prototipos de electrodos sobre tejido biológico. Mediante el MEF se aplicó la aproximación de la Bioheat Equation a un modelo computacional que simulaba la aplicación de energía en un tejido. El modelo calculaba la cantidad de energía aplicada al tejido y la elevación de temperatura consecuente en cada punto del mismo, teniendo presente las características físicas del tejido biológico (en éste caso concreto, hígado), el algoritmo de deposición energética y la forma y dimensiones del electrodo empleado [223]. En el estudio de aplicación del dispositivo, las simulaciones se interrumpieron si la temperatura máxima alrededor del electrodo sobrepasaba los 100°C y se analizaron la distribución de los voltajes y temperaturas en el tejido usando la isoterma de 55°C como límite térmico de la lesión, asumiendo ésta como temperatura mínima necesaria para alcanzar necrosis coagulativa (ver figura 18). Los resultados del modelo permitieron estimar la geometría de la coagulación tisular creada, así como realizar aproximaciones teóricas a los problemas de distribución de la corriente y de la temperatura a lo largo de la lesión producida. De esta manera se pudieron desechar los modelos de electrodos y los algoritmos de administración de

la energía que no obtenían los resultados deseados antes de empezar la fase de experimentación animal.

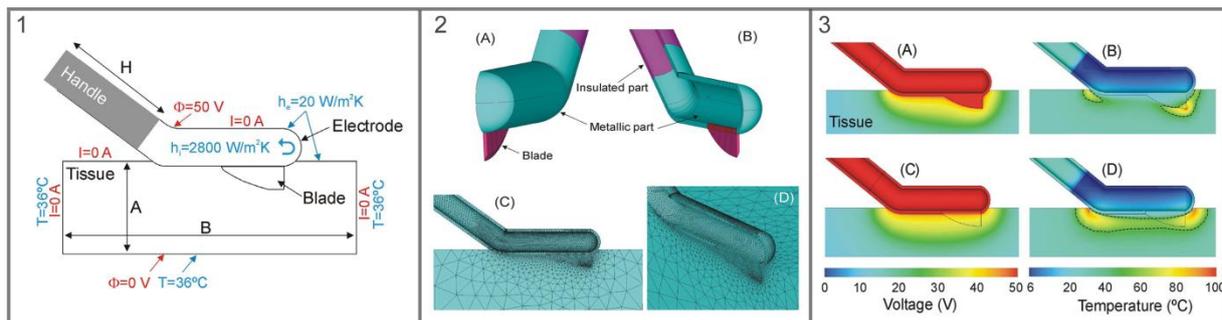


Figura 18 | Modelo teórico de elementos finitos (MEF) y resultados. (1) Representación gráfica del plano de simetría considerado en el MEF. Condiciones límite térmicas (azul) y eléctricas (rojo). (2) Proyecciones tridimensionales del modelo computacional del dispositivo (“A-B”) y dos ejemplos de la simulación en MEF (“C-D”). (3) Resultados del modelo térmico del dispositivo. Distribución de voltaje eléctrico (“A”) y temperatura (B) en el tejido a los 4 segundos de aplicación de 50 V. Distribución de voltaje eléctrico (“C”) y temperatura (“D”) en el tejido a los 10 segundos en caso de disponer de una cuchilla aislada. La línea discontinua representa la isoterma de 55°C que sirve como estimador del límite de lesión térmica. Ilustración modificada de Burdío *et. al.* [223].

- Fases de experimentación ex vivo e in vivo: A nivel experimental el dispositivo fue probado en una primera serie experimental de hepatectomías ex vivo e in vivo en modelo porcino en la que se comparaba el dispositivo internamente refrigerado con otro dispositivo asistido por RF (Tissuelink®) [224]. En el estudio ex vivo se evaluó la factibilidad de la aplicación en la transección parenquimatosa hepática en un modelo animal y en la aplicación in vivo se evaluó el comportamiento sobre la pérdida hemática intraoperatoria y el tiempo de transección. En ambos estudios los resultados fueron significativos evidenciando una disminución de las pérdidas hemáticas intraoperatorias y del tiempo de transección hepática en los animales tratados con el dispositivo internamente refrigerado. Resultados que se corroboraron en un segundo estudio con aplicación laparoscópica [225].

Estas diferencias se explicaron por una mayor profundidad de coagulación tisular en la superficie de transección hepática de hasta el doble (6 mm) en comparación con los del dispositivo asistido por RF control (3 mm). Esta importante diferencia se podría explicar en

parte por el efecto de la distribución de forma no uniforme del suero salino sobre la superficie hepática por el dispositivo Tissuelink®. Sin embargo, el sistema de refrigeración interna en circuito cerrado propio de éste dispositivo permite una refrigeración uniforme en todo momento de la parte activa del dispositivo. Dicho efecto, unido al empleo de un generador propio de ablación hepática (con tensiones eléctricas 4 veces inferiores a las generadas por el sistema Tissuelink®), reduce el fenómeno de arco eléctrico, la formación de humo y por tanto la cantidad de tejido carbonizado y escarificado. Este funcionamiento eléctrico más eficiente y las potencias de aplicación superiores explican la mayor profundidad de penetración de la lesión de ablación [224]. Además, los resultados obtenidos tras la aplicación laparoscópica confirmaron la factibilidad de aplicación de la versión laparoscópica del dispositivo y los resultados positivos en términos de reducción de las pérdidas hemáticas y tiempos de transección, así como capacidad de sellado de canalículos biliares [225].

- Fase de validación clínica: Tras el estudio experimental en Fase I [226], el dispositivo entró en Fase II del Ensayo clínico en el Hospital del Mar previa aprobación por parte de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) (código 312/08 EC) y del comité local de ensayos clínicos. De acuerdo al protocolo previsto, se practicaron un total de 28 hepatectomías en proporción 2:1 repartidos aleatoriamente según secuencia de randomización previamente diseñada en dos grupos: Grupo A (transección hepática asistida por Coolinside) y grupo B (transección convencional sin sistema de transección asistido por radiofrecuencia). Los criterios de inclusión fueron pacientes afectos de metástasis hepáticas resecables de cualquier edad y cualquier tipo de riesgo quirúrgico medido por la clasificación de la American Society Association (ASA). Se extirparon un total de 59 nódulos hepáticos de los que 48 fueron histológicamente confirmativos de metástasis hepáticas. La vía laparoscópica fue empleada en 13 pacientes (46%) y se combinó la resección hepática con otros procedimientos quirúrgicos

(incluyendo resección combinada del tumor primario y cierre de estoma derivativo) en dos pacientes. La morbilidad global fue del 32% sin diferencias significativas entre grupos. Tal y como se había visto en Fase I [226], se observaron diferencias significativas en el volumen de hemorragia a favor del grupo A frente al B (226 mL frente a 508 mL, para grupos A y B, respectivamente, $p=0,057$) y en la hemorragia ajustada a la superficie de transección a favor del grupo A frente al B (2,8 mL/cm² frente a 7,1 mL/cm², $p=0,01$). Además, no se observaron diferencias significativas ni en el índice de transfusión ni en la velocidad de transección entre grupos.

Nuevas aproximaciones: Recientemente, el dispositivo también ha sido probado en nefrectomías parciales laparoscópicas en modelo porcino (transección renal) en comparación con el método estándar (sección del parénquima renal con bisturí eléctrico, bajo clampaje del pedículo renal y sutura laparoscópica de la superficie de transección) [227]. La ventaja principal que aportó el sistema Coolinside en esta aplicación fue una reducción significativa del volumen de hemorragia ($15,5 \pm 23,7$ mL vs $79,4 \pm 76,3$ mL) y del tiempo quirúrgico ($35,3 \pm 13,7$ min vs. $60,2 \pm 10,5$ min, debido esencialmente a que evita las maniobras de control del pedículo renal). Sin embargo, no se consiguió reducir la tasa de fuga urinaria frente al grupo control.

En paralelo, también se ha evaluado la aplicación del dispositivo en la cirugía pancreática en modelo porcino, en concreto en pancreatectomías distales [114]. Los resultados del estudio se comentan más extensamente en el apartado 2.4.

Todos estos resultados, impulsaron al desarrollo y comercialización del dispositivo Coolinside® por la empresa Apeiron Medical.

2.3.2. Características y funcionamiento del dispositivo

Coolinside es un electrodo sencillo de manipulación con un diseño pensado para cumplir dos funciones: coagular y cortar (ver figura 18). Este dispositivo está compuesto por un electrodo redondeado, que para la utilización en éste trabajo experimental, se conectó a un generador de RF CC-1 Cosman Coagulator System (Radionics, Burlington, MA, USA).

Existen un total de 10 variantes del dispositivo; según el grosor del extremo activo (3, 5 y 8 mm), la longitud del dispositivo (modelos largos para cirugía laparoscópica y cortos para cirugía abierta) así como la presencia o ausencia de cuchilla. La figura 19 muestra la diferencia entre un dispositivo laparoscópico y uno para cirugía abierta), ambos con cuchilla.

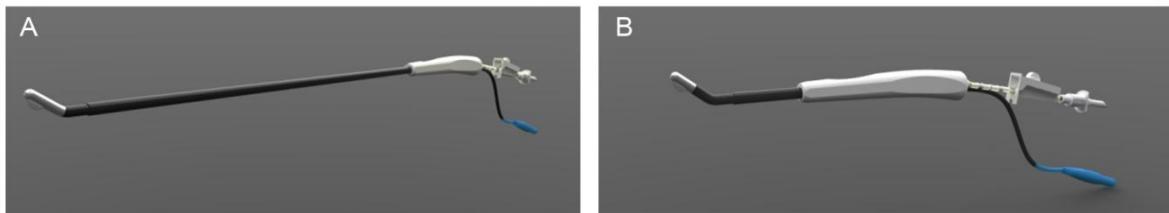


Figura 19 | Representación del Coolinside; dispositivo asistido por RF. (A) Modelo para aplicación laparoscópica y (B) para cirugía abierta.

En general los generadores de RF han sido diseñados para la ablación percutánea de tumores, donde la impedancia oscila siempre entre los 50-300 Ω y cuando sale de este rango el generador se apaga. Sin embargo, en la manipulación quirúrgica con un dispositivo como el Coolinside, la aplicación no es constante, produciéndose un circuito abierto (impedancia infinita) cada vez que el cirujano deja de apoyar el electrodo sobre el tejido. Para evitar esto y facilitar el uso permanente del dispositivo, se diseñó una caja interruptor que sirve de interface

y de control por pedal, al tener una resistencia interna que asegura una impedancia mínima y evita así el apagado del generador, cuando el electrodo deja de estar en contacto con el tejido.

Tal y como indica su nombre, Coolinside se caracteriza por emplazar en su interior un sistema de refrigeración que enfría el extremo activo evitando la carbonización del tejido. Este sistema está compuesto por un conducto por el cual entra salino frío propulsado por una bomba peristáltica (Radionics, Burlington, MA, USA) a 130 mL/min en el extremo activo. El suero en el interior del electrodo se calienta porque toma calor del tejido calentado.

La figura 20 muestra el Generador de RF, la bomba peristáltica que permite la refrigeración interna del Coolinside y la caja interruptor que actúa como interface entre el generador y el dispositivo.

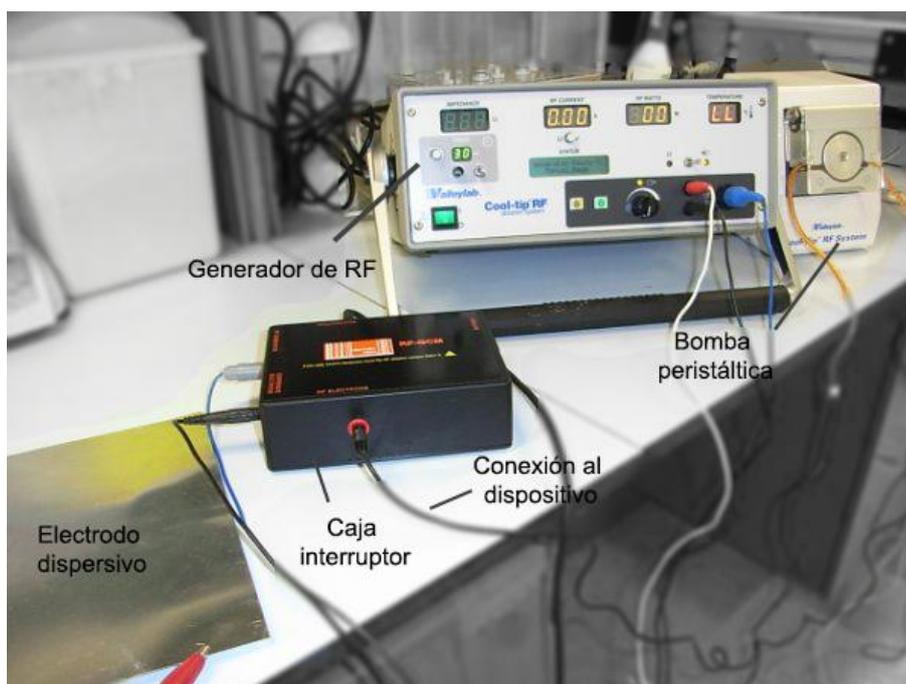


Figura 20 | Conjunto de accesorios del dispositivo Coolinside en experimentación. De izquierda a derecha: Electrodo dispersivo, la caja interruptor que actúa como interface entre el generador y el dispositivo; el generador de RF, y la bomba peristáltica que permite el flujo de salino frío en el interior del dispositivo. El dispositivo se conecta a la caja interruptor y se controla mediante un pedal (no aparece en la imagen).

El extremo activo incorpora una cuchilla de aproximadamente 2,5 mm de profundidad que permite el corte mecánico del tejido una vez coagulado lo que asegura una resección hemostática y segura [223] de acuerdo a los estudios previos realizados.

El diseño del dispositivo se completa por una curvatura en el extremo activo que permite la utilización del dispositivo en 2 posiciones. Una principal para cortar y coagular el parénquima tal y como podemos ver en la figura 21-A, y una posición secundaria útil para el sellado de vasos (ver figura 21-B). Además, su curvatura permite el acceso por trócares en laparoscopia.

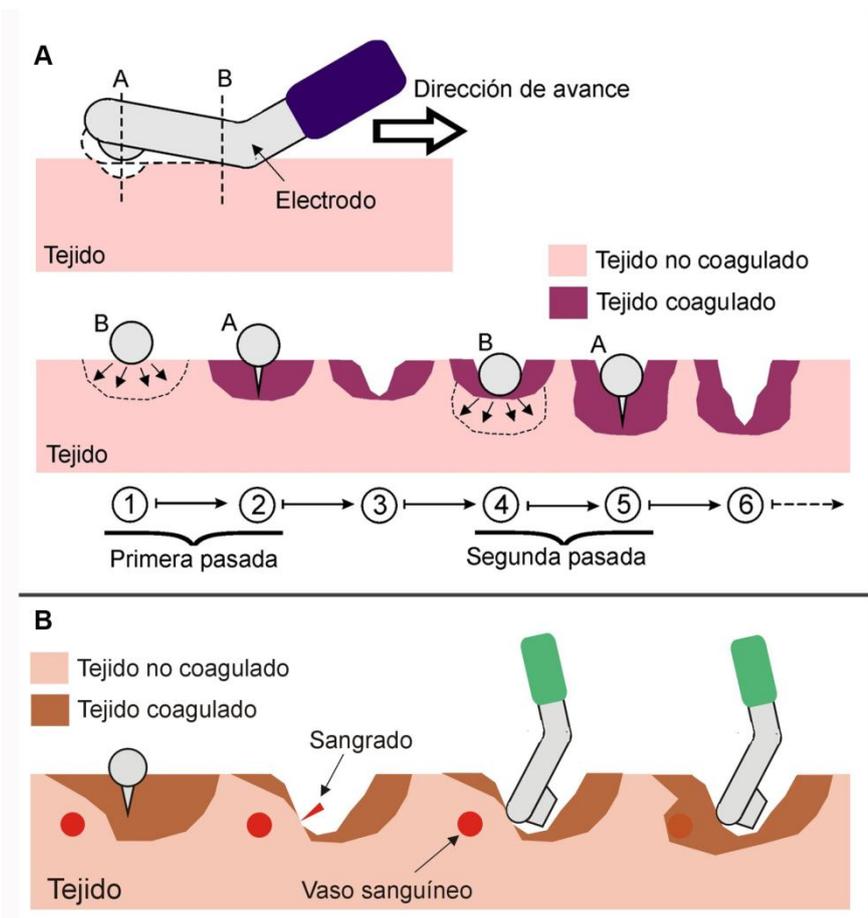


Figura 21 | Representación de la correcta manipulación del Coolinside para conseguir una resección sin hemorragia. (A) Arriba: Plano lateral del electrodo donde se observa la sección distal que incluye la cuchilla (“A”) y la proximal (“B”). A bajo: sección transversal que muestra la aplicación secuencial del dispositivo. (B) Aplicación secundaria para la coagulación de vasos.

2.4 Experiencias de la ablación por RF en el páncreas

Teniendo en cuenta que la mayoría de los pacientes con cáncer de páncreas tienen enfermedad no resecable en el momento del diagnóstico y presentan opciones limitadas de tratamiento, la ablación de tumores por radiofrecuencia (RFA) ha adquirido un gran interés [228].

A pesar de que existen pocas experiencias publicadas en las cuales se utilice la RF para la ablación de tumores pancreáticos, algunos estudios sugieren que la aplicación de RF presenta algunos problemas potenciales relacionados con la anatomía pancreática, la biología de los tumores o particularidades propias de parénquima pancreático. Incluso, algunos autores sugieren que la ablación por RF compromete la viabilidad del conducto biliar, duodeno o el colon por posible lesión térmica y que estas lesiones pueden causar pancreatitis necrótica hemorrágica, fístula pancreática o ascitis pancreática [229, 230]. Wu *et al.* [231] publicaron su experiencia en 16 pacientes con tumores irresecables de la cabeza del páncreas tratados con Cool-tip aplicando temperaturas mayores a los 90°C. Los resultados del artículo muestran una tasa de complicaciones elevada del 43,7%; 3 fístulas pancreáticas, 3 hemorragias masivas gastrointestinales y un fallo renal; todo ello asociado a una tasa de mortalidad del 25% de la cual el 50% equivale a pacientes con tumores localizados en la cabeza del páncreas.

Sin embargo, existen otros autores [232-234] que sugieren que la RFA es un sistema seguro capaz de mejorar la supervivencia en estos pacientes en que no es posible resecar el tumor. Spiliotis *et al.* [235] en un estudio retrospectivo de 25 pacientes con cáncer avanzado de páncreas, 13 pacientes recibieron únicamente tratamiento paliativo mientras que 12 fueron tratados también con RFA. La media de supervivencia global en los pacientes que solo recibieron tratamiento paliativo fue de 13 meses y la máxima supervivencia fue de 30 meses.

En cambio en los pacientes sometidos a RFA la media de supervivencia se estimó en 33 meses ($p=0,0048$). Los índices de complicaciones fueron similares en ambos casos presentando un 25% de complicaciones (fuga biliar transitoria, pneumonia y sepsis por catéter) durante el PO pero en ningún caso mortalidad postoperatoria. Por tanto, el estudio sugiere que la aplicación de RFA en pacientes con cáncer de páncreas en estadio III y IV, puede ser un buen tratamiento paliativo para este tipo de pacientes; ya que permite aumentar su supervivencia.

Estos resultados son similares a los publicados por otros autores [228, 236] con tasas de complicaciones PO similares y ningún caso de mortalidad por hemorragia. Girelli *et al.* [237] en base en los resultados obtenidos en 50 pacientes, sugieren que la RFA es segura con una tasa de complicaciones PO del 24% y tiene buena tolerancia en pacientes con cáncer de páncreas localmente avanzado. A diferencia de Wu *et al.* [231], algunos autores [236, 238] proponen medidas profilácticas a la aplicación de RF, como refrigeración en la zona; para la prevención de complicaciones como la pancreatitis o lesiones térmicas, disminuyendo la tasa de complicaciones hasta el 8% [236].

A parte de la aplicación de RF para la ablación de tumores, la RF también se ha empleado para conseguir el sellado de los ductos pancreáticos primarios y secundarios en la transección pancreática [239, 240]. En este sentido, Truty *et al.* [207] publicaron un estudio randomizado en modelo porcino en el que apuntaban que la RF permite el sellado pancreático en pancreatectomías distales resultando en una disminución del índice de fístula (del 5% vs. 42% en el grupo control) y de otras posibles complicaciones. Hartwig *et al.* [198], mediante el sellado del páncreas remanente de una pancreatectomía distal también en modelo porcino, sugirieron que el Ligasure es un dispositivo seguro para la transección distal del páncreas y que permite el cierre de los conductos pancreáticos con bajos índices de fístula. En línea con estos

estudios, nuestro grupo ha evaluado mediante un estudio comparativo con endograpadora (grupo control) la seguridad y eficacia de la RF (Coolinside®, grupo de RF) en el índice de fístula pancreática tras realizar pancreatectomía distales laparoscópicas en modelo porcino [114, 241]. El estudio se realizó sobre un total de 32 animales a los cuales se les realizó una pancreatectomía distal con un método u otro de manera aleatoria. Durante el estudio se identificó una fístula grado A en el grupo de RF (6,25%) y dos fístulas clínicas grado B en el grupo control (12,5%). En el grupo de RF se observó un aumento de amilasa en suero al 4º día, que se estabilizaba en el PO y el aumento de peso fue mayor que en el grupo control. Histopatológicamente, en la superficie de transección del grupo de RF se observó un patrón común de necrosis coagulativa rodeada de una amplia capa de fibrosis que sellaba el conducto pancreático principal y secundarios. Los resultados sugirieron que la capa de fibrosis producto de la coagulación por RF en el páncreas remanente podía ser tan efectiva como la compresión realizada por la endograpadora para el sellado del ducto principal y secundarios en este tipo de procedimientos en modelo porcino.

A nivel clínico, existen otros estudios que sugieren que la RF permite un buen sellado del páncreas remanente tras una pancreatectomía distal reduciendo significativamente los índices de fístula pancreática [239, 241, 242]. Recientemente, Rostas *et al.* [206] han publicado un estudio retrospectivo en 42 pacientes a los que se les ha realizado una pancreatectomía distal laparoscópica mano-asistida con un dispositivo asistido por RF (Tissuelink®) con índices de fístula pancreática del 9,1% (6,1% fístula grado A y un 3% del grado C).

A pesar de la limitada experiencia en pancreatectomías distales, el número de estudios que han utilizado la RF para el sellado del parénquima pancreático en una transección corporocaudal es aún menor, aunque algunos autores sugieren que la RF es útil en la disección del uncinado [243]. Un ejemplo de ello es Belli *et al.*, [199] que utilizan el Ligasure en una duodenopancreatectomía con hipertensión portal asociada a complicaciones por sangrado

y Nagakawa *et al.* [240] utilizando un electrodo monopolar para el sellado del muñón pancreático aunque aplicando clampaje para el páncreas remanente y coagulándolo a continuación.

Hasta donde sabemos, estos trabajos experimentales y clínicos son los únicos publicados sobre aplicación de RF para la transección y sellado del parénquima pancreático. Lo que demuestra la limitada experiencia previa en pancreatectomías asistidas por RF, y nos impulsa a iniciar nuevos estudios como el que presentamos.

Capítulo 3 | Objetivos e hipótesis

3 | Objetivos e hipótesis

3.1 Objetivo

- El objetivo general de este proyecto es evaluar la capacidad de sellado de un dispositivo asistido por radiofrecuencia en el abandono del remanente pancreático tras una duodenopancreatectomía cefálica sin anastomosis (definida de aquí en adelante como pancreatotomía media) y su impacto en el índice de complicaciones postoperatorias asociadas, concretamente en la pancreatitis y en el índice de fístula pancreática.

Para ello, se proponen dos estudios consecutivos, los cuales tiene diferentes objetivos específicos:

- Evaluar la factibilidad y seguridad, en términos de riesgo de pancreatitis necrótico hemorrágica y fístula pancreática, tras realizar una pancreatotomía media en modelo murino mediante un dispositivo electroquirúrgico asistido por radiofrecuencia.
- Evaluar el efecto térmico producto de la electrocoagulación por RF en el comportamiento histológico (endocrino y exocrino) del páncreas distal a corto y largo plazo tras realizar una pancreatotomía media en modelo porcino.

3.2 Hipótesis

- El efecto térmico producto de la electrocoagulación por RF al realizar una pancreatotomía media con el dispositivo Coolinside, está asociado en modelo murino a índices de fistula pancreática inferiores o iguales al 5% y a bajos índices en modelo porcino.
- El efecto térmico producto de la electrocoagulación por RF y posterior sección del cuello del páncreas en dicho modelo no conlleva pancreatitis necrótico hemorrágica.

Capítulo 4 | Material y métodos

4 | Material y métodos

Para dar respuesta a las hipótesis del estudio, el trabajo realizado se estructura en dos fases:

Fase 1) Estudio sobre modelo murino de los efectos de la aplicación de RF y su respuesta tisular en el páncreas distal.

Fase 2) Traslación de la fase 1 del estudio a modelo porcino, un animal de mayor tamaño similar al modelo real en el paciente y con mayor riesgo de fístula pancreática. Además, a diferencia del páncreas murino que tiene una morfología laminar el páncreas porcino tiene una consistencia mucho mayor que nos permite hacer una transección pancreática más compacta y segura sin riesgo de dejar ductos secundarios no seccionados que faciliten una posterior regeneración pancreática (descrita tras realizar ligadura del páncreas murino [244]). Por ello, en esta segunda fase planteamos evaluar los efectos de la aplicación de RF en el sellado del Wirsung y la respuesta tisular a corto y largo plazo en modelo porcino.

Para facilitar el seguimiento de la metodología empleada y de los resultados obtenidos, el capítulo 3 y 4 seguirán la misma estructura, exponiendo el capítulo de material y métodos así como los resultados por separado para cada una de las fases del estudio.

4.1 Fase 1: Estudio sobre modelo murino

4.1.1 Modelo animal

La fase 1 del estudio se centra en un total de 39 ratas hembras Sprague-Dawley (SD) de 7 semanas de vida (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA, USA). Previo al inicio del estudio, 3 animales fueron empleados para el estudio estructural y anatómico del páncreas de la rata y para asegurar el método quirúrgico.

El estudio fue aprobado por el Comité del Ético de Experimentación Animal (CEEA) del PRBB y por el Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya (FBP-10-1280 y DMAH 5452).

4.1.2 Grupos experimentales

Con el objetivo de analizar la respuesta tisular tras el procedimiento se consideraron 6 grupos experimentales con diferentes PO. En los grupos del 0 al 3 (n=8) se realizó la coagulación por RF y posterior transección del páncreas en la confluencia de la porción duodenal y gastroesplénica (sobre la vena porta); de acuerdo a la nomenclatura establecida por *Richard et al.* [245], así como en un estudio posterior por *Kara et al.* [246] (ver figura 22).

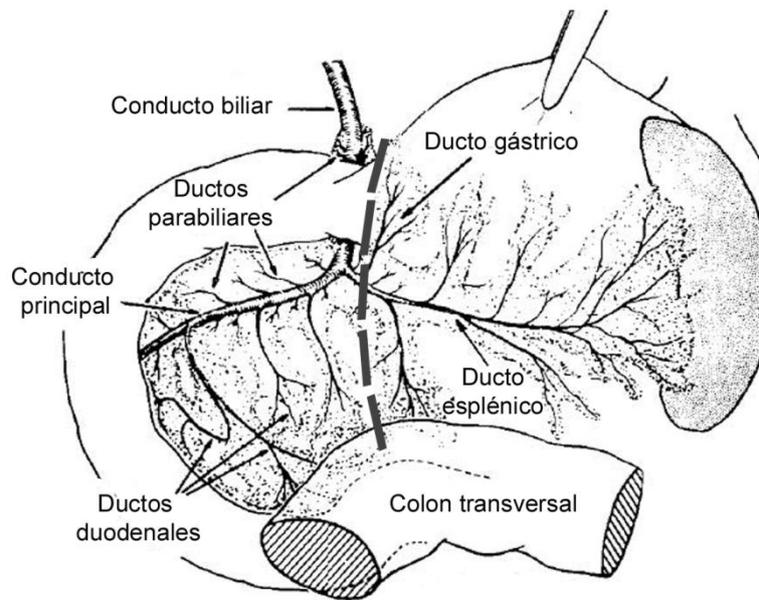


Figura 22 | Esquema anatómico del páncreas de rata. La transección del páncreas asistida por RF se realiza a la altura del conducto biliar y la vena porta (línea discontinua). Ilustración modificada de Richards *et al.* [245].

Se realiza la necropsia de los animales en los días 3, 7, 15 y 21 de postoperatorio, para los grupos del 0 al 3, respectivamente.

Además, con el objetivo de evaluar los posibles cambios histológicos en el páncreas proximal y distal por la disección y manipulación quirúrgica, se consideran dos grupos controles de 15 días de PO: 1) grupo 4 (sham, n=3), que corresponde a los animales sujetos a toda operación excepto la transección pancreática, y 2) el grupo 5 (control, n=4) en que los animales son sometidos únicamente a la manipulación preoperatoria sin procedimiento quirúrgico.

4.1.3 Cuidado preoperatorio

Los animales tuvieron acceso libre a alimento (pienso comercial) y agua ad libitum en condiciones ambientales controladas para evitar al máximo el estrés. Todos los animales

fueron pesados previamente al procedimiento y sedados mediante punción subcutánea con buprenorfina (0,001 mg/kg) 30 minutos antes del procedimiento.

4.1.4 Técnica quirúrgica

La anestesia se realizó con isoflurano al 4% para la inducción y al 2,5% para el mantenimiento en 100% de oxígeno. Se controló el reflejo plantar y paravertebral de los animales antes de iniciar el procedimiento quirúrgico. Además se controló la respiración durante el procedimiento para incrementar la dosis de anestesia en caso necesario.

Todos los procedimientos quirúrgicos fueron realizados por el mismo equipo quirúrgico (R.Q. y F.B.).

Treinta-y-dos animales (grupos 0-3) fueron sometidos a una transección pancreática asistida por RF tal y como se describe a continuación. Inicialmente, se accedió al peritoneo mediante una laparotomía media y se movilizó el estómago, páncreas y el bazo. El bazo fue retraído lateralmente para poder disecar la vena esplénica del parénquima pancreático y evitar así la devascularización del páncreas. A continuación, se realizó la coagulación por RF y posterior transección del páncreas en los animales de los grupos 0-3, en la confluencia de la porción duodenal y la gastrointestinal justo por encima de la vena porta, sin identificar del conducto pancreático. Para ello, se empleó un dispositivo asistido por RF refrigerado internamente; concretamente la versión laparoscópica de 3 mm de diámetro del Coolinside® con cuchilla (Apeiron Medical, Valencia, Spain) descrito en el apartado 2.3 de este trabajo. Tras la transección, el páncreas distal y proximal fueron recolocados en un posición anatómica y se cerró la incisión con doble sutura de ácido poliglicólico (prolene) de 4/0 sin drenaje abdominal. Tras la recuperación anestésica de los animales en una manta eléctrica y mediante luz

infrarroja, los animales fueron alojados en las jaulas tras comprobar la recuperación de los reflejos.

Como control, 3 animales (grupo 4, sham) fueron sometidos a toda la manipulación quirúrgica sin llegar a realizar la transección pancreática, lo que comportó la inducción anestésica, laparotomía, disección y posterior cierre. A diferencia del grupo sham, los animales del grupo 5 no fueron sometidos a ningún procedimiento quirúrgico, simplemente se realizó la manipulación previa.

La coagulación por RF del plano de transección en los animales de los grupos 0-3 consiste en la colocación del electrodo en la confluencia de la porción duodenal y gastroesplénica del páncreas; sobre la vena porta; de acuerdo a la descripción anatómica de Richard *et al.* [245]. A continuación, se realiza una ligera tracción del páncreas para asegurar que existe una distancia mínima de seguridad de 5 mm entre la zona a coagular del páncreas y las estructuras adyacentes para evitar posibles daños térmicos. Se aplicó energía de RF hasta que se observó que la coagulación transversal del tejido era completa y a continuación, se procedió a la transección del páncreas por el centro de la zona tratada con ayuda de la cuchilla del dispositivo, tal y como muestra la figura 23.

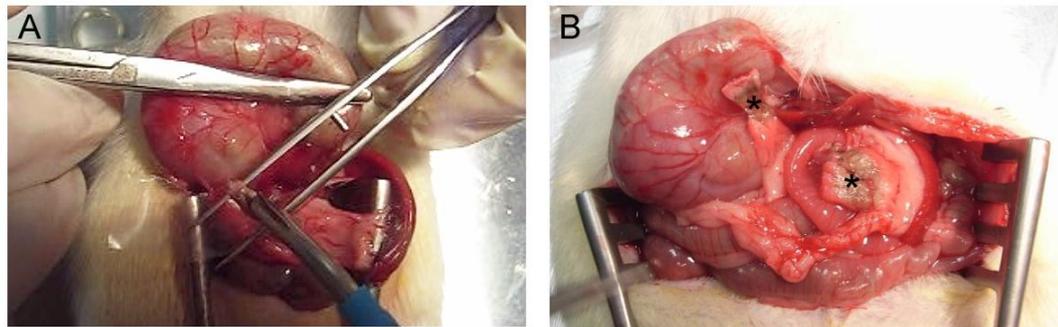


Figura 23 | Aspecto del páncreas durante y posterior a la transección. (A) Fotografía tomada durante la ablación del parénquima pancreático en la confluencia de la porción duodenal y gastroesplénica mediante la cabeza del Coolinside, como en la aplicación para el sellado de vasos. (B) Aspecto del páncreas tras la coagulación por RF y posterior sección. Se observan dos márgenes de coagulación, zonas más oscuras (*) de entre 3 y 5 mm en las dos porciones del páncreas (proximal y distal). A continuación se procede a aplicar RF hasta que se observa que la coagulación de los márgenes de transección es completa.

4.1.5 Postoperatorio y necropsia

Durante el periodo de PO los animales tuvieron libre acceso a comida y agua, la cual durante los tres siguientes días fue tratada con antibiótico (Enrofloxacin, 500 mg/kg). Además del tratamiento de antibiótico en agua bebida, se administró analgesia subcutánea (Buprenorfina, 0,001 mg/kg) cada 12 horas durante los 3 primeros días. Con el objetivo de detectar posibles síntomas de estrés o malestar en los animales durante el postoperatorio, se monitorizó su actividad física, acicalamiento y niveles de alerta de acuerdo a un criterio de punto y final aprobado previamente por el comité ético.

Para poder evaluar posibles signos de pancreatitis, se extrajo sangre de la vena safena tras inducción anestésica (de acuerdo al protocolo descrito previamente) y se evaluaron los niveles de amilasa en suero en el preoperatorio y durante el postoperatorio en los días 3, 7, 15 y 21, según el grupo de estudio.

La eutanasia de los animales se realizó mediante inhalación de CO₂ al 100% de concentración. En la necropsia se realizó la exploración de la cavidad abdominal mediante una

laparotomía lateral y se evaluó la presencia de fístulas pancreáticas, abscesos o fluidos abdominales. Finalmente, se extrajo el páncreas lo más rápido posible y se dividió (en los casos en que hubieran adherencias) en dos secciones, distal y proximal, para realizar el estudio histopatológico.

4.1.6 Estudio histopatológico

Inmediatamente después de la extracción, el páncreas distal y proximal fue fijado en paraformaldehído al 10% durante un máximo de 3 días. Las piezas se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 3 μm que se tiñeron con de hemotoxilina eosina. Durante el análisis histológico se registraron los hallazgos microscópicos como la presencia de necrosis coagulativa, condensación citoplasmática o condensación de la cromatina con formación focal de cuerpos apoptóticos o presencia de abscesos.

En cada animal el páncreas proximal se empleó como control intrasujeto y el grupo 4 (sham) y 5 (control negativo) se emplearon para evaluar posibles diferencias histológicas como resultado de la manipulación quirúrgica y como control entre sujetos, respectivamente.

Del mismo modo que en estudios previos [157, 247, 248], la respuesta apoptótica y la proliferación ductal del páncreas tras la transección fue evaluada mediante análisis inmunohistoquímico (IHC) de caspasa-3 activa (K3) y citoqueratina-7 (Ck7), respectivamente. Además, se realizó una tinción de insulina para analizar la función endocrina en el páncreas distal y el proximal.

El análisis Inmunohistoquímico se realizó tal y como se describe a continuación:

Secciones de 3 µm se fijaron, desparafinaron y rehidrataron en portaobjetos pre-tratados con aminopropilsilano. Tras la recuperación antigénica con citrato sódico al 0,01M y pH 6, se lavaron las preparaciones con TBS x1 y se inhibió la peroxidasa endógena con Peridrol (H₂O₂) al 10% durante 10 min. A continuación, tras 2 lavados con TBS 1x, las preparaciones se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) y albúmina de suero fetal (FBS) al 1% en TBS x1 durante 10 min y se procedió a la incubación del anticuerpo primario o/n a 4°C. Las diluciones de anticuerpos primarios empleados fueron: conejo anti-caspasa-3 (Asp175), dilución 1:1600 (Cell Signalling Technology, Danvers, USA); conejo anti-insulina (C27C9), dilución 1:400 (Cell Signalling Technology, Danvers, STATE, USA) y ratón anti-citoqueratina-7 (RCK105), dilución 1:150 (Santa Cruz Biotechnology, City, CA, USA). Tras lavados en TBS 1x y TBS-Tween 1x, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo/ratón conjugado con avidin-biotin de DAKO (DAKO Real, EnVision, Copenhage Denmark) durante 45 min a temperatura ambiente. Finalmente, las preparaciones se revelaron con cromogen de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB+Cromogen x50, DAKO) y contrateñimos con hematoxilina. A continuación, las muestras fueron nuevamente deshidratadas y montadas en cubreobjetos con PDX.

4.1.7 Variables de estudio

Las variable principales del estudio fueron: (1) la aparición de complicaciones intraoperatorias y postoperatorias como, pancreatitis necrótico hemorrágica y otros parámetros perioperatorios, y (2) los cambios histológicos del páncreas tras la transección asistida por RF de la confluencia de la porción esplénica y gastroduodenal (pancreatotomía media), incluyendo la valoración del páncreas endocrino.

La variable secundaria del estudio fue el índice de POPF asociada a este procedimiento, definida analíticamente por niveles de amilasa tres veces superior al valor normal en suero a partir del tercer día de PO, y macroscópicamente, por la presencia de colecciones o abscesos con alto contenido en amilasa.

Con objeto de poder valorar el funcionamiento del dispositivo de RF en el páncreas, se monitorizaron los parámetros eléctricos mediante el software de Radionics RRT-Graph (Radionics Real-Time Graphics Application) el cual permite registrar la evolución temporal de la potencia, corriente, e impedancia.

4.1.8 Análisis morfométrico

Con el objetivo de cuantificar los cambios histológicos observados en los islotes de Langerhans se realizó un análisis morfométrico de los islotes mediante el software CellB (Cell[^]B image acquisition, Olympus, Tokio, Japón) en secciones del páncreas distal y proximal, tal y cómo has descrito otros autores [249, 250]. Para ello se analizaron 5 áreas al azar para cada región (proximal y distal) en 2-4 animales por grupo experimental. Un total de 501 islotes (con un rango de 20-83 islotes de cada muestra) se examinaron a 100x aumentos y en ellos se midieron: (1) Perfil del diámetro del islote "D" que se calcula a partir del diámetro mayor y menor, "a" y "b"; respectivamente [249], (2) el área media de insulina en μm^2 ; "A" [250], (3) el número de micro y macro isletas en el páncreas proximal y distal, teniendo en cuenta la distinción empírica entre micro islotes (células individuales o agrupaciones de células con un área menor a $1000 \mu\text{m}^2$) y macro islotes (con un área mayor) [250].

Además, con el objetivo de cuantificar el número células positivas para caspasa-3 activa y el área de expresión de citoqueratina-7, se emplearon cortes consecutivos que fueron analizados

mediante el software de tratamiento de imágenes ImageJ (v1.48m software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>)). Para el análisis cuantitativo de K3 y Ck7 se escogieron 5 secciones al azar tal y como se detalla en el análisis morfométrico previo. El número de células positivas para caspasa-3 activa se detecta al aplicar una “máscara” a la imagen que permite separar la señal del fondo y definiendo criterios de circularidad a los objetos a detectar [158, 251]. Para el análisis de Ck7 se aplicó el mismo procedimiento pero sin aplicar criterio esfericidad, simplemente de tamaño. Los datos cuantitativos son exportados a un software estadístico para su posterior análisis.

4.1.9 Análisis estadístico

Para calcular el tamaño muestral, se consideró como variable principal del estudio la aparición/o no aparición de fístula pancreática; una estimación descriptiva de una variable dicotómica; por lo que se consideró un estudio de cohorte y calculamos el tamaño muestral mediante esta expresión [252]:

$$n = \frac{z_{\alpha/2}^2 \cdot p \cdot q}{FE^2} \quad (4)$$

Considerando el estudio randomizado publicado por Tran [55] en que el índice de fístula pancreática tras la anastomosis yeyunal es del 5%, consideramos una proporción de fístulas (p) del 5%, (p=0,05 y q=1-p=0,95).

El error alfa (α) será del 0,05% al considerar un intervalo de confianza del 95%, por tanto tenemos un valor de $Z_{\alpha/2}=0,025 = 1,96$.

El factor de error (FE), definido como la precisión con la que estimamos una proporción, del estudio limita en este caso el tamaño muestral del estudio. Aplicando la fórmula anterior (4) y considerando un FE del 8% para este estudio preliminar, el tamaño de la muestra es de 28 animales para animales operados. Este cálculo no considera el tamaño muestral para los grupos control.

