

Efecto de la ciclosporina A sobre la población fibroblástica en los períodos iniciales de la cicatrización

P. Múgica*, I. García-Alonso**, V. Portugal***, I. López de Tejada**, J.E. Bilbao**** y J. Méndez*****

* Jefe de Servicio. Servicio de Cirugía General. Hospital San Eloy. ** Profesor titular. *** Becario. **** Profesor asociado. ***** Catedrático. Laboratorio de Cirugía Experimental (Departamento de Cirugía y Radiología y Medicina Física). Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco. Lejona. Vizcaya.

Resumen

Cada vez existen más evidencias a favor de una interrelación importante entre el sistema inmunitario y el control de la cicatrización de las heridas. Por este motivo, cabe esperar que aquellos fármacos que afecten en algún sentido a las células inmunitarias (especialmente macrófagos y linfocitos) originarán alguna modificación en el proceso normal de curación de las heridas. El presente trabajo se ha llevado a cabo sobre cicatrices de la línea alba del conejo, en el séptimo día de su evolución. En él se analiza el efecto de la ciclosporina A, a dosis inmunosupresoras, sobre el número y tasa reduplicativa de los fibroblastos del tejido cicatrizal. Se observa una franca disminución de ambos parámetros en los animales tratados con ciclosporina A, sin que ese efecto se manifieste en aquellos tratados únicamente con excipiente. Este déficit fibroblástico se acompaña también de un marcado descenso en la resistencia tensil de las cicatrices.

Palabras clave: Cicatrización. Fibroblastos. Ciclosporina. Resistencia tensil. Conejo.

Introducción

Los fibroblastos son las células *princeps* del complejo proceso de cicatrización al ser los elementos encargados de producir colágeno y sustancia fundamental. Estas células hacen su aparición en la herida al segundo o tercer día, cuando aún no ha finalizado la fase de inflamación o fagocitosis.

Tanto la proliferación como la migración y producción de colágena por los fibroblastos está mediatizada por un número elevado de productos de las células presentes en la fase inflamatoria. Así, las plaquetas¹, macrófagos²⁻⁵ y linfocitos⁶⁻⁸ ejercen una clara influencia sobre los fibroblastos, por lo que sería lógico pensar que cualquier alteración en estas células debiera producir

THE EFFECT OF CYCLOSPORIN A ON THE FIBROBLASTIC POPULATION IN THE INITIAL PERIOD OF SCARRING

There is ever more evidence favoring the important interrelation between the immune system and the control of wound healing. It is, thus, to be expected that drugs affecting the immunity cells (specially macrophages and lymphocytes) should, in some way, originate some modification in the normal process of wound healing. The present study was carried out in scars of the alba line of the rabbit on the seventh day of evolution. The effect of cyclosporin A at immunosuppressive doses was analyzed on the number and reduplicative rate of the fibroblasts of the scarring tissue. A frank decrease of both parameters was observed in the animals treated with cyclosporin A without this effect being manifest in those treated only with excipient. This fibroblastic deficit was also accompanied by a marked decrease in the tensile resistance of the scars.

Key words: Scarring. Fibroblasts. Cyclosporin. Tensile strength. Rabbit.

una clara alteración en el proceso de cicatrización. Por otra parte, todas estas líneas celulares son claramente influenciadas por la ciclosporina A⁹⁻¹¹ por lo que, al menos teóricamente, dicho fármaco debería tener efectos negativos sobre el proceso cicatrizal.

La CsA viene siendo utilizada, cada vez con mayor frecuencia, por su marcada acción inmunosupresora. Utilizada por primera vez en la clínica humana por Calne en 1978¹² debería afectar negativamente a la cicatrización, al igual que otros fármacos inmunosupresores (corticoides^{13, 14} y azatioprina^{15, 16}). Sin embargo, su acción sobre el proceso de cicatrización no está todavía aclarada. Unos autores niegan que el fármaco tenga efectos negativos en la cicatrización¹⁵⁻¹⁹, mientras que otros afirman que retrasa significativamente dicho proceso^{20, 21}.

Dada la discrepancia que todavía existe sobre la acción del fármaco en la cicatrización, hemos realizado el presente trabajo con la idea de valorar esta acción de la CsA sobre los fibroblastos en las fases tempranas del proceso mediante la cuantificación del número de fibroblastos por unidad de área medida

Correspondencia: Dr. P. Múgica.

