

DEPARTAMENTO INTERFACULTATIVO DE FISIOLOGIA ANIMAL

SECRECION BILIAR EN EL POLLO ANESTESIADO Y NO ANESTESIADO: NUEVA TECNICA EXPERIMENTAL

F. LISBONA, F. HIDALGO, A. ESTELLER y M. A. LOPEZ

RESUMEN

Se describe una nueva técnica para el estudio de la secreción biliar en pollos anestesiados y no anestesiados, que permite la recogida simultánea de la bilis segregada por los dos conductos biliares de esta especie, junto con el mantenimiento de la circulación enterohepática de sales biliares. Se discuten por primera vez, de forma conjunta, los resultados de la secreción de bilis en condiciones y vesicular. Igualmente se discuten las diferencias en la secreción biliar entre animales anestesiados y no anestesiados.

SUMMARY

A new experimental technique to study the biliary secretion in anaesthetized and unanaesthetized chicken that allows the simultaneous collection of the bile secreted through the two bile ducts of this species, together with the maintenance of the enterohepatic circulation of bile salts is described. The results of biliary secretion in basal conditions through the hepatic and vesicular ducts are discussed in conjunction for the first time. Equally differences in biliary secretion between anaesthetized and unanaesthetized animals are discussed.

Existen un pequeño número de publicaciones acerca de la fisiología de la Secreción Biliar en el pollo. Este hecho es llamativo dada la peculiar anatomía del árbol biliar extrahepático de esta especie, con un conducto hepático directo, desde el lóbulo izquierdo del hígado hasta el duodeno, y otro, vesicu-

lar, que partiendo de una vesícula biliar, que a su vez recibe una serie de pequeños conductos que provienen del lóbulo derecho, va a parar al duodeno independientemente del hepático.

Esta peculiar topografía biliar, hacía en principio pensar que el pollo era una especie de elección para estudiar, de forma separada, la acción de factores coleréticos y colagogos.

Sin embargo, la independencia de los dos sistemas, hepático y vesicular, es tan solo aparente, pues intrahepáticamente existen una serie de conductos que permiten la fácil y rápida mezcla de la bilis de ambos lóbulos, y que fueron puestas de manifiesto por PURTON (14) por técnicas histológicas y por LIN et al. (11) por técnicas fisiológicas.

La posibilidad de que la bilis que fluye normalmente por un conducto, pase al otro tras obstrucción del primero y viceversa, complica extraordinariamente la interpretación de los resultados obtenidos. Así en los trabajos publicados hasta la fecha, o bien se trabajo con solo un conducto (11, 3, 12, 7) o bien se tratan independientemente (1).

En el presente trabajo, no sólo se exponen las técnicas quirúrgicas, que permiten recoger bilis por ambos sistemas de conductos, en las condiciones más próximas a las fisiológicas, tanto en animal anestesiado como en animal no anestesiado con fístul crónica, así como el tratamiento postoperatorio que facilita el correcto mantenimiento sino también se propone por primera vez un método para exponer e interpretar conjuntamente los resultados obtenidos, en cuanto a la bilis que fluye por ambos conductos.

## MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado un total de 50 pollos Broiler con un peso comprendido entre 2 y 4 kg. procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada. A todos los animales se les retiraba la comida, pero no el agua. 20-24 horas antes de la intervención.

### *Experimentos agudos*

Los animales se sedaron con benzodicepan (Valium N.R.) administrado intramuscularmente, en dosis que oscilaron entre

los 20 y 60 mg/kg. La anestesia se completó con la administración endovenosa de etil-uretano (1 mg/kg). La profundidad de la anestesia se controló a través de los reflejos plantar y oculoparpebral.

Se disecó la vena yugular derecha, en la que se introdujo una cánula de polivinilo hasta que su extremo quedó situado en la vena cava descendente; esta cánula se utilizó para la anestesia e inyección de diferentes sustancias; en la arteria carótida derecha se introdujo otra cánula de manera que su extremo llegara al cayado aórtico, lo que nos permitió el registro de presión arterial sin interrupción de flujo.

En todos los casos se practicó traqueotomía de rutina con el fin de reducir al mínimo las dificultades respiratorias; sin embargo, no fue necesario recurrir a la respiración artificial. A continuación se realizó laparotomía lateral derecha a través de la cual se ligó el píloro y se disecaron ambos conductos biliares, que se canularon con tubos de polivinilo del tamaño adecuado; la herida se cubrió con gasas humedecidas con solución salina 0,9 % a 37°C.