Los resultados se presentan como la media y desviación estándar. Los resultados principales se han comparado y correlacionado entre grupos. Para ello, se emplea Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de las muestras y Levene para evaluar la igualdad. Según el tipo de datos, se emplea el test de Friedman, U de Mann-Whitney U test, Kruskal Wallis o ANOVA para comparar los valores. Además, realizamos ajustes a modelos de regresión lineal simples y de regresión logística con el fin de determinar el mejor ajuste de la respuesta apoptótica. La bondad de ajuste del modelo se determina por el coeficiente de correlación de Pearson (r), que se detalla cuando el resultado es significativo. Se consideran diferencias significativas cuando $p < 0,05$. El análisis estadístico se realiza con el SPSS (SPSS versión 19,0, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

4.2 Fase 2: Estudio sobre modelo porcino

4.2.1 Modelo animal

La fase 2 del estudio se realizó en 13 cerdos Landrace obtenidos del servicio de granjas y campos Experimentales de la Facultad de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) y de 25 kg aprox. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA 1256) de la UAB y por el Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya.

4.2.2 Grupos Experimentales

Teniendo en cuenta que el objetivo de la fase 2 en modelo porcino era valorar la capacidad de la electrocoagulación por RF para sellar el conducto de Wirsung y los conductos secundarios así como la respuesta tisular del páncreas, se plantearon dos grupos experimentales con diferentes periodos de postoperatorio. Así, ambos grupos fueron sometidos al mismo procedimiento quirúrgico y la única diferencia residió en la supervivencia de los animales: 1 mes en el grupo “Exp 1 mes” (n=8) y 6 meses para el grupo “Exp 6 meses” (n=5). Además, con el objetivo de valorar cambios histológicos en el páncreas entre animales intervenidos y sanos se incluyeron en el estudio especímenes de páncreas sanos. En concreto páncreas de cerdos de 40 kg (grupo “Control 1 mes”, n=4) y de 120 kg (grupo “Control 6 meses”, n=6). Los especímenes de páncreas de cerdos de 40 kg procedieron de la Universitat Autònoma de Barcelona, y los especímenes de páncreas de animales de 120 kg se obtienen del Banc de Teixits Animals de Catalunya (Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la UAB).

4.2.3 Cuidado preoperatorio

Todo el cuidado preoperatorio, así como el procedimiento anestésico, se realizó por un equipo veterinario cualificado.

Previo al procedimiento anestésico se dejó a los animales en ayuno de 12 horas, permitiendo libre acceso al agua. Todos los animales fueron pesados antes de la anestesia, y una vez sedados, se realizó una extracción de sangre con el fin de realizar el análisis bioquímico de las variables de interés. Las muestras de sangre fueron recogidas y se almacenó el plasma en frío para su posterior análisis.

Se empleó una combinación de azaperona (4-8 mg/Kg, IM) y ketamina (10 mg/kg, IM) en la corralina como sedación inicial. Una vez el animal estaba tranquilo, se trasladó al prequirófano para colocar un catéter periférico de 20-22G en la vena auricular. Posteriormente, se administró morfina 0,2 mg/kg IM y meloxicam 0,2 mg/kg IV; como tratamiento analgésico y amoxicilina LA, 22 mg/kg IM como antibioterapia profiláctica.

La inducción se realiza con propofol (4 mg/kg, IV) y diazepam (0,5 mg/kg ,IV), hasta la pérdida de los reflejos, momento en que se intubó el animal y se mantuvo la anestesia con isoflurano 1,5 - 2% y oxígeno al 100%. Durante todo el procedimiento anestésico se mantiene fluidoterapia de mantenimiento con Ringer Lactato (10 mL/kg/h) y se controlaron los principales parámetros cardiovasculares y respiratorios (frecuencia cardíaca, presión arterial, ECG, SpO₂, ETCO₂, frecuencia respiratoria y temperatura).

Los animales fueron asegurados en posición supina sobre la mesa de operaciones y se aplicaron paños estériles después de una preparación de betadine sobre el abdomen.

4.2.4 Técnica quirúrgica

Todos los procedimientos fueron realizados por el mismo equipo quirúrgico en condiciones estériles (F.B., A.A., R.Q.). Para acceder a la cavidad intraabdominal, se realizó una laparotomía media con electrobisturí que se extendía desde el xifoideas hasta el ombligo, aunque con la curva de aprendizaje en la técnica la incisión fue menor. Tras la exploración y localización de las estructuras principales, se realizó una disección del cuello del páncreas sobre la vena portal usando tijeras y pinzas endoscópicas convencionales. De acuerdo con un estudio previo de la anatomía del páncreas [253], el conducto pancreático principal recorre el cuerpo y la cola del páncreas en el cerdo mediante dos ductos que convergen en la cabeza formando un conducto pancreático principal común: uno por encima de la vena porta (anteroportal) y otro por debajo de esta estructura (retroportal). Esto significa que con el fin de lograr una obstrucción completa de la parte distal (cuerpo y cola) del páncreas ambos conductos fueron seccionados y sellados (ver figura 24). La sección pancreática mantenía la vascularización del lóbulo izquierdo y derecho del páncreas, y durante la sección transversal no se identificó ni suturó el conducto pancreático principal y/o secundarios. Tras reposicionar anatómicamente el páncreas distal y proximal, se colocó un drenaje de silicona Blake (Ethicon, Somerville, NJ, USA) adyacente al páncreas distal y se extrajo del abdomen del animal a través de un orificio menor de 10 mm. El extremo proximal se tunelizó subcutáneamente a la espalda del animal conectándose a un depósito. Todas las heridas se cerraron de manera estándar. A los animales se les permitió despertar de la anestesia y fueron extubados cuando estuvo clínicamente indicado.

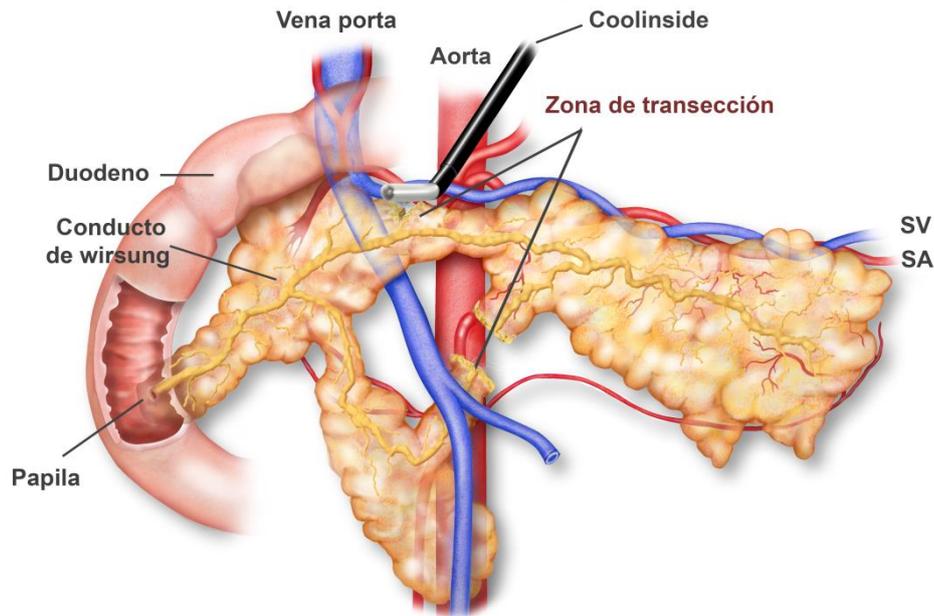


Figura 24 | Esquema anatómico del páncreas del cerdo. La transección se realizó a altura de la vena porta para ambas porciones pancreáticas; retro y anteroportal, manteniendo la vascularización del lóbulo izquierdo y derecho del páncreas.

4.2.5 Postoperatorio y necropsia

Durante todo el postoperatorio, los animales estuvieron bajo control veterinario y del personal del centro usuario así como por los responsables del estudio, los cuales aplicaron protocolos de supervisión para identificar cualquier signo clínico de malestar o estrés. En los 7 primeros días, los animales fueron controlados dos veces al día con el fin de identificar sintomatología sospechosa de fuga o sépsis pancreática, además se controló la ingesta, el débito y el estado de los drenajes abdominales. Durante los 3 primeros días se administró antibioterapia, amoxicilina (20 mg/kg IM, cada 24 h); y analgésicos, en concreto un parche de fentanilo (100 mcg/h) en la zona lumbar del animal y meloxicam (0,1 mg/kg IM cada 24 horas, durante 3 días).

En el postoperatorio inmediato (4 h después de la cirugía), al 3º y 7º día se extrajeron muestras sanguíneas y líquido del drenaje para su análisis. El drenaje se retiró entre el 3º y el 7º día según dejase de salir líquido. Asimismo, se controlaron los niveles de amilasa y glucosa en suero a día 7, 15 y 21 de PO y pre-necropsia, al mes y a los 6 meses para el grupo 1 y 2, respectivamente.

Cuatro semanas después del procedimiento inicial (para el grupo 1) o 6 meses después de la cirugía (para el grupo 2) los animales fueron anestesiados de nuevo, intubados, y ventilados como descrito anteriormente. Se realizó a continuación una laparotomía exploratoria y se evaluó la cavidad abdominal para identificar adherencias, colecciones o abscesos, así como líquido libre.

Durante dicha exploración, se disecó y extrajo el páncreas proximal y distal, el cual fue evaluado macroscópicamente para identificar posibles zonas de coagulación o necrosis. A continuación las piezas se fijaron en formol al 10% para el posterior análisis histopatológico.

Tras la extracción de las piezas los animales se sacrificaron mediante sobredosis de pentobarbital sódico a una concentración de 200 mg/mL (200 mg/kg).

4.2.6 Estudio histopatológico

Tras la fijación de las piezas en formol durante 3-7 días, éstas se procesaron tal y como se describe en el apartado 4.1.6. Durante el análisis histológico, también se registró la presencia de necrosis coagulativa, condensación citoplasmática y condensación de la cromatina con formación focal de cuerpos apoptóticos o presencia de abscesos, tal y como se ha realizado con el modelo murino, además de cualquier otro hallazgo micro y macroscópico. Tal y como sucede en la fase 1 del estudio, el páncreas proximal actuó como control intrasujeto del páncreas distal.

El análisis histológico se centró en tinciones hematoxilina eosina y en el mismo análisis inmunohistoquímico que en fase 1: caspasa-3 activa (K3) para determinar la actividad apoptótica en el tejido y citoqueratina-7 (Ck7) como marcador ductal, y de insulina para analizar la función endocrina en el páncreas distal y el proximal. El protocolo corresponde con el descrito en el apartado 4.1.6, pero con diluciones diferentes a las descritas anteriormente. Las diluciones de anticuerpos primarios empleados fueron: conejo anti-caspasa-3 (Asp175), dilución 1:1600 (Cell Signalling Technology, Danvers, USA); conejo anti-insulina (C27C9), dilución 1:400 (Cell Signalling Technology, Danvers, STATE, USA) y ratón anti-citoqueratina-7 (RCK105), dilución 1:120 (Santa Cruz Biotechnology, City, CA, USA).

Además, con el objetivo de visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I que forman el tejido conectivo interlobulillar en el páncreas distal, se realizó la tinción Tricrómica de Masson en las preparaciones más representativas. Mediante la utilización de hematoxilina férrica, solución de escarlata de biebrich-fucsina ácida y solución de ácido fosfomolibdico-ácido fosfotúngstico, la Tinción de Masson permite identificar el núcleo celular con coloración lila-marrón, el citoplasma con un color rosa-rojo y las fibras de colágeno que adoptan un tono azulado.

Para la tinción Tricrómica de Masson se obtuvieron secciones de 3 μm las cuales se fijaron, desparafinaron, rehidrataron en portaobjetos pre-tratados con aminopropilsilano. A continuación se realizó la tinción con hematoxilina férrica (10 min) y tras un lavado con agua destilada, se aplicó solución escarlata-fucsina ácida (1%) durante 2-5 min. Tras lavar el exceso con agua destilada, se realizó el tratamiento con solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico (5%) durante 15 min y se aplicó el mismo tiempo el azul de anilina. Finalmente se lavaron las muestras con agua destilada, se aplicó ácido acético (1%) durante 3-5 min, se deshidrataron y montaron con PDX.

4.2.7 Variables de estudio

Las variables principales del estudio fueron: (1) de forma similar a la Fase I los cambios histológicos endocrinos y exocrinos del páncreas a corto y también a largo plazo, tras la transección asistida por RF a altura de la vena porta en modelo porcino, (2) así como la aparición de posibles complicaciones.

La variable secundaria del estudio fue evaluar el índice de fístula pancreática (POPF) asociada a este procedimiento en un modelo experimental de mayor tamaño.

4.2.8 Análisis cuantitativo

Con el objetivo de cuantificar posibles cambios en la expresión de citoqueratina-7 e insulina en el páncreas tras el procedimiento, se realizó la adquisición automática de expresión con el microscopio Leica modelo DMI-6000B (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany) mediante el software Micro-manager (Micro-manager, MM studio versión 1.4.16, University of California, San Francisco 2010, www.micro-manager.org). Para ello, se utilizaron las preparaciones de citoqueratina-7 e insulina en 3 zonas de la glándula pancreática, una zona proximal (Proximal, P) situada a 4 cm de la zona de transección, y dos zonas del páncreas distal para cada animal. Para poder identificar posibles variaciones en el páncreas distal, y teniendo en cuenta los cambios histológicos observados, se consideró un corte cercano a la transección, en concreto, a 1-2 cm de la zona de transección (D1), y otro justo antes de la cola (D2) como referencia anatómica (ver figura 25-A). Las preparaciones utilizadas para tinción inmunohistoquímica en las diferentes zonas de análisis; proximal, D1 y D2; son consecutivas.

La cuantificación del área de expresión para cada anticuerpo se realizó mediante una macroinstrucción (macro) en código FIJI (una distribución de ImageJ, <http://fiji.sc/Fiji>) y desarrollada en colaboración con Dr. Raúl Gómez Riera del Departamento de análisis y procesamiento de imágenes (Unidades de microscopia óptica avanzada del Centro de Regulación Genómica, Barcelona). El análisis de imagen se hizo de manera semi-automática tras establecer los valores de umbral de color para cada preparación y evitar así posibles errores de segmentación por la variabilidad de intensidad de color entre preparaciones.

Inicialmente, se calibró la imagen y se aplicó un filtro de desenfoque Gaussiano con valor de sigma 3, el cual se caracteriza por aplicar una ecuación de convolución de la función de Gauss para cada pixel con un valor de corte sigma que hemos establecido empíricamente en 3 con objeto de no perder tanta definición en la detección de partículas. A continuación, realizamos un ajuste de contraste automático para cada canal (RGB) con el objetivo de mejorar el contraste del fondo con la región de interés (ROI; en éste caso concreto insulina) y evitar así posibles variaciones de color durante la adquisición. Después, establecimos de manera empírica el umbral de color, (matiz, saturación y brillo) que se aplicaron a todas las fotos de la misma adquisición. Una vez definidos estos parámetros los utilizamos para la segmentación de la imagen mediante el "Método del valor umbral"; un conjunto de algoritmos cuya finalidad es segmentar gráficos rasterizados, es decir separar los objetos de una imagen que nos interesen del resto. Para el análisis de partículas, aplicamos un algoritmo de clasificación el cual selecciona las regiones de interés con un área mayor a $5 \mu\text{m}^2$, un parámetro definido para captar células y no posibles artefactos que aún residan en la imagen. La macro procesa de manera automática las fotografías y nos proporciona un resumen de los resultados de la adquisición (ver anexo 1-A). Generamos además un gestor de ROIs, el cual almacena las regiones de interés para cada análisis y nos permite revisar la segmentación para cada imagen

analizada. La figura 25-B resume de manera esquemática los pasos de la segmentación, así como el gestor de ROIs.

Para el análisis cuantitativo de insulina, se consideraron como variables de estudio el área de expresión (μm^2) y el tamaño medio de los islotes (μm^2). La citada macro también da como resultado el porcentaje de área equivalente (%), pero es un parámetro que no se ha considerado ni el análisis de citoqueratina-7 ni en el de insulina. Para el análisis cuantitativo de citoqueratina-7 se consideró como variable de interés el área de expresión (μm^2), la cual será analizada en adelante.

En algunas preparaciones de insulina en las que la tinción del anticuerpo era mucho más intensa, se decidió no aplicar el filtro Gaussiano, ya que al aplicar la ecuación de convolución la saturación del color aumentaba y eso dificultaba la segmentación correcta por color. Los resultados obtenidos del análisis de las preparaciones sin aplicar el filtro, no se consideraron para evaluar la variable tamaño medio de los islotes, ya que en la segmentación sin filtro un islote morfológicamente más irregular podía ser detectado como varios islotes más pequeños y esto comportaría una reducción del tamaño medio del islote equivocada. Sin embargo, el área de expresión de insulina no variaba al aplicar o no el filtro, por lo que se consideraron todas las preparaciones para evaluar el comportamiento de dicha variable.

Con el objetivo de cuantificar el área de la sección pancreática transversal sobre la que se ha hecho la adquisición para cada zona y animal, se utilizó el software de tratamiento de imagen 3D-DOCTOR (Able Software Corp, Lexington, MA, USA). Para ello se adquirieron fotografías macroscópicas de toda la preparación y tras calibrar la imagen se realizó una segmentación manual para obtener el área total de la sección. En base a las preparaciones de citoqueratina-7, se realizó una segunda segmentación manual en la que se consideró el área que macroscópicamente expresa citoqueratina-7 como área de parénquima pancreático, En esta

segmentación se excluyó el tejido conectivo de la cápsula pancreática, el área contenida en ductos de diámetro máximo 1 mm, así como infiltración de tejido adiposo interlobulillar. La figura 25-C resume la metodología empleada, así como las dos mediciones consideradas en el sección pancreática (área total y área de parénquima pancreático).

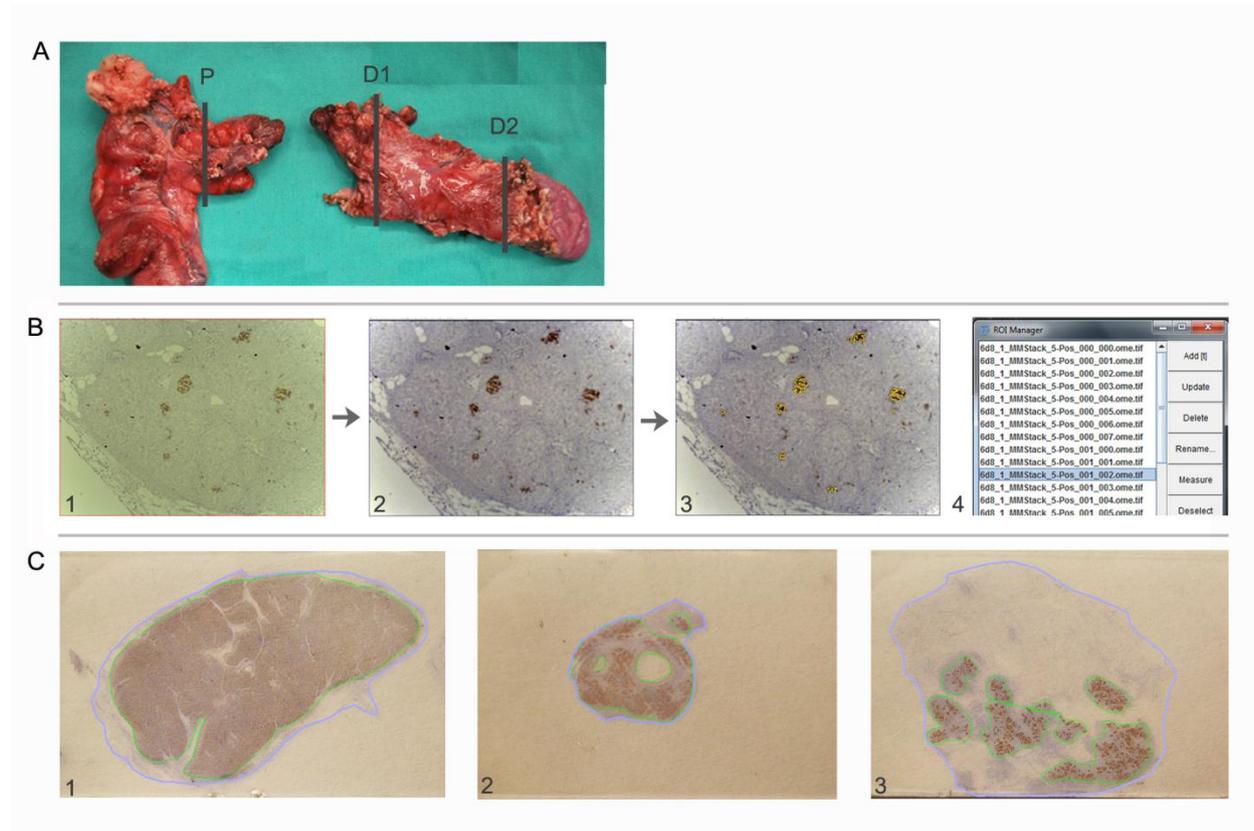


Figura 25 | Esquema representativo de la metodología aplicada en la cuantificación. (A) Fotografía de un páncreas tras la necropsia y zonas sobre las cuales se ha realizado la cuantificación, "P" proximal, "D1" distal cercano a la transección entre 1-2 cm de la zona de coagulación y "D2" distal alejado de la transección; delante de la cola. (B) Cuantificación de insulina con el software Micro-manager: Aspecto de la imagen tras la adquisición (B-1), aplicación de contraste automático (B-2) y segmentación de la región de interés (amarillo, B-3). Gestor de ROIs (B-4). (C) Estudio del área de parénquima con el software 3D-DOCTOR para preparaciones "P" (C-1), "D1" (C-2) y "D2" (C-3) de 6 meses de PO. El color azul indica el perímetro del área total y el color verde el área de parénquima pancreático excluyendo el tejido conectivo y el tejido adiposo así como dilataciones ductales.

4.2.9 Análisis estadístico

Se consideraron 2 grupos, uno de 1 mes de PO ($n_1=8$) y un segundo grupo de 6 meses de PO ($n_2=5$).

Los resultados de la fase 2 se analizaron estadísticamente igual que los de fase 1 y los resultados son presentados como media y desviación estándar. Para ello se empleó el test de Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de las muestras y el test de Levene para evaluar la igualdad. Según el tipo de datos se empleó el test de Friedman, U de Mann-Whitney U test, Kruskal Wallis o ANOVA para comparar los valores. Se consideraron diferencias significativas cuando $p<0,05$. El análisis estadístico se realiza con el SPSS (SPSS versión 19,0, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Capítulo 5 | Resultados

5 | Resultados

Los resultados se exponen siguiendo la misma estructura descrita en el capítulo 4, es decir, primero los relativos a la fase 1 del estudio y a continuación los de la fase 2.

5.1 Fase 1: Estudio sobre modelo murino

5.1.1 Estudios de supervivencia

No se observaron desviaciones respecto el protocolo, ni se dieron complicaciones intraoperatorias o muertes. Todos los animales toleraron correctamente la cirugía y mostraron una rápida recuperación. Durante el postoperatorio los animales no mostraron signos de dolor o enfermedad, aunque algunos animales durante el postoperatorio inmediato sí mostraron síntomas de estrés o molestia, cómo el pelo erizado o la falta de acicalamiento, lo cual fue considerado normal en el contexto postoperatorio.

Durante el postoperatorio los animales se mostraron activos y sin sintomatología de enfermedad pancreática o dolor abdominal. La tolerancia a la comida y bebida fue buena y presentaron un crecimiento normal de acuerdo al esperado, con una media de peso preoperatorio de $197,9 \pm 19,0$ g y de $251,6 \pm 17,1$ g en el momento de la necropsia (a las 3 semanas) (ver figura 26).

En ningún caso se observaron colecciones con alto contenido de enzimas amilasa o abscesos durante la exploración en la necropsia, ni tampoco se identificaron fístulas pancreáticas.

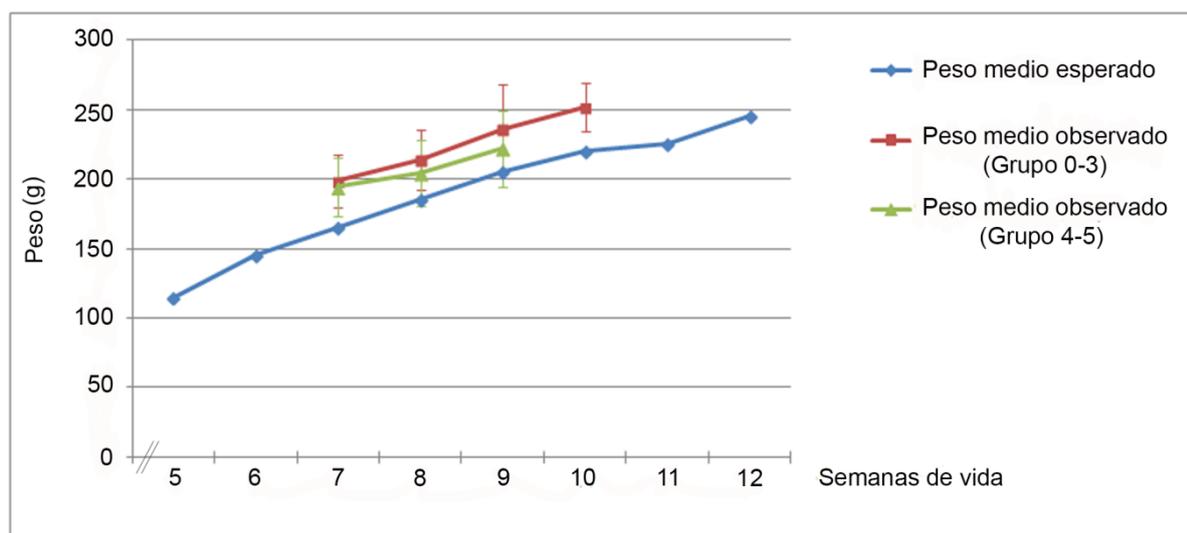


Figura 26 | Curva de crecimiento en modelo murino durante el PO. Representación del peso (g) medio de los grupos sometidos a transección pancreática (Grupo 0-3) y de los animales del grupo sham y control (Grupo 4 y 5) comparada con el crecimiento esperado en hembras Sprague-Dawley durante el PO [254]. No se observaron diferencias significativas del crecimiento observado con el esperado.

5.1.2 Determinación bioquímica

La figura 27 muestra los niveles de amilasa antes y después de la cirugía, al 3er, 7º y 15º día. En la figura se observa un aumento significativo ($p < 0,05$) de los niveles de amilasa sérica al 3er día de PO en los grupos 0-3 respecto a los niveles basales que disminuyó hasta niveles preoperatorios a la semana, y se mantienen bajos a los 21 días de PO (1862 ± 192 U/L). También se observaron diferencias significativas de los niveles de amilasa al 3er día entre los grupos 0-3 y los grupos control 4-5 (ver figura 26). Al representar los niveles séricos de amilasa al 3er día versus sus valores de amilasa sérica preoperatoria, 7 animales (21%) mostraron niveles 3 veces superiores, pero ninguno de ellos presentó complicaciones durante el seguimiento postoperatorio ni se detectaron colecciones abdominales, signos de peritonitis u otras complicaciones durante la necropsia.

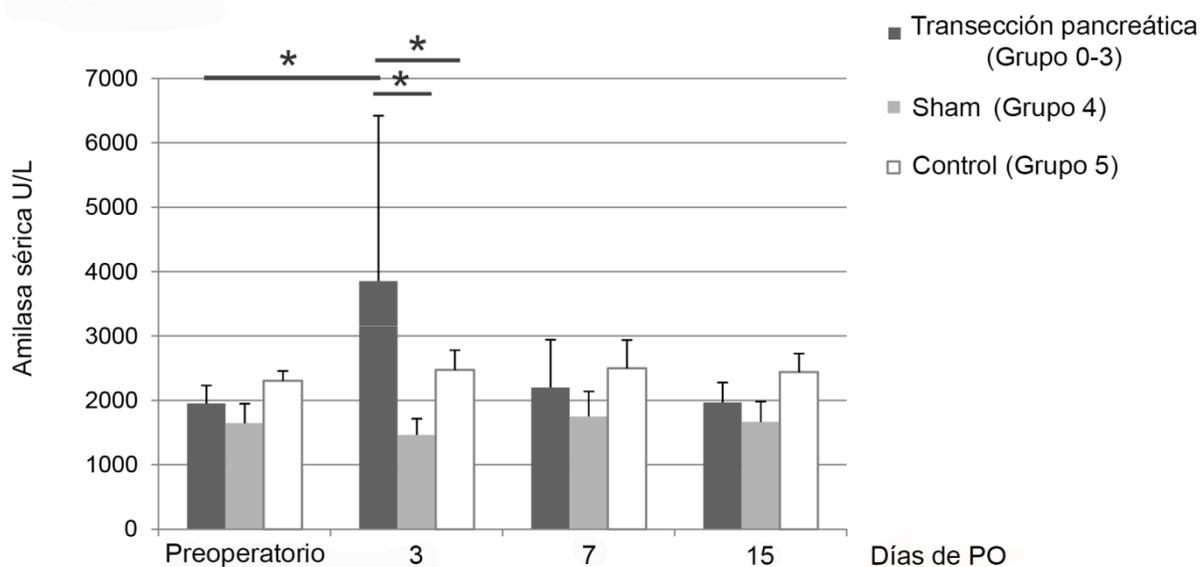


Figura 27 | Niveles de amilasa sérica preoperatoria y postoperatoria según el grupo experimental. Se distingue entre los grupos sometidos a transección pancreática (Grupo 0-3) y los animales del grupo sham y control (Grupo 4 y 5). Existen diferencias significativas (* $p < 0,05$) entre los niveles de amilasa en los animales operados al 3er día con los valores del preoperatorio de los grupos controles y entre los animales operados (Grupo 0-3) y los grupos controles (Grupo 4 y 5) al 3er día.

5.1.3 Análisis histopatológico

Durante el estudio histopatológico de los animales sometidos a la transección asistida por radiofrecuencia se identificaron claramente 3 zonas: (1) el margen de transección, (2) el páncreas proximal y (3) el páncreas distal.

- 1) El margen de transección estaba caracterizado macroscópicamente por una zona deshidratada de coloración amarillenta (ver figura 28) que presentaba un patrón histológico común, basado en una zona central de necrosis coagulativa (Cn) rodeada de infiltrado inflamatorio que varía de acuerdo al día de necropsia. La zona de coagulación térmica observada adquiriría un diámetro máximo de $5 \pm 1,6$ mm y un diámetro mínimo de $2,4 \pm 0,7$ mm para los grupos 0-3.

Al 3er día de cirugía el componente inflamatorio estaba compuesto principalmente por leucocitos polimorfonucleares propios de componente inflamatorio agudo y en algunas zonas se observó puntos de congestión vascular y extravasación. El componente inflamatorio agudo disminuyó a los 15 o 21 días tras la transección (grupo 2 y 3), en los que se identificó un aumento del infiltrado granular compuesto por macrófagos y células multinucleares gigantes. Además se observó un aumento de tejido conjuntivo delimitando la zona de necrosis coagulativa la cual parece reabsorberse (ver figura 28-B)

- 2) No se detectaron cambios en la arquitectura lobulillar del páncreas proximal, con total preservación del tejido endocrino y exocrino (véase figura 29 A-D).
- 3) Se observó una pérdida progresiva de células acinares en el páncreas distal durante el postoperatorio. Al 3er día de PO (grupo 0), el volumen total de los acinos parece haberse reducido con la pérdida de polaridad nuclear y la disminución de zimógeno citoplasmático. También se observaron cuerpos apoptóticos en la mayoría de las unidades acinares (ver figura 29-E).

A la semana de PO (grupo 1) se evidenció la aparición de pseudoductos; estructuras tubulares formadas por células cuboidales las cuales reemplazan prácticamente todo el tejido acinar. Así mismo, el tejido conectivo interlobular parece haberse estrechado acercando más lóbulos adyacentes hasta fusionarse en algún caso (ver figura 29-I).

Posteriormente, a los 15 y 21 días de PO se hizo evidente menos infiltrado inflamatorio, con presencia de algún linfocito y alguna célula plasmática en el margen fibroso, rodeando la zona de necrosis coagulativa. Además, a partir de la 2ª semana de PO se observó aparición de tejido adiposo peripancreático (figuras 29-M, 29-Q) que se hizo más evidente a la 3ª semana.

En los grupos control (Grupos 4 y 5), no se observaron cambios histológicos a nivel exocrino ni endocrino.

Durante el estudio histológico no se evidenció aparición de infiltrado inflamatorio purulento, aunque sí se detectaron 3 micro-abscesos en tres animales distintos; todos ellos con un área menor a $1000 \mu\text{m}^2$; que correspondían a dos casos del grupo 2 y uno del grupo 3. Por tanto, a pesar de estos hallazgos, ante la ausencia de más componente inflamatorio y teniendo en cuenta el buen postoperatorio presentado por todos los animales no se computó como una complicación.

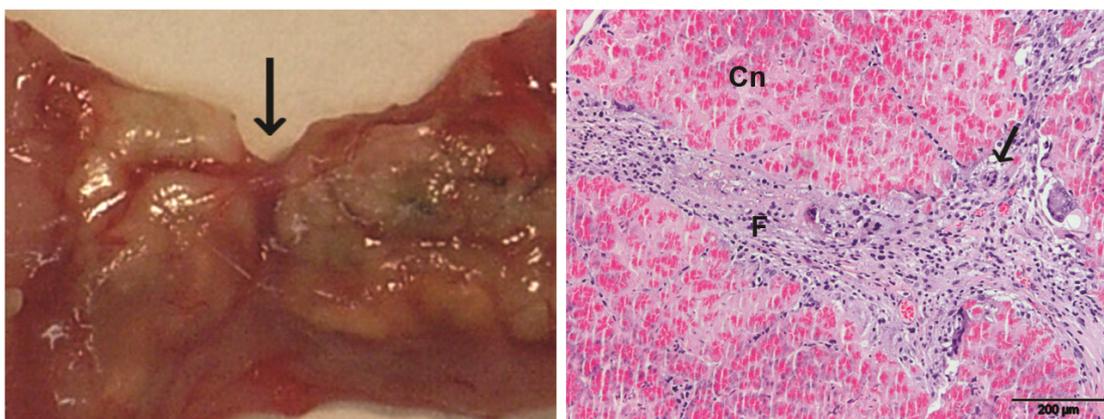


Figura 28 | Área de transección en modelo murino. (A) Fotografía macroscópica. La flecha indica el área de transección, dejando a la izquierda y derecha el margen proximal y distal, respectivamente. (B) Aspecto microscópico del área de transección tras 15 días de PO (Grupo 3). “Cn”, necrosis coagulativa rodeada de leve fibrosis “F” y células gigantes multinucleadas (flecha).

Páncreas distal

Páncreas proximal
(21 días)

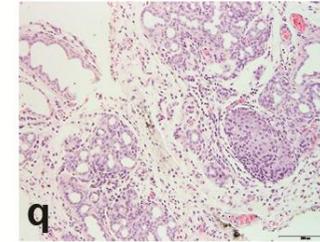
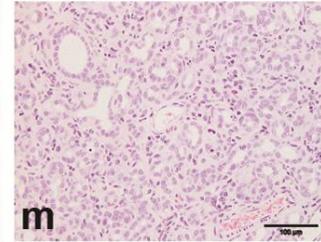
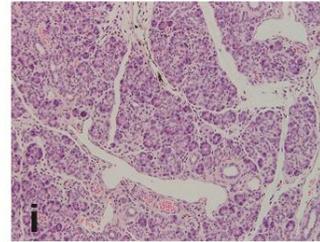
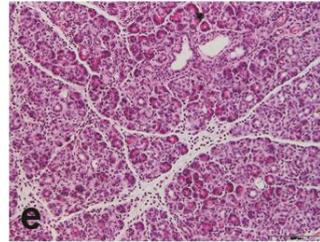
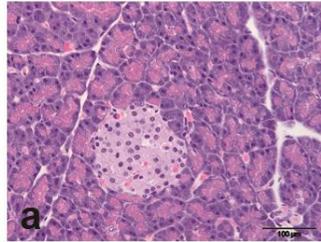
Grupo 0
(3er día)

Grupo 1
(7 días)

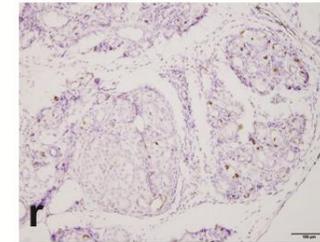
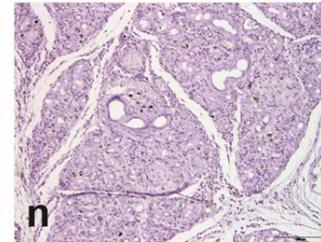
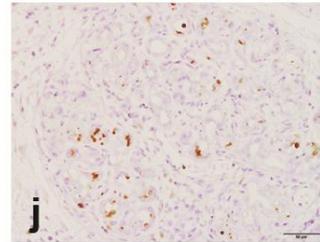
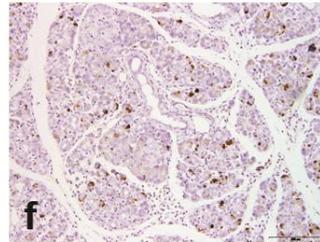
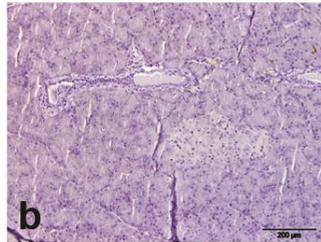
Grupo 2
(15 días)

Grupo 3
(21 días)

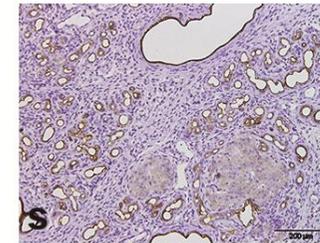
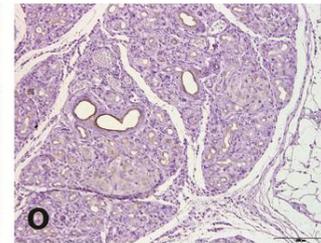
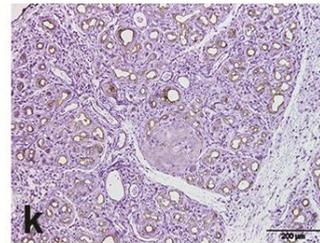
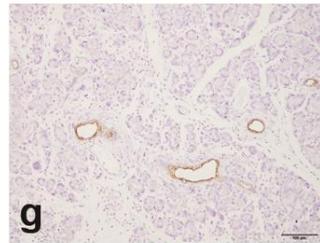
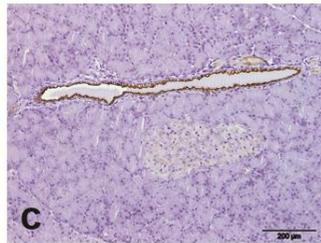
HE



K3



Ck7



I

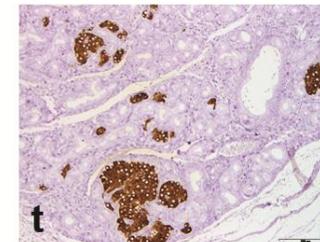
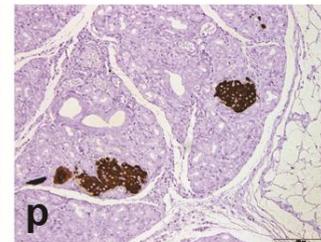
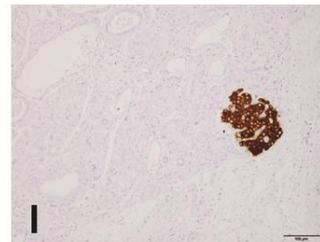
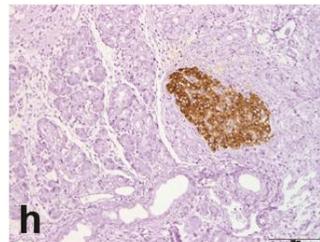
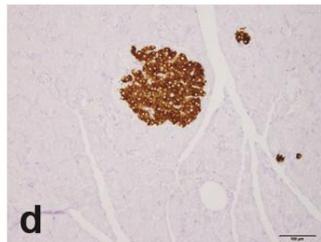


Figura 29 | Tinción de HE e inmunohistoquímica para K3, Ck7 e I. Se identifican tinciones de caspasa-3 (K3), citoqueratina-7 (Ck7) e insulina (I) del páncreas proximal del Grupo 3 (a-d) y páncreas distal del Grupo 0 (e-h), Grupo 1 (i-l), Grupo 2 (m-p) y del Grupo 3 (q-t). La línea K3 muestra una disminución del número de células positivas para la tinción de K3 con el PO, mientras que las estructuras de forma tubular aumentan (tinción positiva para Ck7). La figura muestra como la expresión de I es positiva para todos los grupos. Escala = 200 μ m.

5.1.4 Análisis inmunohistoquímico

El análisis inmunohistoquímico de caspasa-3 activa mostró poca actividad apoptótica en el páncreas proximal de los grupos 0-3, así como en el páncreas distal y proximal de los grupos control (grupo 4 y 5); con presencia de alguna célula positiva. Sin embargo, en el páncreas distal al 3er día de PO se identificó un aumento significativo ($p < 0,05$) de actividad caspasa-3 (ver la figura 29-F). Durante el PO se observó como la expresión de caspasa-3 activa del páncreas distal decrece significativamente hasta niveles basales similares a los del páncreas proximal o los grupos control (figuras 29-J, N y R). El apartado 5.1.5 detalla los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo realizado con el ImageJ.