Laboratorio de Cirugía Experimental.

Facultad de Medicina y Odontología. 48940 Lejona. Vizcaya.

Aceptado para su publicación el 15 de noviembre de 1992.

(densidad fibroblástica), del ADN nuclear de los mismos (índice de duplicación de los fibroblastos) y de la resistencia tensil de la cicatriz.

Material y métodos

Se han utilizado 35 conejos de Nueva Zelanda de ambos sexos, con pesos comprendidos entre 2 y 2,5 kg, proporcionados por el Estabulario de la Universidad del País Vasco (UPV). La primera serie (n = 7) se destinó al estudio de la línea alba normal. El grupo control (n = 7) se utilizó para el estudio morfométrico de las cicatrices y de la cuantificación de la resistencia tensil en animales no sometidos a ningún tratamiento. En la tercera serie (n = 7) se realizaron las determinaciones histológicas en las cicatrices de animales tratados con CsA (20 mg/kg/día i.p. desde la víspera de la intervención hasta el día del sacrificio). Una cuarta serie (n = 7) fue destinada al estudio de las cicatrices tratadas con el vehículo utilizado para la administración de CsA (etanol anhidro e intralipid al 10 % en proporción 1/10). La quinta serie (n = 7) se utilizó para la cuantificación de la resistencia tensil de las cicatrices de animales tratados con CsA en las mismas dosis y por la misma vía que las anteriormente descritas.

Los animales fueron premedicados con Combelén® (0,10 ml/kg/i.m.). La anestesia se indujo con Ketamina® (50 mg/kg/i.m.) y diazepam (2,5 mg/kg/i.m., hasta un máximo de 5 mg). Tras practicar una pequeña incisión laparotómica de aproximadamente 4 cm de longitud, la pared abdominal se cerró con una sutura continua de Vitalon 3/0 (How Medica Inc.). La piel se suturó con sutura continua de seda 3/0. Posteriormente los animales permanecieron en sus jaulas, proporcionándoseles pienso y agua *ad libitum*. En la serie destinada al estudio de la línea alba normal, se extrajo una pequeña muestra de la misma, sacrificando en la misma intervención a los animales con las mismas normas que se describen a continuación.

El resto de los animales fueron sacrificados al séptimo día mediante una sobredosis barbitúrica, siguiendo las normas dictadas por el Real Decreto 223/1988 sobre protección de los animales utilizados para experimentación. A continuación se extrajeron las cicatrices de la línea alba fijándose las muestras en formol al 10 % para su posterior inclusión en parafina. De cada muestra se obtuvieron 6 secciones histológicas de 5 µ de espesor, de las que tres se tiñeron con hematoxilina-eosina (destinadas a la cuantificación de la densidad fibroblástica), y las otras tres con el reactivo de Schiff, según el método de Feulgen. Estas últimas se destinaron al estudio del ADN nuclear de los fibroblastos.

Densidad fibroblástica

Para realizar los estudios histológicos se ha utilizado un equipo compuesto por un microscopio óptico, una lente de proyección (Mipro 125 mm Kpl, Carl Zeiss) y una mesa digitalizadora (DT 1.000 Graphtec, Tokio) controlada por un microprocesador (Olivetti M-20).

Se han valorado tres campos de 622 µ de diámetro (salvo en los casos en los que el tamaño de la muestra no ha permitido considerar más que uno o dos). Utilizando un objetivo × 32 se proyecta la imagen sobre una mesa digitalizadora, lo que proporciona un aumento global de × 371. Sobre dicha proyección se dibuja el contorno del área de cicatriz a estudiar, proporcionan-

do el ordenador, mediante un método de integración, la superficie del tejido cicatrizal. Dicha superficie viene dada en unidades arbitrarias de área (UA), idénticas para todas las cuantificaciones realizadas. La densidad fibroblástica se valora contabilizando el número de fibroblastos directamente sobre la imagen proyectada, interponiendo una cuadrícula para evitar repeticiones. Para cada zona medida se ha calculado el número de fibroblastos por cada 1.000 UA. La media de los tres valores obtenidos se ha utilizado como índice de la densidad fibroblástica de dicha cicatriz.