La bilis que fluye por ambos conductos se recoge en viales, tras pasar por unos transductores Drop-Counter A978 que funcionan por un efecto piezoeléctrico. Estos sistemas nos cuantifican las gotas de secreción, lo que puede convertirse fácilmente en flujo conocido el peso de cada gota. La bilis recogida se reingresa en duodeno cada 60 minutos, tras guardar una pequeña parte para los análisis, con lo que se mantiene intacta la C.E.H. de sales biliares.

Para registro de la presión arterial conectamos la cánula carotídea a un transductor Statham P23Db, que a su vez se conecta a un polígrafo physiograph E & M a través de un carrier preamplificador.

### *Experimentos crónicos*

Durante los dos días previos a la intervención quirúrgica se les inyectó a los animales por vía intramuscular 100 mg de Vit. C y una dosis preventiva de antibióticos.

El procedimiento seguido para la sedación fue similar al descrito en los experimentos agudos, sin que en ningún caso se administrara anestésico, sino únicamente benzodiacepan por

vía intramuscular, lo que condujo a una sedación suficiente dada la escasa duración de la intervención.

Tras laparotomía lateral derecha se procede a la localización del asa duodenal. Se disecan los dos conductos biliares y se realizan incisiones en cada uno de ellos por las que se introducen sendas cánulas de goma siliconada, asegurándose dichas cánulas con ligaduras dobles de lino. En el duodeno y a unos 15 cm del piloro se implanta una cánula en "T" de polivinilo que se fija con una sutura en bolsa de tabaco. Las tres cánulas se exteriorizan a través de la pared abdominal derecha, cuidando siempre de mantener la posición inicial de los conductos así como la del duodeno.

Las dos cánulas biliares nos permiten la recogida de la bilis y la duodenal el reingreso de la misma y la administración de nutrientes y otras sustancias utilizadas en nuestros ensayos.

La herida abdominal se cierra por planos con sutura continua de lino del n.º 0. Se impregna la cicatriz y las zonas de afloramiento de las cánulas con un aerosol de cloranfenicol y violeta de genciana.

A las 12 horas de la operación se facilita a los animales el acceso al agua y a las 36 horas a la comida. Finalizado el período postoperatorio que normalmente tiene una duración de 48 a 72 horas. La recuperación del animal es total y sus condiciones fisiológicas normales permiten el comienzo de los experimentos.

Cada animal se aloja en una jaula especial de  $0,25 \times 0,4$  m. situada a 1 metro del suelo en una habitación termorregulada.

En ningún animal se presentaron alteraciones del funcionamiento hepático. Sin embargo, y debido a la alta viscosidad de la bilis vesicular y al bajo flujo existente en este conducto, con cierta frecuencia se producían tapones que lo obturaban progresivamente; si este estado se prolongaba (más de seis horas), se procedía a sacrificar al animal para evitar que el posible estasis biliar indujera daños hepáticos con la consecuente modificación de los resultados.

A todos los animales se les extirpó el hígado, y se tomaron muestras para su ulterior examen histológico.

Para la recogida de las muestras de bilis, se conectaban a la pieza plástica de las cánulas, bolsas de polietileno previamente taradas. El volumen de bilis se calculó por diferencia de pesada, considerando la densidad de la bilis igual a la unidad.

Una vez determinado el flujo, una muestra homogénea de bilis se guardaba en frascos de vidrio, los cuales se mantenían a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis, y el resto de la bilis se reinyectaba en duodeno. Las sales biliares se analizaron por un método colorimétrico (10), los Cl se cuantificaron por un método potenciométrico y el  $\text{Na}^{+}$  y el  $\text{K}^{+}$  por espectrofotometría de absorción atómica.

## RESULTADOS

La Fig. 1 recoge los valores medios de flujo y concentración de sales biliares y  $\text{Cl}^{-}$ , tanto en animales anestesiados como no anestesiados, en diferentes condiciones experimentales.