En el análisis con citoqueratina-7 se observó un aumento de expresión en la pared de los pseudoductos que se hizo evidente en el páncreas distal a la semana de PO y que parece progresivo durante las tres semanas de PO (ver Figura 29-G, K, O, S). Este aumento de expresión correlaciona con la condensación del citoplasma acinar así como con la de cimógeno. También se observaron epitelios ductales positivos para citoqueratina-7 en el páncreas proximal.

No se observaron diferencias en la expresión de insulina para el páncreas proximal, aunque el páncreas distal presentó un aumento significativo de expresión de la insulina. Concretamente, se identificaron pequeñas células positivas aisladas y pequeñas agrupaciones celulares (ver resultados morfométricos en el apartado 5.1.5).

5.1.5 Análisis morfométrico y cuantitativo

Tal y como indica la figura 30, el análisis cuantitativo de caspasa-3 activa en páncreas proximal no muestra diferencias durante el PO. Sin embargo, el número de células positivas en el páncreas distal muestra un aumento de expresión de Caspasa-3 activa al tercer día que disminuye durante el PO. De hecho, el mejor ajuste de mínimos cuadrados para la expresión de Caspasa-3 durante el PO se obtiene con un modelo inverso ($r = 0,77$, $p < 0,05$).

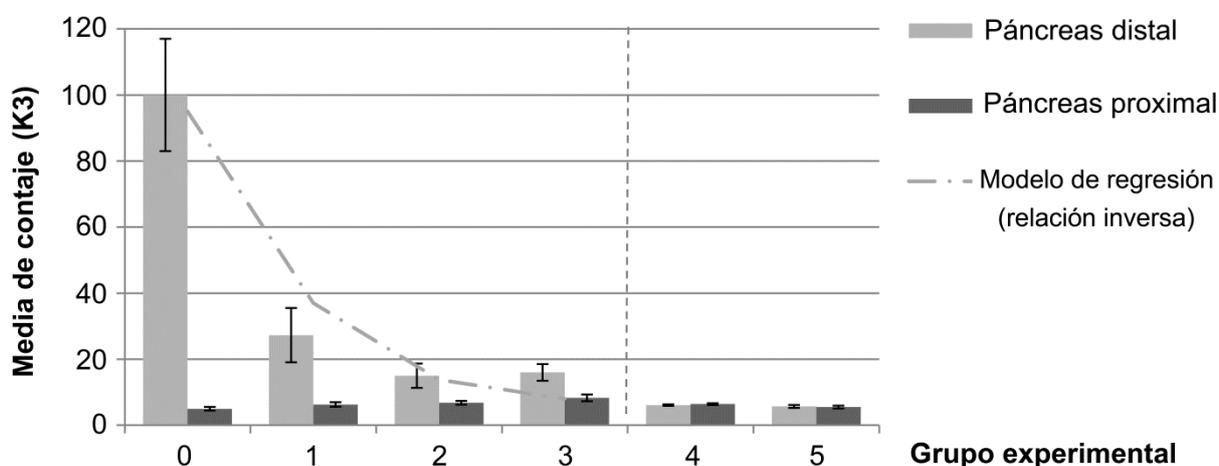


Figura 30 | Contaje de células positivas para caspasa-3 activa en el páncreas proximal y distal. No hay diferencias significativas en la expresión de caspasa-3 activa del páncreas proximal durante el PO, mientras que el páncreas distal se observa una relación no lineal (inversa) entre la expresión de caspasa-3 activa durante el PO (Grupos 0-3). La bondad de ajuste (línea discontinua) es de $r = 0,77$ ($p < 0,05$). Valores expresados como media \pm SD

El análisis cuantitativo de Ck7, tal y como representa la figura 31, destaca un aumento significativo de expresión de citoqueratina en el páncreas distal de los animales operados. La expresión aumentó progresivamente durante el PO hasta la 2^o semana, en la que alcanza la expresión máxima ($p < 0,05$). A la 3^a semana, se observó un descenso de expresión de Ck7 que se asocia al aumento de infiltración de tejido adiposo observada en el análisis de las preparaciones. A diferencia de lo observado en el páncreas distal, el páncreas proximal no

presentó cambios de expresión a lo largo del PO en animales operados ni controles, con los que tampoco se observaron diferencias significativas.

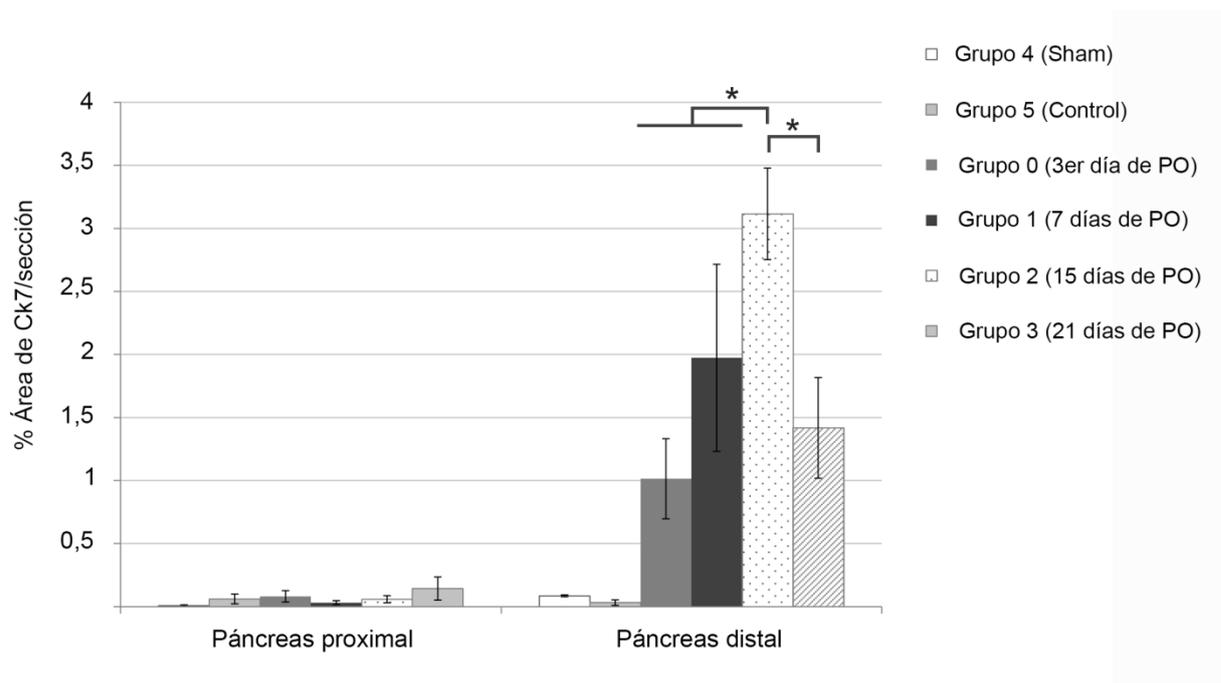


Figura 31 | Análisis cuantitativo de expresión de citoqueratina-7 (Ck7) en el páncreas proximal y distal. La figura muestra un aumento progresivo de expresión de Ck7 en el páncreas distal de los animales operados (Grupo 0-3), que alcanza el máximo de expresión a la 2ª semana (* $p < 0,05$) a partir de la cual se observa un descenso de expresión significativo. El páncreas proximal de los animales operados, así como el distal y proximal de los controles (Grupo 4-5) no presenta ningún cambio.

El tamaño de los islotes del páncreas proximal no presentó diferencias significativas entre grupos. Sin embargo, en el páncreas distal se identificó una disminución significativa ($p < 0,05$) del área media de los islotes y del diámetro medio de los islotes para los grupos 1-3 en comparación con el grupo 0, 4 y 5 (ver Tabla 6). Teniendo en cuenta la distinción entre micro islotes (células individuales o agrupaciones de células con un área menor a $1000 \mu\text{m}^2$) o macro islotes, se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) de hasta 3 veces el número de micro islotes en el páncreas distal de los animales sometidos a transección pancreática (grupos 1-3) en comparación con el grupo 0 y los grupos control 4-5 (ver figura 32).

Tabla 6 | Área media (A) y diámetro medio de islote (D) en las diferentes secciones pancreáticas. Análisis en páncreas proximal (lóbulo duodenal) y páncreas distal (lóbulo esplénico). Valores expresados como media \pm SD. *Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos 1-3 y grupos 0, 4 y 5.

Páncreas		Grupo					
		Control (4)	Sham (5)	0	1	2	3
A (μm^2)	Proximal	640 \pm 164	1805 \pm 558	599 \pm 172	517 \pm 168	1371 \pm 488	1061 \pm 339
	Distal	850 \pm 211	1142 \pm 257	751 \pm 252	320 \pm 117*	339 \pm 88*	452 \pm 158*
D (μm)	Proximal	70 \pm 9	118 \pm 23	69 \pm 10	63 \pm 10	99 \pm 15	88 \pm 17
	Distal	83 \pm 11	94 \pm 13	63 \pm 13	38 \pm 5*	45 \pm 5*	44 \pm 6*

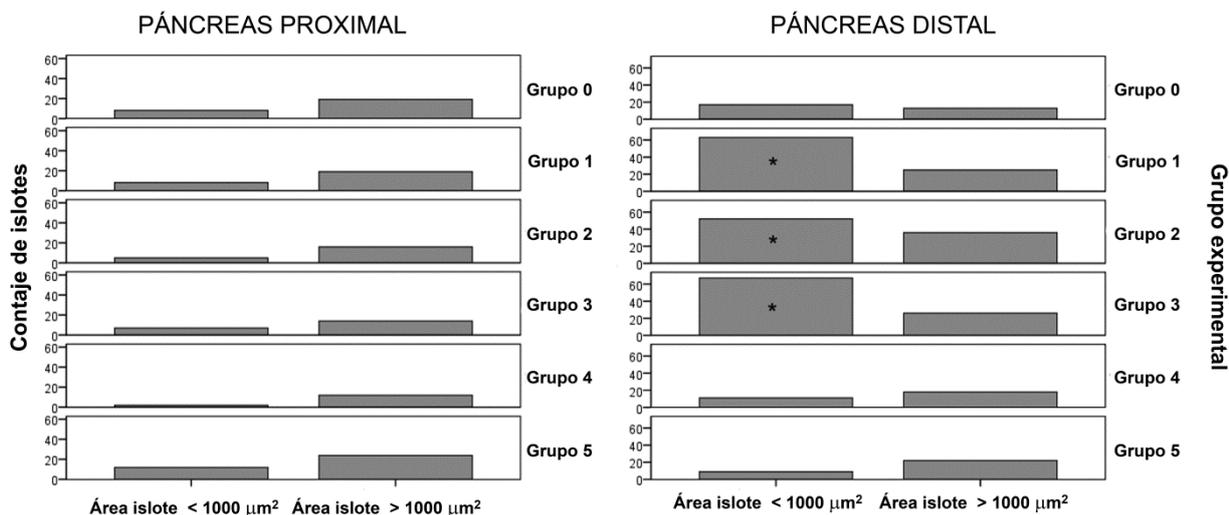


Figura 32 | Contaje celular de micro islotes y macro islotes ($>1000\mu\text{m}^2$). El análisis estadístico muestra un aumento significativo de micro isletas en el páncreas distal de los grupos sometidos a transección pancreática (grupo 1-3) en relación al grupo 0 y los grupos control 4-5. Sin embargo, no se evidencian diferencias significativas entre grupos en el número de islotes del páncreas proximal. * $p < 0,05$.

5.1.6 Análisis técnico del dispositivo

El dispositivo se comporta de acuerdo a lo esperado y es capaz de coagular sin problemas el páncreas de la rata. La coagulación térmica se inicia alrededor del punto de contacto, debido posiblemente a que la tracción que se realiza comporta la reducción de la corriente sanguínea y por tanto la disminución de la impedancia.

A pesar de que la transección del páncreas se realiza con la cuchilla incluida en el propio dispositivo, en algunos casos se emplearon unas tijeras para realizar la transección del parénquima pancreático en medio de la zona coagulada. La cuchilla del dispositivo en ésta aplicación concreta resultó de poca utilidad teniendo en cuenta la consistencia y tamaño del páncreas en la rata.

El tiempo de transección medio fue de 89 ± 50 s durante el cual se aplicó una potencia media de $20,0 \pm 0,6$ W lo que resulta en una media de energía entregada de 320 ± 80 J en cada ablación.

En la figura 33-A se expone la evolución de la potencia administrada (W) en función del tiempo y la figura 33-B representa simultáneamente la potencia y la energía entregada (J) acumulada en un caso concreto en función del tiempo de ablación.

Como se observa en la figura A existen considerables oscilaciones de la potencia a lo largo de la aplicación. Dichas oscilaciones se explican fácilmente por cambios inherentes a la calidad del contacto con el tejido (contacto manual). Globalmente, se observa un ascenso en la potencia administrada hasta el segundo 20 debido al fenómeno de ionización del tejido. A partir de ahí en un segundo contacto, se observa un descenso de la potencia administrada que se correlaciona con el incremento de impedancia inherente a la deshidratación del tejido. Éste

comportamiento se asocia a la ralentización en el incremento de energía acumulada que se observa a partir del segundo 20 en la figura B.

Desde el segundo 28 al 37 existe una interrupción en la deposición energética deliberada tras completar la sección pancreática y una reanudación de la deposición a partir del segundo 37 que corresponde con la coagulación de superficie en remanente distal referida en la metodología. Obsérvese también que en este segundo ciclo de aplicación de la deposición energética se hace a un régimen inferior debido a que la impedancia del contacto es alta (dado que el tejido está fuertemente deshidratado) y el voltaje aplicado es igual que en el primer ciclo de aplicación. Esta ralentización final de la deposición energética tiene también su repercusión en la gráfica B de acumulación energética donde se observa un incremento menor de dicha energía acumulada con respecto al tiempo.

El anexo 1-B recoge todas la gráficas de los animales analizados.

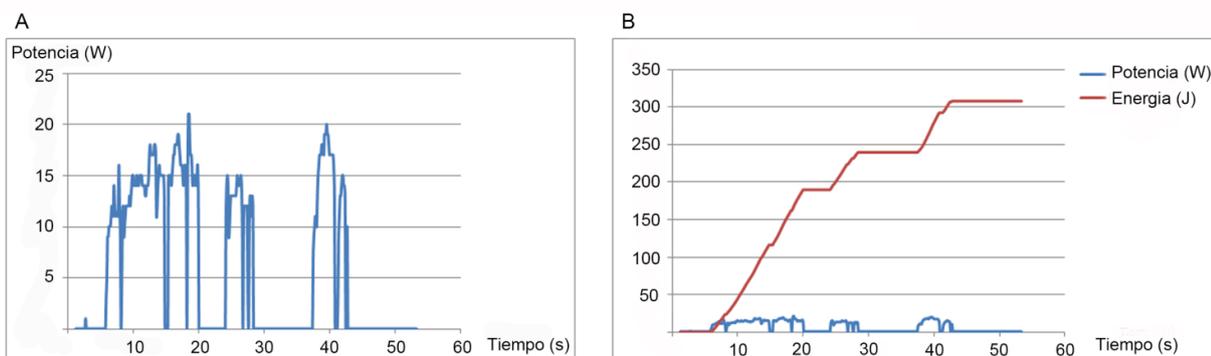


Figura 33 | Representación gráfica del comportamiento eléctrico del dispositivo Coolinside durante la transección pancreática en un caso. (A) Representación de la potencia (W, línea azul) en función del tiempo (s) en la que se diferencian dos momentos diferentes de contacto en el tejido; unos picos iniciales que corresponden a la coagulación casi completa del parénquima pancreático (potencia emitida durante los 8-28 segundos aproximadamente) y una segunda fase (a partir de los 30 segundos) en que se coagula algún punto del margen de transección. (B) Representa la energía entregada (J) en función del tiempo (línea roja) y la potencia (W, línea azul). Nótese que la mayor cantidad de energía entregada se produce durante la fase inicial de la ablación en la que se produce la deshidratación del tejido.

5.2 Fase 2: Estudio sobre modelo porcino

5.2.1 Estudios de supervivencia

En 13 de los animales no se observaron desviaciones respecto el protocolo, ni se dieron complicaciones intraoperatorias graves. No obstante, se produjo una muerte al 3er día de PO por una lesión iatrogénica del colédoco que se detectó durante la necropsia. Éste caso fue desviado del estudio y analizado de manera independiente (apartado 5.2.1.1), por lo que de aquí en adelante se considera un tamaño muestral de 12 animales.

El tiempo medio de transección fue de 5 ± 2 min y el tiempo total de intervención de 60 ± 12 min.

Todos los animales toleraron bien la cirugía y durante el postoperatorio no se observaron signos de dolor o enfermedad importantes, aunque algunos animales durante el postoperatorio inmediato mostraron alguna molestia abdominal considerada normal en el contexto del postoperatorio. Durante el postoperatorio se produjeron algunas complicaciones relativas al cierre de la herida quirúrgica, resultando en 3 hernias abdominales que requirieron de un vendaje compresivo y de una eventración e infección de la herida quirúrgica que requirió de reintervención. Además, se produjeron 3 pequeñas úlceras en la porción superior de la herida debido a la sutura empleada de gliconato (Monosyn®).

Durante el postoperatorio los animales se mostraron activos sin sintomatología de enfermedad pancreática o dolor abdominal importante, con buena tolerancia a la comida y bebida. Los animales presentaron un crecimiento normal respecto a lo esperado, con una media de peso preoperatorio de 26 ± 8 kg y una media de peso pre-necropsia al mes y a los 6 meses de 39 ± 12 kg y 125 ± 14 kg, respectivamente.

5.2.1.1 Caso excluido del estudio por muerte postoperatoria

Durante el control postoperatorio de los animales se detectó la muerte de uno de los animales al 3er día. Conjuntamente con el equipo de veterinarios de la UAB se realizó la necropsia del animal y en la exploración se detectó un abdomen con aspecto normal y poco líquido libre en la cavidad rico en amilasas con concentración de 24013 U/L. El páncreas proximal ofrecía un aspecto preservado así como el páncreas distal el cual tenía un aspecto normal, no edematoso ni desestructurado. La zona de transección mostraba un aspecto necrótico de textura friable. Se identificó un colédoco muy dilatado (figura 34-B) en su desembocadura al duodeno sin presencia de bilis en el intestino, por lo que se sospechó de una colangitis como resultado de iatrogenia del colédoco durante el procedimiento. Además, durante la necropsia, se diseccionó la vesícula biliar y se observó que el conducto cístico no estaba dilatado, a diferencia del colédoco.

Durante el estudio histológico de la pieza se descartó la lesión térmica por contigüidad como posible causa de la iatrogenia, ya que no se observó signos de necrosis coagulativa en el páncreas adyacente al plano de transección (ver figura 34-D). Se identificó una gran presencia bacteriana en el tejido, por lo que se diagnosticó una colangitis como resultado de la iatrogenia del colédoco distal por posible contacto con el dispositivo, pero no por continuidad térmica a la lesión de ablación pancreática ya que la zona de transección está alejada del colédoco.

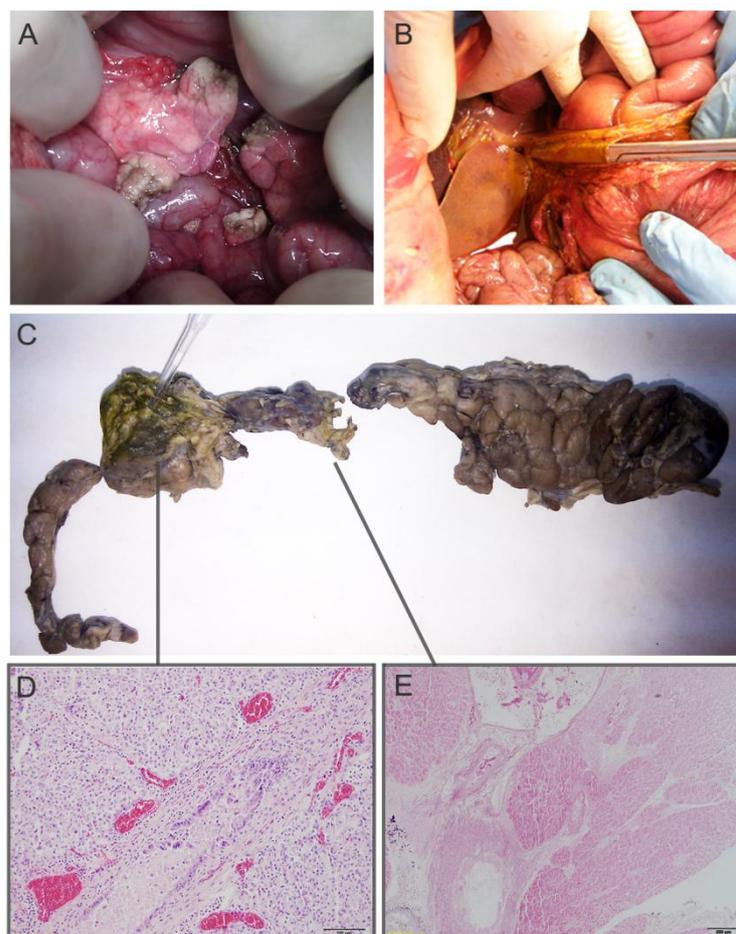


Figura 34 | Fotografías de macroscópicas y microscópicas de animal que falleció al 3er día de PO por una iatrogenia del colédoco y que fue excluido del estudio. (A) Aspecto del margen de transección durante la cirugía. (B) Dilatación del colédoco en la desembocadura identificada durante la autopsia. (C) Aspecto del páncreas proximal y distal. La punta de la pipeta muestra la dilatación del colédoco. (D) Páncreas proximal adyacente a la lesión en que se observa preservación del páncreas exocrino, sin presencia de necrosis coagulativa (HE, escala=100 μ m). (E) Margen de transección del páncreas proximal en la que se observa patrón de necrosis coagulativa (HE, escala=100 μ m).

5.2.2 Determinación bioquímica

La Tabla 7 muestra los niveles de amilasa y glucosa sérica durante el PO de los animales.

Tabla 7 | Concentración de amilasa (U/L) y glucosa sérica (mg/dl) durante el pre y postoperatorio de los 12 cerdos. Valores expresados como media \pm SD. *Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores de amilasa a las 4h y al 3er día respecto los valores en el preoperatorio.

	Postoperatorio							
	Preoperatorio	4 h	3 días	7 días	15 días	21 días	1 mes	6 meses
Amilasa sérica (U/L)	1385 \pm 132	1929 \pm 2145*	2566 \pm 762 *	1771 \pm 612	1176 \pm 128	1367 \pm 191	1074 \pm 213	1715 \pm 119
Glucosa sérica (mg/dl)	123 \pm 17	156 \pm 14	148 \pm 14	113 \pm 4	125 \pm 11	120 \pm 7	140 \pm 26	100 \pm 8

Durante el postoperatorio inmediato se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) de los niveles de amilasa sérica a las 4h y al 3er día respecto al nivel basal, los cuales disminuyeron hasta niveles similares a los preoperatorios a la semana, y se mantuvieron durante todo el PO.

Tal como muestra la Tabla 7, no se evidenciaron diferencias significativas en la concentración de glucosa sérica durante el PO.

La figura 35 muestra las concentraciones de amilasa en líquido peritoneal (LP). Los valores fueron de 476 ± 141 U/L; 4052 ± 1002 U/L; de 1821 ± 1053 U/L y de 0 U/L, en el preoperatorio, al 3er día (drenado a través del drenaje abdominal) y en la pre-necropsia al mes y a los 6 meses respectivamente. Destaca en general, un aumento de la concentración de amilasa en LP tras la transección del parénquima con RF.

En uno de los animales en el momento de la necropsia al mes de PO, se observó una colección de 4 cm con líquido rico en amilasas (8101 U/L, asterisco morado en la figura 34) rodeada de una cápsula dura. La cápsula estaba constituida por tejido conjuntivo, sin mucosa y sin presencia de necrosis en el interior, por lo que se identificó como un pseudoquiste. Este caso se analiza en profundidad más adelante en el apartado 5.2.3. Si se excluye éste caso del análisis, el valor medio de la concentración de amilasa en líquido libre al mes se reduce a 775 ± 139 U/L.

En los animales con un PO de 6 meses no se identificó presencia de líquido libre en la cavidad abdominal por lo que se consideró que la concentración de amilasa en LP fue 0 U/L.

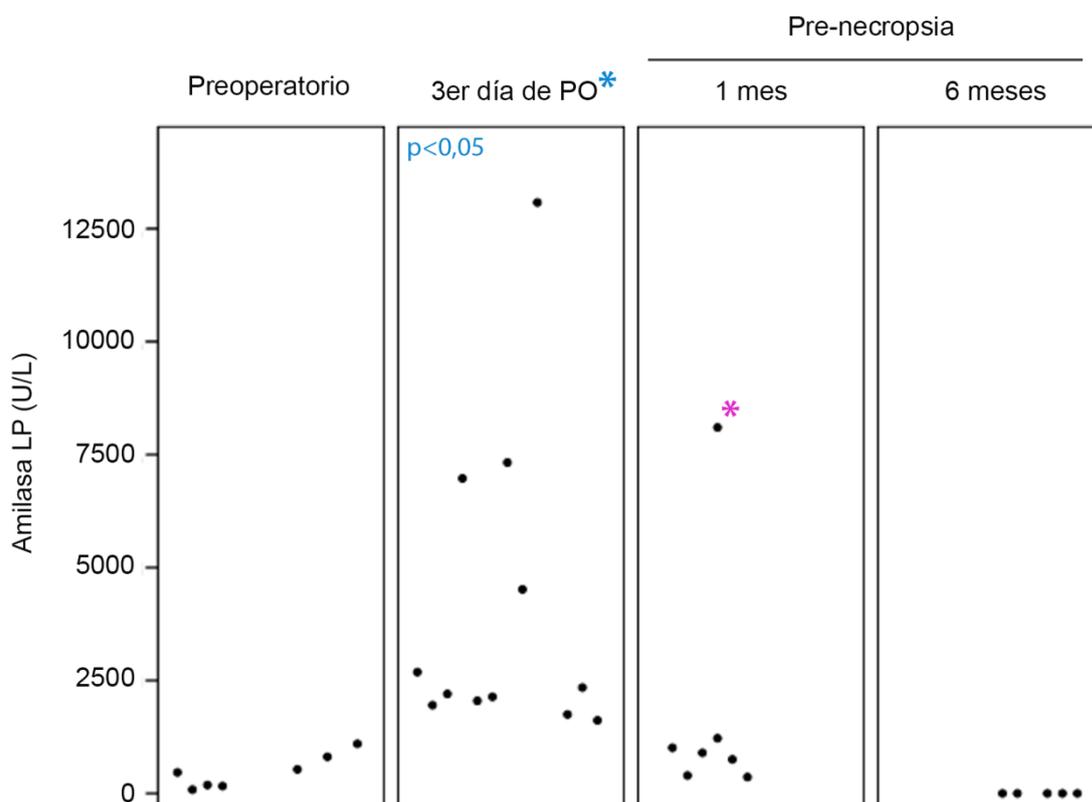


Figura 35 | Concentración de amilasa (U/L) en líquido peritoneal (LP) en el preoperatorio, al 3er día y en la pre-necropsia ; 1 y 6 meses. (*) Se observa un aumento significativo en la concentración de amilasa en LP al 3er día. (*) Determinación obtenida del contenido pseudoquiste identificado al mes de PO durante la necropsia que tiene una colección rica en amilasas con valores de 8101 U/L.

Tal y como se destaca en la figura 35, tres de los animales presentaron un aumento significativo de amilasa en LP al 3er día de PO, con valores de 6973 U/L (1), 7324 U/L (2) y 13080 U/L (3). Sin embargo, ninguno de estos animales drenó cantidades clínicamente significativas de líquido peritoneal, con secreciones menores a 50 mL al final de los tres días de PO. A continuación se analizan éstos tres casos con más detalle:

- (1) En el primero de los casos, el animal presentó un absceso en la herida quirúrgica que requirió de drenaje de la herida a la 4^a semana de PO. Durante la anestesia previa al drenaje de la herida se produjo la muerte súbita del animal. En la exploración no se detectaron signos de pancreatitis y se observó escasa cantidad de líquido peritoneal con una concentración de amilasa en LP de 898,4 U/L y una concentración de

amilasa sérica de 973,4 U/L. Tras la autopsia, la causa de la muerte se asoció a un broncoespasmo severo durante la anestesia que no respondió a maniobras de reanimación, tal y como dictaminaron los patólogos externos al grupo de investigación. Bioquímicamente, teniendo en cuenta la definición de fístula [38] establecida por la ISGPF y que los niveles de amilasa en LP del drenaje al 3er día fueron tres veces superiores a la concentración de amilasa sérica del mismo día; consideraremos éste caso como una fístula grado A, ya que no se observaron repercusiones clínicas asociadas y se resolvió a la 4ª semana de PO.

(2) El segundo de los animales, no presentó ninguna anomalía clínica durante el seguimiento postoperatorio, ni colecciones drenadas o signos de peritonitis durante la necropsia a pesar del aumento de amilasa LP en el drenaje. Durante el PO no se observó aumento de la concentración de amilasa sérica. Por tanto, éste caso también se consideró como una fístula grado A [38].

(3) En el tercer caso, el animal presentó una eventración que requirió de reintervención. Durante la reintervención no se detectaron anomalías, signos de peritonitis ni líquido libre en la cavidad. Sin embargo, se observó un aumento de concentración de amilasa sérica al 3er día (10494 U/L) que se estabilizó a la semana (1794,3 U/L). Por tanto, teniendo en cuenta la relación de amilasa en LP con la concentración de amilasa sérica del mismo día no podríamos considerar que éste animal presentó una fístula grado A, ya que la concentración no es tres veces superior a los valores de amilasa sérica.

5.2.3 Análisis histopatológico

El estudio histopatológico de las muestras de páncreas proximal y distal del modelo porcino; siguió un patrón común caracterizado por tres zonas diferenciadas, tal y como sucedió en el modelo murino (ver apartado 5.1.3): (1) el margen de transección, (2) el páncreas proximal y (3) el páncreas distal. A continuación se describen las características de cada zona al mes y a los 6 meses de PO.

(1) El margen de transección estaba bien preservado macroscópicamente al mes de PO.

De hecho se identificaron los 4 puntos de coagulación correspondientes a los márgenes distal y proximal de la transección de la rama antero-portal y retroportal del páncreas (figura 36-A). La zona de coagulación tenía un aspecto deshidratado y amarillo que se mantenía al mes de PO (ver figura 36-B). Histológicamente; el margen de transección al mes de PO estaba caracterizado por zonas de necrosis coagulativa, con acinos fantasma en los que no se identificó ninguna estructura a parte del citoplasma, rodeadas de fibrosis e infiltración aguda de tipo polimorfonucleados (ver figura 37).

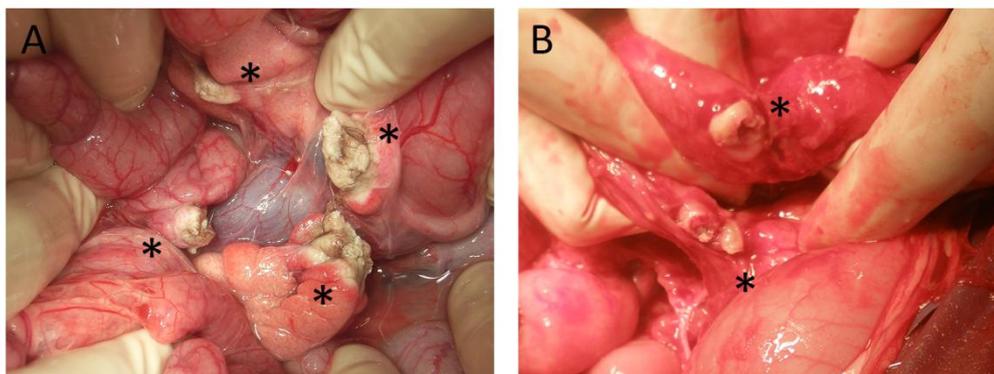


Figura 36 | Aspecto del margen de transección durante la intervención (A) y al mes de PO (B). Tras la intervención se observan cuatro zonas de coagulación (*) (2 al margen distal y 2 al margen proximal) las cuales macroscópicamente tienen un aspecto deshidratado y amarillento que se preservan al mes de PO.

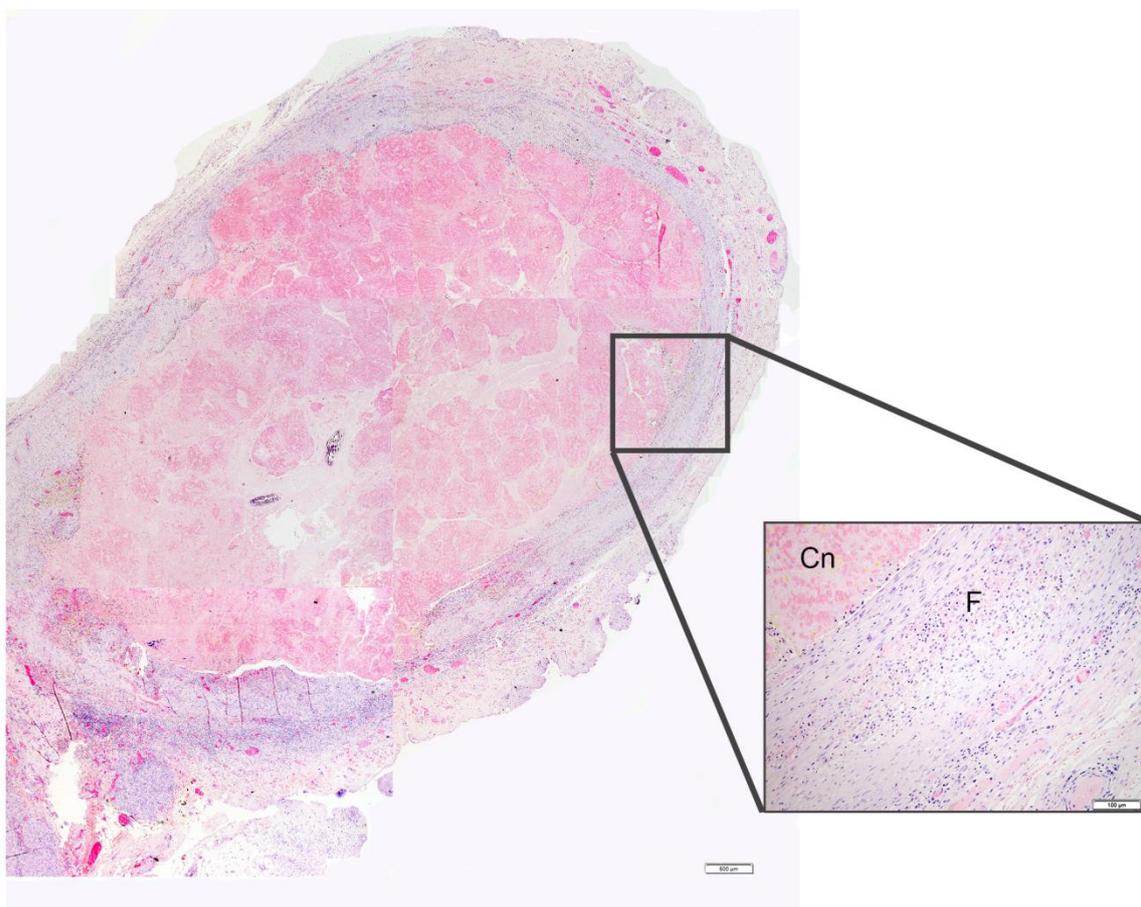


Figura 37 | Reconstrucción fotográfica del margen de coagulación de uno de los animales del estudio al mes de PO. Se identifica una amplia zona de necrosis coagulativa ("Cn") rodeada de una capa de fibrosis ("F") con escaso componente inflamatorio. Reconstrucción fotográfica de imágenes a 2x (Escala= 500 µm) y detalle a 10x (Escala= 200 µm).

Durante la necropsia realizada a los 6 meses se encontraron adherencias de fácil disección pero que dificultaron la identificación del margen de transección. Macroscópicamente el margen de transección había perdido el aspecto deshidratado característico de las zonas de coagulación observadas tras un mes de PO. En la mayoría de casos se pudieron identificar dos bolas de tejido conjuntivo. Estos hallazgos histológicos sugieren que la zona de necrosis coagulativa fue totalmente reemplazada por tejido conjuntivo maduro en el que se identificaba algún linfocito y/o células plasmáticas.

También se observó un aumento de los ganglios que parecen hiperplásicos situados cerca del margen de transección.

- (2) En el páncreas proximal, no se observaron cambios estructurales macroscópicos o microscópicos ni evidencia de muerte celular o aparición de pseudoductos. Los ductos se mantuvieron intactos sin indicios de dilatación y con el epitelio cúbico bien preservado.
- (3) El páncreas distal ofrecía al mes de PO un aspecto macroscópicamente atrófico y con un aumento de tejido adiposo interlobulillar y tejido peripancreático que se evidenció aún más con el aumento del periodo de postoperatorio. Microscópicamente, y a diferencia de los resultados histopatológicos descritos en el modelo murino, en este caso, el patrón de atrofia acinar parecía más tardía aunque similar al del modelo murino a la 2ª semana. El páncreas exocrino tenía un aspecto ligeramente desestructurado y estaba caracterizado por la aparición de pseudoductos rodeados por tejido fibroso e inflamatorio, el cual parece disminuirse cortes más cercanos a la cola del páncreas. A pesar de que no se observó componente cimógeno en el interior de los acinos, el patrón de atrofia no pareció tan avanzado como el de la rata con el mismo periodo PO.

Además, no se observó actividad apoptótica significativa en el páncreas distal en ninguno de los animales.

A los 6 meses de PO no se observó ningún acino preservado en el páncreas distal. Además las agrupaciones de pseudoductos se hicieron más evidentes por el aumento de componente fibroso y la disminución de componente inflamatorio (ver figura 38-F). A nivel endocrino la proliferación ductal, así como la infiltración de tejido fibrótico, dificultó la identificación de los islotes y de las agrupaciones de células β (micro-islotes), a diferencia de lo observado en modelo murino.

Algunos animales al mes y a los 6 meses de PO presentaron dilatación de los ductos pancreáticos en los cortes cercanos al margen de transección, la cual decreció en cortes más cercanos a la cola. Estos ductos se caracterizaron por el cambio de epitelio cúbico, propio de los ductos no dilatados, a un epitelio plano que en algunos casos llegó a perderse durante el tratamiento histológico (ver figura 38-D, E).

Durante la necropsia de uno de los animales de 1 mes de PO se identificó un pseudoquiste de 4 cm de diámetro en la zona del cuerpo del páncreas. La estanqueidad del sellado distal se valoró por inyección de tinta china tras canalización del ducto pancreático al realizar la sección en la cola del páncreas. Con esta maniobra se observó fuga de tinta al interior del pseudoquiste (ver figura 39-D). El Wirsung canalizado desde la papila no presentó dilatación ductal, ni en la porción proximal ni en la distal del páncreas. Sin embargo sí se observó dilatación ductal de un conducto pancreático secundario con epitelio bien preservado del páncreas distal; tal y como se muestra la figuras 38-A y 38-B. El interior del pseudoquiste contenía líquido pancreático rico en amilasas (ver resultados en apartado 5.2.2) y durante la extracción de la pieza se detectaron dos zonas de consistencia duro-elástica que parecían corresponder a la zona de transección (asteriscos en la figura 39-A).

Histológicamente, el pseudoquiste presentó una pared de tejido fibroso no epitelizada (figura 39-C) y el parénquima proximal al pseudoquiste estaba totalmente preservado. En el estudio del páncreas distal se observa cómo el parénquima exocrino estaba bastante preservado, con acinos ligeramente reactivos pero con componente cimógeno en el interior, propio de una atrofia no completa del páncreas distal, y componente inflamatorio agudo (figura 38-C).

Tras el estudio del caso y teniendo en cuenta el pseudoquiste, la evidencia de fuga desde el páncreas distal, la ausencia de atrofia en el páncreas distal y la preservación del epitelio cúbico en el conducto pancreático principal y secundario (ver figura 38-C y 38-D), se consideró éste caso como un sellado fallido de los conductos pancreáticos.