Cuantificación del ADN

El contenido en ADN de los núcleos celulares se ha medido mediante un microespectrofotómetro VMS-0,5 (Carl Zeiss, Obercochen) controlado *on line* por un ordenador Olivetti M-20, dotado de una platina motorizada de 0,25 µ de resolución.

En cada preparación se han cuantificado 100 núcleos de fibroblastos, distribuyéndose los valores así obtenidos en un histograma de frecuencias. Sobre dicho histograma, y siguiendo el método de Bartel, se han ajustado dos curvas de Gauss. En la primera de ellas quedan incluidos los núcleos con un contenido de ADN 2C, englobándose en la segunda aquellos que, por haber iniciado la reduplicación de su material genético, han alcanzado cifras superiores.

A continuación, y por un método de integración, se ha establecido la superficie de cada una de las curvas (S1 y S2), calculándose la proporción existente entre ambas; esto representa el porcentaje de fibroblastos en fase de síntesis:

$$\%Fs = \frac{S1}{S1 + S2} \times 100$$

Tensiometría

Para el estudio tensiométrico se extrajeron de cada cicatriz, previo marcaje con una cinta métrica, dos tiras de 1 cm de anchura que se mantuvieron sumergidas en suero fisiológico para evitar retracciones hasta el momento de la medición, que siempre se realizó escasos minutos después de obtenida la muestra.

La resistencia tensil se ha valorado mediante un tensiómetro de diseño propio. El instrumento se fundamenta en un motor eléctrico que proporciona una fuerza de tracción constante de 0,147 N/seg. En el otro extremo del aparato se encuentra fijado un dinamómetro, en cuya parte móvil está articulada una pluma que se desplaza sobre un papel milimetrado que avanza a una velocidad constante de 0,25 cm/seg. Entre ambos elementos se fija la cicatriz mediante dos mordazas ancladas, una en el dinamómetro y otra en el motor.

Se consigue así una gráfica en la que en las ordenadas se representa la fuerza expresada en N y en las abscisas el tiempo transcurrido. El instante de la rotura queda registrado por el brusco descenso de la gráfica.

Análisis estadístico

Atendiendo a la distribución no normal de los resultados, las comparaciones realizadas entre las distintas series experimentales se han llevado a cabo utilizando un test no paramétrico:

TABLA 1. Resultados de la medición de la densidad fibroblástica en cada una de las series experimentales

	Línea alba	Cicatriz	CsA	Excipiente
1	19,70	16,80	7,90	16,20
2	24,70	13,15	7,60	16,90
3	27,30	10,10	5,70	16,50
4	19,00	16,30	6,10	16,30
5	32,70	9,30	16,10	16,20
6	32,20	13,30	11,20	16,70
7	31,00	13,20	9,30	16,90
\bar{X}	26,66	13,16	9,12	16,53
DE	5,73	2,81	3,59	0,30

TABLA 2. Porcentaje de fibroblastos en fase de síntesis en cada una de las series experimentales

	Línea alba	Cicatriz	CsA	Excipiente
1	2,10	15,46	6,93	2,10
2	18,68	19,61	22,34	18,68
3	5,06	13,98	18,44	23,36
4	4,08	26,51	5,73	24,49
5	27,90	32,30	19,16	24,29
6	7,93	21,60	18,18	17,90
7	6,29	23,14	15,20	30,62
Mediana	6,29	21,60	18,18	24,29
\bar{X}	10,29	21,80	15,14	24,28
DE	9,44	6,33	6,37	5,79

TABLA 3. Medición de la resistencia tensil en los animales control y en los tratados con ciclosporina A

	Control		Ciclosporina A	
	A	B	A	B
1	4,10	2,80	3,10	2,80
2	12,00	12,00	2,90	3,40
3	4,50	5,80	1,00	1,00
4	8,30	6,20	3,30	3,60
5	12,00	10,00	1,50	1,70
6	5,20	8,80	3,60	3,70
\bar{X}	7,642		2,633	
DE	3,325		1,038	

Rank Sum Test. Se han considerado diferencias significativas aquellas con una $p < 0,05$.

Resultados

Los resultados de la cuantificación de la densidad fibroblástica (número de fibroblastos por cada 1.000 UA) se recogen en la tabla 1. Estos mismos resultados se reflejan de forma gráfica en la figura 1.