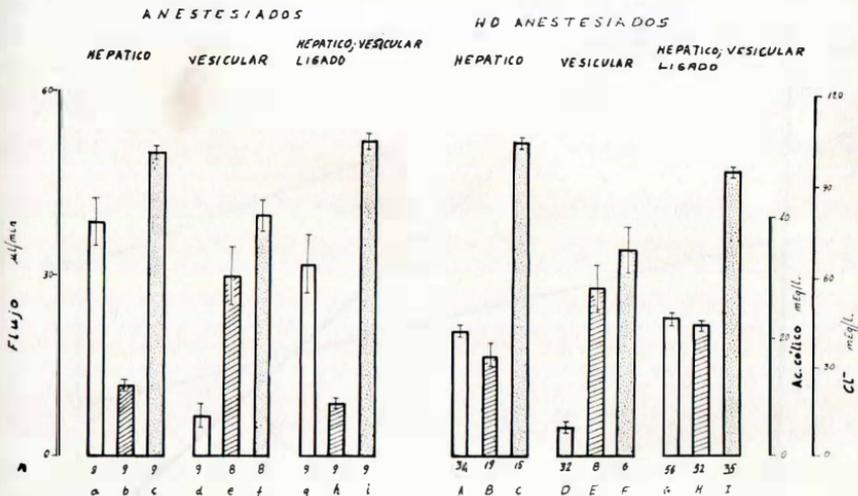


Fig. 1.—Flujo de bilis, concentración de ácido cólico y de cloruro en pollos, en diferentes condiciones basales.

- Flujo de bilis  
 Concentración de ácido cólico  
 Concentración de cloruro

- a — A  $p < 0.001$   
 b — B  $p < 0.01$   
 h — H  $p < 0.001$   
 i — I  $p < 0.001$

La Fig. 2 nos muestra la correlación existente entre la concentración de Cl y la de ácido cólico en la bilis recogida en el conducto hepático, en el conducto vesicular y en la vesícula de pollos anestesiados.

<i>a</i> :	<i>Bilis conducto hepático</i> :	$y = -1.97x + 124$	$r = -0.712$
			$P < 0.05$
<i>b</i> :	" " <i>vesicular</i> :	$y = -0.78x + 103$	$r = -0.943$
			$P < 0.001$
<i>c</i> :	" <i>en vesícula</i> :	$y = -0.53x + 65$	$r = -0.743$
			$P < 0.01$

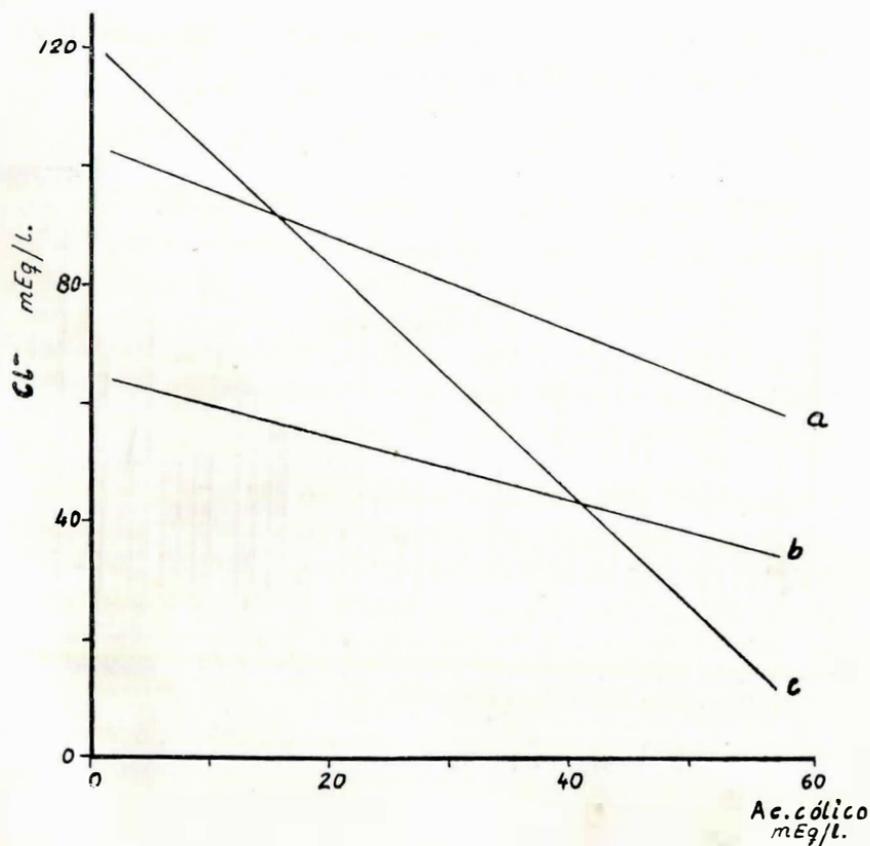


Fig. 2.—Correlación entre concentración de ácido cólico y cloruro en la bilis del conducto hepático, conducto vesicular y vesícula biliar de pollos anestesiados.