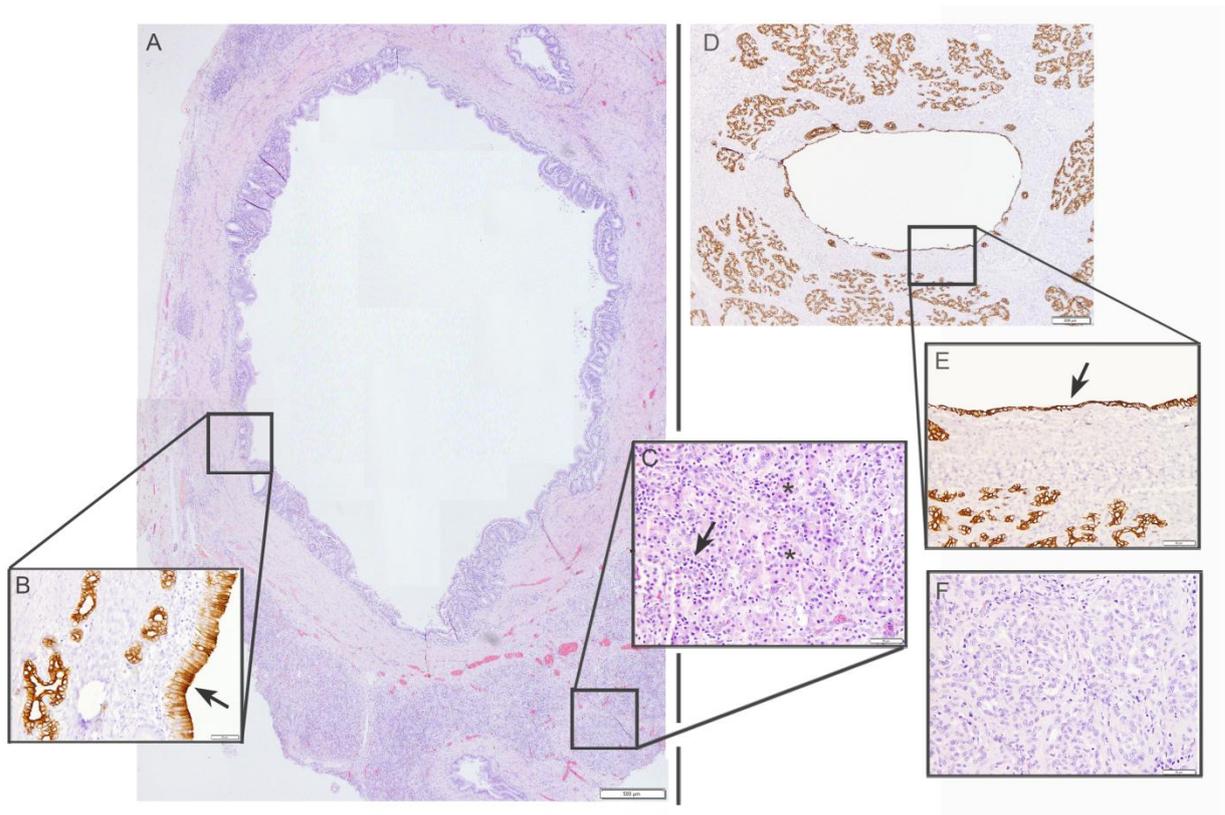


Figura 38 | Aspecto microscópico del conducto de Wirsung en caso de sellada completo y parcial. (A) Sección del Wirsung en páncreas distal de cerdo que presenta un pseudoquiste al mes de PO (HE, escala=500 μ m). (B) Detalle del epitelio cúbico preservado (Ck7, escala=50 μ m), y (C) páncreas exocrino con atrofia parcial en la que se observa contenido de zimógeno en algunos acinos (*) así como componente inflamatorio agudo (flecha, HE, escala=50 μ m). (D) Sección del Wirsung en páncreas distal de un animal al mes de PO rodeado de tejido fibroso y metaplasia acino-ductal (Ck7, escala=200 μ m) y (E) detalle del aplanamiento del epitelio del ducto en caso de sellado completo (Ck7, escala=50 μ m) y (F) atrofia exocrina total (HE, escala= 50 μ m).

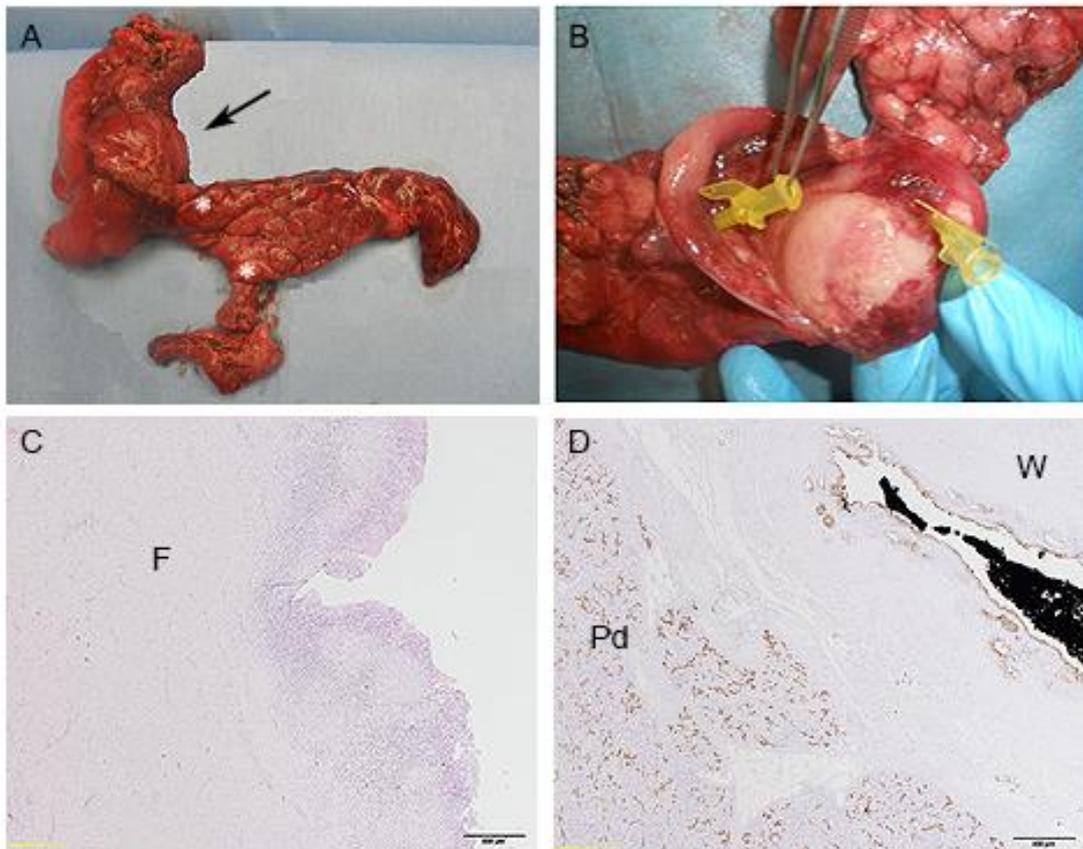


Figura 39 | Aspecto macroscópico y microscópico del animal que presenta un pseudoquiste. (A) Páncreas macroscópico del animal en el que se identifica un pseudoquiste (flecha) y dos bolas de coagulación (asteriscos blancos). Porción de páncreas uncinado cortada artificialmente. (B) Canalización del ducto a páncreas distal y proximal desde el interior del pseudoquiste. (C) Detalle de la pared del pseudoquiste formada por una capa de tejido conjuntivo sin epitelio ("F") y (D) páncreas distal ("Pd") ligeramente atrófico con conducto de Wirsung permeable ("W") no dilatado. (HE, escala=500 μ m).

5.2.4 Análisis inmunohistoquímico

La baja expresión de caspasa-3 en el páncreas distal y proximal al mes de PO indicó que la actividad apoptótica no era significativa al mes de PO. Además, la respuesta apoptótica a los 6 meses fue casi imperceptible, por lo que no se cuantificó la expresión (ver figura 40 D-F).

A diferencia de la actividad apoptótica al mes de PO, se observó un aumento de expresión de citoqueratina-7 en el epitelio de los pseudoductos del páncreas distal en relación con el páncreas proximal que se localiza en el epitelio del ducto centroacinar (figura 40 G-H).

A los 6 meses de PO, la expresión de citoqueratina-7 se mantuvo elevada (ver figura 40-I) aunque mucho más localizada, lo que sugiere un reemplazo de tejido acinar por tejido fibroso, el cual que se confirmó por un lado con la tinción Tricrómica de Masson (ver figura 40 M-O) y por otro en el análisis cuantitativo (ver apartado 5.2.5). La tinción tricrómica mostró preservación del citoplasma acinar en el páncreas proximal (teñido de color rosa en la figura 40-M); se reducción significativa al mes de PO en el páncreas distal, así como un aumento de tejido delimitando las agrupaciones de pseudoductos (ver figura 40-N). A los 6 meses de PO el aumento de tejido fibrótico o conectivo se hizo mucho más evidente, delimitando las agrupaciones de pseudoductos por bandas fibrosas de color azul y por la presencia de islotes en color rosa (figura 40-O).

En cuanto a la expresión de insulina en el páncreas distal, en una primera impresión se observó un ligero aumento en el número de islotes y en el tamaño de estos en relación con el páncreas proximal que se hacía más evidente a medida que transcurría el PO (ver Figura 40 J-L). La cuantificación real del área de insulina confirma estos hallazgos (ver apartado 5.2.5).

También se observó un aumento en el tamaño medio de los islotes en el páncreas proximal.

A nivel morfológico, se observó a los 6 meses un cambio en el aspecto de los islotes, presentando una morfología menos preservada en el páncreas distal, aunque la detección de los islotes con insulina es normal. Además, el análisis de las imágenes sugiere que hay un aumento del número de islotes pequeños y células aisladas positivas para Insulina (ver figuras 40-I y 40-C).

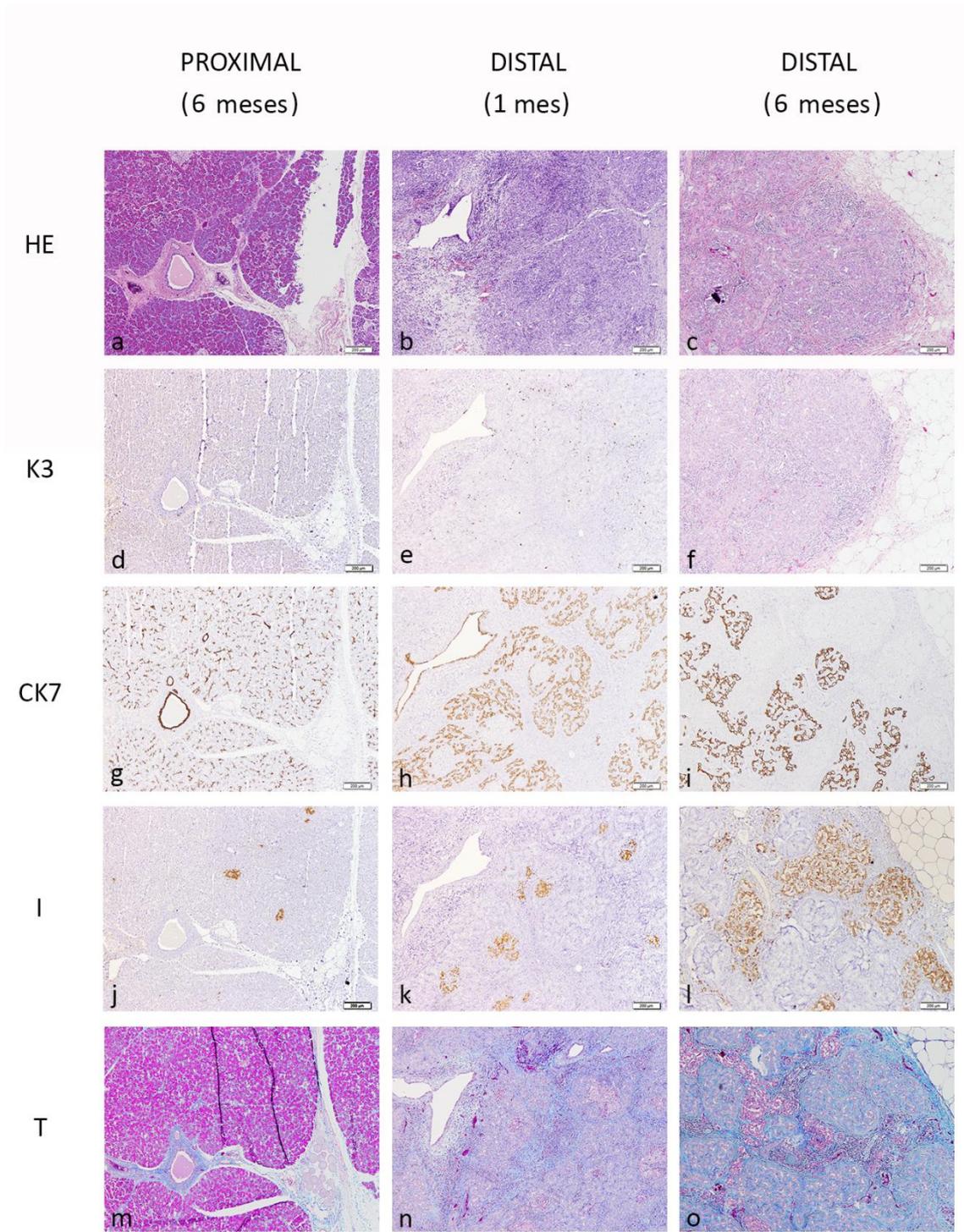


Figura 40 | Tinción de HE y Tricrómica de Masson e inmunohistoquímica de K3, Ck7 y I del páncreas proximal (a, d, g, j, m) y del páncreas distal al mes de PO (b, e, h, k, n) y a los 6 meses de PO (c, f, i, l, o). No se observa actividad apoptótica en el páncreas distal al mes y a los 6 meses de cirugía (e-f). La expresión de Ck7 en la pared de los pseudoductos aumenta significativamente en el páncreas distal al mes de la cirugía y se mantiene elevada a los 6 meses (h-i) aunque parece que hay un reemplazo por tejido fibrótico a los 6 meses (o). A nivel endocrino, se observa preservación de la expresión de I en el páncreas distal al mes y a los 6 meses en el páncreas distal y proximal.

5.2.5 Análisis morfométrico y cuantitativo

Para el análisis cuantitativo de las muestras se consideraron tres cortes por animal: uno del páncreas proximal "P" y dos del páncreas distal "D1" y "D2". Sin embargo, teniendo en cuenta que no se observaron diferencias significativas en el comportamiento entre las zonas D1 y D2, los resultados se exponen de manera conjunta y se referencia de aquí en adelante como páncreas proximal y distal (ver anexo 1-C).

Las figuras 41 y 42 muestran los resultados obtenidos del análisis cuantitativo de expresión de citoqueratina-7 (Ck7) e insulina (I) en el páncreas distal y proximal. Los resultados de Ck7 e insulina están expresados en mm²/ sección transversal del páncreas (área total de páncreas) para cada zona de estudio.

A pesar de que en el análisis inmunohistoquímico (ver apartado 5.2.4) y en la cuantificación de expresión, se observa un aumento de expresión de Ck7 a 1 mes de cirugía, en el páncreas distal de los animales operados; estadísticamente no hay diferencias significativas respecto al grupo control (ver figura 41). Sin embargo, al comparar los valores de expresión de Ck7 en el páncreas distal al mes de la cirugía con el páncreas proximal, se observa un aumento significativo con valores de hasta el doble de expresión ($6,38 \pm 0,92$ mm² y $3,24 \pm 0,79$ mm² distal y proximal; respectivamente, $p < 0,05$). Éste aumento se corresponde histológicamente con el aumento de expresión de Ck7 en el epitelio de los pseudoductos del páncreas distal producto del proceso de metaplasia acino-ductal observado.

En el caso de los animales con supervivencia de 6 meses, los resultados muestran cómo se reduce significativamente la expresión de Ck7 ($p < 0,05$) en la sección de páncreas distal ($3,11 \pm 0,50$ mm²) en comparación con el control proximal de los mismos sujetos ($6,02 \pm 1,51$ mm²) y con el grupo control de 6 meses ($5,47 \pm 0,64$ mm² de Ck7 en el páncreas distal). La media de

expresión de Ck7 a los 6 meses en el páncreas distal de estos animales sometidos a transección alcanzó valores similares a la media de expresión observada en el páncreas proximal de animales sanos ($3,24 \pm 0,79 \text{ mm}^2$ y $2,39 \pm 0,47 \text{ mm}^2$; para el páncreas proximal del grupo experimental y control a 1 mes de PO respectivamente). Por tanto, aunque en el análisis inmunohistoquímico veíamos zonas localizadas con mucha expresión de Ck7 la expresión por sección pancreática disminuye, lo cual se asocia al reemplazo de los pseudoductos por tejido fibrótico y adiposo observado en el análisis histológico.

Además, el análisis de los controles y del páncreas proximal de los animales sometidos a transección, muestra como con la edad del animal se produce un aumento de expresión de Ck7.

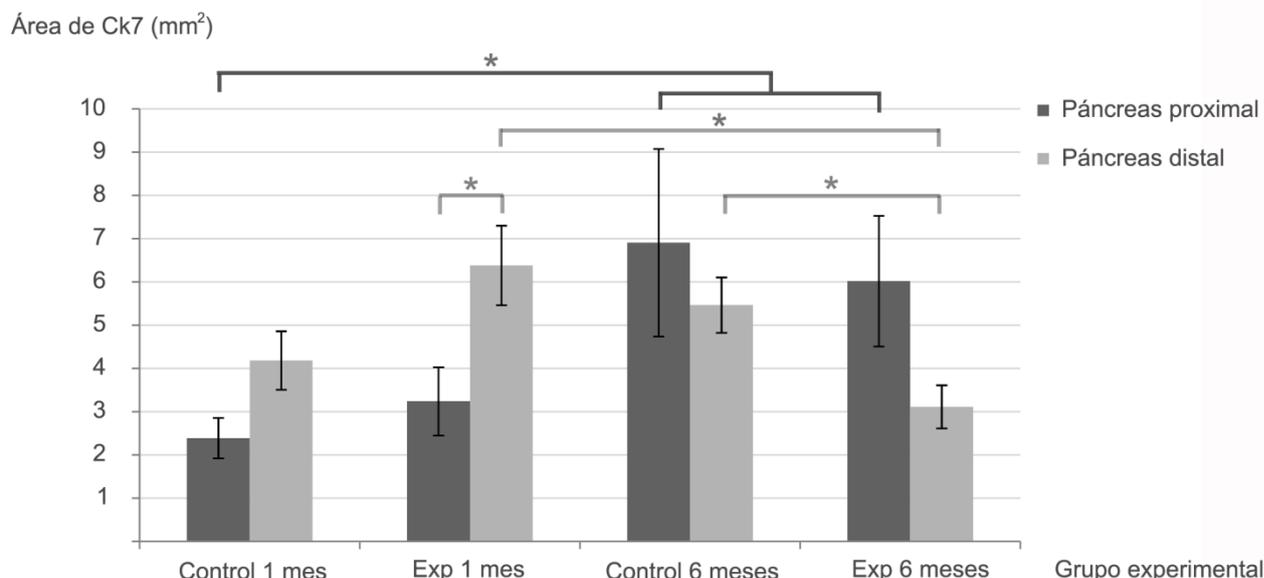


Figura 41 | Área de expresión de citoqueratina-7 (Ck7) en mm² por sección pancreática (proximal y distal) y grupo experimental. Valores expresados como media \pm SD. Nótese un aumento significativo ($*p < 0,05$) de expresión Ck7 con la edad del animal (control y experimental 6 meses) en el páncreas proximal en comparación con los controles al mes. Se observa un aumento significativo ($*p < 0,05$) de expresión en el páncreas distal en los animales operados de 1 mes de PO respecto su control proximal. Con el PO (a los 6 meses) se observa un descenso significativo ($*p < 0,05$) de expresión de Ck7 en el páncreas distal en comparación con los niveles de expresión al mes de PO y respecto el control a los 6 meses. Control 1 mes, $n_p=4$, $n_d=8$; Exp 1 mes, $n_p=7$, $n_d=13$; Control 6 meses, $n_p=5$ y $n_d=14$; Exp 6 meses $n_p=5$, $n_d=10$. Abreviaturas: “ n_p ” y “ n_d ” tamaño de muestras para páncreas proximal y distal; respectivamente; y “Exp” experimental.

Tal y como muestra la figura 42, los resultados obtenidos del análisis cuantitativo de expresión de insulina por sección pancreática indican como el crecimiento del animal (en edad y peso) está asociado a un aumento significativo de expresión de insulina. Sin embargo, no se observan variaciones de expresión de insulina significativas que puedan estar asociadas a la cirugía, ni en el páncreas proximal ni en el distal.

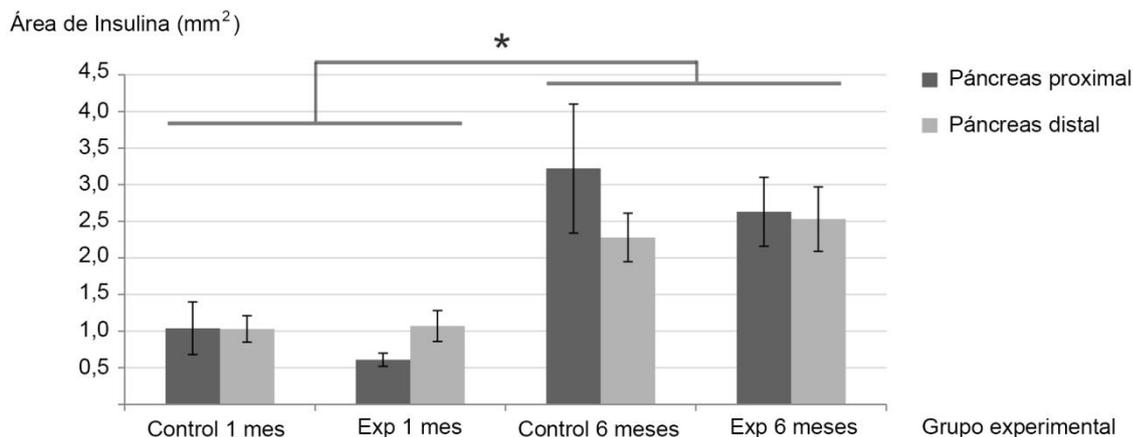


Figura 42 | Área expresión de insulina (I) en mm² por sección pancreática; proximal y distal; al mes y a los 6 meses de PO; así como para los controles. Valores expresados como media \pm SD. Nótese un aumento significativo (* $p < 0,05$) en la media de expresión de I con el crecimiento del animal, respecto a los animales operados y controles al mes. No se observan diferencias significativas de expresión entre páncreas proximal y distal para cada grupo, así como tampoco se evidencian diferencias de expresión entre animales operados y controles. Control 1 mes, $n_p=4$, $n_d=8$; Exp 1 mes, $n_p=7$, $n_d=13$; Control 6 meses, $n_p=5$, $n_d=14$; Exp 6 meses $n_p=5$, $n_d=10$. Abreviaturas: “ n_p ” y “ n_d ” tamaño de muestras para páncreas proximal y distal; respectivamente; y “Exp” experimental.

El tamaño medio del islote aumentó con el tiempo de supervivencia de los animales; a pesar de que estadísticamente no se observan diferencias al mes de PO (figura 43-A) respecto al control. Esta tendencia se evidencia en el páncreas proximal de los animales controles; en los que el área media de islote aumenta de $522,08 \pm 159,49 \mu\text{m}^2$ al mes de PO a $1119,34 \pm 436,89 \mu\text{m}^2$ tras 6 meses. De manera similar, se observa un aumento del tamaño medio del islote en el páncreas proximal de los animales sometidos al procedimiento de $837,75 \pm 196,75 \mu\text{m}^2$ a $1497,45 \pm 465,37 \mu\text{m}^2$ al mes y 6 meses de PO, respectivamente.

A pesar de que no hay diferencias de expresión de insulina por sección pancreática, el comportamiento del tamaño medio de los islotes no es igual entre páncreas proximal y distal a los 6 meses de PO. Los resultados indican como el tamaño disminuye significativamente en el páncreas distal de los animales operados tras 6 meses de PO respecto su control en el páncreas proximal. Además, se observaron diferencias significativas con el tamaño medio de

los islotes en el páncreas distal de los animales operados al mes y del control a 6 meses de PO. La figura muestra como el tamaño de los islotes disminuye hasta un valor medio de $446,09 \pm 107,89 \mu\text{m}^2$.

Estos resultados son consistentes cuando se analizan en el contexto de las imágenes de inmunohistoquímica B y C de la figura 43, las cuales muestran como en el páncreas distal de los animales de 6 meses de PO aumenta el número de pequeñas agrupaciones de células que son positivas para insulina, así como células aisladas (ver flechas de las figuras 43-B y 43-C). El aumento de éstas células aisladas comporta que el área media de islote disminuya aunque se identifiquen islotes de igual tamaño que en el páncreas proximal.

A

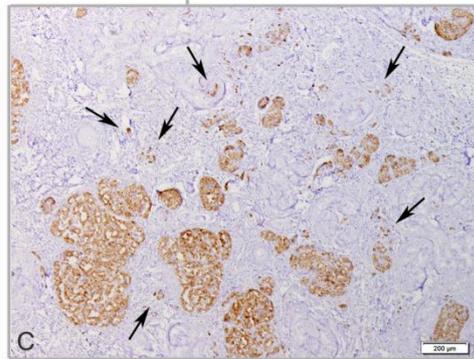
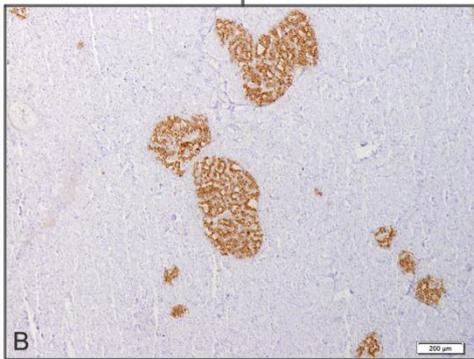
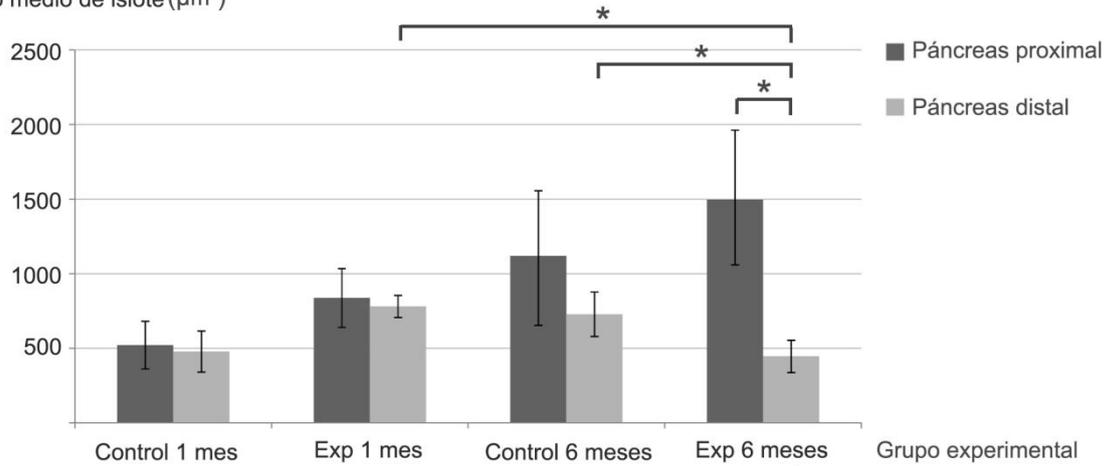
Tamaño medio de islote (μm^2)

Figura 43 | Figura representativa del tamaño medio de islote por sección pancreática y grupo experimental. (A) Tamaño medio de islote (μm^2) en el páncreas proximal y distal; al mes y a los 6 meses de PO; así como para los controles. Valores expresados como media \pm SD. Se observa una tendencia de crecimiento en el tamaño medio de los islotes con el PO, más evidente en el páncreas proximal. Nótese una disminución significativa ($*p < 0,05$) del tamaño medio de los islotes a los 6 meses en el páncreas distal de los animales operados al comparar con el tamaño al mes de PO, respecto al páncreas proximal del mismo grupo experimental o los controles. IHC de Insulina del páncreas proximal (B) y distal (C) de un animal de 6 meses de PO. (Flechas: Células o agrupaciones celulares positivas para Insulina que no se observan en el páncreas proximal del mismo animal). Control 1 mes, $n_p=2$, $n_d=3$; Exp 1 mes, $n_p=5$, $n_d=13$; Control 6 meses, $n_p=3$, $n_d=7$; Exp 6 meses $n_p=4$, $n_d=10$. Abreviaturas: “ n_p ” y “ n_d ” tamaño de muestras para páncreas proximal y distal; respectivamente; y “Exp” experimental.

La figura 44 muestra la distribución de tejidos por sección pancreática (área total) que engloba el área de tejido conectivo y adiposo, área de parénquima pancreático, área de metaplasia acino-ductal e insulina.

Tal y como muestra la figura, se observó un aumento significativo del área total de páncreas con el postoperatorio, sin diferencias entre controles y animales operados.

El área de parénquima pancreático también aumentó con el PO en los controles así como en el páncreas proximal de los animales sometidos a la pancreatotomía media. Sin embargo, en el páncreas distal se identificó histológicamente un aumento en el área de metaplasia acino-ductal al mes de PO que se redujo a los 6 meses hasta representar el 20% del área total, sin presencia de parénquima pancreático preservado.

De acuerdo a lo descrito en la figura 42, la figura 44 muestra el aumento en el área de insulina con el crecimiento del animal (edad y peso) sin diferencias entre operados y controles, ni tampoco entre páncreas distal y proximal.

En cuanto al área de tejido conectivo y adiposo no se observaron diferencias en los controles entre proximal y distal, ni con el PO. Sin embargo, se observó un aumento significativo del área de tejido conectivo y adiposo en los animales operados con el PO, tanto el páncreas proximal como en el distal, aunque fue mucho más evidente en el páncreas distal. A pesar del aumento absoluto de expresión en el páncreas proximal de los animales operados, el porcentaje de área de tejido conectivo respecto el área total no varía significativamente, con valores del 36% y el 30% al mes y 6 de meses de PO. En cambio, el área media de tejido conectivo y adiposo en el páncreas distal de los animales operados aumenta hasta representar el 80% a los 6 meses, respecto al 43% al mes de PO.

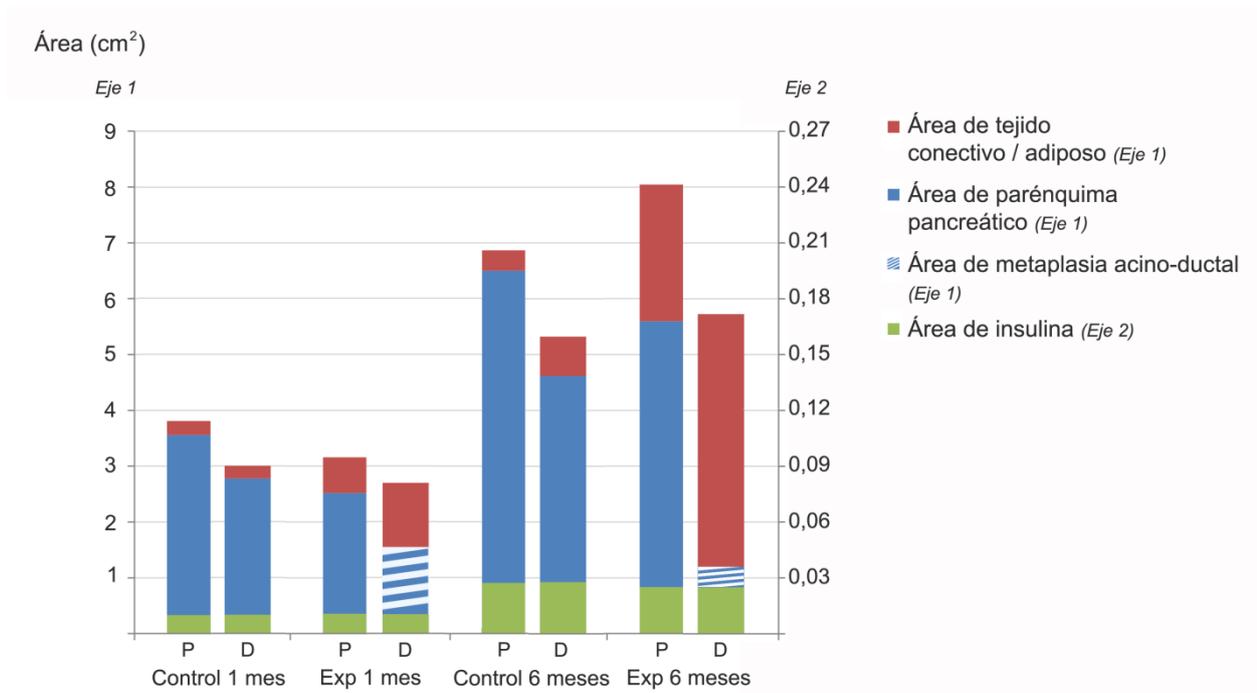


Figura 44 | Esquema representativo de la distribución de expresión de los diferentes tejidos por sección de páncreas proximal y distal para los diferentes grupos experimentales. Los resultados se expresan como área media en cm^2 ; en el eje principal (*Eje 1*) se interpretan las áreas de tejido conectivo y adiposo, así como el área de parénquima y metaplasia acino-ductal; asociado al área que expresa citoqueratina-7. En el eje secundario (*Eje 2*) se leen los valores de insulina, también expresados en cm^2 . El área total de la sección pancreática corresponde a la suma de todas las áreas. Obsérvese un aumento significativo de la sección de páncreas con el crecimiento del animal (grupo experimental y control a 6 meses) comparado con los grupos a 1 mes. Además, se observa como en el páncreas distal del grupo experimental a 1 mes disminuye el área de metaplasia acino-ductal en comparación con el área de parénquima pancreático preservado en el proximal o el grupo control a 1 mes. También se observa como el área de metaplasia acino-ductal sigue disminuyendo hasta los 6 meses de PO, aunque el área total de páncreas se mantiene sin cambios respecto al proximal o al grupo control de 6 meses.

Capítulo 6 | Discusión

6 | Discusión

Desde hace años la aplicación de corrientes eléctricas de radiofrecuencia (RF) ha experimentado un creciente interés en el tratamiento de tumores sólidos no tratables quirúrgicamente (irresecables), especialmente en el hígado, pero también en otros tejidos como pulmón, riñón, hueso, cerebro, pecho, glándula adrenal y bazo [255-263]. En cambio, la aplicación de RF en el páncreas continúa siendo motivo de controversia, ya que algunos autores sugieren que está asociada a la aparición de posibles problemas potenciales debido a la anatomía e histología del parénquima pancreático [229]. A pesar de ello, dentro del contexto quirúrgico existen estudios que plantean la aplicación de RF en el páncreas con dos objetivos principales. Por un lado la ablación focal de tumores irresecables, así como tratamiento paliativo del dolor, o para aumentar la supervivencia en algunos pacientes en los que no se puede eliminar la enfermedad [235, 236]; y por otro lado como técnica para mejorar el sellado de los ductos pancreáticos y evitar la formación de fístulas pancreáticas en el plano de transección de las pancreatomecías distales, teniendo en cuenta la capacidad de las lesiones térmicas creadas por RF para sellar pequeños vasos y ductos [114, 239].

De hecho, algunos autores han sugerido recientemente la utilización de dispositivos basados en RF, similares al que se emplea en éste estudio, para ambos objetivos, ablación focal de tumores pancreáticos y transección en pancreatomecías distales [114, 231, 232, 235, 241].

No obstante ningún estudio; a excepción del realizado por nuestro grupo, posterior a esta investigación (descrito en el anexo 3) [264]; ha planteado la utilización de la RF en el sellado del parénquima pancreático a la altura de la vena porta, es decir, para una transección corporocaudal similar a la que se haría en una duodenopancreatectomía.

Por tanto, hasta donde sabemos, esta investigación representa el primer estudio de la literatura en el que se realiza una transección del parénquima pancreático a la altura de la vena porta

(pancreatotomía media) mediante un dispositivo asistido por RF en modelo murino y en modelo porcino. En ambos estudios se valora la capacidad de sellado del efecto térmico producto de la electrocoagulación por RF en el comportamiento histológico (endocrino y exocrino) del páncreas distal a corto y largo plazo así como el impacto en el índice de fístula pancreática y otras complicaciones.

Una de las hipótesis de estudio fue que el efecto térmico producto de la electrocoagulación por RF puede ser capaz de sellar eficazmente los conductos pancreáticos en ambos modelos animales al realizar una pancreatotomía media en ausencia de anastomosis pancreática, sin identificar ni ligar previamente el conducto pancreático principal y sin estar asociado a aparición de pancreatitis necrótico hemorrágica.

En contra de lo establecido por algunos autores [228, 229] que alertan de la aparición de pancreatitis necrótico hemorrágica con complicaciones severas por la utilización de RF en el páncreas; no hemos observado ningún caso de pancreatitis necrótico hemorrágica ni de muerte intraoperatoria en todo el estudio, por lo que los resultados sugieren que el procedimiento es seguro en términos de complicaciones intraoperatorias y aparición de pancreatitis necrótico hemorrágica.

En cuanto a la aparición de fístula pancreática (POPF), aunque no era un objetivo primario del estudio y ante la ausencia de drenaje; se estableció como definición de POPF en modelo murino lo siguiente: niveles de amilasa tres veces superior al valor normal en suero a partir del tercer día de PO y caracterizado macroscópicamente por la presencia de colecciones o abscesos con alto contenido en amilasa. De acuerdo con ésta definición, en modelo murino se observó un aumento de amilasa en sangre al 3er día de PO, el cual se normalizaba a la semana sin sintomatología clínica asociada. Además, en ningún caso se observaron colecciones ni abscesos durante la necropsia.

En modelo porcino, también se identificó un aumento significativo de los niveles de amilasa sérica a las 4 h y al 3er día de PO respecto al nivel basal, que disminuyó a la semana hasta niveles similares al preoperatorio y se mantuvo bajo durante todo el postoperatorio.

De manera similar a lo descrito por otros autores tras la aplicación de RF en el páncreas [114, 265], se observó un aumento temporal de los niveles de amilasa en LP sin correlación clínica hacia el 3er día de PO que se estabilizaban a la semana de PO. Dos animales presentaron una elevación transitoria de la concentración de amilasa en líquido peritoneal (LP) por encima del límite establecido como POPF al 3er día de PO, aunque ninguno de los estos dos animales drenó cantidades clínicamente significativas de líquido peritoneal con secreciones menores a 50 mL tras tres días de PO, ni anomalías clínicas importantes (ni colecciones no drenadas o signos de peritonitis durante la necropsia). Solo en un caso, se observó persistencia de los valores de amilasa elevados a la semana, que histopatológicamente se correlacionaba con un pseudoquiste que presentaba permeabilidad proximal y distal del conducto pancreático principal. Además, se identificó un patrón de atrofia parcial del parénquima exocrino del páncreas distal; en el que se identificó contenido de cimógeno en el interior de los acinos. Por tanto, teniendo en cuenta éstos hallazgos, se consideró éste animal como un caso de sellado fallido en el estudio.

A excepción de éste caso, en el resto de animales; tanto en modelo murino como en porcino; no se ha podido demostrar una correlación entre el área de necrosis coagulativa y el aumento de los niveles de amilasa. Basándonos en la experiencia de otros autores sobre el uso de RF en el páncreas [114, 207, 265] y en el estudio histológico del páncreas distal y proximal de nuestros animales, podemos especular que esta elevación de amilasa en el líquido alrededor del parénquima tratado, totalmente asintomática, podría ser consecuencia de la necrosis coagulativa y citólisis del parénquima de la superficie de transección, más que de una fuga real

de líquido pancreático. Además, este proceso se ha descrito como los primeros cambios histológicos hacia la formación de una capa de fibrosis madura que se identifica en el margen de transección durante la necropsia de los animales. Por consiguiente, esta observación podría explicar la elevación de la concentración de amilasa en los dos animales diagnosticados con fístula pancreática grado A (17%) de acuerdo a los criterios establecidos por Bassi et al. [38]

Como parte de las variables de estudio, se planteó evaluar la respuesta tisular del páncreas distal tras el procedimiento a corto y largo plazo. El análisis histológico del páncreas distal, tanto en modelo murino como en modelo porcino, está caracterizado por la atrofia total del componente exocrino y la aparición de pseudoductos, un proceso que ha sido descrito por muchos autores en diferentes modelos experimentales [60, 68, 99, 266, 267] incluso en modelos in vitro [248, 268, 269] como metaplasia acino-ductal [270].

Los resultados de expresión de caspasa-3 observados en el estudio en modelo murino sugieren como el proceso de metaplasia acino-ductal se inicia con la activación de un proceso apoptótico p53 dependiente en el páncreas distal, tal y como han sido sugerido otros estudios [59, 63]. Este proceso tiene un pico de actividad al 3er día y comporta la progresión de la atrofia. Además, algunos autores sugieren que la rápida respuesta apoptótica acinar observada en el páncreas distal está inversamente relacionada con la severidad de daño pancreático. Esto sugiere, que la inducción apoptótica con éste procedimiento podría actuar como una reacción protectora a desarrollar pancreatitis aguda [271-274]. Del mismo modo, Girelli *et al.* [236] observaron que la obstrucción del conducto pancreático por la presencia de un tumor reducía el riesgo de pancreatitis aguda después de la ablación focal por RF. Por lo tanto, la eliminación de las células acinares por un proceso apoptótico dependiente después de la

ablación por RF y la posterior sección de todo el parénquima podría explicar por qué este modelo no está asociado a aparición de pancreatitis necrótico hemorrágica, a diferencia de lo descrito por Elias et al. [229] quienes observaron aparición de pancreatitis necrótico hemorrágica en dos pacientes tras tratar múltiples metástasis con ablación por RF.

De acuerdo a la literatura, la metaplasia acino-ductal está caracterizada por la coexpresión de marcadores epiteliales entre ellos citoqueratina-7, y marcadores propios de células acinares; como amilasa o PDX-1 (pancreática o duodenal homeobox-1) [248]. A pesar de que nuestro estudio no ha valorado la coexpresión de éstos marcadores, el análisis inmunohistoquímico muestra expresión de citoqueratina-7 (Ck7) en los pseudoductos del páncreas distal en modelo murino y porcino. Los resultados del análisis cuantitativo en ambos modelos, de acuerdo con lo publicado por otros autores [60, 62]; sugiere que en PO temprano (hasta los 15 días) se produce un aumento significativo de expresión de Ck7 asociado precisamente al proceso de metaplasia acino-ductal. Sin embargo, los resultados también sugieren que a las 3 semanas en modelo murino y hacia el mes en modelo porcino se produce un descenso de expresión que algunos autores asocian al aumento de tejido fibrótico y a la infiltración de tejido adiposo [61, 62]. Ésta evolución de la metaplasia acino-ductal se observa también en el PO tardío (6 meses) mediante la tinción Tricrómica de Masson en el páncreas distal del modelo porcino.