Como puede apreciarse, la máxima densidad fibroblástica se observa en la línea alba normal. Los animales no tratados con excipiente tienen valores muy próximos entre sí, mientras que la menor densidad celular se encuentra en aquellos animales tratados con CsA. Las diferencias entre las distintas series experimentales alcanzan significación estadística.

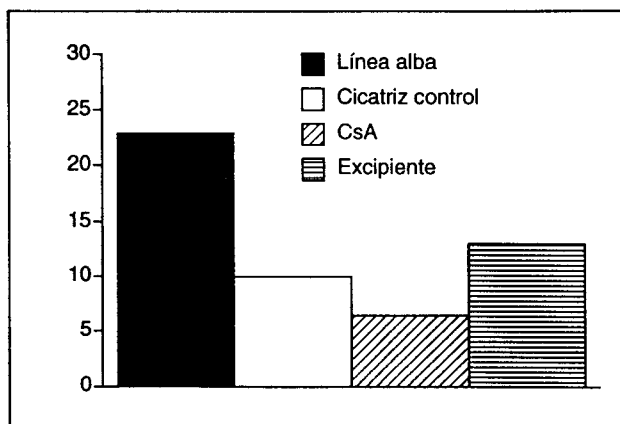


Fig. 1. Densidad fibroblástica en el tejido cicatrizal en el séptimo día de evolución. La pirámide de la izquierda representa el contenido en fibroblastos de la línea alba normal. Se puede observar la menor celularidad del tejido cicatrizal debido al gran desarrollo vascular. Los animales tratados con CsA presentan una importante disminución de su población fibroblástica, disminución que no puede achacarse al excipiente utilizado.

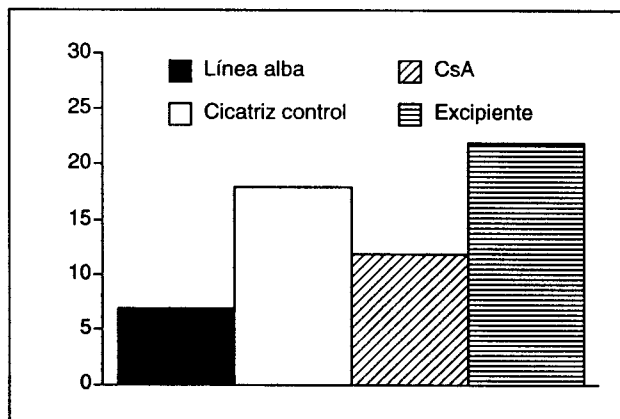


Fig. 2. Porcentaje de fibroblastos en fase de síntesis. La menor tasa reduplicativa corresponde a la línea alba normal. En el tejido cicatrizal (control y tratado con excipiente) se aprecia una mayor actividad de reproducción celular. La administración de CsA ha disminuido el porcentaje de fibroblastos en síntesis.

La tabla 2 muestra los resultados de la actividad de duplicación de los fibroblastos, recogidos de forma gráfica en la figura 2. Como era de esperar, la línea alba normal muestra el menor porcentaje de fibroblastos en fase de duplicación. Este parámetro está notablemente aumentado en las cicatrices de los animales no tratados, sin que la administración de excipiente haya producido diferencias significativas.

Por otro lado, el tratamiento con CsA ha producido una disminución significativa del porcentaje de fibroblastos en la fase activa del ciclo celular, hasta el punto de que la diferencia frente a los resultados obtenidos en la línea alba normal no alcanza significación estadística.

Los resultados del análisis tensiométrico realizado en el grupo control y en el grupo de animales tratados con CsA se recogen en la tabla 3 y en la figura 3. Como puede observarse, la resistencia tensil de las cicatrices de los animales tratados con CsA se ha visto reducida a un 34,45 % de los valores normales, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

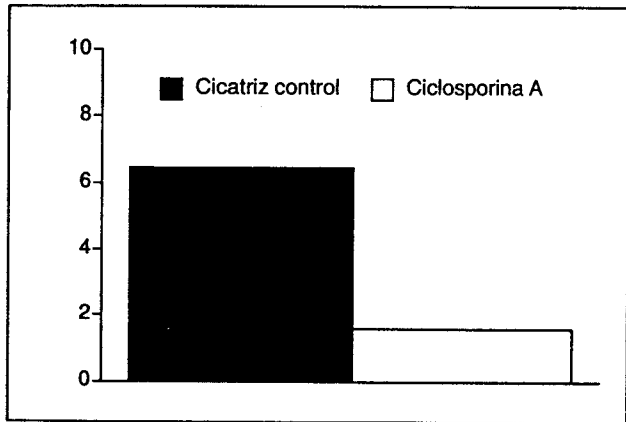


Fig. 3. Resistencia tensil de las cicatrices. En los animales tratados con CsA se puede observar una muy importante reducción de la resistencia tensil frente a los animales no tratados.