La Fig. 3 ilustra las variantes de flujo y de concentración de sales biliares y  $\text{Cl}^-$  en la bilis que fluye por el conducto hepático de pollos no anestesiados, con el conducto vesicular ligado y la circulación enterohepática de sales biliares intacta. Y la Fig. 4 las variaciones de los mismos parámetros y además las de flujo total (suma del hepático más el vesicular) en similares condiciones a la de la figura 3.

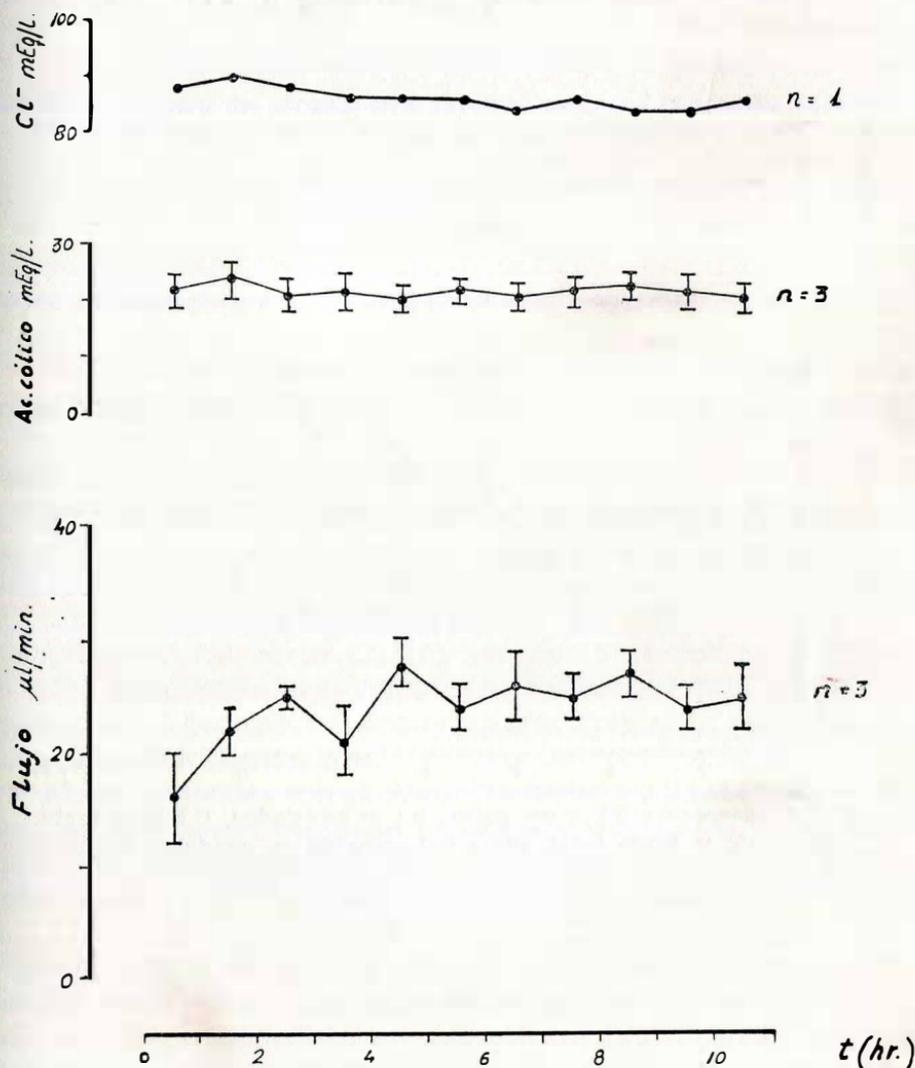


Fig. 3.—Secreción biliar en pollos no anestesiados. C.E.H. intacta. Conducto vesicular ligado.