Por consiguiente, a pesar de las diferencias entre los dos modelos, parece ser que la atrofia progresa de manera similar tanto en modelo murino como en porcino, aunque a diferente velocidad. La evolución temporal de la respuesta tisular del tejido exocrino frente a la oclusión del ducto primario y secundarios con RF, parece estimular un proceso de metaplasia acino-ductal que con el PO tardío (6 meses en modelo porcino) desencadenaría el reemplazo de los pseudoductos por tejido fibrótico y posterior metaplasia grasa. En este sentido Calvetti-Weder

et al. [244] han descrito la regeneración del tejido exocrino tras el proceso de atrofia, así como otros autores sugieren la capacidad regenerativa del páncreas exocrino tras otros procedimientos [81, 97, 98, 271, 275-277]. Sin embargo, tras estudiar el modelo de ligadura empleado por Cavelti-Weder *et al.* [244] y en base a nuestra experiencia en modelos similares, creemos que la anatomía del páncreas murino dificulta la ligadura del ductos secundarios y por lo que no se produce una atrofia exocrina total, con presencia de acinos preservados tras 15 días de la ligadura. La ausencia de atrofia completa del páncreas distal podría estimular la regeneración del tejido exocrino y permitiría el drenaje de jugos pancreáticos a tracto gastrointestinal a pesar de mantener la ligadura original tras 12 meses de PO.

Nuestros dos modelos experimentales, al mantener totalmente intacto el páncreas proximal no permiten valorar la función exocrina ni la necesidad de administración de enzimas digestivas. Sin embargo, Di Magno *et al.* [176] demostraron que la esteatorrea (un tipo de diarrea, caracterizada por la presencia de secreciones lipídicas en las heces fecales) no ocurre hasta que la lipasa se reduce entre el 5-10% respecto el flujo normal. Pero en las situaciones en que la función exocrina se reduce, la habilidad en la digestión de grasas es el factor determinante que causará las complicaciones clínicas y sintomatología más relevante. En este sentido, ante la posible insuficiencia exocrina tras el procedimiento, se podría establecer un cambio en los hábitos en el consumo de alcohol y dieta, así como la administración oral de enzimas pancreáticas durante las comidas para compensar la falta de enzimas endógenas [175]. A pesar de que la duodenopancreatectomía tiene como objetivo preservar la función exocrina, algunos autores [31, 42, 278, 279] han publicado series clínicas en que la duodenopancreatectomía y la anastomosis pancreaticogástrica puede estar asociada a la aparición de insuficiencia exocrina por la estenosis de la anastomosis; si bien; no se ha

observado insuficiencia endocrina en los pacientes hasta los 3 años de PO, aunque sí atrofia del páncreas distal, resultados que contrastan con los publicados por Tran *et al.* [55].

En cuanto al comportamiento del tejido endocrino, los resultados obtenidos en el estudio en modelo murino están en la línea de los publicado por Wang *et al.* [68], en los que se reportó un aumento significativo de micro-islotos ($<1000 \mu\text{m}^2$) o células β aisladas en el páncreas distal tras la transección pancreática. Aunque en nuestros resultados obtenidos en modelo murino [280] hablamos de micro-islotos; de acuerdo a la definición establecido por Wang *et al.*; creemos más apropiado hablar de agrupaciones de células β y no de islotos; ya que no se ha valorado la presencia de otro tipo de células endocrinas que conforman un islote de Langerhans.

En modelo porcino, con el crecimiento del animal (edad y peso) se observó un aumento en el área de expresión de insulina en el páncreas distal y proximal de los animales operados, sin diferencias significativas respecto los controles. Este comportamiento fue similar al observado en modelo murino, así como a lo descrito por otros autores [244, 281]. En cuanto al tamaño de los islotos a los 6 meses de PO, se identificó un descenso significativo del tamaño medio en el páncreas distal respecto al control proximal intrasujeto, al control distal de 6 meses e incluso respecto al tamaño medio de los islotos al mes de PO. A pesar de que el análisis cuantitativo podría sugerir una reducción del tamaño de los islotos por la cirugía, el análisis histológico muestra como la reducción del tamaño medio de los islotos está asociado al aumento del número de islotos pequeños o agrupaciones de células β , que se hace más evidente a los 6 meses de PO, y no a la desaparición de islotos de mayor tamaño, los cuales se preservan en el páncreas distal aunque algunos de ellos con patrón morfológico diferente [101, 102].

A pesar de que el modelo experimental utilizado en ambos estudios no nos permite saber si los islotos del páncreas distales son totalmente funcionales, tal y como sugieren Gooszen *et al.*

[101] o Tran *et al.* [55] por la disrupción de los islotes por tejido fibrótico, los resultados sugieren que la respuesta tisular del páncreas distal no evita el crecimiento de los islotes comparado con páncreas sano, ya que el área de insulina en el páncreas distal de los animales operados no muestra diferencias significativas respecto los controles ni respecto el páncreas proximal. Por tanto, tampoco podemos asociar el proceso de atrofia del páncreas distal a la disminución de masa endocrina [244]; una de las principales características de la diabetes [65, 282-284].

Recientemente, algunos autores han planteado nuevas estrategias terapéuticas para la diabetes en base a modelos experimentales, en los cuales se han identificado células β aisladas y pequeñas agrupaciones en modelo murino y porcino. Algunos de estos estudios emplean modelos de la ligadura del ducto pancreático [68-70] o pancreatectomía parcial [81-84, 97, 281, 285], así como estudios *in vitro* [286, 287] y modelos transgénicos [70, 86, 95, 288-290]. Sin embargo, a pesar de que existen muchos estudios que plantean éstas nuevas estrategias terapéuticas, el mecanismo por el cual ocurre la regeneración es motivo de controversia. Algunos estudios han sugerido que la regeneración se produce por replicación o expansión de islotes y células β pre-existentes [65, 80, 81, 83, 85, 91, 92], aunque otros hablan de neogénesis de células progenitoras exocrinas, un proceso que implica células madres de tejido facultativo como acinos [94-96], células ductales [68, 87, 88, 97-99] o centroacinares, incluso por transdiferenciación de otro tipo de células endocrinas [69, 70, 86]. Algunos estudios recientes consideran que se pueden producir ambos mecanismos de regeneración aunque en diferentes estadios y que la proporción entre regeneración o β -neogénesis puede variar en función del procedimiento, la especie y la edad [65, 291-293]. En nuestro estudio en particular, la ausencia de marcadores específicos, así como la pre-existencia de islotes en el páncreas distal y proximal antes del procedimiento [65, 292, 294]; no permite establecer el origen de éstas células β , ni el estado de maduración o la funcionalidad, ya que no sabemos si expresan

factores asociados a la maduración de los islotes [97, 292]. A pesar de ello, los resultados del estudio sugieren que el sellado del parénquima pancreático con RF estimula la aparición local de nuevas células β en el páncreas distal [65, 68, 69, 81], aunque cuantitativamente no tiene un impacto significativo en el área total de expresión de insulina por sección. Esto contrasta con los resultados de Lee *et al.* [81] quienes observaron replicación de células β en toda la glándula tras realizar una pancreatometomía parcial.

En cuanto a la funcionalidad de los islotes y su capacidad para mantener el balance glucémico, la ausencia de diferencias significativas en la concentración de glucosa del suero sugiere una preservación de la función endocrina del páncreas. Sin embargo, la presencia y preservación del páncreas proximal tras realizar la transección del parénquima a la altura de la vena porta, limita la valoración de la función endocrina, ya que existen estudios que establecen que menos del 40% de la masa endocrina es suficiente para mantener la normogluceemia [84, 86, 105, 295].

Zhou *et al.* [95] consideraron que la falta de organización de las nuevas células β formando islotes (células β aisladas o pequeñas agrupaciones) afecta a su funcionalidad, al inhibir la secreción de insulina basal y aumentar la secreción de insulina estimulada por glucosa [296]. Por el contrario, un estudio reciente [297] sugiere que la neogénesis de células β es un posible contribuyente a la respuesta compensatoria ante la resistencia a la insulina en ausencia de diabetes diagnosticada. Incluso algunos autores sugieren que pacientes con resistencia a la insulina pueden aumentar la secreción de las células β para satisfacer la creciente demanda de insulina y no desarrollar diabetes [298]. Este poder adaptativo del páncreas endocrino encaja con estudios en los que a pesar de inducir la atrofia del páncreas, se sugiere que no hay un deterioro de la tolerancia a la glucosa [56, 101-104, 299-301]. Por el contrario, otros autores mantienen que la oclusión del ducto está asociada al desarrollo de diabetes [55, 67, 302].

Otro hito importante de nuestro trabajo era evaluar la seguridad, manejabilidad y funcionamiento del dispositivo de RF en un modelo experimental de transección del parénquima pancreático a altura de la vena porta. Los resultados en modelo murino y porcino sugieren que el dispositivo funcionó correctamente en términos de usabilidad. Para la aplicación en un modelo de animal pequeño sería recomendable un dispositivo con un electrodo de menor diámetro para poder coagular de manera más precisa. Sin embargo, el dispositivo de 3 mm de diámetro demostró ser un sistema eficaz en modelo porcino al conseguir un sellado eficiente ante un ducto de mayor tamaño, similar al que nos encontraríamos en la aplicación clínica.

El efecto de sellado observado en este estudio fue debido a que la necrosis coagulativa provocó la retracción de las fibras de colágeno lo que permitió el sellado de vasos y ductos en la zona del plano de transección (ver figura 45), un efecto que se ha demostrado en otros órganos como el hepático [223, 224, 226] o en pancreatometomía distales [114, 241]. Los resultados de nuestro estudio sugieren que el patrón histopatológico del margen de transección está caracterizado por un ligero infiltrado inflamatorio y una capa de fibrosis que rodea la necrosis coagulativa, lo cual ha sido también observado por otros autores tras una semana del empleo de técnicas de hipertermia sobre el parénquima pancreático [198, 303-305]. Estos hallazgos histológicos podrían ser el primer paso para la formación de la espesa capa de fibrosis que rodea la superficie del remanente pancreático y que hemos podido observar un mes después de la intervención en todos los animales. Esta fibrosis es la base de la capacidad de sellado de los dispositivos asistidos por RF y otras fuentes de energía térmica permitiendo el sellado total de ducto pancreáticos principales y secundarios reduciendo la probabilidad de fístula pancreática y el daño de ésta [306-308]. Además, la utilización de un único dispositivo para el corte, sellado y hemostasia de la superficie seccionada, facilita el manejo quirúrgico.

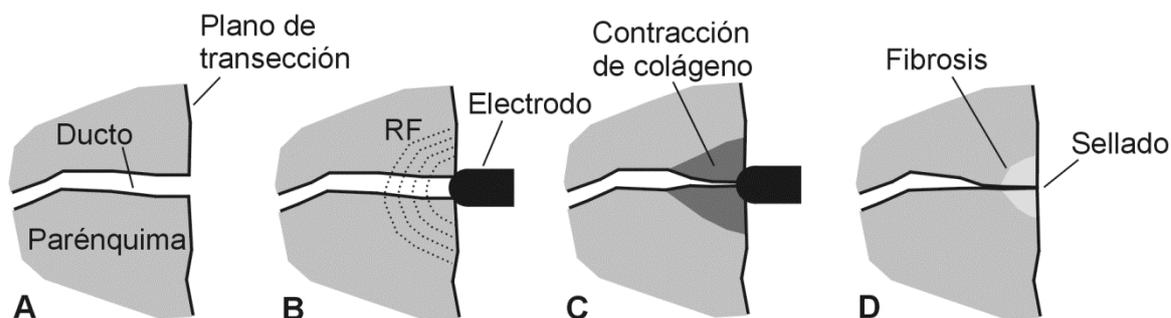


Figura 45 | Figura representativa del efecto térmico de la RF hacia el sellado de los ductos pancreáticos. Nótese que el efecto térmico de la RF (B), provoca la retracción de las fibras de colágeno (C) y forma una capa de fibrosis (D) que permiten el sellado de los ductos primarios y secundarios.

De acuerdo a otros autores [41, 48, 308-311], la ausencia de anastomosis del remanente pancreático puede prevenir muchas de las complicaciones asociadas a la duodenopancreatectomía, ya que en el caso de fístula pancreática del remanente, la gravedad es menor que cuando se origina de la anastomosis a duodeno ya que no se produce la activación de las enzimas pancreáticas. Además, tal y como sugieren gran parte de los cirujanos, la maniobra más complicada durante la duodenopancreatectomía corresponde a la anastomosis. Por consiguiente, parece ser que la simplificación de éste técnica podría representar un beneficio para cirujanos con limitada experiencia en éste procedimiento [312] o para evitar la anastomosis en aquellos pacientes que tengan una predisposición a desarrollar fístula pancreática [33, 34, 36, 90, 107, 108]. En línea con estos autores [313], un estudio prospectivo reciente concluye que la ligadura, a pesar de estar asociada a índices de morbilidad mayores que la anastomosis, puede ser una buena alternativa en determinadas circunstancias. Es por eso, que a pesar de que los resultados de éste estudio no son concluyentes, lo observado en este trabajo y los resultados obtenidos del estudio comparativo [264] sugieren que la transección del parénquima pancreático mediante un dispositivo asistido

por RF refrigerado internamente puede ser una herramienta capaz de simplificar la maniobra quirúrgica y de reducir las complicaciones asociadas a éste tipo de procedimientos.

Limitaciones del estudio

Una de las limitaciones fundamentales de estudio está asociada a la extrapolación del modelo porcino a la experiencia clínica. Como han descrito otros autores [314] el páncreas porcino puede considerarse una situación “ideal” desde el punto de vista del cirujano, debido a la presencia exigua de grasa peripancreática y a su relación no tan “íntima” con los vasos esplénicos, menos comparable con la anatomía humana. De hecho, estas características pueden facilitar su disección, pero no su transección. Además, el porcino es el modelo animal más universalmente aceptado y utilizado como aproximación a la cirugía pancreática humana [198, 207]. En línea con los modelos animales empleados, no se ha identificado en ningún caso el conducto pancreático principal previamente a la transección, si no que se ha realizado la transección en base al modelo anatómico descrito.

En cuanto al páncreas endocrino, aunque la capacidad de regeneración de islotes se ha descrito en roedores y cerdos, la capacidad regenerativa en los islotes humanos tras una lesión es menos clara. Algunos estudios denotan que el páncreas adulto mantiene la capacidad de aumentar la masa de células β asociada al embarazo [315, 316] o a la obesidad [317-319], se ha observado una capacidad proliferativa reducida, posiblemente debido al análisis post-mortem de las muestras [291, 298]. Por lo tanto, no podemos saber cuál sería el comportamiento endocrino en la extrapolación clínica.

La preservación del páncreas proximal es otra de las limitaciones del estudio, ya que no permite valorar la función exocrina ni endocrina, al dejar suficiente glándula pancreática para controlar la secreción de jugos pancreáticos así como el balance glucémico.

Otra limitación a tener en cuenta es la dificultad de mantenimiento de animales de gran tamaño (cerdos de 120 Kg), que impide plantear estudios de mayor supervivencia con éste modelo animal.

Finalmente, cabe destacar que en este estudio se ha evaluado el efecto de combinar la electrocoagulación por RF y la posterior transección del páncreas, por lo que el efecto aislado de cualquiera de los procedimientos está fuera del alcance del estudio.

Capítulo 7 | Conclusiones

7 | Conclusiones

- 1) La transección del parénquima pancreático a la altura de la vena porta (equivalente a una pancreatotomía media) mediante un dispositivo asistido por radiofrecuencia (RF), es un procedimiento seguro y factible en términos de complicaciones intra y postoperatorias.
- 2) El efecto térmico producto de la electrocoagulación por RF al realizar una pancreatotomía media es capaz de sellar los conductos pancreático en modelo murino y porcino.
- 3) El sellado a largo plazo del parénquima pancreático mediante RF se consigue por la formación de fibrosis secundaria a necrosis coagulativa producida en la superficie de transección.
- 4) El efecto térmico producido por la electrocoagulación de RF al realizar una pancreatotomía media no está asociado a la aparición de pancreatitis necrótico hemorrágica.
- 5) El efecto térmico producido por la electrocoagulación de RF al realizar una pancreatotomía media en modelo murino está asociado a índices de fístula pancreática menores al 5%.
- 6) El sellado del parénquima pancreático mediante electrocoagulación por RF al realizar una pancreatotomía media, desencadena un proceso de atrofia exocrina en el páncreas distal reduciendo de este modo la probabilidad de aparición de fístulas pancreáticas por fugas.

- 7) El proceso de atrofia exocrina en el páncreas distal producido por el sellado del parénquima pancreático mediante electrocoagulación por RF desencadena una rápida respuesta apoptótica que estimula un proceso de metaplasia acino-ductal que con el postoperatorio se reemplaza por tejido fibrótico y posterior infiltración adiposa.

- 8) El sellado del parénquima pancreático mediante electrocoagulación no está asociado al descenso de la masa endocrina en modelo porcino tras 6 meses de postoperatorio. Además, desencadena un proceso de regeneración local de células β en modelo murino y modelo porcino; aunque a diferentes periodos de postoperatorio.

Capítulo 8 | Bibliografía

8 | Bibliografía

1. Fordtran., et al., *Enfermedades gastrointestinales y hepáticas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento*,. 7 ed, ed. Editorial Médica Panamericana. Vol. Volumen 2. 2004. 1346 páginas.
2. Mescher, A.L. and C.U. Junqueira, *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. 12 ed, ed. A.L. Mescher. 2013, New York Sydney McGraw-Hill Medical: The McGraw -Hill Companies, Inc. 544.
3. Omary, M.B., et al., *The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 50-9.
4. Brissova, M., et al., *Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy*. J Histochem Cytochem, 2005. **53**(9): p. 1087-97.
5. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 10-29.
6. Alexakis, N., et al., *Current standards of surgery for pancreatic cancer*. Br J Surg, 2004. **91**(11): p. 1410-27.
7. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2009*. CA Cancer J Clin, 2009. **59**(4): p. 225-49.
8. Parkin, D.M., et al., *Estimating the world cancer burden: Globocan 2000*. Int J Cancer, 2001. **94**(2): p. 153-6.
9. Bosman, F.T., et al., eds. *WHO classification of tumours of the digestive system*. . 4th Edition ed. 2010, World Health Organization: Geneva. 417.
10. Matsuno, S., et al., *Pancreatic Cancer Registry in Japan: 20 years of experience*. Pancreas, 2004. **28**(3): p. 219-30.
11. Luttges, J., et al., *Rare ductal adenocarcinoma of the pancreas in patients younger than age 40 years*. Cancer, 2004. **100**(1): p. 173-82.
12. Gold, E.B. and S.B. Goldin, *Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer*. Surg Oncol Clin N Am, 1998. **7**(1): p. 67-91.
13. Klein, A.P., et al., *Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds*. Cancer Res, 2004. **64**(7): p. 2634-8.
14. Okusaka, T., et al., *Abdominal pain in patients with resectable pancreatic cancer with reference to clinicopathologic findings*. Pancreas, 2001. **22**(3): p. 279-84.
15. Chari, S.T., et al., *Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study*. Gastroenterology, 2005. **129**(2): p. 504-11.
16. Li, D., et al., *Pancreatic cancer*. Lancet, 2004. **363**(9414): p. 1049-57.

17. Matsuno, S., S. Egawa, and K. Arai, *Trends in treatment for pancreatic cancer*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2001. **8**(6): p. 544-8.
18. Negm, R.S., M. Verma, and S. Srivastava, *The promise of biomarkers in cancer screening and detection*. Trends Mol Med, 2002. **8**(6): p. 288-93.
19. Hruban, R.H. and N. Fukushima, *Pancreatic adenocarcinoma: update on the surgical pathology of carcinomas of ductal origin and PanINs*. Mod Pathol, 2007. **20** Suppl 1: p. S61-70.
20. Maitra, A., et al., *Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray*. Mod Pathol, 2003. **16**(9): p. 902-12.
21. Edge, S.B. and C.C. Compton, *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM*. Ann Surg Oncol, 2010. **17**(6): p. 1471-4.
22. Winter, J.M., et al., *1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience*. J Gastrointest Surg, 2006. **10**(9): p. 1199-210; discussion 1210-1.
23. Lin, P.W. and Y.J. Lin, *Prospective randomized comparison between pylorus-preserving and standard pancreaticoduodenectomy*. Br J Surg, 1999. **86**(5): p. 603-7.
24. Tran, K.T., et al., *Pylorus preserving pancreaticoduodenectomy versus standard Whipple procedure: a prospective, randomized, multicenter analysis of 170 patients with pancreatic and periampullary tumors*. Ann Surg, 2004. **240**(5): p. 738-45.
25. Seiler, C.A., et al., *Randomized clinical trial of pylorus-preserving duodenopancreatectomy versus classical Whipple resection-long term results*. Br J Surg, 2005. **92**(5): p. 547-56.
26. Tsuchiya, R., T. Tsunoda, and T. Yamaguchi, *Operation of choice for resectable carcinoma of the head of the pancreas*. Int J Pancreatol, 1990. **6**(4): p. 295-306.
27. Schlitt, H.J., et al., *Morbidity and mortality associated with pancreatogastrostomy and pancreatojejunostomy following partial pancreatoduodenectomy*. Br J Surg, 2002. **89**(10): p. 1245-51.
28. Kapur, B.M., et al., *Pancreaticogastrostomy for reconstruction of pancreatic stump after pancreaticoduodenectomy for ampullary carcinoma*. Am J Surg, 1998. **176**(3): p. 274-8.
29. Yeo, C.J., et al., *A prospective randomized trial of pancreaticogastrostomy versus pancreatojejunostomy after pancreaticoduodenectomy*. Ann Surg, 1995. **222**(4): p. 580-8; discussion 588-92.
30. Takada, T., et al., *Pancreatic enzyme activity after a pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy reconstructed with pancreaticogastrostomy*. Pancreas, 1995. **11**(3): p. 276-82.

31. Pessaux, P., et al., *Permeability and functionality of pancreaticogastrostomy after pancreaticoduodenectomy with dynamic magnetic resonance pancreatography after secretin stimulation*. J Am Coll Surg, 2002. **194**(4): p. 454-62.
32. Birkmeyer, J.D., et al., *Surgeon volume and operative mortality in the United States*. N Engl J Med, 2003. **349**(22): p. 2117-27.
33. Callery, M.P., W.B. Pratt, and C.M. Vollmer, Jr., *Prevention and management of pancreatic fistula*. J Gastrointest Surg, 2009. **13**(1): p. 163-73.
34. Yang, Y.M., et al., *Risk factors of pancreatic leakage after pancreaticoduodenectomy*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(16): p. 2456-61.
35. Shrikhande, S.V. and M.A. D'Souza, *Pancreatic fistula after pancreatectomy: evolving definitions, preventive strategies and modern management*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(38): p. 5789-96.
36. Lai, E.C., S.H. Lau, and W.Y. Lau, *Measures to prevent pancreatic fistula after pancreatoduodenectomy: a comprehensive review*. Arch Surg, 2009. **144**(11): p. 1074-80.
37. Cameron, J.L., et al., *One thousand consecutive pancreaticoduodenectomies*. Ann Surg, 2006. **244**(1): p. 10-5.
38. Bassi, C., et al., *Postoperative pancreatic fistula: an international study group (ISGPF) definition*. Surgery, 2005. **138**(1): p. 8-13.
39. Lieberman, M.D., et al., *Relation of perioperative deaths to hospital volume among patients undergoing pancreatic resection for malignancy*. Ann Surg, 1995. **222**(5): p. 638-45.
40. Vollmer, C.M., et al., *Utility of staging laparoscopy in subsets of peripancreatic and biliary malignancies*. Ann Surg, 2002. **235**(1): p. 1-7.
41. Goldsmith, H.S., *Pancreatic duct ligation: an idea revisited*. J Am Coll Surg, 2013. **217**(3): p. 560-2.
42. Lemaire, E., et al., *Functional and morphological changes in the pancreatic remnant following pancreaticoduodenectomy with pancreaticogastric anastomosis*. Br J Surg, 2000. **87**(4): p. 434-8.
43. ReMine, W.H., et al., *Total pancreatectomy*. Ann Surg, 1970. **172**(4): p. 595-604.
44. Brooks, J.R., D.C. Brooks, and J.D. Levine, *Total pancreatectomy for ductal cell carcinoma of the pancreas. An update*. Ann Surg, 1989. **209**(4): p. 405-10.
45. Andren-Sandberg, A., et al., *Surgical treatment of pancreatic cancer. The Swedish experience*. Int J Pancreatol, 1991. **9**: p. 145-51.
46. Whipple, A.O., W.B. Parsons, and C.R. Mullins, *Treatment of Carcinoma of the Ampulla of Vater*. Ann Surg, 1935. **102**(4): p. 763-79.

47. Brunschwig, A., *Pancreatoduodenectomy: a curative operation for malignant neoplasms in the pancreatoduodenal region; report of three over-five-year survivors*. Ann Surg, 1952. **136**(4): p. 610-24.
48. Goldsmith, H.S., B.C. Ghosh, and A.G. Huvos, *Ligation versus implantation of the pancreatic duct after pancreaticoduodenectomy*. Surg Gynecol Obstet, 1971. **132**(1): p. 87-92.
49. Bartoli, F.G., et al., *Pancreatic fistula and relative mortality in malignant disease after pancreaticoduodenectomy. Review and statistical meta-analysis regarding 15 years of literature*. Anticancer Res, 1991. **11**(5): p. 1831-48.
50. Grobmyer, S.R., et al., *Pancreatic anastomotic failure after pancreaticoduodenectomy*. Am J Surg, 2000. **180**(2): p. 117-20.
51. Dencker, H., *The management of the pancreatic duct at pancreatectomy*. Acta Chir Scand, 1972. **138**(6): p. 620-3.
52. Gall, F.P., et al., *Severe chronic cephalic pancreatitis: use of partial duodenopancreatectomy with occlusion of the pancreatic duct in 289 patients*. World J Surg, 1989. **13**(6): p. 809-16; discussion 816-7.
53. Gebhardt, C., et al., *Experimental studies on pancreatic duct occlusion with prolamine*. Horm Metab Res Suppl, 1983(13): p. 9-11.
54. Suc, B., et al., *Temporary fibrin glue occlusion of the main pancreatic duct in the prevention of intra-abdominal complications after pancreatic resection: prospective randomized trial*. Ann Surg, 2003. **237**(1): p. 57-65.
55. Tran, K., et al., *Occlusion of the pancreatic duct versus pancreaticojejunostomy: a prospective randomized trial*. Ann Surg, 2002. **236**(4): p. 422-8; discussion 428.
56. Little, J.M., C. Lauer, and J. Hogg, *Pancreatic duct obstruction with an acrylate glue: a new method for producing pancreatic exocrine atrophy*. Surgery, 1977. **81**(3): p. 243-9.
57. Ohwada, S., et al., *Fibrin glue sandwich prevents pancreatic fistula following distal pancreatectomy*. World J Surg, 1998. **22**(5): p. 494-8.
58. Madding, G.F. and P.A. Kennedy, *Chronic alcoholic pancreatitis. Treatment by ductal obstruction*. Am J Surg, 1973. **125**(5): p. 538-41.
59. Walker, N.I., *Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. I. The role of apoptosis and intraepithelial macrophages in acinar cell deletion*. Am J Pathol, 1987. **126**(3): p. 439-51.
60. Walker, N.I., C.M. Winterford, and J.F. Kerr, *Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. II. Duct and stromal cell proliferation, differentiation, and deletion*. Pancreas, 1992. **7**(4): p. 420-34.
61. Pound, A.W. and N.I. Walker, *Involution of the pancreas after ligation of the pancreatic ducts. I: a histological study*. Br J Exp Pathol, 1981. **62**(6): p. 547-58.

62. Watanabe, S., et al., *Changes in the mouse exocrine pancreas after pancreatic duct ligation: a qualitative and quantitative histological study*. Arch Histol Cytol, 1995. **58**(3): p. 365-74.
63. Scoggins, C.R., et al., *p53-dependent acinar cell apoptosis triggers epithelial proliferation in duct-ligated murine pancreas*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **279**(4): p. G827-36.
64. Nichols, R.J., C. New, and J.P. Annes, *Adult tissue sources for new beta cells*. Transl Res, 2014. **163**(4): p. 418-31.
65. Hao, E., S.H. Lee, and F. Levine, *Efficient beta-cell regeneration by a combination of neogenesis and replication following beta-cell ablation and reversal of pancreatic duct ligation*. Stem Cells, 2013. **31**(11): p. 2388-95.
66. Boquist, L. and C. Edstrom, *Ultrastructure of pancreatic acinar and islet parenchyma in rats at various intervals after duct ligation*. Virchows Arch A Pathol Pathol Anat, 1970. **349**(1): p. 69-79.
67. Isaksson, G., I. Ihse, and I. Lundquist, *Influence of pancreatic duct ligation on endocrine and exocrine rat pancreas*. Acta Physiol Scand, 1983. **117**(2): p. 281-6.
68. Wang, R.N., G. Kloppel, and L. Bouwens, *Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats*. Diabetologia, 1995. **38**(12): p. 1405-11.
69. Chung, C.H., et al., *Pancreatic beta-cell neogenesis by direct conversion from mature alpha-cells*. Stem Cells, 2010. **28**(9): p. 1630-8.
70. Xu, X., et al., *Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas*. Cell, 2008. **132**(2): p. 197-207.
71. Ferris, W.F., et al., *Brief occlusion of the main pancreatic duct rapidly initiates signals which lead to increased duct cell proliferation in the rat*. Cell Biol Int, 2001. **25**(1): p. 113-7.
72. Rosenberg, L., *In vivo cell transformation: neogenesis of beta cells from pancreatic ductal cells*. Cell Transplant, 1995. **4**(4): p. 371-83.
73. Rosenberg, L., *Induction of islet cell neogenesis in the adult pancreas: the partial duct obstruction model*. Microsc Res Tech, 1998. **43**(4): p. 337-46.
74. Rosenberg, L., R.A. Brown, and W.P. Duguid, *A new approach to the induction of duct epithelial hyperplasia and nesidioblastosis by cellophane wrapping of the hamster pancreas*. J Surg Res, 1983. **35**(1): p. 63-72.
75. Vinik, A., et al., *Induction of pancreatic islet neogenesis*. Horm Metab Res, 1997. **29**(6): p. 278-93.
76. Wolfe-Coote, S., et al., *The non-human primate endocrine pancreas: development, regeneration potential and metaplasia*. Cell Biol Int, 1996. **20**(2): p. 95-101.

77. Wolfe-Coote, S., et al., *Development, differentiation, and regeneration potential of the Vervet monkey endocrine pancreas*. *Microsc Res Tech*, 1998. **43**(4): p. 322-31.
78. Wolfe-Coote, S.A., et al., *Induction of cell proliferation and differentiation in the pancreas of the adult Vervet monkey (Cercopithecus aethiops): preliminary results*. *Pancreas*, 1998. **16**(2): p. 129-33.
79. Ferris, W.F., et al., *Glucocorticoid administration and brief occlusion of the main pancreatic duct are likely to increase islet mass by a similar mechanism*. *Pancreas*, 2005. **31**(2): p. 132-7.
80. Nir, T., D.A. Melton, and Y. Dor, *Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(9): p. 2553-61.
81. Lee, S.H., E. Hao, and F. Levine, *beta-Cell replication and islet neogenesis following partial pancreatectomy*. *Islets*, 2011. **3**(4): p. 188-95.
82. Bonner-Weir, S., et al., *A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development*. *Diabetes*, 1993. **42**(12): p. 1715-20.
83. Dor, Y., et al., *Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation*. *Nature*, 2004. **429**(6987): p. 41-6.
84. Peshavaria, M., et al., *Regulation of pancreatic beta-cell regeneration in the normoglycemic 60% partial-pancreatectomy mouse*. *Diabetes*, 2006. **55**(12): p. 3289-98.
85. Cano, D.A., et al., *Regulated beta-cell regeneration in the adult mouse pancreas*. *Diabetes*, 2008. **57**(4): p. 958-66.
86. Thorel, F., et al., *Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss*. *Nature*, 2010. **464**(7292): p. 1149-54.
87. Waguri, M., et al., *Demonstration of two different processes of beta-cell regeneration in a new diabetic mouse model induced by selective perfusion of alloxan*. *Diabetes*, 1997. **46**(8): p. 1281-90.
88. Rooman, I. and L. Bouwens, *Combined gastrin and epidermal growth factor treatment induces islet regeneration and restores normoglycaemia in C57Bl6/J mice treated with alloxan*. *Diabetologia*, 2004. **47**(2): p. 259-65.
89. Tokui, Y., et al., *Neogenesis and proliferation of beta-cells induced by human betacellulin gene transduction via retrograde pancreatic duct injection of an adenovirus vector*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **350**(4): p. 987-93.
90. Yamamoto, K., et al., *Recombinant human betacellulin promotes the neogenesis of beta-cells and ameliorates glucose intolerance in mice with diabetes induced by selective alloxan perfusion*. *Diabetes*, 2000. **49**(12): p. 2021-7.
91. Baeyens, L., et al., *In vitro generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells*. *Diabetologia*, 2005. **48**(1): p. 49-57.

92. Wang, Z.V., et al., *PANIC-ATTAC: a mouse model for inducible and reversible beta-cell ablation*. *Diabetes*, 2008. **57**(8): p. 2137-48.
93. Bonner-Weir, S., D.F. Trent, and G.C. Weir, *Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release*. *J Clin Invest*, 1983. **71**(6): p. 1544-53.
94. Lipsett, M. and D.T. Finegood, *beta-cell neogenesis during prolonged hyperglycemia in rats*. *Diabetes*, 2002. **51**(6): p. 1834-41.
95. Zhou, Q., et al., *In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells*. *Nature*, 2008. **455**(7213): p. 627-32.
96. Minami, K., et al., *Lineage tracing and characterization of insulin-secreting cells generated from adult pancreatic acinar cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(42): p. 15116-21.
97. Li, W.C., et al., *Activation of pancreatic-duct-derived progenitor cells during pancreas regeneration in adult rats*. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 16): p. 2792-802.
98. Inada, A., et al., *Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(50): p. 19915-9.
99. Rooman, I., J. Lardon, and L. Bouwens, *Gastrin stimulates beta-cell neogenesis and increases islet mass from transdifferentiated but not from normal exocrine pancreas tissue*. *Diabetes*, 2002. **51**(3): p. 686-90.
100. Ekberg, H., et al., *Long-term duct-occluded segmental pancreatic autografts. Does fibrosis lead to graft loss?* *Transplantation*, 1988. **46**(1): p. 21-5.
101. Gooszen, H.G., F.T. Bosman, and R. van Schilfgaarde, *The effect of duct obliteration on the histology and endocrine function of the canine pancreas*. *Transplantation*, 1984. **38**(1): p. 13-7.
102. Williamson, P., et al., *Long-term canine duct-occluded segmental pancreatic autografts: endocrine function*. *Pancreas*, 1988. **3**(6): p. 646-52.
103. Illner, W.D., et al., *Duct occlusion-induced vascularized islet grafts are not associated with progressive long-term dysfunction*. *Transplant Proc*, 1995. **27**(1): p. 1342-3.
104. Meister, R., et al., *Maximal stimulation of pancreatic islet B-cells, and A-cell response to arginine, in dogs with longterm pancreatic acinar atrophy*. *Eur J Surg*, 1991. **157**(5): p. 333-40.
105. Idezuki, Y., F.C. Goetz, and R.C. Lillehei, *Late effect of pancreatic duct ligation on beta cell function*. *Am J Surg*, 1969. **117**(1): p. 33-9.

106. Ambromovage, A.M., F.W. Pairent, and J.M. Howard, *Pancreatic exocrine insufficiency. V. The effects of long-term pancreatic duct ligation on serum insulin levels and glucose metabolism in the dog.* Ann Surg, 1973. **177**(3): p. 338-43.
107. Lin, J.W., et al., *Risk factors and outcomes in postpancreaticoduodenectomy pancreaticocutaneous fistula.* J Gastrointest Surg, 2004. **8**(8): p. 951-9.
108. Pessaux, P., et al., *External pancreatic duct stent decreases pancreatic fistula rate after pancreaticoduodenectomy: prospective multicenter randomized trial.* Ann Surg, 2011. **253**(5): p. 879-85.
109. Satoh, K., et al., *Nationwide epidemiological survey of acute pancreatitis in Japan.* Pancreas, 2011. **40**(4): p. 503-7.
110. Shen, H.N., C.L. Lu, and C.Y. Li, *Epidemiology of first-attack acute pancreatitis in Taiwan from 2000 through 2009: a nationwide population-based study.* Pancreas, 2012. **41**(5): p. 696-702.
111. Ahmed, M., et al., *Principles of and advances in percutaneous ablation.* Radiology, 2011. **258**(2): p. 351-69.
112. Navarro, S., et al., *[Recommendations of the Spanish Biliopancreatic Club for the Treatment of Acute Pancreatitis. Consensus development conference].* Gastroenterol Hepatol, 2008. **31**(6): p. 366-87.
113. Hirota, M., et al., *The sixth nationwide epidemiological survey of chronic pancreatitis in Japan.* Pancreatol, 2012. **12**(2): p. 79-84.
114. Dorcaratto, D., et al., *Radiofrequency is a secure and effective method for pancreatic transection in laparoscopic distal pancreatectomy: results of a randomized, controlled trial in an experimental model.* Surg Endosc, 2013. **27**(10): p. 3710-9.
115. Yadav, D. and A.B. Lowenfels, *Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systematic review.* Pancreas, 2006. **33**(4): p. 323-30.
116. Ruhl, C.E. and J.E. Everhart, *Gallstone disease is associated with increased mortality in the United States.* Gastroenterology, 2011. **140**(2): p. 508-16.
117. Saligram, S., et al., *Analyses of hospital administrative data that use diagnosis codes overestimate the cases of acute pancreatitis.* Clin Gastroenterol Hepatol, 2012. **10**(7): p. 805-811 e1.
118. Sadr-Azodi, O., et al., *Patients with celiac disease have an increased risk for pancreatitis.* Clin Gastroenterol Hepatol, 2012. **10**(10): p. 1136-1142 e3.
119. Opie, E.L. and J.C. Meakins, *Data Concerning the Etiology and Pathology of Hemorrhagic Necrosis of the Pancreas (Acute Hemorrhagic Pancreatitis).* J Exp Med, 1909. **11**(4): p. 561-78.
120. Lerch, M.M. and F.S. Gorelick, *Models of acute and chronic pancreatitis.* Gastroenterology, 2013. **144**(6): p. 1180-93.

121. Steer, M.L., *Surgical Research*, in *Surgical Research*, W.S. Wiley and W.W. Douglas, Editors. 2001, Academic Press. p. 733-746.
122. Hernandez, C.A. and M.M. Lerch, *Sphincter stenosis and gallstone migration through the biliary tract*. *Lancet*, 1993. **341**(8857): p. 1371-3.
123. Lerch, M.M., C.A. Hernandez, and G. Adler, *Acute pancreatitis*. *N Engl J Med*, 1994. **331**(14): p. 948-9.
124. Lerch, M.M., et al., *Pancreatic duct obstruction triggers acute necrotizing pancreatitis in the opossum*. *Gastroenterology*, 1993. **104**(3): p. 853-61.
125. Lerch, M.M., et al., *Pancreatic outflow obstruction as the critical event for human gall stone induced pancreatitis*. *Gut*, 1994. **35**(10): p. 1501-3.
126. Bradley, E.L., 3rd, *A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992*. *Arch Surg*, 1993. **128**(5): p. 586-90.
127. Dziurkowska-Marek, A., et al., *The dynamics of the oxidant-antioxidant balance in the early phase of human acute biliary pancreatitis*. *Pancreatology*, 2004. **4**(3-4): p. 215-22.
128. Lankisch, P.G., et al., *Hemoconcentration: an early marker of severe and/or necrotizing pancreatitis? A critical appraisal*. *Am J Gastroenterol*, 2001. **96**(7): p. 2081-5.
129. Blum, T., et al., *Fatal outcome in acute pancreatitis: its occurrence and early prediction*. *Pancreatology*, 2001. **1**(3): p. 237-41.
130. de Beaux, A.C., K.R. Palmer, and D.C. Carter, *Factors influencing morbidity and mortality in acute pancreatitis; an analysis of 279 cases*. *Gut*, 1995. **37**(1): p. 121-6.
131. Perez, A., et al., *Is severity of necrotizing pancreatitis increased in extended necrosis and infected necrosis?* *Pancreas*, 2002. **25**(3): p. 229-33.
132. Talamini, G., et al., *Serum creatinine and chest radiographs in the early assessment of acute pancreatitis*. *Am J Surg*, 1999. **177**(1): p. 7-14.
133. Malangoni, M.A. and A.S. Martin, *Outcome of severe acute pancreatitis*. *Am J Surg*, 2005. **189**(3): p. 273-7.
134. Lankisch, P.G., et al., *Has blood glucose level measured on admission to hospital in a patient with acute pancreatitis any prognostic value?* *Pancreatology*, 2001. **1**(3): p. 224-9.
135. Singh, V.K., et al., *An assessment of the severity of interstitial pancreatitis*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2011. **9**(12): p. 1098-103.
136. Banks, P.A., *Acute pancreatitis: medical and surgical management*. *Am J Gastroenterol*, 1994. **89**(8 Suppl): p. S78-85.
137. Gloor, B., et al., *Pancreatic infection in severe pancreatitis: the role of fungus and multiresistant organisms*. *Arch Surg*, 2001. **136**(5): p. 592-6.