Discusión

El primer punto de discusión es, sin duda, la elección del momento evolutivo del proceso en el que hemos realizado nuestro estudio. Aunque algunos autores estudian la cicatrización en fases tempranas (séptimo día)^{16, 20, 22}, la gran mayoría lo retrasa hasta la segunda, tercera o cuarta semana^{15, 21-26}. Dado que el objeto del presente trabajo es precisamente el estudio de los fibroblastos, y ya que estas células predominan en la cicatriz en las fases tempranas de la cicatrización, hemos considerado que las cicatrices obtenidas al séptimo día ofrecerían las mayores facilidades para el estudio de dichas células.

Por otra parte, los diferentes parámetros estudiados (cuantificación del número de fibroblastos, medición del ADN nuclear como índice de replicación de los mismos, y de la resistencia tensil como indicativo de la producción de colágeno) aportan datos objetivos, y permiten estudiar en su conjunto el proceso cicatrizal²⁷.

Según nuestras experiencias, la CsA afecta de forma negativa al proceso de cicatrización, al menos en las etapas iniciales de la misma. El fármaco parece realizar su acción sobre el mismo fibroblasto, como indica la significativa disminución de la densidad fibroblástica y del índice de replicación de dichas células en los animales tratados. Por otra parte, la clara disminución de la resistencia tensil que se observa en las cicatrices tratadas con CsA, pensamos que puede interpretarse como índice indirecto de la disminución de la producción de hidroxiprolina. En diferentes trabajos consultados puede observarse un comportamiento idéntico de ambos parámetros^{21, 23, 25, 26}.

Se plantea inmediatamente la duda de si dicha acción sobre los fibroblastos podría deberse a un efecto directo de la CsA sobre dichas células, o bien desarrollarse a través de su acción inmunosupresora.

Aunque no existen estudios específicos sobre esta cuestión, sí se conoce, desde los primeros estudios experimentales del fármaco, que éste produce una marcada hipertrofia gingival^{28, 29}, hipertrofia que se debe a una clara acción mitogénica sobre los fibroblastos gingivales³⁰. No parece, por tanto, aventurado considerar que la CsA, caso de tener algún efecto directo sobre los fibroblastos, éste sería de carácter positivo más que inhibitorio. Así pues, la acción de la CsA se realizaría a través de sus efectos inmunosupresores.

Es indudable que de nuestro trabajo no puede deducirse el mecanismo de la acción del fármaco sobre los fibroblastos. La CsA tiene importantes acciones sobre los linfocitos T y éstos, a su vez, parecen tener gran influencia en todo el proceso cicatrizal. Así, Barbul et al, al tratar a los animales con una hormona estimuladora del timo que produce una expansión de los linfocitos T supresores, observaron una disminución de la resistencia tensil y del depósito de hidroxiprolina en las heridas²⁶. Al actuar en sentido opuesto, administrando anticuerpos monoclonales antilinfocitos T supresores, los mismos autores observaron el efecto contrario^{23, 25}.

De manera similar, en animales esplenectomizados³¹ y atímicos^{25, 26} se ha observado la misma potenciación de la fibroplasia. En todos estos trabajos se involucra selectivamente a los linfocitos T supresores en la cicatrización. Breslin et al aportaron indicios de la importancia del correcto mantenimiento del cociente Ts/Th en el proceso cicatrizal²⁴. Sería precisamente la alteración de dicho cociente el mecanismo que podría explicar la acción del fármaco, ya que está generalmente admitido que la CsA inhibe la actividad *Helper* de los linfocitos T, sin afectar en gran medida a los linfocitos Ts.

Agradecimiento

A los Laboratorios Sandoz que gentilmente han suministrado la CsA utilizada en este trabajo.