El registro 1, recoge las variaciones de presión arterial (parte superior) y de flujo por el conducto vesicular hepático en un animal anestesiado al que se pinzó alternativamente los conductos hepático y vesicular.

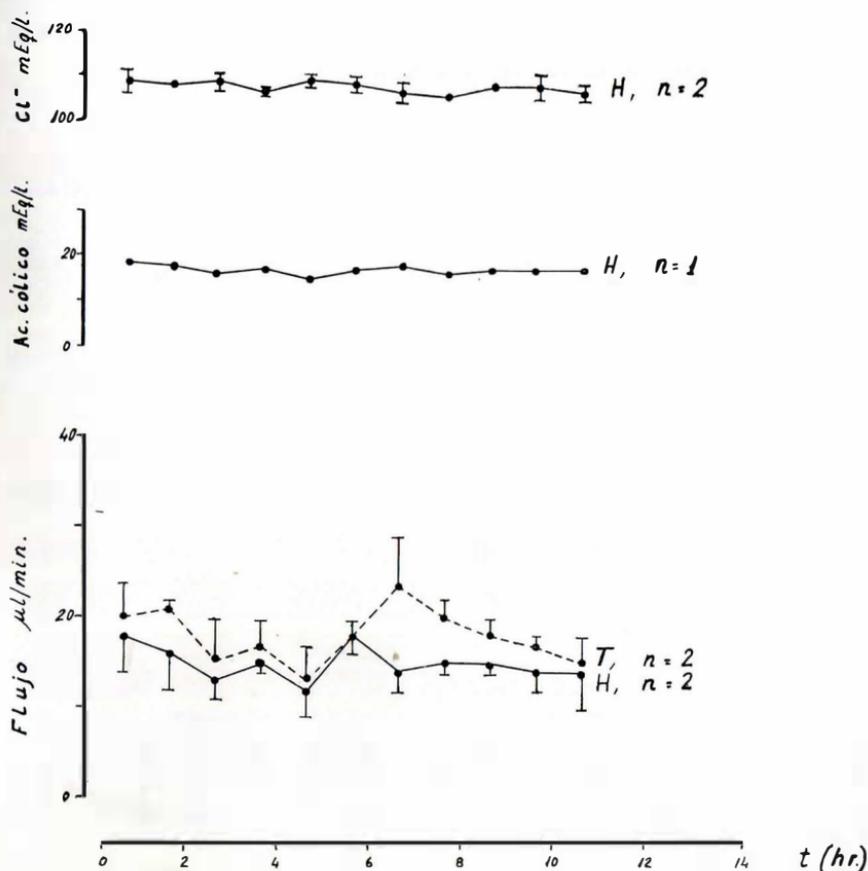
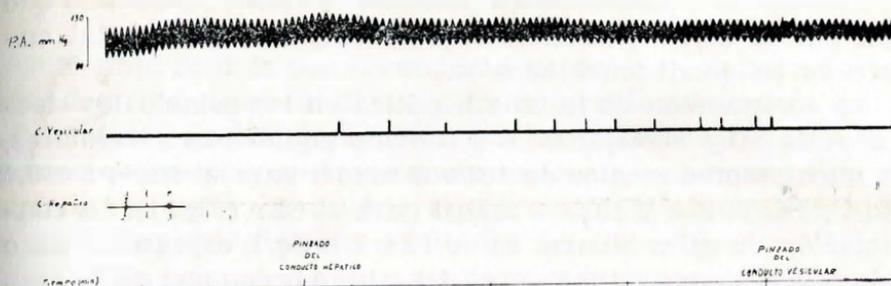


Fig. 4.—Secreción biliar en pollos no anestesiados, C.E.H. intacta. (T  $\times$  Flujo total, suma del recogido en conducto hepático y conducto vesicular. H  $\times$  Conducto hepático).



Registro 1.—Efecto del pinzamiento alternativo de los conductos hepáticos y vesicular sobre el flujo de bilis en pollo anestesiado.

## DISCUSION

### *Sobre la secreción en reposo en animal anestesiado*

En nuestras condiciones experimentales, en pollos de peso comprendido entre 2 y 3 kg., el flujo medio de bilis por el conducto hepático es de  $39 \pm 4$  ( $n = 10$ )  $\mu\text{l}/\text{min}$ . (Fig. 1), lo que equivale aproximadamente a  $33 \mu\text{l}/\text{g}$ . hígado/hora.