138. Isenmann, R., B. Rau, and H.G. Beger, *Bacterial infection and extent of necrosis are determinants of organ failure in patients with acute necrotizing pancreatitis*. Br J Surg, 1999. **86**(8): p. 1020-4.
139. Isenmann, R., et al., *Prophylactic antibiotic treatment in patients with predicted severe acute pancreatitis: a placebo-controlled, double-blind trial*. Gastroenterology, 2004. **126**(4): p. 997-1004.
140. Bassi, C., et al., *Controlled clinical trial of pefloxacin versus imipenem in severe acute pancreatitis*. Gastroenterology, 1998. **115**(6): p. 1513-7.
141. Rau, B., et al., *Role of ultrasonographically guided fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of infected pancreatic necrosis*. Br J Surg, 1998. **85**(2): p. 179-84.
142. Luiten, E.J., et al., *Controlled clinical trial of selective decontamination for the treatment of severe acute pancreatitis*. Ann Surg, 1995. **222**(1): p. 57-65.
143. Luiten, E.J., et al., *Differential prognosis of gram-negative versus gram-positive infected and sterile pancreatic necrosis: results of a randomized trial in patients with severe acute pancreatitis treated with adjuvant selective decontamination*. Clin Infect Dis, 1997. **25**(4): p. 811-6.
144. Pederzoli, P., et al., *Conservative treatment of external pancreatic fistulas with parenteral nutrition alone or in combination with continuous intravenous infusion of somatostatin, glucagon or calcitonin*. Surg Gynecol Obstet, 1986. **163**(5): p. 428-32.
145. Mettu, S.R., et al., *Efficacy of serum nitric oxide level estimation in assessing the severity of necrotizing pancreatitis*. Pancreatolgy, 2003. **3**(6): p. 506-13; discussion 513-4.
146. Pederzoli, P., et al., *A randomized multicenter clinical trial of antibiotic prophylaxis of septic complications in acute necrotizing pancreatitis with imipenem*. Surg Gynecol Obstet, 1993. **176**(5): p. 480-3.
147. Sainio, V., et al., *Early antibiotic treatment in acute necrotising pancreatitis*. Lancet, 1995. **346**(8976): p. 663-7.
148. Nordback, I., et al., *Early treatment with antibiotics reduces the need for surgery in acute necrotizing pancreatitis--a single-center randomized study*. J Gastrointest Surg, 2001. **5**(2): p. 113-8; discussion 118-20.
149. Sharma, V.K. and C.W. Howden, *Prophylactic antibiotic administration reduces sepsis and mortality in acute necrotizing pancreatitis: a meta-analysis*. Pancreas, 2001. **22**(1): p. 28-31.
150. Villatoro, E., C. Bassi, and M. Larvin, *Antibiotic therapy for prophylaxis against infection of pancreatic necrosis in acute pancreatitis*. Cochrane Database Syst Rev, 2006(4): p. CD002941.

151. Besselink, M.G., et al., *Timing and impact of infections in acute pancreatitis*. Br J Surg, 2009. **96**(3): p. 267-73.
152. van Santvoort, H.C., et al., *A conservative and minimally invasive approach to necrotizing pancreatitis improves outcome*. Gastroenterology, 2011. **141**(4): p. 1254-63.
153. Beger, H.G., et al., *Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective clinical study*. Gastroenterology, 1986. **91**(2): p. 433-8.
154. Baillie, J., *Pancreatic pseudocysts (Part I)*. Gastrointest Endosc, 2004. **59**(7): p. 873-9.
155. Baillie, J., *Pancreatic pseudocysts (Part II)*. Gastrointest Endosc, 2004. **60**(1): p. 105-13.
156. Forsmark, C.E., et al., *AGA Institute technical review on acute pancreatitis*. Gastroenterology, 2007. **132**(5): p. 2022-44.
157. Crawford, H.C., et al., *Matrix metalloproteinase-7 is expressed by pancreatic cancer precursors and regulates acinar-to-ductal metaplasia in exocrine pancreas*. J Clin Invest, 2002. **109**(11): p. 1437-44.
158. Hartig, S.M., *Basic image analysis and manipulation in ImageJ*, in *Curr Protoc Mol Biol*. 2013. p. Unit14 15.
159. Schneider, A., J.M. Lohr, and M.V. Singer, *The M-ANNHEIM classification of chronic pancreatitis: introduction of a unifying classification system based on a review of previous classifications of the disease*. J Gastroenterol, 2007. **42**(2): p. 101-19.
160. Kloppel, G., S. Detlefsen, and B. Feyerabend, *Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern*. Virchows Arch, 2004. **445**(1): p. 1-8.
161. Andren-Sandberg, A., D. Hoem, and H. Gislason, *Pain management in chronic pancreatitis*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2002. **14**(9): p. 957-70.
162. Etemad, B. and D.C. Whitcomb, *Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments*. Gastroenterology, 2001. **120**(3): p. 682-707.
163. Homma, T., H. Harada, and M. Koizumi, *Diagnostic criteria for chronic pancreatitis by the Japan Pancreas Society*. Pancreas, 1997. **15**(1): p. 14-5.
164. Bellizzi, A.M. and W.L. Frankel, *Pancreatic Pathology: A Practical Review*. Labmedicine, 2009. **40**(70): p. 9.
165. Clain, J.E. and R.K. Pearson, *Diagnosis of chronic pancreatitis. Is a gold standard necessary?* Surg Clin North Am, 1999. **79**(4): p. 829-45.
166. Chari, S.T. and M.V. Singer, *The problem of classification and staging of chronic pancreatitis. Proposals based on current knowledge of its natural history*. Scand J Gastroenterol, 1994. **29**(10): p. 949-60.
167. Walsh, T.N., et al., *Minimal change chronic pancreatitis*. Gut, 1992. **33**(11): p. 1566-71.
168. Whitcomb, D.C., et al., *Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene*. Nat Genet, 1996. **14**(2): p. 141-5.

169. Witt, H., et al., *Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis*. Nat Genet, 2000. **25**(2): p. 213-6.
170. Sharer, N., et al., *Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis*. N Engl J Med, 1998. **339**(10): p. 645-52.
171. Sarles, H., et al., *Observations on 205 confirmed cases of acute pancreatitis, recurring pancreatitis, and chronic pancreatitis*. Gut, 1965. **6**(6): p. 545-59.
172. Kloppel, G., et al., *Pathology and nomenclature of human gastrointestinal neuroendocrine (carcinoid) tumors and related lesions*. World J Surg, 1996. **20**(2): p. 132-41.
173. Freiburghaus, A.U., F. Redha, and R.W. Ammann, *Does acute pancreatitis progress to chronic pancreatitis? A microvascular pancreatitis model in the rat*. Pancreas, 1995. **11**(4): p. 374-81.
174. Sarles, H., *Etiopathogenesis and definition of chronic pancreatitis*. Dig Dis Sci, 1986. **31**(9 Suppl): p. 91S-107S.
175. Lindkvist, B., *Diagnosis and treatment of pancreatic exocrine insufficiency*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(42): p. 7258-66.
176. DiMagno, E.P., V.L. Go, and W.H. Summerskill, *Relations between pancreatic enzyme outputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency*. N Engl J Med, 1973. **288**(16): p. 813-5.
177. DiMagno, E.P., et al., *Fate of orally ingested enzymes in pancreatic insufficiency. Comparison of two dosage schedules*. N Engl J Med, 1977. **296**(23): p. 1318-22.
178. Dumonceau, J.M. and C. Macias-Gomez, *Endoscopic management of complications of chronic pancreatitis*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(42): p. 7308-15.
179. Cho, A., et al., *Comparison of laparoscopy-assisted and open pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy for periampullary disease*. Am J Surg, 2009. **198**(3): p. 445-9.
180. Staudacher, C., et al., *Laparoscopic assisted duodenopancreatectomy*. Surg Endosc, 2005. **19**(3): p. 352-6.
181. Jayne, D.G., et al., *Five-year follow-up of the Medical Research Council CLASICC trial of laparoscopically assisted versus open surgery for colorectal cancer*. Br J Surg, 2010. **97**(11): p. 1638-45.
182. Gagner, M. and A. Pomp, *Laparoscopic pylorus-preserving pancreatoduodenectomy*. Surg Endosc, 1994. **8**(5): p. 408-10.
183. Gumbs, A.A., et al., *Laparoscopic pancreatoduodenectomy: a review of 285 published cases*. Ann Surg Oncol, 2011. **18**(5): p. 1335-41.
184. Nakamura, Y., et al., *Pancreaticojejunostomy with closure of the pancreatic stump by endoscopic linear stapler in laparoscopic pancreaticoduodenectomy: a reliable*

- technique and benefits for pancreatic resection. Asian J Endosc Surg, 2012. 5(4): p. 191-4.*
185. Jacobs, M.J. and A. Kamyab, *Total laparoscopic pancreaticoduodenectomy. JSLS, 2013. 17(2): p. 188-93.*
186. Dulucq, J.L., P. Wintringer, and A. Mahajna, *Laparoscopic pancreaticoduodenectomy for benign and malignant diseases. Surg Endosc, 2006. 20(7): p. 1045-50.*
187. Dulucq, J.L., et al., *Are major laparoscopic pancreatic resections worthwhile? A prospective study of 32 patients in a single institution. Surg Endosc, 2005. 19(8): p. 1028-34.*
188. Gagner, M. and A. Pomp, *Laparoscopic pancreatic resection: Is it worthwhile? J Gastrointest Surg, 1997. 1(1): p. 20-5; discussion 25-6.*
189. Gumbs, A.A. and B. Gayet, *The laparoscopic duodenopancreatectomy: the posterior approach. Surg Endosc, 2008. 22(2): p. 539-40.*
190. Kendrick, M.L. and D. Cusati, *Total laparoscopic pancreaticoduodenectomy: feasibility and outcome in an early experience. Arch Surg, 2010. 145(1): p. 19-23.*
191. Palanivelu, C., et al., *Evolution in techniques of laparoscopic pancreaticoduodenectomy: a decade long experience from a tertiary center. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2009. 16(6): p. 731-40.*
192. Pugliese, R., et al., *Laparoscopic pancreaticoduodenectomy: a retrospective review of 19 cases. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech, 2008. 18(1): p. 13-8.*
193. Sugo, H., et al., *Distal pancreatectomy using the harmonic scalpel. Surgery, 2000. 128(3): p. 490-1.*
194. Orsenigo, E., et al., *Laparoscopic central pancreatectomy. Am J Surg, 2006. 191(4): p. 549-52.*
195. Heverhagen, A.E., et al., *Harmonic scalpel versus conventional dissection technique in pylorus-preserving partial duodenopancreatectomy. Dig Surg, 2012. 29(5): p. 420-5.*
196. Sugo, H., et al., *Comparison of ultrasonically activated scalpel versus conventional division for the pancreas in distal pancreatectomy. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2001. 8(4): p. 349-52.*
197. Suzuki, Y., et al., *Randomized clinical trial of ultrasonic dissector or conventional division in distal pancreatectomy for non-fibrotic pancreas. Br J Surg, 1999. 86(5): p. 608-11.*
198. Hartwig, W., et al., *LigaSure for pancreatic sealing during distal pancreatectomy. World J Surg, 2010. 34(5): p. 1066-70.*
199. Belli, G., et al., *Pancreaticoduodenectomy in portal hypertension: use of the Ligasure. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2003. 10(3): p. 215-7.*

200. Eng, O.S., et al., *Safety and efficacy of LigaSure usage in pancreaticoduodenectomy*. HPB (Oxford), 2013. **15**(10): p. 747-52.
201. Pointer, D.T., Jr., L.M. Slakey, and D.P. Slakey, *Safety and effectiveness of vessel sealing for dissection during pancreaticoduodenectomy*. Am Surg, 2013. **79**(3): p. 290-5.
202. Gehrig, T., et al., *LigaSure versus conventional dissection technique in pancreatoduodenectomy: a pilot study*. Am J Surg, 2011. **201**(2): p. 166-70.
203. Gehrig, T., et al., *LigaSure Impact versus conventional dissection technique in pylorus-preserving pancreatoduodenectomy in clinical suspicion of cancerous tumours on the head of the pancreas: study protocol for a randomised controlled trial*. Trials, 2011. **12**: p. 162.
204. Ferrone, C.R., et al., *Pancreatic fistula rates after 462 distal pancreatectomies: staplers do not decrease fistula rates*. J Gastrointest Surg, 2008. **12**(10): p. 1691-7; discussion 1697-8.
205. Diener, M.K., et al., *Efficacy of stapler versus hand-sewn closure after distal pancreatectomy (DISPACT): a randomised, controlled multicentre trial*. Lancet, 2011. **377**(9776): p. 1514-22.
206. Rostas, J.W., W.O. Richards, and L.W. Thompson, *Improved rate of pancreatic fistula after distal pancreatectomy: parenchymal division with the use of saline-coupled radiofrequency ablation*. HPB (Oxford), 2012. **14**(8): p. 560-4.
207. Truty, M.J., M.D. Sawyer, and F.G. Que, *Decreasing pancreatic leak after distal pancreatectomy: saline-coupled radiofrequency ablation in a porcine model*. J Gastrointest Surg, 2007. **11**(8): p. 998-1007.
208. Weber, J.C., et al., *New technique for liver resection using heat coagulative necrosis*. Ann Surg, 2002. **236**(5): p. 560-3.
209. Berjano, E., *Ablación quirúrgica. Fuentes de energía y tecnologías*. Cir. Cardio., 2008. **15**(4): p. 375-83.
210. Pennes, H.H., *Analysis of tissue and arterial blood temperatures in the resting human forearm*. Journal of applied physiology, 1948. **1**(2): p. 93-122.
211. Berjano, E.J., J. Saiz, and J.M. Ferrero, *Radio-frequency heating of the cornea: theoretical model and in vitro experiments*. IEEE transactions on bio-medical engineering, 2002. **49**(3): p. 196-205.
212. Larson, T.R., D.G. Bostwick, and A. Corica, *Temperature-correlated histopathologic changes following microwave thermoablation of obstructive tissue in patients with benign prostatic hyperplasia*. Urology, 1996. **47**(4): p. 463-9.
213. Curley, S.A. and F. Izzo, *Radiofrequency ablation of primary and metastatic hepatic malignancies*. Int J Clin Oncol, 2002. **7**(2): p. 72-81.

214. Ganguli, S. and S. Goldberg, *Radiofrequency equipment and scientific basis for radiofrequency ablation.*, in *Interventional radiological treatment of liver tumors*, A. Adam and P. Mueller, Editors. 2009, Cambridge University Press: Cambridge.
215. Zervas, N.T. and A. Kuwayama, *Pathological characteristics of experimental thermal lesions. Comparison of induction heating and radiofrequency electrocoagulation.* Journal of neurosurgery, 1972. **37**(4): p. 418-22.
216. Goldberg, S.N., et al., *Treatment of intrahepatic malignancy with radiofrequency ablation: radiologic-pathologic correlation.* Cancer, 2000. **88**(11): p. 2452-63.
217. Goldberg, S.N., G.S. Gazelle, and P.R. Mueller, *Thermal ablation therapy for focal malignancy: a unified approach to underlying principles, techniques, and diagnostic imaging guidance.* AJR. American journal of roentgenology, 2000. **174**(2): p. 323-31.
218. Zhu, W.G., et al., *Promotion of heat-induced apoptosis in FM3A cells by protease inhibitors.* Biochem Biophys Res Commun, 1996. **225**(3): p. 924-31.
219. Yonezawa, M., et al., *Hyperthermia induces apoptosis in malignant fibrous histiocytoma cells in vitro.* Int J Cancer, 1996. **66**(3): p. 347-51.
220. Sakaguchi, Y., et al., *Apoptosis in tumors and normal tissues induced by whole body hyperthermia in rats.* Cancer Res, 1995. **55**(22): p. 5459-64.
221. Hotta, S., et al., *Immediate changes in subcellular structures of transplanted tumors following photodynamic and laser hyperthermic therapy.* Lasers Surg Med, 1995. **16**(3): p. 262-71.
222. Goldberg, S.N. and G.S. Gazelle, *Radiofrequency tissue ablation: physical principles and techniques for increasing coagulation necrosis.* Hepato-gastroenterology, 2001. **48**(38): p. 359-67.
223. Burdio, F., et al., *Research and development of a new RF-assisted device for bloodless rapid transection of the liver: computational modeling and in vivo experiments.* Biomed Eng Online, 2009. **8**: p. 6.
224. Burdio, F., et al., *A radiofrequency-assisted device for bloodless rapid transection of the liver: a comparative study in a pig liver model.* Eur J Surg Oncol, 2008. **34**(5): p. 599-605.
225. Navarro, A., et al., *Laparoscopic blood-saving liver resection using a new radiofrequency-assisted device: preliminary report of an in vivo study with pig liver.* Surg Endosc, 2008. **22**(5): p. 1384-91.
226. Burdio, F., et al., *A new single-instrument technique for parenchyma division and hemostasis in liver resection: a clinical feasibility study.* Am J Surg, 2010. **200**(6): p. e75-80.

227. Rios, J.S., et al., *Single instrument for hemostatic control in laparoscopic partial nephrectomy in a porcine model without renal vascular clamping*. J Endourol, 2011. **25**(6): p. 1005-11.
228. Siriwardena, A.K., *Radiofrequency ablation for locally advanced cancer of the pancreas*. JOP, 2006. **7**(1): p. 1-4.
229. Elias, D., et al., *Necrotizing pancreatitis after radiofrequency destruction of pancreatic tumours*. Eur J Surg Oncol, 2004. **30**(1): p. 85-7.
230. Casadei, R., et al., *A prospective study on radiofrequency ablation locally advanced pancreatic cancer*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2010. **9**(3): p. 306-11.
231. Wu, Y., et al., *High operative risk of cool-tip radiofrequency ablation for unresectable pancreatic head cancer*. J Surg Oncol, 2006. **94**(5): p. 392-5.
232. Hadjicostas, P., et al., *Radiofrequency ablation in pancreatic cancer*. HPB (Oxford), 2006. **8**(1): p. 61-4.
233. Cantore, M., et al., *Combined modality treatment for patients with locally advanced pancreatic adenocarcinoma*. Br J Surg, 2012. **99**(8): p. 1083-8.
234. Spiliotis, J., *Commentary on pancreatic carcinoma: the role of radiofrequency ablation in advanced disease*. Cancers (Basel), 2010. **2**(4): p. 2055-7.
235. Spiliotis, J.D., et al., *Radiofrequency ablation combined with palliative surgery may prolong survival of patients with advanced cancer of the pancreas*. Langenbecks Arch Surg, 2007. **392**(1): p. 55-60.
236. Girelli, R., et al., *Feasibility and safety of radiofrequency ablation for locally advanced pancreatic cancer*. Br J Surg, 2010. **97**(2): p. 220-5.
237. Girelli, R., et al., *Results of 100 pancreatic radiofrequency ablations in the context of a multimodal strategy for stage III ductal adenocarcinoma*. Langenbecks Arch Surg, 2013. **398**(1): p. 63-9.
238. Fegrachi, S., et al., *Radiofrequency ablation of the pancreas with and without intraluminal duodenal cooling in a porcine model*. J Surg Res, 2013. **184**(2): p. 867-72.
239. Blansfield, J.A., et al., *Novel method of stump closure for distal pancreatectomy with a 75% reduction in pancreatic fistula rate*. J Gastrointest Surg, 2012. **16**(3): p. 524-8.
240. Nagakawa, Y., et al., *The VIO soft-coagulation system can prevent pancreatic fistula following pancreatectomy*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2008. **15**(4): p. 359-65.
241. Dorcaratto, D., et al., *Laparoscopic distal pancreatectomy: feasibility study of radiofrequency-assisted transection in a porcine model*. J Laparoendosc Adv Surg Tech A, 2012. **22**(3): p. 242-8.
242. Kitagawa, H., et al., *Nonclosure technique with saline-coupled bipolar electrocautery in management of the cut surface after distal pancreatectomy*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2008. **15**(4): p. 377-83.

243. McCormack, L., H. Petrowsky, and P.A. Clavien, *Novel approach using dissecting sealer for uncinata process resection during pancreaticoduodenectomy*. J Am Coll Surg, 2006. **202**(3): p. 556-8.
244. Cavelti-Weder, C., et al., *Pancreatic duct ligation after almost complete beta-cell loss: exocrine regeneration but no evidence of beta-cell regeneration*. Endocrinology, 2013. **154**(12): p. 4493-502.
245. Richards, C., et al., *Segmental Division of the Rat Pancreas for Experimental Procedures*. Lab Invest, 1964. **13**: p. 1303-21.
246. Kara, M.E., *The anatomical study on the rat pancreas and its ducts with emphasis on the surgical approach*. Ann Anat, 2005. **187**(2): p. 105-12.
247. Bouwens, L., F. Braet, and H. Heimberg, *Identification of rat pancreatic duct cells by their expression of cytokeratins 7, 19, and 20 in vivo and after isolation and culture*. J Histochem Cytochem, 1995. **43**(3): p. 245-53.
248. Fanjul, M., et al., *Evidence for epithelial-mesenchymal transition in adult human pancreatic exocrine cells*. J Histochem Cytochem, 2010. **58**(9): p. 807-23.
249. Elayat, A.A., M.M. el-Naggar, and M. Tahir, *An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets*. J Anat, 1995. **186 (Pt 3)**: p. 629-37.
250. Wang, S., et al., *Neurog3 gene dosage regulates allocation of endocrine and exocrine cell fates in the developing mouse pancreas*. Dev Biol, 2010. **339**(1): p. 26-37.
251. Vert, G. and J. Chory, *Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 96-100.
252. Martínez-Gonzalez, M.A., I.J. E., and F.J. Faulin Fajardo, eds. *Bioestadística Amigable*. 2a Edición ed. 2006, DIAZ DE SANTOS. 936.
253. Ferrer, J., et al., *Pig pancreas anatomy: implications for pancreas procurement, preservation, and islet isolation*. Transplantation, 2008. **86**(11): p. 1503-10.
254. Poole, T.B., P. English, and Universities Federation for Animal Welfare., *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals*. 7th ed. 1999, Oxford ; Malden, Mass., USA: Blackwell Science.
255. Mirza, A.N., et al., *Radiofrequency ablation of solid tumors*. Cancer J, 2001. **7**(2): p. 95-102.
256. Lee, J.M., et al., *Percutaneous radiofrequency ablation for inoperable non-small cell lung cancer and metastases: preliminary report*. Radiology, 2004. **230**(1): p. 125-34.
257. Zlotta, A.R., et al., *Radiofrequency interstitial tumor ablation (RITA) is a possible new modality for treatment of renal cancer: ex vivo and in vivo experience*. J Endourol, 1997. **11**(4): p. 251-8.

258. Boss, A., et al., *Magnetic resonance-guided percutaneous radiofrequency ablation of renal cell carcinomas: a pilot clinical study*. Invest Radiol, 2005. **40**(9): p. 583-90.
259. Hayashi, A.H., et al., *Treatment of invasive breast carcinoma with ultrasound-guided radiofrequency ablation*. Am J Surg, 2003. **185**(5): p. 429-35.
260. Shariat, S.F., et al., *Pilot study of radiofrequency interstitial tumor ablation (RITA) for the treatment of radio-recurrent prostate cancer*. Prostate, 2005. **65**(3): p. 260-7.
261. Martel, J., A. Bueno, and E. Ortiz, *Percutaneous radiofrequency treatment of osteoid osteoma using cool-tip electrodes*. Eur J Radiol, 2005. **56**(3): p. 403-8.
262. Callstrom, M.R., et al., *Painful metastases involving bone: feasibility of percutaneous CT- and US-guided radio-frequency ablation*. Radiology, 2002. **224**(1): p. 87-97.
263. Gananadha, S., S. Wulf, and D.L. Morris, *Safety and efficacy of radiofrequency ablation of brain: a potentially minimally invasive treatment for brain tumours*. Minim Invasive Neurosurg, 2004. **47**(6): p. 325-8.
264. Burdío, F., et al., *Using the sealing effect of radiofrequency-assisted transection of the pancreas to avoid pancreatic anastomosis after pancreaticoduodenectomy. A controlled study on the pig through a laparoscopic approach*. Surg Endosc, Under review 2014.
265. Goldberg, S.N., et al., *EUS-guided radiofrequency ablation in the pancreas: results in a porcine model*. Gastrointest Endosc, 1999. **50**(3): p. 392-401.
266. Bockman, D.E., *Morphology of the exocrine pancreas related to pancreatitis*. Microsc Res Tech, 1997. **37**(5-6): p. 509-19.
267. Rooman, I., et al., *Mitogenic effect of gastrin and expression of gastrin receptors in duct-like cells of rat pancreas*. Gastroenterology, 2001. **121**(4): p. 940-9.
268. Wagner, M., et al., *Malignant transformation of duct-like cells originating from acini in transforming growth factor transgenic mice*. Gastroenterology, 1998. **115**(5): p. 1254-62.
269. Gu, D. and N. Sarvetnick, *Epithelial cell proliferation and islet neogenesis in IFN-g transgenic mice*. Development, 1993. **118**(1): p. 33-46.
270. Ball, S.G. and T.M. Barber, *Molecular development of the pancreatic beta cell: implications for cell replacement therapy*. Trends Endocrinol Metab, 2003. **14**(8): p. 349-55.
271. Criscimanna, A., et al., *Duct cells contribute to regeneration of endocrine and acinar cells following pancreatic damage in adult mice*. Gastroenterology, 2011. **141**(4): p. 1451-62, 1462 e1-6.
272. Iovanna, J.L., *Redifferentiation and apoptosis of pancreatic cells during acute pancreatitis*. Int J Pancreatol, 1996. **20**(2): p. 77-84.
273. Bhatia, M., *Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **286**(2): p. G189-96.

274. Kaiser, A.M., et al., *Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis*. Am J Physiol, 1995. **269**(5 Pt 1): p. C1295-304.
275. Desai, B.M., et al., *Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet beta cell, regeneration*. J Clin Invest, 2007. **117**(4): p. 971-7.
276. Jensen, J.N., et al., *Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration*. Gastroenterology, 2005. **128**(3): p. 728-41.
277. Strobel, O., et al., *In vivo lineage tracing defines the role of acinar-to-ductal transdifferentiation in inflammatory ductal metaplasia*. Gastroenterology, 2007. **133**(6): p. 1999-2009.
278. Di Carlo, V., et al., *Pancreatoduodenectomy with occlusion of the residual stump by Neoprene injection*. World J Surg, 1989. **13**(1): p. 105-10; discussion 110-1.
279. Gall, F.P., et al., *Duodenal pancreatectomy with occlusion of the pancreatic duct*. Hepatogastroenterology, 1990. **37**(3): p. 290-4.
280. Quesada, R., et al., *Radiofrequency pancreatic ablation and section of the main pancreatic duct does not lead to necrotizing pancreatitis*. Pancreas, 2014. **43**(6): p. 931-7.
281. Rankin, M.M., et al., *beta-Cells are not generated in pancreatic duct ligation-induced injury in adult mice*. Diabetes, 2013. **62**(5): p. 1634-45.
282. Gepts, W., *Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus*. Diabetes, 1965. **14**(10): p. 619-33.
283. Meier, J.J., et al., *Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration?* Diabetologia, 2005. **48**(11): p. 2221-8.
284. Butler, A.E., et al., *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. Diabetes, 2003. **52**(1): p. 102-10.
285. Teta, M., et al., *Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors*. Dev Cell, 2007. **12**(5): p. 817-26.
286. Hao, E., et al., *Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelial cells of the adult human pancreas*. Nat Med, 2006. **12**(3): p. 310-6.
287. Ramiya, V.K., et al., *Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells*. Nat Med, 2000. **6**(3): p. 278-82.
288. Sarvetnick, N.E. and D. Gu, *Regeneration of pancreatic endocrine cells in interferon-gamma transgenic mice*. Adv Exp Med Biol, 1992. **321**: p. 85-9; discussion 91-3.
289. Collombat, P., et al., *The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells*. Cell, 2009. **138**(3): p. 449-62.

290. Mellitzer, G., et al., *Pancreatic islet progenitor cells in neurogenin 3-yellow fluorescent protein knock-add-on mice*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(11): p. 2765-76.
291. Bonner-Weir, S., et al., *Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story*. Diabetes, 2010. **59**(10): p. 2340-8.
292. Chung, C.H. and F. Levine, *Adult pancreatic alpha-cells: a new source of cells for beta-cell regeneration*. Rev Diabet Stud, 2010. **7**(2): p. 124-31.
293. Demeterco, C., et al., *Adult human beta-cell neogenesis?* Diabetes Obes Metab, 2009. **11 Suppl 4**: p. 46-53.
294. Thorel, F. and P.L. Herrera, *[Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells in diabetic mice]*. Med Sci (Paris), 2010. **26**(11): p. 906-9.
295. Ritzel, R.A., et al., *Relationship between beta-cell mass and fasting blood glucose concentration in humans*. Diabetes Care, 2006. **29**(3): p. 717-8.
296. Konstantinova, I., et al., *EphA-Ephrin-A-mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets*. Cell, 2007. **129**(2): p. 359-70.
297. Mezza, T., et al., *Insulin resistance alters islet morphology in nondiabetic humans*. Diabetes, 2014. **63**(3): p. 994-1007.
298. Montanya, E., *Insulin resistance compensation: not just a matter of beta-Cells?* Diabetes, 2014. **63**(3): p. 832-4.
299. Ekberg, H., et al., *Long-term function and histology of duct-occluded segmental pancreatic autografts in the dog*. Transplant Proc, 1988. **20**(1): p. 81-3.
300. Little, J.M., M. Stephen, and J. Hogg, *Duct obstruction with an acrylate glue for treatment of chronic alcoholic pancreatitis*. Lancet, 1979. **2**(8142): p. 557-9.
301. Land, W., et al., *Pancreatic duct obstruction with prolamine solution*. Transplant Proc, 1980. **12**(4 Suppl 2): p. 72-5.
302. Menge, B.A., et al., *Partial pancreatectomy in adult humans does not provoke beta-cell regeneration*. Diabetes, 2008. **57**(1): p. 142-9.
303. Chamberlain, R.S., et al., *Can harmonic focus curved shear effectively seal the pancreatic ducts and prevent pancreatic leak? Feasibility evaluation and testing in ex vivo and in vivo porcine models*. J Surg Res, 2009. **157**(2): p. 279-83.
304. Gehrig, T., et al., *Comparison of Different Surgical Techniques in Distal Pancreatectomy: An Experimental Study in a Porcine Model*. Surg Innov, 2011.
305. Goldberg, S.N., et al., *EUS-guided radiofrequency ablation in the pancreas: results in a porcine model*. Gastrointestinal endoscopy, 1999. **50**(3): p. 392-401.
306. Papachristou, D.N. and J.G. Fortner, *Pancreatic fistula complicating pancreatectomy for malignant disease*. Br J Surg, 1981. **68**(4): p. 238-40.
307. Papachristou, D.N. and J.G. Fortner, *Management of the pancreatic remnant in pancreatoduodenectomy*. J Surg Oncol, 1981. **18**(1): p. 1-7.

308. Marcus, S.G., H. Cohen, and J.H. Ranson, *Optimal management of the pancreatic remnant after pancreaticoduodenectomy*. *Ann Surg*, 1995. **221**(6): p. 635-45; discussion 645-8.
309. Brunschwig, A., *Resection of head of pancreas and duodenum for carcinoma--pancreatoduodenectomy*. *CA Cancer J Clin*, 1974. **24**(6): p. 363-7.
310. Papachristou, D.N., H. D'Agostino, and J.G. Fortner, *Ligation of the pancreatic duct in pancreatectomy*. *Br J Surg*, 1980. **67**(4): p. 260-2.
311. Shankar, S., B. Theis, and R.C. Russell, *Management of the stump of the pancreas after distal pancreatic resection*. *Br J Surg*, 1990. **77**(5): p. 541-4.
312. Coleman, J.J., et al., *Early subspecialization and perceived competence in surgical training: are residents ready?* *J Am Coll Surg*, 2013. **216**(4): p. 764-71; discussion 771-3.
313. Fromm, D. and K. Schwarz, *Ligation of the pancreatic duct during difficult operative circumstances*. *J Am Coll Surg*, 2003. **197**(6): p. 943-8.
314. Hanly, E.J., et al., *New tools for laparoscopic division of the pancreas: a comparative animal study*. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*, 2004. **14**(2): p. 53-60.
315. Green, I.C. and K.W. Taylor, *Effects of pregnancy in the rat on the size and insulin secretory response of the islets of Langerhans*. *J Endocrinol*, 1972. **54**(2): p. 317-25.
316. Van Assche, F.A., L. Aerts, and F. De Prins, *A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy*. *Br J Obstet Gynaecol*, 1978. **85**(11): p. 818-20.
317. Bruning, J.C., et al., *Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles*. *Cell*, 1997. **88**(4): p. 561-72.
318. Kloppel, G., et al., *Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited*. *Surv Synth Pathol Res*, 1985. **4**(2): p. 110-25.
319. Rahier, J., et al., *Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes*. *Diabetes Obes Metab*, 2008. **10 Suppl 4**: p. 32-42.

Capítulo 9 | Anexos

9 | Anexos

Anexo 1: Información suplementaria

Anexo 1-A: Macro para el Análisis morfométrico y cuantitativo en Fase 2

```

//*****
// InsulineColorDetector, is a macro for quick estimation insuline leve from 'jpg' or 'tif' images
// (RGB;1360x1024).
/// Copyright (C) 2014 Raul Gomez Riera
// This program is free software: you can redistribute it and/or modify it under the terms of the GNU
// General Public License as published by the Free Software Foundation, either version 3 of the License,
// or (at your option) any later version.
// This program is distributed in the hope that it will be useful, but WITHOUT ANY WARRANTY; without
// even the implied warranty of MERCHANTABILITY or FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. See
// the GNU General Public License for more details.
// You should have received a copy of the GNU General Public License along with this program. If not,
// see <http://www.gnu.org/licenses/>.
//
// Date: 2014/04/04
// Author: Raul Gomez
// Collaboration: Rita Quesada
// Contact information:
// e-mail: gomezriera@gmail.com
//*****
function ThresholdColour(Hue,minSaturation,Brightness)
{
// Color Thresholder 1.48s
// Autogenerated macro, single images only!
min=newArray(3);
max=newArray(3);
filter=newArray(3);
a=getTitle();
run("HSB Stack");
run("Convert Stack to Images");

selectWindow("Hue");
rename("0");

```

```

selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]=0;
max[0]=Hue;
filter[0]="pass";
min[1]=minSaturation;
max[1]=255;
filter[1]="pass";
min[2]=0;
max[2]=Brightness;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    setThreshold(min[i], max[i]);
    run("Convert to Mask");
    if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0","1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0","2");
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a);
// Colour Thresholding-----
}

//***** Main *****
requires("1.48s");
run("Colors...", "foreground=white background=black selection=yellow");
//We stablish empirically hue, saturation and brightness
Dialog.create("Insuline Detector");
Dialog.addMessage(" Image Datasets");
Dialog.addString("Directory path: ", "C:\\");
Dialog.addMessage(" Color Threshold");
Dialog.addNumber("Hue ",28);

```

```

Dialog.addNumber("min Saturation ",134);
Dialog.addNumber("Brightness ",138);
Dialog.show();

path_source = Dialog.getString();
Hue = Dialog.getNumber();
minSaturation = Dialog.getNumber();
Brightness = Dialog.getNumber();

fileList = exec('cmd' ,'/c', 'dir ' + path_source + ' /TC /OD /B | findstr /r ".*jpg .*tif");
listOfstring = split(fileList,'\n');

roiManager("reset");
setBatchMode(true);
showProgress(0.0);
if (listOfstring.length == 0)
{
    exit("No image file is found");
}

for (i = 0; i<listOfstring.length; i++)
{

    showProgress(i/(listOfstring.length));
    open(path_source + '\\' + listOfstring[i]);
    run("Bio-Formats Importer", 'open=' + path_source + '\\' + listOfstring[i] + '\\' + ' autoscale
color_mode=Default view=Hyperstack stack_order=XYCZT');
    run("Set Scale...", "distance=1 known=1.79 pixel=1 unit=um");
    run("Gaussian Blur...", "sigma=3");
    // Gaussian Blur can be inactivated
    title = listOfstring[i];
    j = 1;
    while (j<=nSlices)
    {
        setSlice(j);
        run("Enhance Contrast...", "saturated=0.3");
        j++;
    }
    run("RGB Color");
    selectImage(title);
}

```

```

close(title);

ThresholdColour(Hue,minSaturation,Brightness);
rename(listOfstring[i]);
run("Set Measurements...", "area redirect=None decimal=2");
run("Analyze Particles...", "size=5-Infinity circularity=0.00-1.00 pixel show=Masks clear summarize");
// Analyze particles

if (nResults != 0)
{
run("Create Selection");
roiManager("Add");
roiManager("Select",i);
roiManager("Rename", title);
}
else
{
run("Select All");
roiManager("Add");
roiManager("Select",i);
roiManager("Rename", title);
}

while (nImages>0)
{
selectImage(nImages);
close();
}
call("java.lang.System.gc");
}
showProgress(1.0);
call("java.lang.System.gc");
setBatchMode(false);
getDateAndTime(year, month, dayOfWeek, dayOfMonth, hour, minute, second, msec);
roiManager("Save", path_source + '\\' + d2s(year,0) + '_' + d2s(month,0) + '_' + d2s(dayOfMonth,0) + '_' +
d2s(hour,0) + '_' + d2s(minute,0) + '_' + d2s(second,0) + '_' + d2s(msec,0) + "_ROI.zip");
selectWindow("ROI Manager");
run("Close");

selectWindow("Summary");

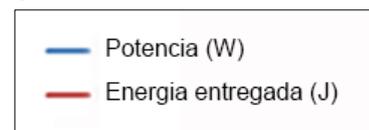
```

```
saveAs("Text", path_source + '\\' + d2s(year,0) + '_' + d2s(month,0) + '_' + d2s(dayOfMonth,0) + '_' +  
d2s(hour,0) + '_' + d2s(minute,0) + '_' + d2s(second,0) + d2s(msec,0) + "_Summary.xls");  
run("Close");  
waitForUser("Message","Execution completed successfully!");
```

Anexo 1-B: Gráficas del comportamiento eléctrico del Coolinside durante la pancreatotomía en modelo murino

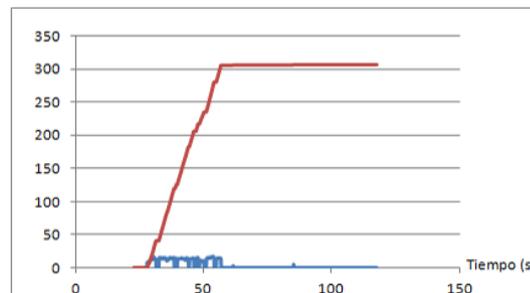
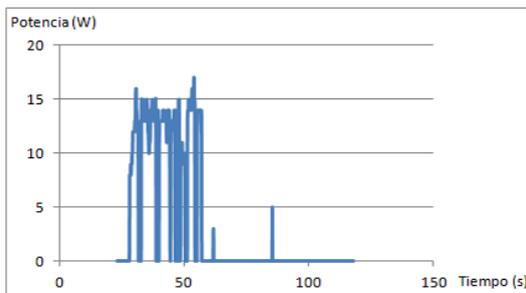
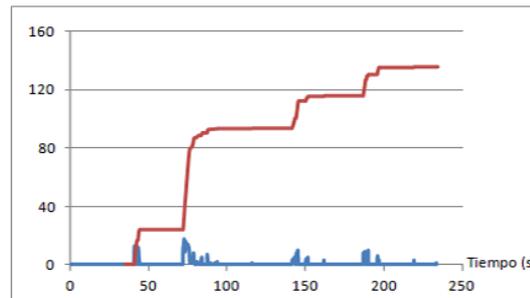
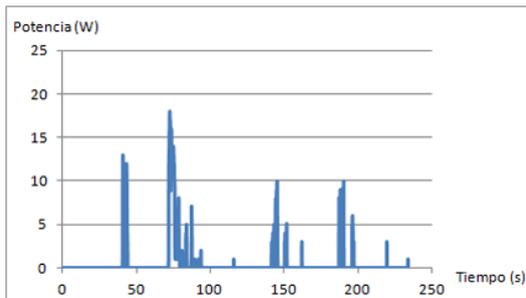
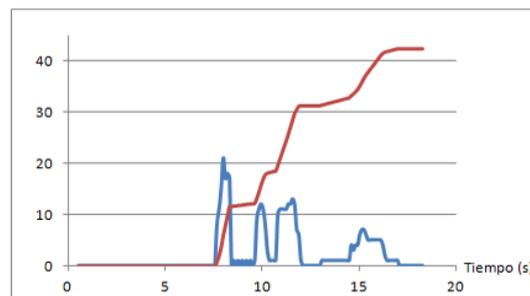
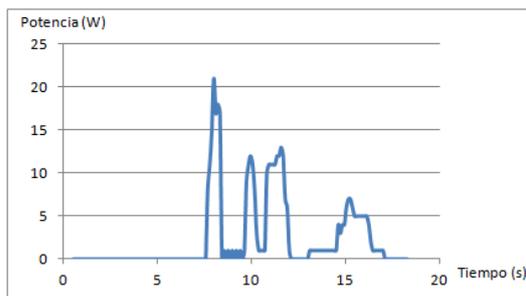
Tabla 8 | Representación gráfica del comportamiento eléctrico del dispositivo Coolinside durante la transección pancreática en 24 casos. (Izq) Representación de la potencia (W, línea azul) en función del tiempo (s) en la que se diferencian dos momentos diferentes de contacto en el tejido; unos picos iniciales que corresponden a la coagulación casi completa del parénquima pancreático y una segunda fase en que se coagula algún punto del margen de transección. (Der) Representa la energía entregada (J) en función del tiempo (línea roja) y la potencia (W, línea azul). Nótese que la mayor cantidad de energía entregada se produce durante la fase inicial de la ablación en la que se produce la deshidratación del tejido.