El flujo por el conducto vesicular es variable y mucho más reducido, con un valor medio de  $7 \pm 2 \mu\text{l}/\text{min}$ . En consecuencia, el flujo total de bilis en el pollo anestesiado es elevado, inferior al del conejo (2) (9), la rata (2) (9) (15) y el cobaya (2), y superior al del perro (2) (8), monos (6), hombre (2) y gato (13); en nuestros experimentos se obtiene un flujo del mismo orden que el descrito en la bibliografía (11), para esta especie, en semejantes condiciones.

En los animales con el conducto vesicular ligado (Fig. 1) el flujo de bilis por el conducto hepático es análogo al de los animales con dicho conducto libre, no existiendo diferencia significativa entre ambos grupos. En este sentido estamos de acuerdo con LIN y col. (11), quienes observan hechos similares, y deducen la existencia de anastomosis a nivel intrahepático entre los dos sistemas de conductos presentes en el árbol biliar de esta especie, anastomosis que también se han estudiado desde el punto de vista morfológico (14). Más aún, en los ensayos realizados por nosotros pinzando alternativamente el conducto hepático y el vesicular (registro 1) se comprueba que, siempre

que uno de los conductos está pinzado, la cantidad de bilis que fluya por el otro es sensiblemente idéntica al flujo total encontrado en condiciones basales.

La composición de la bilis hepática en los principales electrolitos es muy semejante a la de los líquidos extracelulares, con unos valores medios de  $164 \pm 8$  mEq/l para el  $\text{Na}^+$ ,  $5 \pm 0,4$  mEq/l para el  $\text{K}^+$  y  $101 \pm 2$  mEq/l para el  $\text{Cl}^-$  (Fig. 1). La concentración de sales biliares es de  $12 \pm 1$  mEq/l, expresada como ácido cólico, siendo estos valores del mismo orden que en los mamíferos cuyo flujo biliar es alto, y más bajos que en aquellos que presentan una secreción biliar reducida. Al estudiar la composición de la bilis vesicular, es preciso tener en cuenta que la vesícula biliar del pollo no es homóloga de la de mamíferos, ya que se trata de un simple ensanchamiento del conducto vesicular, a través del cual la bilis fluye de manera continua; por ello no es de extrañar que se aprecien diferencias entre la bilis recogida del conducto vesicular y la extraída directamente de la vesícula. La bilis del conducto vesicular (Fig. 1) presenta una concentración en sales biliares, muy superior a la de la bilis hepática, y asimismo se encuentran aumentadas, aunque en menor cuantía, las proporciones de Na y K hasta valores de  $177 \pm 9$  y  $8 \pm 2$  mEq/l, respectivamente; la elevación de la concentración de sales biliares se compensa por un descenso del mismo orden en la de  $\text{Cl}^-$ . En la bilis extraída de la vesícula la situación es similar, pero más acusada, llegando la concentración de sales biliares a sextuplicar la de la bilis hepática, y de la  $\text{Cl}^-$   $26 \pm 4$  ( $n = 15$ ), a ser una cuarta parte de la encontrada en dicha bilis hepática. Tanto en la bilis del conducto vesicular, como en la extraída de la vesícula, existe correlación negativa (Fig. 2), estadísticamente significativa ( $P < 0,01$ ), entre la concentración de sales biliares y la de  $\text{Cl}^-$ , lo que ya había sido puesto de manifiesto por ESTELLER y col. en un trabajo previo (5). Todo lo anteriormente indicado demuestra que la vesícula biliar del pollo, pese a las diferencias morfológicas, se comporta funcionalmente de modo análogo a la de mamíferos, teniendo lugar en la misma una reabsorción de agua y  $\text{Cl}^-$  y concentrándose en consecuencia los ácidos biliares y los cationes.

### *Sobre la secreción en reposo en animal no anestesiado*

El flujo de bilis por el conducto hepático en pollos no anestesiados (Fig. 1) es de  $22 \pm 1 \mu\text{l}/\text{min}$ . significativamente menor ( $P < 0,001$ ) que el obtenido en las preparaciones agudas, y lo mismo ocurre cuando el conducto vesicular está ligado (Fig. 1), aunque en este caso no hay significación estadística, debido a la gran dispersión de los resultados. La concentración de sales biliares es siempre significativamente superior en los animales no anestesiados, y en cambio es inferior a la de  $\text{Cl}^-$  (Fig. 1); por lo que se refiere a la bilis recogida del conducto vesicular, no hay diferencias entre ambos grupos de animales. Existen varias explicaciones posibles para las variaciones encontradas, entre las que podemos mencionar las siguientes: un efecto positivo de la anestesia sobre el flujo de bilis, un componente mecánico debido al distinto procedimiento de recogida (ver Método), una hipersecreción por el estímulo físico proporcionado por la cánula en los períodos iniciales, cambios en los procesos de reabsorción de agua en el sistema de conductos a causa de la anestesia, etc. No estamos en condiciones de dilucidar cuál de estas explicaciones es la correcta, o cuál es la contribución real de cada uno de estos mecanismos. En todo caso es preciso destacar que las diferencias en flujo se acompañan siempre de cambios en composición, de forma que, a mayor flujo menor concentración de sales biliares, tendiendo la producción de las mismas a mantenerse constante, y, a mayor concentración de sales biliares, menor concentración de  $\text{Cl}^-$ .

En ausencia de estímulos, y cuando la circulación enterohepática (CEH) de sales biliares se mantiene intacta, la secreción de bilis en pollos no anestesiados es notablemente constante, tanto en flujo como en composición (Figs. 3 y 4). La contribución vesicular nuevamente es escasa como se deduce de la comparación entre el flujo por el conducto hepático y el flujo total (Fig. 3) y entre los flujos hepáticos cuando el conducto vesicular está ligado o no (Fig. 3 y Fig. 4).

La constancia de los datos obtenidos a lo largo del tiempo (hasta tres meses) en animales no anestesiados, así como la ausencia de síntomas de alteraciones hepáticas en los controles histológicos postmortem, indican que la preparación quirúrgico-experimental empleada por nosotros es aceptable desde el punto

de vista fisiológico. Por otra parte, la presentación y discusión de nuestros resultados en pollos anestesiados o no, por la novedad que supone el tratamiento conjunto de la secreción a través de ambos conductos, resulta de interés para estudios posteriores en especies animales con este tipo de disposición anatómica en su árbol biliar intra y extrahepático.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1.—ANGELUCCI, L., BALDIERI, M. & LINARI, G.: Eur. J. Pharmac., 11, 217-232, 1970.
- 2.—CHENDEROVITCH, J.: Am. J. Physiol., 214, 86-93, 1968.
- 3.—CLARKSON, T. B., KING, J. S. & WARNOCK, N. H.: Am. J. Vet. Res., 18, 187-190, 1957.
- 4.—CLARKSON, M. J. & RICHARDS, T. G.: The liver with special reference to bile formation. In: Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl. Ed. by D. J. Bell and B. M. Freeman. Vol. 2, 1085-1114. New York, Academic Press.
- 5.—ESTELLER, A., DE LA HIGUERA, M., LOPEZ, M. A., ZAMORA, S. & MURILLO, A.: Rev. Esp. Fisiol., 31, 91-94, 1975.
- 6.—ESTELLER, A., LISBONA, F., MARTINEZ DE VICTORIA, E. & MURILLO, A.: Rev. Esp. de Fisiol., 33, 31-35, 1977.
- 7.—HIMES, J. A. & CORNELIUS, C. E.: Cornell Vet., 65, 374-379, 1975.
- 8.—KIRCHMAYER, K., TARNAWSKI, A., DROZ, H. & CICHECKA, K.: Gut., 13, 709-712, 1972.
- 9.—KLAASEN, C. D.: J. of Physiol., 224, 259-269, 1972.
- 10.—LEVIN, S. J., JOHNSTON, C. G. & BOYLE, A. J.: Anal. Chem., 33, 1407-1411, 1961.
- 11.—LIN, G. L., HIMES, J. A. & CORNELIUS, C. E.: Am. J. Physiol., 226, 881-885, 1974.
- 12.—LIND, G. W., GRONWALL, R. R. & CORNELIUS, C. E.: Res. Vet. Sci., 8, 280-282, 1967.
- 13.—PUGH, P. M. & STONE, S. L.: J. Physiol., 201, 50P.
- 14.—PURTON, M. D.: J. Zool. London, 159, 273-280, 1969.
- 15.—SHAW, H. M. & HEATH, I.: Austr. J. of Biol. Sci., 25, 147-154, NAR 42, 8, 302, 1972.