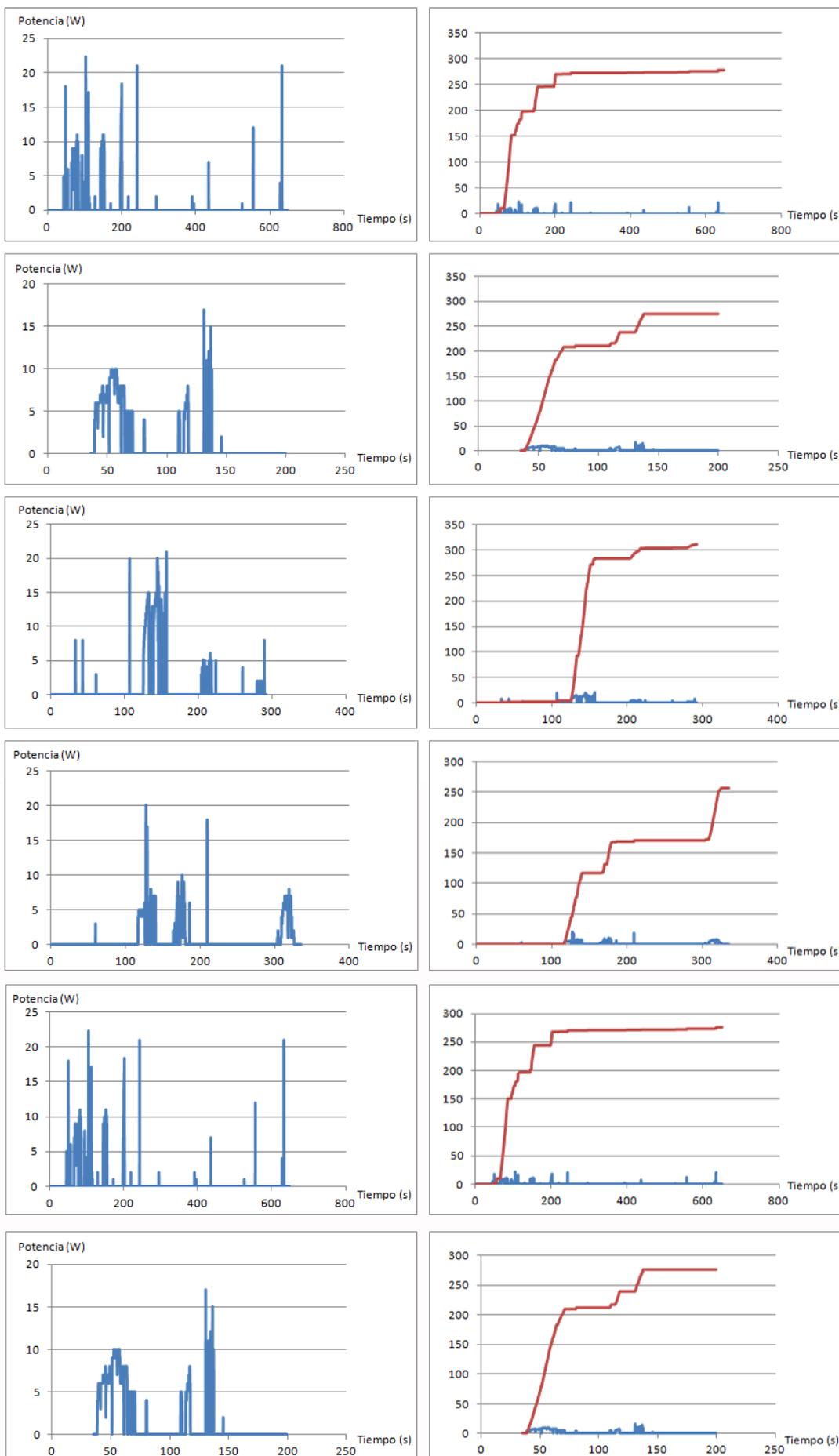
Leyenda:

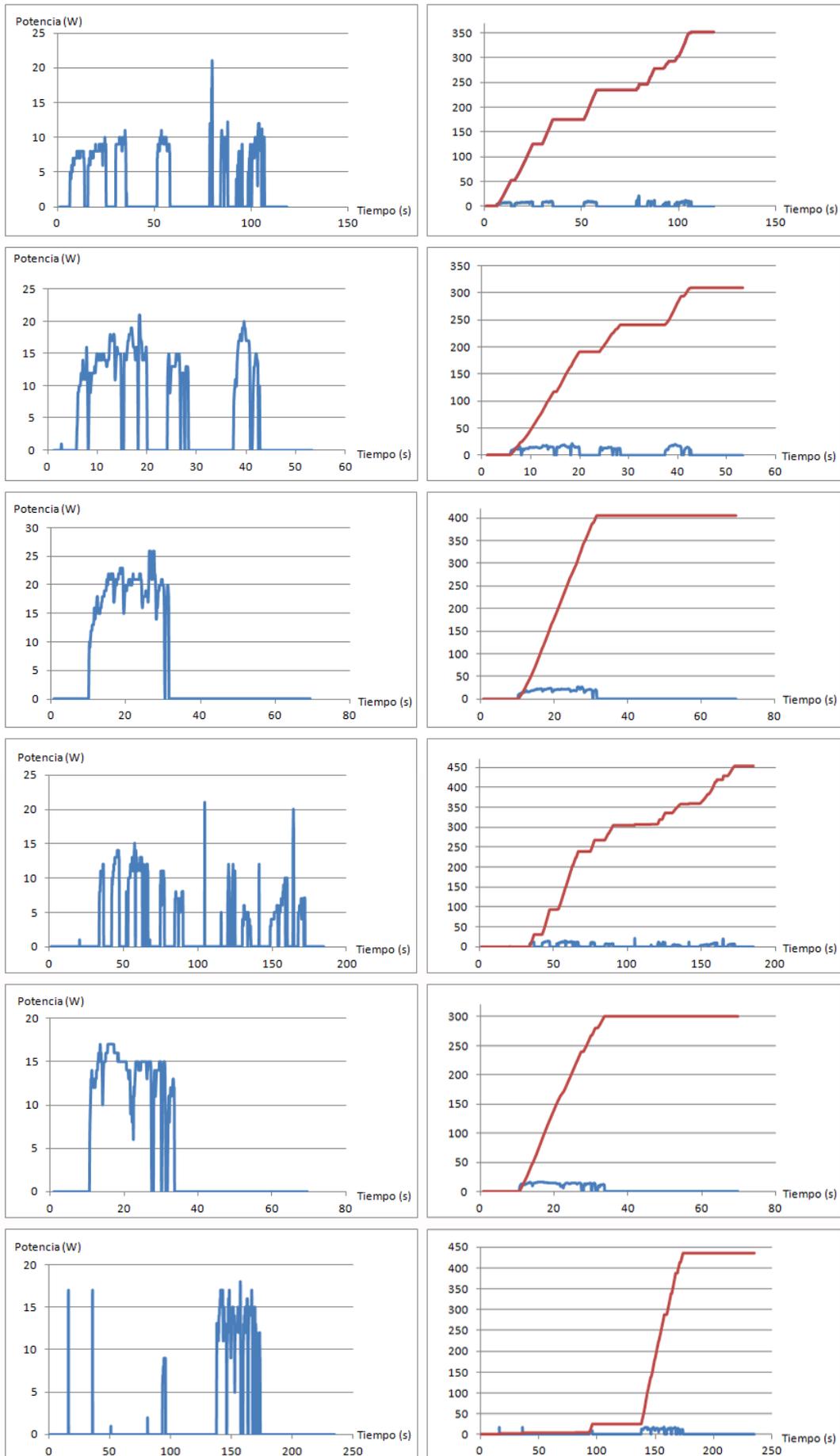


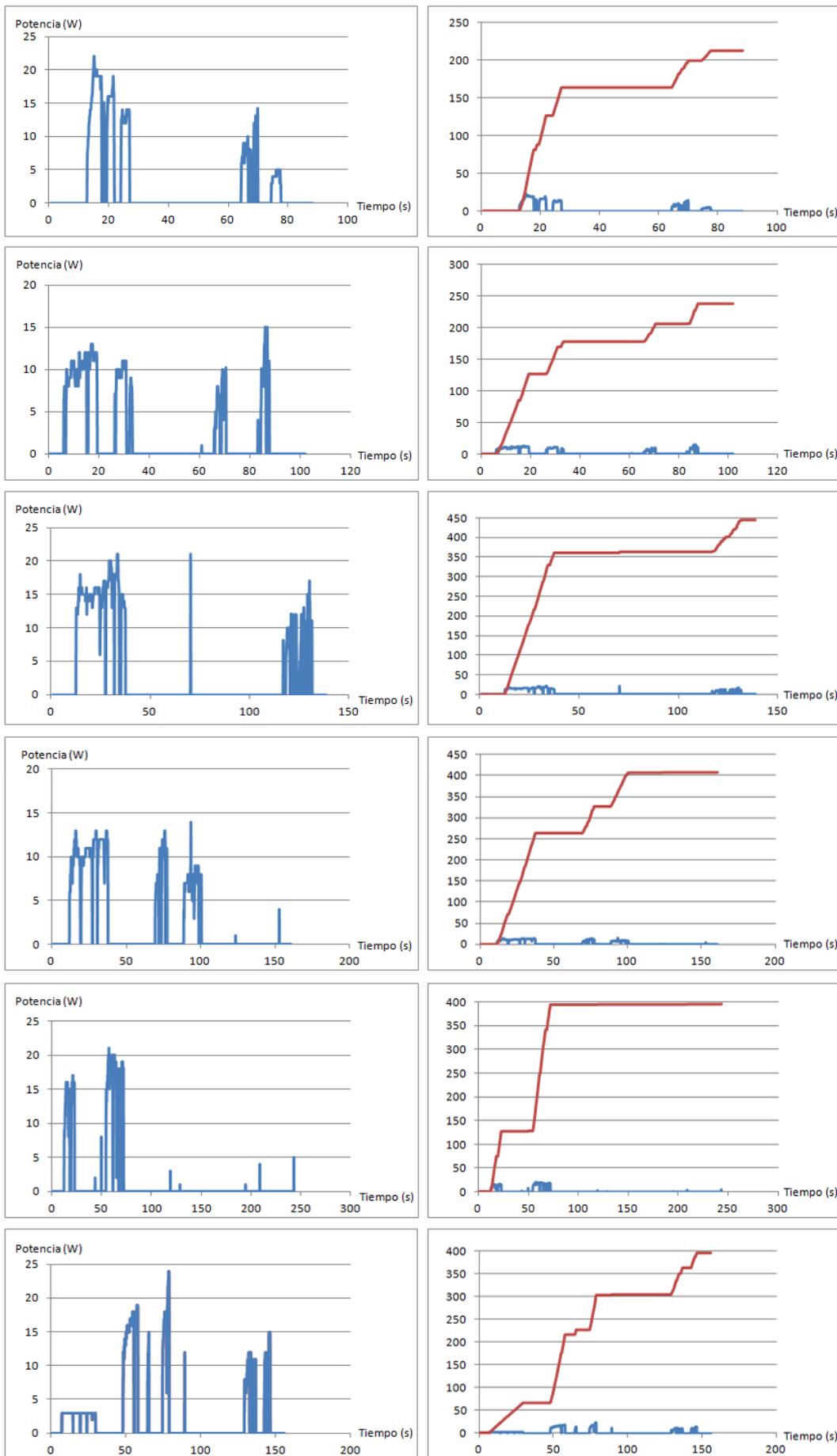
Potencia (W) / Tiempo (s)

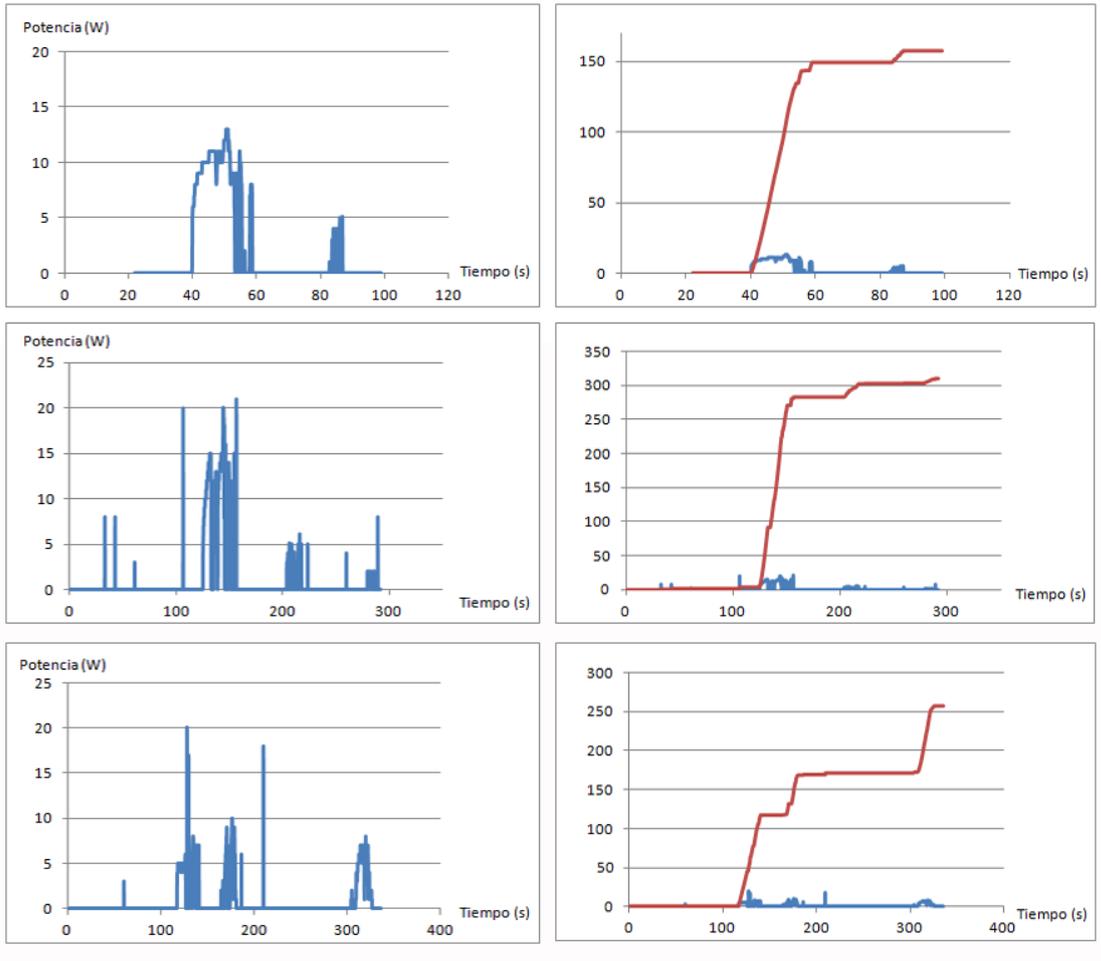
Potencia (W) /Tiempo (s)
Energía entregada (J) / Tiempo (s)











Anexo 1-C: Estadística sobre las diferencias entre D1 y D2 en el análisis morfométrico en modelo porcino

Nota: “D1” Sección del páncreas distal a 1-2 cm de la zona de transección.

“D2”: Sección del páncreas distal justo antes de la cola.

Tabla 9 | Área de expresión de Ck7 para D1 y D2 (mm²). Valores expresados como media \pm SD. Tras aplicar U de Mann Whitney no se observan diferencias significativas entre D1 y D2.

	Control 1 mes	Exp 1 mes	Control 6 meses	Exp 6 meses
D1	4,8 \pm 1,3	6,4 \pm 1,3	5,9 \pm 0,7	3,6 \pm 0,3
D2	3,5 \pm 0,4	6,3 \pm 1,3	5,0 \pm 1,1	2,7 \pm 0,9

Tabla 10 | Área de expresión de I para D1 y D2 (mm²). Valores expresados como media \pm SD. Tras aplicar U de Mann Whitney no se observan diferencias significativas entre D1 y D2.

	Control 1 mes	Exp 1 mes	Control 6 meses	Exp 6 meses
D1	1,2 \pm 0,4	0,9 \pm 0,1	2,4 \pm 0,6	2,1 \pm 0,6
D2	0,9 \pm 0,1	1,3 \pm 0,4	2,2 \pm 0,3	3,0 \pm 0,6

Tabla 11 | Tamaño medio de los islotes para D1 y D2 (μ m²). Valores expresados como media \pm SD. Tras aplicar U de Mann Whitney no se observan diferencias significativas entre D1 y D2.

	Control 1 mes	Exp 1 mes	Control 6 meses	Exp 6 meses
D1	645 \pm 228	862 \pm 84	685 \pm 211	397 \pm 60
D2	312 \pm 133	685 \pm 124	772 \pm 225	495 \pm 218

Tabla 12 | Área total de la sección pancreática para D1 y D2 (cm²). Valores expresados como media \pm SD. Tras aplicar U de Mann Whitney no se observan diferencias significativas entre D1 y D2.

	Control 1 mes	Exp 1 mes	Control 6 meses	Exp 6 meses
D1	2,6 \pm 0,5	2,7 \pm 0,5	5,3 \pm 0,9	5,7 \pm 1,7
D2	3,4 \pm 0,5	2,7 \pm 0,4	5,3 \pm 0,4	5,7 \pm 1,7

Anexo 2: Comunicaciones científicas relacionadas y publicaciones

Comunicaciones científicas relacionadas

45th Annual Congress of the European Society for Surgical Research. Center Médical Universitaire (CMU), Ginebra, Suissa. (9-12 de Juny del 2010)

Presentación oral: "Distant infusion of saline may enlarge coagulation volume during radiofrequency ablation of liver tissue using cool-tip electrodes without impairing their predictability"

Póster: "Preliminary results of a clinical trial based on a sutureless radiofrequency-assisted device for transection of the liver."

Publicaciones relacionadas con la tesis

Quesada, R., et al., Radiofrequency pancreatic ablation and section of the main pancreatic duct does not lead to necrotizing pancreatitis. *Pancreas*, 2014. **43**(6): p. 931-7.

Se adjunta el artículo

Publicaciones no relacionadas con la tesis

Burdio, F., P. Tobajas, **R. Quesada-Diez**, E. Berjano, A. Navarro, I. Poves and L. Grande (2011). "Distant infusion of saline may enlarge coagulation volume during radiofrequency ablation of liver tissue using cool-tip electrodes without impairing predictability." *AJR Am J Roentgenol* **196**(6): W837-843.

Dorcaratto, D., F. Burdio, D. Fondevila, A. Andaluz, I. Poves, M. A. Martinez, **R. Quesada**, E. Berjano and L. Grande (2012). "Laparoscopic distal pancreatectomy: feasibility study of radiofrequency-assisted transection in a porcine model." *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* **22**(3): 242-248.

Dorcaratto, D., F. Burdio, D. Fondevila, A. Andaluz, **R. Quesada**, I. Poves, M. Caceres, X. Mayol, E. Berjano and L. Grande (2013). "Radiofrequency is a secure and effective method for pancreatic transection in laparoscopic distal pancreatectomy: results of a randomized, controlled trial in an experimental model." *Surg Endosc* **27**(10): 3710-3719.

Martinez-Serrano, M. A., L. Grande, F. Burdio, E. Berjano, I. Poves and **R. Quesada** (2011). "[Sutureless hepatic transection using a new radiofrequency assisted device. Theoretical model, experimental study and clinic trial]." Cirugia espanola **89**(3): 145-151.

Trujillo, M., V. Ribera, **R. Quesada** and E. Berjano (2012). "Applicator for RF thermokeratoplasty: feasibility study using theoretical modeling and ex vivo experiments." Ann Biomed Eng **40**(5): 1182-1191.

ATENCIÓN ¡

Las páginas 190 a 196 de la tesis incluyen el artículo, que puede consultarse en el web del editor

ATTENTION ¡

Pages 190 to 196 of the thesis are availables at the editor's web

[http://journals.lww.com/pancreasjournal/Abstract/2014/08000/
Radiofrequency Pancreatic Ablation and Section of.19.aspx](http://journals.lww.com/pancreasjournal/Abstract/2014/08000/Radiofrequency_Pancreatic_Ablation_and_Section_of.19.aspx)

Anexo 3: Estudio posteriores de nuestro estudio relacionados con la tesis

Recientemente, a la vista de los resultados obtenidos de la presente tesis, desarrollamos un estudio comparativo en modelo porcino para valorar la eficacia de la transección asistida por RF en el sellado del cuello pancreático sin realizar anastomosis del páncreas al tubo digestivo (grupo de estudio) en comparación con la endograpadora (grupo control) [264].

El estudio se realizó en un total de 16 animales, 8 para cada grupo. Durante el PO, un animal del grupo control murió al 2º día por una fuga pancreática claramente identificada en la zona de grapas del páncreas distal. En el grupo control 6 animales (75%) presentaron POPF de grado A de los cuales 3 presentaron pseudoquiste en el margen de la transección. En cambio en el grupo de estudio, se identificó un solo caso de POPF de grado A (16%) asociado a la presencia de un pseudoquiste en el margen de transección.

Histológicamente, el páncreas proximal se mantenía preservado en todos los grupos y el margen de transección en el grupo de estudio estaba caracterizado por una zona de necrosis coagulativa rodeada de fibrosis tal y como se había descrito en estudio previos [114] y se describe en ésta tesis. El páncreas distal en 10 animales (4 en el grupo control y 6 en el grupo de estudio) estaba caracterizado por un patrón de atrofia exocrina total, en el que se observó metaplasia acino-ductal sin presencia de contenido de cimógeno en el citoplasma de los acinos, así como una marcada infiltración adiposa y un aplanamiento del epitelio ductal. El páncreas distal de los animales con pseudoquiste estaba caracterizado por atrofia parcial del páncreas remanente (presencia de lóbulos atróficos y lóbulos preservados, o una atrofia parcial generalizada en las que algunos acinos contienen cimógeno en el interior citoplasmático).

Por tanto, los resultados sugirieron que la transección asistida por RF puede ser más eficaz que la endograpadora en el control de las POPF.

Anexos

Se adjunta el artículo.

1
2
3
4 **Using the sealing effect of radiofrequency-assisted transection of the pancreas to**
5
6 **avoid pancreatic anastomosis after pancreaticoduodenectomy. A controlled study**
7
8 **on the pig through a laparoscopic approach**
9

10
11 Fernando Burdío MD PhD,¹ Dimitri Dorcaratto MD PhD², Lourdes Hernandez MD,¹
12
13 Ana Andaluz MD PhD,³ Xavier Moll MD PhD,³ Rita Quesada MS,⁴ Ignasi Poves MD
14
15 PhD,¹ Luis Grande MD PhD,¹ Marta Cáceres MD,⁵ Enrique Berjano PhD.⁶
16
17
18
19
20

21 From the Department of Surgery,¹ Hospital del Mar, Barcelona, Spain; Department of
22
23 Surgery,² St Vicens University Hospital, Dublin, Ireland; Veterinary Faculty,³
24
25 University of Barcelona, Spain; Instituto Municipal de Investigación Médica (IMIM),⁴
26
27 Barcelona, Spain; Hospital Sagrat Cor,⁵ Barcelona, Spain; Department of Electronic
28
29 Engineering,⁶ Universitat Politècnica de València, Spain.
30
31
32
33
34
35

36 This work was completely supported by grant TEC2011-27133-C02-02 from the
37
38 Spanish Government and the European Economic Community.
39
40
41
42

43 Address reprint requests and correspondence to:

44
45
46 Fernando Burdío, MD.
47

48
49 Servicio de Cirugía. Hospital del Mar. Passeig Maritim 25. 08003 Barcelona, Spain
50
51

52 Tf: +349324833490
53

54
55 FAX: +34932483433E-mail: fburdio@hotmail.com
56
57

58
59 Original article
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 **ABSTRACT**
5

6
7 **Background:** The current approach to managing the distal pancreas after
8
9 pancreaticoduodenectomy is to anastomose the stump to either the jejunum or the
10
11 stomach. However, occlusion of the main pancreatic duct (usually sutured, ligated or
12
13 glued), remains an option in certain circumstances, even if it does involve a greater risk
14
15 of pancreatic fistula. Recent studies suggest that distal pancreatic transection by
16
17 radiofrequency-assisted transection (RFAT) devices can seal the main pancreatic duct
18
19 easily and safely. Our goal was to elucidate whether RFAT of the neck of the pancreas
20
21 would be more efficient than a mechanical suture in controlling the risk of pancreatic
22
23 fistula formation (POPF) when pancreatic anastomosis was avoided.
24
25
26

27
28 **Methods:** Using a laparoscopic approach, sixteen pigs were subjected to transection of
29
30 the neck of the pancreas either by stapler (ST group; n=8) or RFAT (RF group; n=8)
31
32 without pancreatic anastomosis. The primary endpoint was incidence of POPF.
33
34 Secondary endpoints were: operative time, transection time, intraoperative
35
36 complications, weight variations, postoperative serum amylase/glucose concentration
37
38 and peritoneal fluid amylase concentration, histopathologic alterations of the pancreatic
39
40 remnant and other postoperative clinical parameters.
41
42
43
44

45
46 **Results:** One animal of group ST died on the 2nd day PO due to POPF. Overall, six
47
48 animals (75%) in the ST group and one (14%) in the RF group were diagnosed of POPF
49
50 (p=0.019). One animal in the RF group and three animals in the ST group had a
51
52 pseudocyst over the portal vein in close contact with both pancreas stumps. On day 30
53
54 PO, almost complete atrophy of the exocrine distal pancreas in comparison to proximal
55
56 pancreas was observed when the main pancreatic duct was efficiently sealed.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Conclusion: RFAT of the neck of the pancreas achieved more efficient sealing of the stump of the pancreas than a mechanical suture and led to the complete atrophy of the distal remnant pancreas.

1
2
3
4
5
6
7 **INTRODUCTION**
8
9

10 It is generally agreed that the best way to manage the pancreatic stump after
11 pancreaticoduodenectomy (PD) is to anastomose the pancreas either to the jejunum or
12 stomach(1). Even today, after PD more than 20% of patients are still believed to
13 develop a postoperative pancreatic fistula (POPF) of some sort(2). POPF is largely the
14 most significant cause of morbidity and mortality after PD. POPF may lead to
15 hemorrhage, sepsis and subsequent death due to leakage from pancreatic
16 anastomoses(3).
17
18
19
20
21
22
23
24

25
26
27 Ligation of the pancreatic stump after PD without anastomosis to the
28 gastrointestinal tract, as originally described by Whipple, could prevent a large part of
29 the postoperative complications since if a pancreatic fistula occurs there is no defect in
30 the small bowel, no leakage of intestinal fluid and no activation of pancreatic
31 enzymes(4)(5). However, ligation of the pancreatic stump is rarely performed today,
32 mainly because of the excessive incidence of a long-lasting fistula which could be
33 cumbersome (sometimes in more than 50 % of patients)(1). For example, Reissman(6)
34 described a 94 % fistula rate after primary suture of the pancreatic stump after PD. In
35 this study, even though fistulas were always well tolerated and caused no mortality, they
36 lasted for a mean period of 73 days. This may explain why today ligation of the
37 pancreatic duct is justified only during difficult operative circumstances(1).
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52
53 Radiofrequency (RF) energy has been used both experimentally and clinically
54 to manage the pancreatic remnant after distal pancreatectomies due to its ability to seal
55 the main and secondary pancreatic ducts(7)(8). In recent years, our group has tested the
56 ability of internally-cooled electrodes to seal vessels in the liver(9)(10) and in the
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 kidney(11). Recent studies including our own using a porcine pancreatic model(12)(13),
5
6 suggest that distal pancreatic transection by such RF-assisted transection (RFAT)
7
8 devices can seal the main pancreatic duct easily and safely. More recently, we have also
9
10 demonstrated in a murine model that RFAT of the neck of the pancreas may safely seal
11
12 the remnant distal pancreas and avoid pancreatic fistula and necrotizing pancreatitis. In
13
14 the same study we also observed that most of the acinar cells of the remnant distal
15
16 pancreas after transection of the pancreas were rapidly and massively deleted by p53-
17
18 dependent apoptosis(14).
19
20
21
22

23 The goal of the present study was to elucidate whether RFAT of the neck of the
24
25 pancreas in a large animal would be more efficient than a mechanical suture in
26
27 controlling the risk of POPF when pancreatic anastomosis was not performed.
28
29
30
31

32 **MATERIAL AND METHODS**

33 *Animals*

34
35
36 Sixteen Landrace pigs with a mean preoperative weight of 37 kg (range 23-47)
37
38 obtained from the farm of the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain) were used for
39
40 the experimental procedures and assigned to either the radiofrequency group (RF; n = 8)
41
42 or mechanical stapler group (ST; n = 8). All aspects of this study were performed as part
43
44 of an animal research protocol, in accordance with the guidelines approved by the
45
46 Ethical Commission of the Universitat Autònoma de Barcelona (Authorization Number
47
48 CEEAH 1256) and the Government of Catalonia's Animal Care Committee.
49
50
51

52 *Transection devices*

53
54
55 Pancreatic transection was performed in the RF group by the 3-mm diameter
56
57 laparoscopic version of the Coolinside device (Apeiron Medical, Valencia, Spain). The
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 operating performance of this device has been described in detail
5
6 elsewhere(9)(10)(15)(16). Briefly, it consists of a handheld instrument that performs the
7
8 two surgical tasks of coagulation/sealing and cutting of tissue. Coagulation and sealing
9
10 are performed by a 3-mm diameter electrode connected to an RF generator CC-1
11
12 (Radionics, Burlington, MA,USA) (Figure 1). The electrode is internally cooled with
13
14 chilled saline solution (0–5 °C) by means of a PEPM peristaltic pump (Radionics,
15
16 Burlington, MA,USA). Mechanical cutting is performed by a sharp blade attached
17
18 distally to the electrode. The tissue is first coagulated by the proximal zone of the
19
20 electrode with a backward movement and is then transected by the blade, which only
21
22 cuts the amount of tissue previously coagulated and sealed(9)(15). In the ST group, both
23
24 pancreatic transections were performed by the Endo GIA® 60-mm mechanical device
25
26 (Covidien, Norwalk, CT, USA) with 3.5-mm staples, similarly to other studies on the
27
28 pancreas both experimentally(13)(17) and clinically after performing the Whipple’s
29
30 procedure(18). No pancreatic anastomosis was performed in any case.
31
32
33
34
35
36
37

38 ***Perioperative care***

39
40 Preoperative care and anesthesia were provided by fully trained veterinary staff.
41
42 All animals were fasted for 12 hours before surgery. After initial sedation with a
43
44 combination of azaperone and ketamine (4 and 10 mg/kg IM respectively), intravenous
45
46 access was obtained through marginal ear-vein cannulation and analgesia was given
47
48 previous to anesthesia (morphine 0.42 mg/kg IM and meloxicam 0.2 mg/kg IV). The
49
50 anesthetic induction phase was performed with propofol (4 mg/kg IV). The trachea was
51
52 intubated and anaesthesia maintained with 2–2.5% isoflurane (IsoVet, B. Braun,
53
54 Barcelona, Spain) in 100% oxygen through a semi-closed circular anaesthetic system.
55
56
57
58
59 Ventilation was controlled using an intermittent positive pressure ventilator (SAV 2500,
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 B.Braun, Barcelona, Spain) in order to maintain normocapnia during the
5
6 entire anaesthetic period. All animals received an infusion of lactated Ringer's solution
7
8 at a rate of 10 mL/kg/h during the perioperative period and IV antibiotic therapy
9
10 (cephalexin, 20 mg/kg) was administered via the cephalic vein. Throughout the surgical
11
12 process, temperature, cardiac frequency, respiratory frequency, capnography, arterial
13
14 pressure, pulse and electrocardiography were monitored using a multifunction patient
15
16 VetCare monitor.
17
18
19
20
21

22 ***Surgical procedure***

23
24 All the surgical procedures were performed by the same surgical team (DD and
25
26 LH) using a four-port laparoscopic approach. In all animals, a dissection of the neck of
27
28 the pancreas over the portal vein was performed using conventional endoscopic scissors
29
30 and graspers. According to a previous study on pancreas anatomy(19) the main
31
32 pancreatic duct running along the body and tail of the pancreas in the pig coalesces with
33
34 a common main pancreatic duct in the head by two ducts: one above the portal vein and
35
36 another below this structure. This means that in order to achieve complete obstruction
37
38 of the distal part (body and tail) of the pancreas both ducts must be severed (Figure 1).
39
40 The main pancreatic duct was neither identified nor sutured after transection in either
41
42 group. A Blake Silicon Drain (Ethicon, Somerville, NJ) was positioned adjacent to the
43
44 pancreatic stump and extracted from the animal's abdomen through the 5-mm inferior
45
46 right trocar orifice. The proximal end was subcutaneously tunneled to the animal's back
47
48 and connected to a reservoir. All wounds were closed in standard fashion. The animals
49
50 were allowed to awaken from anesthesia and were extubated when clinically indicated.
51
52
53
54
55
56
57
58

59 ***Postoperative care***

1
2
3
4 All animals were given water ad libitum for the first 24 h and subsequently fed
5
6 twice daily with pig chow thereafter. Antibiotics (amoxicillin 20 mg/kg IM, q24 h) were
7
8 administered for the first three postoperative days. All animals were inspected twice a
9
10 day for the first seven postoperative days to detect any clinical signs of pancreatic leak
11
12 or sepsis and to monitor debit and state of abdominal drains. All animals received
13
14 buprenorphine (0.02–0.03 mg/kg IM, q128 h) for the first 24 postoperative hours and
15
16 meloxicam (0.12 mg/kg IM, q24 h) for postoperative analgesia in the first five
17
18 postoperative days. All animals received 100µg/h fentanyl patch after surgical
19
20 procedure. The patch was maintained during the first 3 days of the postoperative period.
21
22
23
24
25
26

27 *Laboratory measurements*

28
29
30 Peripheral blood was collected for measurement of serum amylase and glucose
31
32 levels prior to the surgical procedure, 3 h after intervention, on postoperative (PO) days
33
34 1, 3 and 7 and 4 weeks P.O before euthanasia. The blood samples were then
35
36 centrifuged at 2.500xg for 10 min to extract the serum. Peripancreatic fluid amylase
37
38 concentrations were measured from the drain tube on days 1, 3 and 7 P.O. and, if
39
40 present, during laparotomy 4 weeks P.O. The surgical drain was retired beyond day 7
41
42 P.O. if no evidence of pancreatic leak was observed (see definition of POPF in analyzed
43
44 variables) and if the output was <20 ml per day. Biochemical laboratory parameters
45
46 were determined at the Centralized Analysis Center of the Universitat Autònoma de
47
48 Barcelona, Veterinary Faculty by technicians who were unaware of the study groups.
49
50
51
52
53
54

55 *Necropsy*

56
57 Four weeks after pancreatic transection, all animals were again anesthetized,
58
59 intubated, and ventilated as described above. Exploratory laparotomy was performed
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 and the peritoneal cavity was assessed for excessive adhesions, free peritoneal fluid, or
5
6 any undrained collection/abscess. The pancreatic stumps were identified, skeletonized,
7
8 and photographed. The pancreas (head, uncinated process and distal pancreas) was
9
10 dissected, removed, and temporarily placed in 10 % buffered neutral formalin. The main
11
12 pancreatic duct was identified and cannulated with an angiocatheter both through the
13
14 ampulla in the duodenum and after cutting the pancreatic tail. A 1:5 dilution of Black
15
16 China dye was then injected into the pancreatic duct in a retrograde fashion to assess for
17
18 macroscopic dye extravasation from the pancreatic stump. Thereafter, the specimen was
19
20 immersed in 10 % buffered neutral formalin for further histopathological processing.
21
22
23
24 The animals were then sacrificed with a commercial euthanasia solution.
25
26
27
28

29 *Analyzed variables*

30
31 The primary outcome was the development of POPF defined as (1) macroscopic
32
33 leak (evidence of dye extravasation from the pancreatic stump when catheterizing the
34
35 distal main pancreatic duct), (2) any undrained amylase-rich fluid collections/abscess, or
36
37 (3) greater than threefold drain/serum amylase ratio after the third postoperative day
38
39 following the International Study Group of Pancreatic Fistula (ISGPF) guidelines(20).
40
41
42

43 Secondary outcomes were: operative time, transection time, intraoperative
44
45 complications, weight variations (crude or relative to preoperative values),
46
47 postoperative serum amylase/glucose concentration and peritoneal fluid amylase
48
49 concentration, histopathologic alterations of the pancreatic remnant, wound infection,
50
51 and other postoperative clinical parameters (anorexia, emesis, lethargy, and narcotic
52
53 need).
54
55
56
57

58 *Histopathological study*

1
2
3
4 Consecutive sections of 2 mm thickness were taken from each animal from the
5
6 margin of the pancreatic transection, in both proximal and distal samples. Alternative
7
8 sections were routinely processed, paraffin-embedded, cut to a thickness of 5 µm,
9
10 stained with hematoxylin and eosin, and evaluated by a pathologist blinded to the
11
12 experimental design. The pathologist, graded the severity of the exocrine pancreas
13
14 atrophy using a score ranging from 0 to 5, which was chosen to maximize detection and
15
16 repeatability (21).
17
18
19
20
21

22 ***Statistical analysis***

23
24 Continuous variables are presented as median and minimum- maximum value.
25
26 The Kolmogorov–Smirnov test was used to determine the variables’ distribution. The
27
28 Student’s t test was used to make pair-wise comparisons of normal distributed
29
30 parameters, and the Mann-Whitney U test was used for nonparametric data.
31
32 Dichotomous variables were compared using the Chi-square test. Additionally,
33
34 laboratory analyses that included repeated measures were evaluated by two way
35
36 analysis of variance(22) with the Bonferroni test for posthoc analysis. Data collection
37
38 and analyses were performed with the Statistical Package for the Social Sciences
39
40 (version 19.0; SPSS Inc., Chicago, IL,USA).
41
42
43
44
45
46

47 **RESULTS**

48 ***Intraoperative features***

49
50
51
52 All the procedures were performed by a laparoscopic approach. There were no
53
54 intraoperative deaths or major complications during surgery. In three cases (one in the
55
56 ST group and two in the RF group) the duodenum was slightly damaged by grasp
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 forceps and required suture reparation with no consequences in the postoperative period.
5
6 No significant differences were found either in operative time or transection time
7
8 between the groups (Table 1).
9

10 11 ***Postoperative follow up*** 12

13
14 Two animals died during the postoperative period: 1) One animal in the ST
15 group was lethargic and feverish on day 2 PO and died that night. At necropsy, there
16 was abundant free cloudy intraperitoneal liquid with an amylase concentration of 3956
17 UI/L (Serum amylase concentration on the same PO day: 3099 UI/L). At the distal
18 stump just around some staples a leak of presumably pancreatic fluid was clearly
19 coming when the distal pancreas was squeezed (Figure 2A). This leak was also put into
20 evidence when the main pancreatic duct was injected with dye in the distal pancreas and
21 extravasated at the same level of the pancreatic stump. No other findings were
22 encountered at necropsy. 2) Another animal in the RF group died on day 3 PO after an
23 uneventful immediate postoperative period. At necropsy, a bowel volvulus by torsion of
24 the mesentery leading to gangrene of half the bowel was observed. No other findings
25 were encountered at necropsy. The remaining animals were killed on day 30 PO in
26 good clinical conditions with a mean weight gain of 20.5 kg (range: 8.5-30). The
27 animals of RF group had a greater postoperative crude weight gain than the ST group
28 ($p < 0.005$). These differences did not reach statistical difference in relative values (as
29 percentages) (Tables 1 and 2).
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 52 ***Findings at necropsy and incidence of Postoperative Pancreatic Fistula (POPF)*** 53

54
55 No macroscopic changes were observed in any of the proximal pancreas samples
56 in either group, with the complete microscopic preservation of this pancreatic
57 architecture in all cases. All the animals in the RF group had four round-shaped areas of
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 coagulation necrosis completely surrounded by a dense layer of mature connective
5
6 tissue at necropsy, which corresponded to the RF coagulation in both transection lines
7
8 (two around the proximal pancreas and two around the distal pancreas) (Figure 1 and
9
10 Figure 2C1). This last feature was not found in the ST group.
11
12

13
14 At necropsy three macroscopic with their corresponding microscopic patterns in
15
16 the distal remnant pancreas were found, related to the presence/absence of POPF
17
18 (Figure 2):
19
20

- 21 1) The most clinically relevant pancreatic leak was diagnosed in the ST group
22
23 animal that died on day 2 PO (see above) and was the only abnormal finding
24
25 during the animal necropsy (Tables 1, 2 and Figure 2A). The histological
26
27 study of the distal pancreas revealed the complete microscopic preservation
28
29 of the pancreatic architecture (Figure 2A3).
30
31
- 32 2) One animal in the RF group and three in the ST group presented a solitary
33
34 fluid collection over the portal vein in close contact with both pancreatic
35
36 stumps (proximal and distal) (Table 1 and Figure 2B). Three of these animals
37
38 presented a greater than threefold drain/serum amylase ratio beyond the third
39
40 postoperative day (Table 2). The sizes of these collections ranged between 3
41
42 and 16 cm in diameter and had a defined fibrous wall at microscopic
43
44 evaluation. In these collections usually only transparent amylase-rich liquid
45
46 and little or no solid material was found, so that they were then defined as
47
48 pancreatic pseudocysts. After canalization of the main pancreatic duct in the
49
50 tail and infusion of the dye solution through it, a connection was always
51
52 found between the pseudocyst and the main duct from the distal pancreatic
53
54 remnant. However, no connection was found between this collection and the
55
56 proximal main pancreatic duct in any case. In two of the animals with
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 pseudocysts a moderate degree of acinar atrophy (score 2 to 3) was
5
6 encountered in the distal pancreas. In another animal with a pseudocyst, the
7
8 exocrine atrophy showed a lobular pattern, with lobules with no atrophy
9
10 (score 0), moderate (score 3), and complete atrophy (score 5) (Table 2).
11
12 Finally, one additional animal presented a large pseudocyst (16 cm in
13
14 diameter). In this last case a complete atrophy (score 5) of the acinar
15
16 component in the distal pancreas was observed (Table 2).
17
18

19
20 3) A greater than threefold drain/serum ratio amylase was found in two animals
21
22 in the ST group on day 7 PO and no fluid collections were observed at
23
24 autopsy (Table 2). These animals were diagnosed with POPF according to
25
26 (ISGPF) guidelines and all of them had an uneventful postoperative history
27
28 and no fluid collections at necropsy. The microscopic evaluation of these
29
30 cases as well as in the cases not diagnosed with POPF, showed that the
31
32 acinar component had completely disappeared on day 30 PO (atrophy score
33
34 5) (Figure 2C2). The single exception to this finding was in one animal in the
35
36 RF group with an uneventful postoperative history and no signs of POPF in
37
38 whom the “bridge” of pancreatic tissue serving as an anatomical connection
39
40 between the splenic and connecting lobes behind the portal vein (Figure 1,
41
42 Note B) was not completely severed. As expected, in this case the complete
43
44 preservation of the distal pancreas was observed (score 0 of atrophy) (Table
45
46
47
48
49
50 2).
51

52 Overall, taking into account the above-cited definition of POPF, 6 animals
53
54 (75%) in the ST group and one animal (14%) in the RF group were diagnosed with
55
56 POPF. This difference reached statistical difference ($p=0.019$) (Table 1).
57
58

59 ***Common histological features of complete distal atrophy***
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 In a total of 10 animals (4 in the ST and 6 in the RF group, see Table 2) the
5
6 acinar component had completely disappeared (atrophy score 5) and the exocrine acini
7
8 had been completely replaced by pseudo-ductal complexes, based on apparently novel
9
10 duct-like structures composed of low-cuboidal cells (Figure 3). The ducts showed
11
12 dilatation, which was most marked in the interlobular ducts or in the main duct next to
13
14 the transection interface margin, and decreased distally. This feature was least notable in
15
16 the intralobular ducts. In the interlobular ducts and in the main pancreatic ducts we
17
18 observed epithelial metaplasia, from cylindrical to squamous and moderate periductal
19
20 fibrosis which was maximal in the main pancreatic duct (Figure 3). There was also
21
22 marked interlobular adipose infiltration between the areas of pseudo-ductal complexes.
23
24 In the atrophied pancreas, islets of Langerhans were frequently found in sections and
25
26 located close to duct-like structures.
27
28
29
30

31 ***Laboratory analysis***

32
33
34
35 Four animals in the ST and one animal in the RF group presented a greater than
36
37 threefold drain/serum amylase ratio after the third postoperative day (Table 2). In three
38
39 of these animals (60 %) a pseudocyst was observed in close contact with both pancreatic
40
41 stumps at necropsy.
42
43
44

45
46 When plotting the peritoneal amylase concentration throughout the postoperative
47
48 period it was observed that until day 3 PO these values were similar in both groups.
49
50 However after day 3 PO these values were higher and more variable in the ST than in
51
52 the RF group (15546 IU/L, range 114-65440 and 7252 IU/L, range 779-40044 versus
53
54 1930 IU/L, range 899-2500 and 2152 IU/L, range 781-4378, for ST and RF group on
55
56 days 7 and 30, respectively) as could be considering the difference in POPF between the
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 groups (Table 3 and Figure 4). However, these group differences did not reach
5
6 statistical significance (probably because of the high variability in the ST group).
7
8

9
10 Serum amylase and glucose levels were similar in both groups throughout the
11 postoperative period (Table 3). However, taking together both groups throughout the
12 postoperative period, the single postoperative time that demonstrated a significant
13
14 higher level in serum amylase was on day 1 ($p < 0.013$). A similar analysis of serum
15
16 glucose identified only the 3h PO to be significantly higher than any other time
17
18 ($p < 0.0001$) (immediate postoperative hyperglycemia) (Table 3).
19
20
21
22
23
24
25
26

27 **DISCUSSION**

28
29
30 POPF is known to be the most significant cause of morbidity and mortality after
31 PD(23). In a recent prospective multicenter randomized trial it was demonstrated that
32
33 POPF was about 42% in the subgroup of soft pancreas and main pancreatic diameter < 3
34
35 mm, regardless of the type of pancreatic anastomosis (to jejunum or to stomach)(24). It
36
37 therefore seems there is special room for improvement in this subgroup of patients (with
38
39 a normal pancreas). Unfortunately, it is generally accepted that if the pancreatic stump
40
41 is not anastomosed (but sutured, ligated or glued) the incidence of fistula may be higher
42
43 or even systematic. In fact, Reissman et al(6) in a controlled study after PD with duct
44
45 ligation showed that it was as high as 94 % and of long duration, even though it was
46
47 usually well tolerated. In the last prospective randomized trial of glue occlusion of the
48
49 pancreatic duct versus pancreaticojejunostomy after PD similar exocrine insufficiency
50
51 were observed among the groups. It was also suggested there might be a possibly higher
52
53 risk of diabetes in the occluded pancreatic duct group, even though this study was not
54
55 powered to correctly evaluate this variable(4). In any case, the major problem reported
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 in ductal ligation is usually the formation of long-lasting pancreatic fistula (normally
5 well tolerated) (1). This is why this surgical option is usually only accepted in certain
6
7
8 “difficult circumstances”(1) even though is currently employed by some groups with
9
10 different indications(18) (25).

11
12
13
14 Similarly to above-cited clinical studies with duct ligation after PD, in our
15 controlled experimental study we observed a high incidence (75%) of POPF after
16 mechanical suture of the distal stump of the normal porcine pancreas when the neck of
17 the gland was severed. However, when RF coagulation of the neck of the pancreas was
18 performed prior to the section this incidence was dramatically reduced to 14 %, which
19 led to better recovery of the animal as demonstrated by a higher postoperative crude
20 weight gain over the control group (see Table 1 and Figure 4). This higher efficiency of
21 RF coagulation over suture on sealing the stump of the pancreas matches well with
22 recent data from clinical(7) and experimental(12)(13)(17) studies with RFAT distal
23 pancreatectomy versus stapler occlusion technique. The better efficiency on sealing the
24 pancreatic stump with RFAT devices and other hyperthermic systems may be due to
25 eliciting fibrosis and collagen shrinkage secondary to coagulative necrosis, leading to
26 the sealing of the ducts and vessels as previously described (7)(13)(26)(27)(28)(29)(30).
27 Similar results were seen in the present study in the RF group, in which we found
28 round-shaped areas of coagulation necrosis completely surrounded by a dense layer of
29 mature connective tissue at necropsy on both transection lines at necropsy (Figure 2).
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 To our knowledge this is the first time that an RFAT of the pancreas has been
52 performed leaving the distal pancreas without any drainage of the main pancreatic duct
53 in a large animal model. In a recent study on a murine model in which a similar RFAT
54 of the neck of the pancreas was performed, we observed that most of the acinar cells
55 were rapidly and massively deleted by p53-dependent apoptosis (peaked on day 3 PO)
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 by caspase activation with some pancreatic epithelial proliferation and beta-cell
5
6 neogenesis (14). This study further demonstrated that this RFAT pancreas model did not
7
8 lead to necrotizing pancreatitis. These results are similar to previous studies with
9
10 ligation of the main pancreatic duct in the murine
11
12 model(31)(32)(33)(34)(35)(36)(37)(38). Similarly, in the present study on the porcine
13
14 pancreas we found an increase in serum amylase levels ($p<0.05$) on day 3 PO over their
15
16 preoperative value with no clinical repercussions, which returned to levels similar to
17
18 baseline in the following weeks (Table 3). Probably as a result of this massive deletion
19
20 of the exocrine pancreas, on day 30 PO almost complete atrophy of the exocrine distal
21
22 pancreas as compared to the proximal pancreas was observed when the main pancreatic
23
24 duct was efficiently sealed. However, four animals in the ST group showed some degree
25
26 of partial preservation of the exocrine pancreas. In fact, all the animals with a low
27
28 degree of atrophy had some kind of evident failure of the main pancreatic duct as was
29
30 shown by dye extravasation from the pancreatic stump at necropsy in the form of free
31
32 pancreatic leak (one case) or pseudocyst (three cases) (Table 1).
33
34
35
36
37
38

39 In conclusion, RFAT of the neck of the pancreas achieved a more efficient
40
41 sealing of the stump of the pancreas than a mechanical suture and led to a complete
42
43 atrophy of the distal remnant pancreas. This method could also be useful to close the
44
45 pancreatic stump without pancreatic anastomosis after PD in certain circumstances
46
47 which could avoid the most significant cause of morbidity and mortality after PD.
48
49 Further studies should confirm these results before its clinical application.
50
51

52 **Study limitations**

- 53
54 1. This study was performed on large animals (similar to human pancreas) with a
55
56 normal soft pancreas and small main pancreatic duct (< 3 mm in diameter)
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 which are known to have the highest rate of POPF at least with pancreatic
5
6 anastomosis. However there are some differences in the size and anatomy of the
7
8 pancreas between both species.
9

- 10
11 2. In this study, an RFAT device was used with a mean transection time of 5
12
13 minutes (Table 1). It is unclear whether a longer coagulation time or a different
14
15 RFAT device would improve the sealing efficiency of the pancreatic stump.
16
17 3. The method of managing the pancreatic stump in the control group in this study
18
19 (stapler) is reproducible and similar to that employed by some authors(18) in the
20
21 clinical setting after Whipple’s procedure. However, the procedure of choice to
22
23 occlude the main pancreatic duct varies widely in current studies, which may
24
25 limit the conclusions of this study.
26
27
28
29
30
31
32
33
34

35 **ACKNOWLEDGMENTS**

36
37 This work received all its financial support from the Spanish “Plan Nacional de I+D+I
38
39 del Ministerio de Ciencia e Innovación” Grant No. TEC2011-27133-C02-02. The
40
41 authors also thank Trevor Willis for his language revision.
42
43
44
45
46
47
48

49 **REFERENCES**

- 50
51
52 1. Fromm D, Schwarz K. Ligation of the pancreatic duct during difficult operative
53
54 circumstances. *J Am Coll Surg* [Internet]. 2003 Dec [cited 2014 Jun
55
56 28];197(6):943–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644282>
57
58 2. Callery MP, Pratt WB, Kent TS, Chaikof EL, Jr CMV. A Prospectively Validated
59
60 Clinical Risk Score Accurately Predicts Pancreatic Fistula after
61
62 Pancreatoduodenectomy. *J Am Coll Surg* [Internet]. American College of
63
64
65

1
2
3
4 Surgeons; 2013;216(1):1–14. Available from:
5 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2012.09.002>
6

- 7
8 3. Tran KTC, Smeenk HG, van Eijck CHJ, Kazemier G, Hop WC, Greve JWG, et
9 al. Pylorus Preserving Pancreaticoduodenectomy Versus Standard Whipple
10 Procedure. *Ann Surg* [Internet]. 2004 Nov [cited 2014 Jul 6];240(5):738–45.
11 Available from:
12 [http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0](http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0000658-200411000-00002)
13 [0000658-200411000-00002](http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0000658-200411000-00002)
14
- 15
16 4. Tran K, Van Eijck C, Di Carlo V, Hop WCJ, Zerbi A, Balzano G, et al.
17 Occlusion of the pancreatic duct versus pancreaticojejunostomy: a prospective
18 randomized trial. *Ann Surg* [Internet]. 2002 Oct [cited 2014 Jun 28];236(4):422–
19 8; discussion 428. Available from:
20 [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1422596&tool=pmce](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1422596&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)
21 [ntrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1422596&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)
22
- 23
24 5. Pederzoli P. *Pancreatic fistulas*. Springer-Verlag; 1992.
25
- 26
27 6. Reissman P, Perry Y, Cuenca A, Bloom A, Eid A, Shiloni E, et al.
28 Pancreaticojejunostomy versus controlled pancreaticocutaneous fistula in
29 pancreaticoduodenectomy for periampullary carcinoma. *Am J Surg* [Internet].
30 1995 Jun [cited 2014 Jul 6];169(6):585–8. Available from:
31 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7771621>
32
- 33
34 7. Blansfield JA, Rapp MM, Chokshi RJ, Woll NL, Hunsinger MA, Sheldon DG, et
35 al. Novel Method of Stump Closure for Distal Pancreatectomy with a 75 %
36 Reduction in Pancreatic Fistula Rate. 2011;
37
- 38
39 8. Nagakawa Y, Tsuchida A, Saito H, Tohyama Y, Matsudo T, Kawakita H, et al.
40 The VIO soft-coagulation system can prevent pancreatic fistula following
41 pancreatectomy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* [Internet]. 2008 Jan [cited 2014
42 Jul 6];15(4):359–65. Available from:
43 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18670835>
44
- 45
46 9. Burdío F, Navarro A, Berjano E, Sousa R, Burdío JM, Güemes A, et al. A
47 radiofrequency-assisted device for bloodless rapid transection of the liver: a
48 comparative study in a pig liver model. *Eur J Surg Oncol* [Internet]. 2008 May
49 [cited 2014 Jul 6];34(5):599–605. Available from:
50 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17614248>
51
- 52
53 10. Navarro A, Burdío F, Berjano EJ, Güemes A, Sousa R, Rufas M, et al.
54 Laparoscopic blood-saving liver resection using a new radiofrequency-assisted
55 device: preliminary report of an in vivo study with pig liver. *Surg Endosc*
56 [Internet]. 2008 May [cited 2014 Jul 6];22(5):1384–91. Available from:
57 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18322742>
58
- 59
60 11. Ríos JS, Zalabardo JMS, Burdío F, Berjano E, Moros M, Gonzalez A, et al.
61 Single instrument for hemostatic control in laparoscopic partial nephrectomy in a
62 porcine model without renal vascular clamping. *J Endourol* [Internet]. 2011 Jun
63
64
65

1
2
3
4 [cited 2014 Jul 6];25(6):1005–11. Available from:
5 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21595553>
6

- 7
8 12. Truty MJ, Sawyer MD, Que FG. Decreasing pancreatic leak after distal
9 pancreatectomy: saline-coupled radiofrequency ablation in a porcine model. *J*
10 *Gastrointest Surg* [Internet]. 2007 Aug [cited 2014 Jun 28];11(8):998–1007.
11 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17510773>
12
- 13 13. Dorcaratto D, Burdío F, Fondevila D, Andaluz A, Quesada R, Poves I, et al.
14 Radiofrequency is a secure and effective method for pancreatic transection in
15 laparoscopic distal pancreatectomy: results of a randomized, controlled trial in an
16 experimental model. *Surg Endosc* [Internet]. 2013 Oct [cited 2014 Jul
17 6];27(10):3710–9. Available from:
18 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23584822>
19
- 20
21 14. Quesada R, Burdío F, Iglesias M, Dorcaratto D, Cáceres M, Andaluz A, et al.
22 Radiofrequency Pancreatic Ablation and Section of the Main Pancreatic Duct
23 Does Not Lead to Necrotizing Pancreatitis. *Pancreas* [Internet]. 2014 Jun
24 27;43(6):1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24977335>
25
- 26 15. Burdío F, Berjano EJ, Navarro A, Burdío JM, Grande L, Gonzalez A, et al.
27 Research and development of a new RF-assisted device for bloodless rapid
28 transection of the liver: computational modeling and in vivo experiments.
29 *Biomed Eng Online* [Internet]. 2009 Jan [cited 2014 Jul 6];8:6. Available from:
30 [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2672929&tool=pmce
31 ntrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2672929&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)
32
33
- 34 16. Burdío F, Grande L, Berjano E, Martinez-Serrano M, Poves I, Burdío JM, et al.
35 A new single-instrument technique for parenchyma division and hemostasis in
36 liver resection: a clinical feasibility study. *Am J Surg* [Internet]. 2010 Dec [cited
37 2014 Jul 6];200(6):e75–80. Available from:
38 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20864082>
39
40
- 41 17. Dorcaratto D, Burdío F, Fondevila D, Andaluz A, Poves I, Martinez MA, et al.
42 Laparoscopic distal pancreatectomy: feasibility study of radiofrequency-assisted
43 transection in a porcine model. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* [Internet]. 2012
44 Apr [cited 2014 Jul 6];22(3):242–8. Available from:
45 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22288880>
46
47
- 48 18. Theodosopoulos T, Dellaportas D, Yiallourou AI, Gkiokas G, Polymeneas G,
49 Fotopoulos A. Pancreatic Remnant Occlusion after Whipple’s Procedure: An
50 Alternative Oncologically Safe Method. *ISRN Surg* [Internet]. 2013
51 Jan;2013:960424. Available from:
52 [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3748772&tool=pmce
53 ntrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3748772&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)
54
55
- 56 19. Ferrer J, Iii WES, Weegman BP, Suszynski TM, David ER. Pig pancreas
57 anatomy: implications for pancreas procurement, preservation, and islet
58 isolation. *NIH Public Access*. 2009;86(11):612–26.
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 20. Bassi C, Dervenis C, Butturini G, Fingerhut A, Yeo C, Izbicki J, et al.
5 Postoperative pancreatic fistula: an international study group (ISGPF) definition.
6 Surgery [Internet]. 2005 Jul [cited 2014 Jun 6];138(1):8–13. Available from:
7 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16003309>
8
9
10 21. Gibson-Corley KN, Olivier a K, Meyerholz DK. Principles for valid
11 histopathologic scoring in research. Vet Pathol [Internet]. 2013 Nov [cited 2014
12 Jul 6];50(6):1007–15. Available from:
13 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23558974>
14
15 22. Altman D. Practical statistics for medical research. London: Chapman & Hall;
16 1991.
17
18 23. Fuks D, Piessen G, Huet E, Tavernier M, Zerbib P, Michot F, et al. Life-
19 threatening postoperative pancreatic fistula (grade C) after
20 pancreaticoduodenectomy: incidence, prognosis, and risk factors. Am J Surg
21 [Internet]. 2009 Jun [cited 2014 Jul 6];197(6):702–9. Available from:
22 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18778804>
23
24 24. Pessaux P, Sauvanet A, Mariette C, Paye F, Muscari F, Cunha AS, et al. External
25 pancreatic duct stent decreases pancreatic fistula rate after
26 pancreaticoduodenectomy: prospective multicenter randomized trial. Ann Surg
27 [Internet]. 2011 May [cited 2014 Jun 21];253(5):879–85. Available from:
28 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21368658>
29
30 25. Farsi M, Boffi B, Cantafio S, Miranda E, Bencini L, Moretti R. [Treatment of the
31 pancreatic stump after pancreaticoduodenectomy. Wirsung duct occlusion versus
32 pancreaticojejunostomy]. Minerva Chir [Internet]. 2007 Aug [cited 2014 Jul
33 6];62(4):225–33. Available from:
34 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17641582>
35
36 26. Fronza JS, Bentrem DJ, Baker MS, Talamonti MS, Ujiki MB. Laparoscopic
37 distal pancreatectomy using radiofrequency energy. Am J Surg [Internet].
38 Elsevier Inc.; 2010 Mar [cited 2014 Jun 28];199(3):401–4; discussion 404.
39 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20226919>
40
41 27. Rempp H, Voigtländer M, Clasen S, Kempf S, Neugebauer A, Schraml C, et al.
42 Increased ablation zones using a cryo-based internally cooled bipolar RF
43 applicator in ex vivo bovine liver. Invest Radiol [Internet]. 2009
44 Dec;44(12):763–8. Available from:
45 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19838120>
46
47 28. Talamini MA. New Tools for Laparoscopic Division of the Pancreas.
48 2004;14(2):53–60.
49
50 29. Hartwig W, Duckheim M, Strobel O, Dovzhanskiy D, Bergmann F, Hackert T, et
51 al. LigaSure for pancreatic sealing during distal pancreatectomy. World J Surg
52 [Internet]. 2010 May [cited 2014 Jun 28];34(5):1066–70. Available from:
53 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20151128>
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 30. Suzuki Y, Fujino Y, Tanioka Y, Hori Y, Ueda T, Takeyama Y, et al. Randomized
5 clinical trial of ultrasonic dissector or conventional division in distal
6 pancreatectomy for non-fibrotic pancreas. *Br J Surg* [Internet]. 1999
7 May;86(5):608–11. Available from:
8 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10361178>
9
- 10
11 31. Walker NI. Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. I.
12 The role of apoptosis and intraepithelial macrophages in acinar cell deletion. *Am*
13 *J Pathol* [Internet]. 1987 Mar;126(3):439–51. Available from:
14 <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1899643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
15
16
17
18 32. Walker NI, Winterford CM, Kerr JF. Ultrastructure of the rat pancreas after
19 experimental duct ligation. II. Duct and stromal cell proliferation, differentiation,
20 and deletion. *Pancreas* [Internet]. 1992 Jan;7(4):420–34. Available from:
21 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1641387>
22
- 23
24 33. Scoggins CR, Meszoely IM, Wada M, Means AL, Yang L, Leach SD, et al. p53-
25 Dependent acinar cell apoptosis triggers epithelial proliferation in duct-ligated
26 murine pancreas p53-Dependent acinar cell apoptosis triggers epithelial
27 proliferation in duct-ligated murine pancreas. 2011;
28
- 29
30 34. Schuler M, Bossy-Wetzel E, Goldstein JC, Fitzgerald P, Green DR. P53 Induces
31 Apoptosis By Caspase Activation Through Mitochondrial Cytochrome C
32 Release. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Mar 10;275(10):7337–42. Available from:
33 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16889987>
34
- 35
36 35. Watanabei S, Abe K, Anb Y, Katoh H. Pancreas after Changes in the Mouse
37 Exocrine Duct Ligation□: A Qual itative and Quantitative Histological Study.
38 1995;58(3):365–74.
- 39
40 36. Wang RN, Kloppel G, Bouwens L. Diabetologia Duct- to islet-cell differentiation
41 and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. 1995;1405–11.
- 42
43 37. Mice PD, Li M, Miyagawa J, Moriwaki M, Yuan M, Yang Q, et al. Analysis of
44 Expression Profiles of Islet-associated Transcription and Growth Factors During
45 β -Cell Neogenesis from Duct. 2003;27(4):345–55.
46
47
- 48
49 38. Criscimanna A, Speicher J a, Houshmand G, Shiota C, Prasad K, Ji B, et al.
50 Duct cells contribute to regeneration of endocrine and acinar cells following
51 pancreatic damage in adult mice. *Gastroenterology* [Internet]. 2011 Oct [cited
52 2014 May 30];141(4):1451–62, 1462.e1–6. Available from:
53 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763240>
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 1: Intra- and postoperative variables

	ST group n=8	RF group n=8	P value
Operative time (minutes)*	47 (35-60)	58 (40-95)	N.S.
Transection time (minutes)*	5 (5-7)	5 (5-5)	N.S.
Postoperative weight gain (kg) *	14 (0-22)	25 (15-30) †	0.005
Postoperative weight gain (%)*	48 (0-87)	61 (43-77) †	N.S.
Pseudocyst (%)	3 (38)	1 (14) †	N.S.
Postoperative death linked to pancreatic leak (%)	1	0 (0) †	N.S.
Dye extravasation from the pancreatic stump at necropsy (%)	4 (50)	1 (14) †	N.S.
POPF (%)	6 (75)	1 (14) †	0.019

*Data expressed as median and range

†Excluding the animal that died on day 3 PO by intestinal volvulus (not linked to pancreatic leak)

N.S. No significant differences

Table 2**Table 2: Animals**

Animal	Group	PO (days)	Postoperative Weight gain (kg)	Cause of death	> Threefold drain/serum amylase > 3 PO	Pseudocyst	Dye extravasation from pancreatic stump at necropsy	POPF	Score of atrophy in distal pancreas (0-5)
1	ST	30	19	-	No	No	No	No	5
2	ST	30	20	-	Yes	Yes	Yes	Yes	2
3	ST	30	22	-	Yes	Yes	Yes	Yes	2-3
4	ST	2	0	Pancreatic leak	No	No	Yes	Yes	0
5	ST	30	14	-	Yes	No	No	Yes	5
6	ST	30	13	-	Yes	No	No	Yes	5
7	ST	30	16	-	No	Yes	Yes	Yes	2-5
8	ST	30	9	-	No	No	No	No	5
9*	RF	30	21	-	No	No	No	No	0
10	RF	30	15	-	No	No	No	No	5
11	RF	30	28	-	No	No	No	No	5
12	RF	30	27	-	Yes	Yes	Yes	Yes	5
13	RF	30	30	-	No	No	No	No	5
14	RF	3	0	Volvulus	No	No	No	No	0
15	RF	30	26	-	No	No	No	No	5
16	RF	30	60	-	No	No	No	No	5

* In this animal, as observed at necropsy, the “bridge” of pancreatic tissue serving as an anatomical connection between the splenic and connecting lobes behind the portal vein (Figure 1, Note B) was not completely severed. POPF: Postoperative Pancreatic Fistula.

Table 3: Preoperative and postoperative serum amylase and glucose levels by group and throughout the postoperative period

	Serum amylase (IU/L)			Serum glucose (mg/dL)		
	ST group	RF group	MEAN	ST group	RF group	MEAN
Preoperative	2191 (1165-3094)	2441 (1428-3662)	2316	119 (66-161)	98 (73-118)	109
3 h PO	2943 (2148-3826)	3009 (1736-3944)	2976	159 (110-208)	179 (98-272)	169*
1 day PO	4950 (3098-9623)	6968 (3520-11634)	5959*	95 (72-123)	102 (89-116)	99
3 day PO	3014 (1363-7926)	2595 (1372-3648)	2805	128 (100-156)	113 (98-147)	121
7 day PO	4362 (1393-17692)	2191 (1065-3025)	3277	120 (101-140)	112 (103-134)	116
30 day PO	2166 (1219-3145)	2634 (1339-3825)	2400	99 (75-120)	106 (83-142)	103

Data expressed as mean and range

No significant differences were found between groups (ST and RF) in either variable

*Mean values with significant differences ($p < 0.05$) throughout the postoperative period

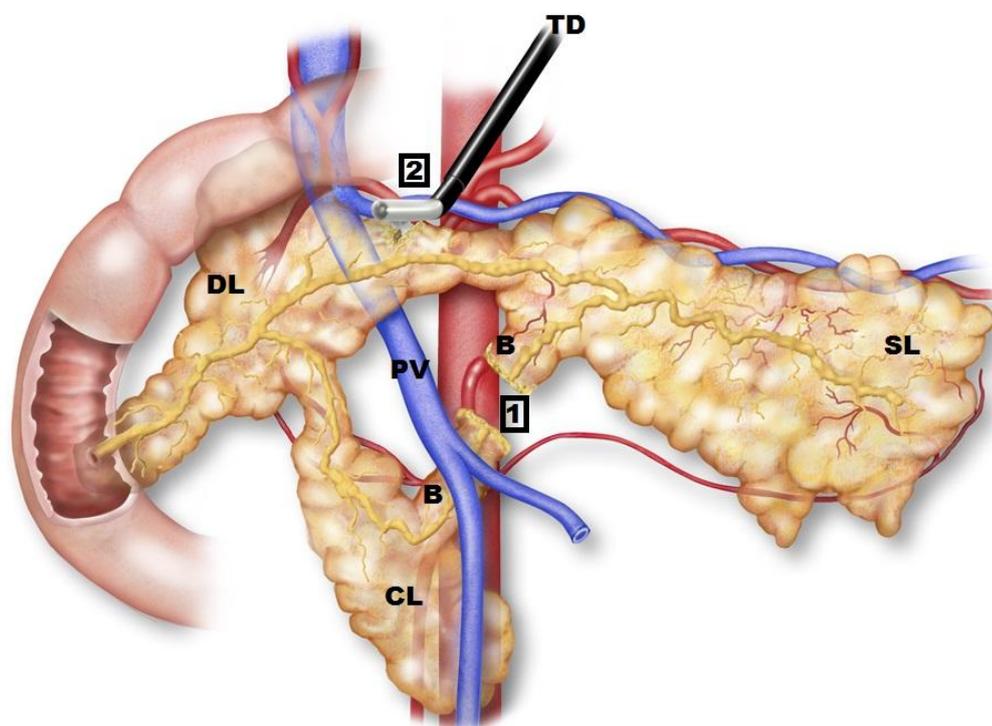


Figure 1: Normal anatomy of the porcine pancreas and the surgical procedure after the first section of the pancreas according to Ferrer et al[19]. The “splenic” lobe (SL), corresponding to the tail and body in the human pancreas, is attached to the spleen. The “duodenal” lobe (DL), corresponding to the head of the pancreas, is located adjacent to the duodenum while the “connecting” lobe (CL), corresponding to the uncinate process is an extension of the pancreas which is anterior to the portal vein (PV). There is also a “bridge” (B) of pancreatic tissue serving as an anatomical connection between the splenic and connecting lobes behind the portal vein. In order to achieve a complete obstruction of the distal part (body and tail) of the pancreas two sections of the pancreas were performed (numbers 1 and 2) with the transection device (TD) (either RFAT device or stapler).

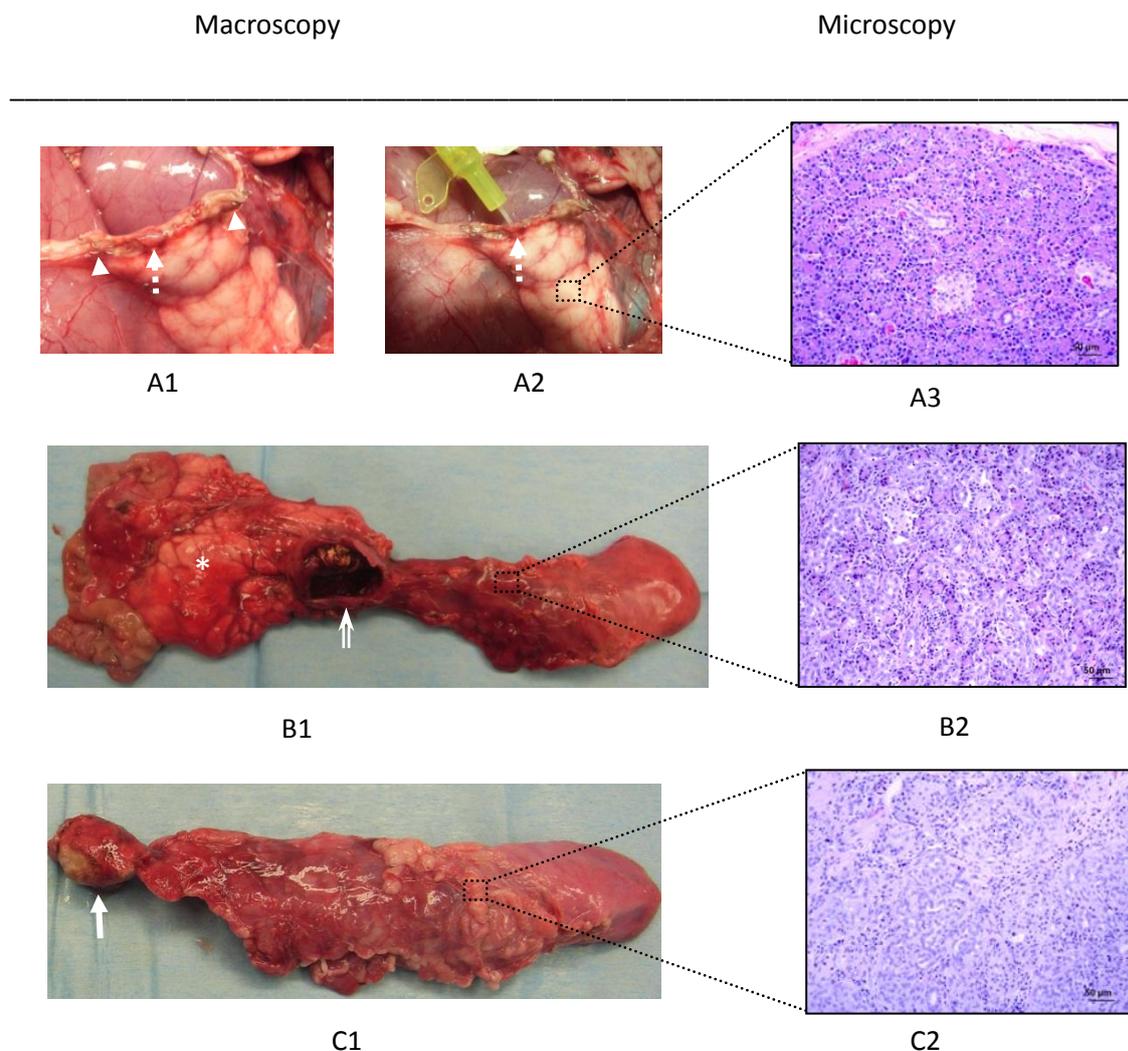


Figure 2: At necropsy three macroscopic with their corresponding microscopic patterns in the distal remnant pancreas were found (A-C): 1) *Pancreatic leak* (broken arrow, A1) from the distal stump was observed in an animal that died on day 2 PO (ST group). The origin of the leak was easily canalized with a probe (broken arrow, A2) between some staples (arrowhead). Histologically no signs of atrophy were described (A3); 2) *Pseudocyst* (open arrow, B1) and *partial atrophy* (B2) in the distal pancreas was usually encountered (3 out of 4 cases of pseudocyst); 3) *Complete atrophy of the distal remnant pancreas* (C1-2). This representative specimen belongs to the RF group, in which an area of coagulative necrosis was always observed (arrow). This area of coagulation necrosis was surrounded by a dense layer of mature connective tissue. In the distal pancreas a complete atrophy was observed microscopically. In any case, the proximal pancreas was well preserved with no signs of atrophy (asterisk)

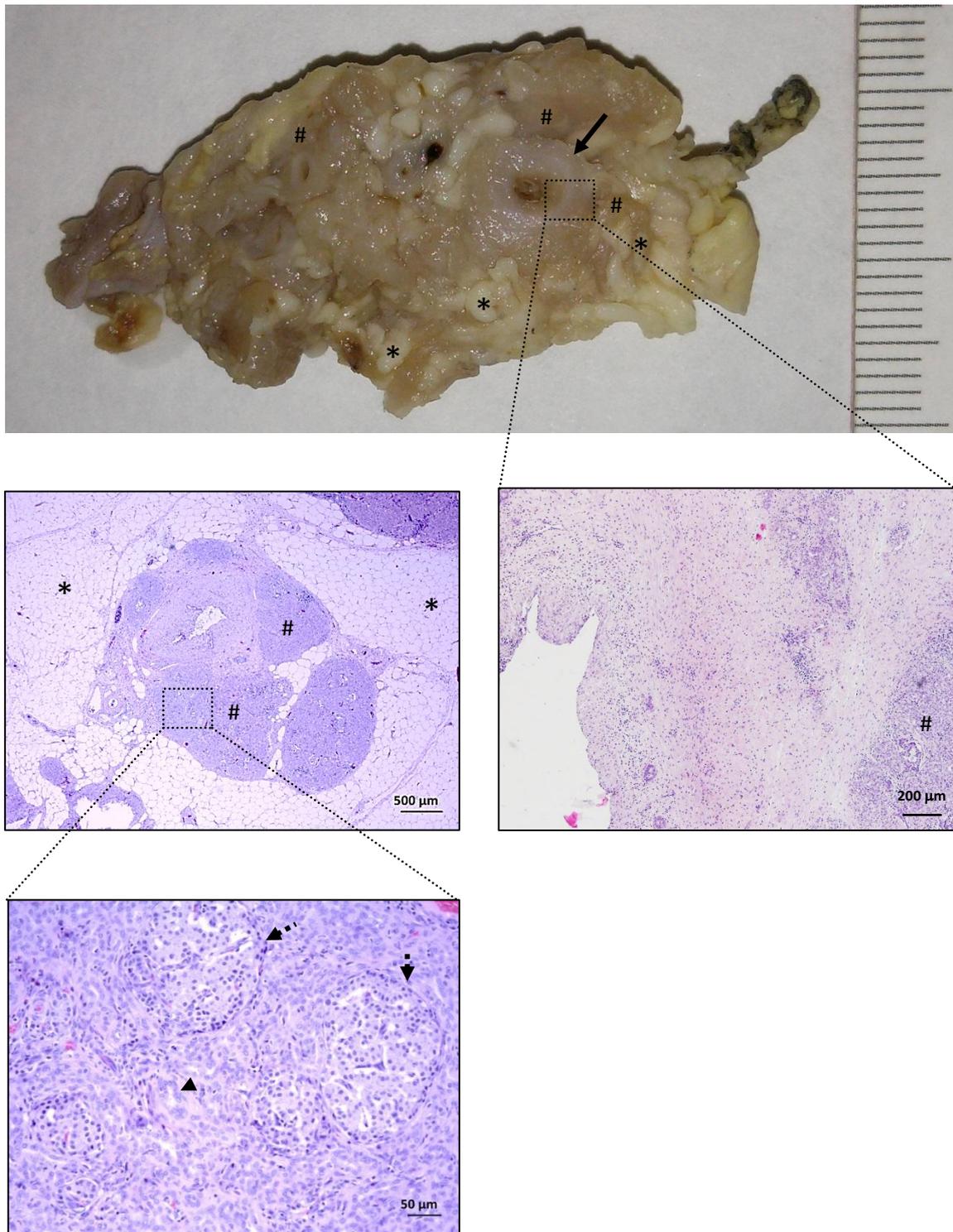


Figure 3: *Common histological features of complete atrophy.* The main pancreatic duct (arrow) is dilated and provided with a thick fibrotic wall. The acinar component of the pancreatic tissue has completely disappeared (atrophy score 5) and replaced by lobules (#) of pseudo-ductal complexes with some dilated ducts (arrowheads). In these lobules, islets of Langerhans were easily seen (broken arrows). In between these lobules, there was marked interlobular adipose infiltration (asterisk).

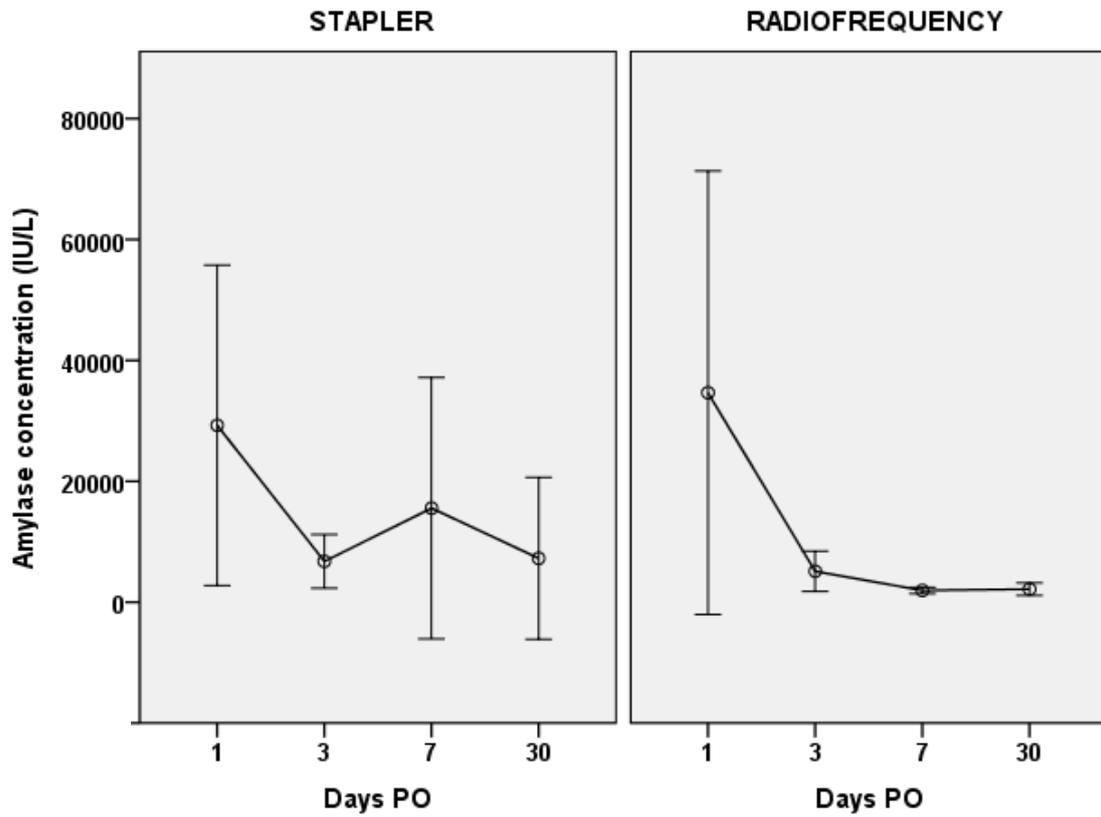


Figure 4: Peritoneal liquid amylase concentration throughout the postoperative period in both groups. Circles indicate mean values and each segment denotes 95% confidence interval of values. Note that values in the RF group are usually lower and homogeneous beyond day 3 PO.