Bibliografía

- Shattil SJ, Bennett JS. Platelets and their membranes in hemostasis; physiology and pathophysiology. *Ann Intern Med* 1981; 94:108-118.
- Browder W, Williams D, Lucore P, Pretus H, Jones E, McNamee R. Effect of enhanced macrophage function on early wound healing. *Surgery* 1988; 104:224-230.
- Fukasawa M, Bryant SM, Dizerega GS. Incorporation of thymidine by fibroblasts: evidence for complex regulation by postsurgical macrophages. *J Surg Res* 1988; 45:460-466.
- Orita H, Campeau JD, Nakamura RM, Dizerega GS. Modulation of fibroblast proliferation and transformation by activated macrophages during postoperative peritoneal reepithelialization. *Am J Obstet* 1986; 155:905-911.
- Fukasawa M, Yanagihara DL, Rodgers KE, Dizerega GS. The mitogenic activity of peritoneal tissue repair cells: Control by Growth Factors. *J Surg Res* 1989; 47:45-51.
- Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblast by Transforming Growth Factor-beta. *J Exp Med* 1987; 165:251-256.
- Duncan MR, Berman B. Gamma-Interferon is the lymphokine and beta-Interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast. *J Exp Med* 1985; 162:516-527.
- Barbul A, Shawe T, Rotter SM, Efron JE, Wasserkrug HL, Badawy SB. Wound healing in nude mice: a study of the regulatory role of lymphocytes in fibroplasia. *Surgery* 1989; 105:764-769.
- Furie M, Fawakami Y, Kawakami T, Katz SI. Differential inhibition of the T cell activation pathway by dexamethasone and cyclosporine. *Transplantation* 1990; 49:560-564.
- Wasik MA, Beller DI. Induction of macrophage membrane interleukin 1 expression by T-cell dependent and T-cell independent pathways is inhibited by cyclosporin A. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 52:331-340.
- Benson A, Ziegler HK. Macrophages as targets for inhibition by cyclosporine. *Transplantation* 1989; 47:696-703.
- Calne RY, White DJG, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC et al. Cyclosporin-A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 1978; 13:1.323-1.326.

13. Van Story-Lewis PE, Tenenbaum HC. Glucocorticoid inhibition of fibroblast contraction of collagen gels. *Biochem Pharmacol* 1986; 35:1.283-1.286.
14. Benson SC, Luvalle PA. Inhibition of lysyl oxidase and prolyl hydroxylase activity in glucocorticoid treated rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; 99:557-561.
15. Goldberg M, Lima O, Morgan E, Ayabe HA, Luk S, Fridman A et al. A comparison between cyclosporin A and methylprednisolone plus azathioprine on bronchial healing following canine lung auto-transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983; 85:821-826.
16. Eisinger DR, Sheil AG. A comparison of the effects of cyclosporin A and standard agents on primary wound healing in the rat. *Surg Gynecol Obstet* 1985; 160:135-138.
17. Kossendrup D, Wiederholt M, Hoffman F. Influence of cyclosporin A, dexamethasone, and benzalkonium chloride (BAK) on corneal epithelial wound healing in the rabbit and Guinea pig eye. *Cornea* 1985; 4:177-181.
18. Behrens-Baumann W, Theuring S, Brewitt H. The effect of topical cyclosporin A on the rabbit cornea. A clinical and electron microscopic study. *Graefes. Arch Clin Exp Ophthalmol* 1986; 224:520-524.
19. Hoffmann F, Wiederholt M, Kossendrup D. Der einfluss von Cyclosporin A, Dexamethason und verschiedenen Knoservierungsmitteln auf die epitheliale Wundheilung der denervierten Meerschweinchenhornhaut. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1986; 189:30-33.
20. Nemlander A, Ahonen J, Wiktorowicz K, Von Wilebrand E, Hekali R et al. Effect of cyclosporine on wound healing. *Transplantation* 1983; 36:1-6.
21. Fishel R, Barbul A, Wasserkrug HL, Penberthy LT, Rettura G, Efron G. Cyclosporine A impairs wound healing in rats. *J Surg Res* 1983; 34:572-575.
22. Recker F, Marquardt K, Redha F, Uhlschmid G, Largaider F. Cyclosporine A impairs wound healing of ureterocystostomy in rats. Scanning electron microscopic examination. *Urol Res* 1989; 17:21-26.
23. Barbul A, Breslin RJ, Woodyard JP, Wasserkrug HL, Efron G. The effect of "in vivo" T Helper and T Suppressor lymphocyte depletion on wound healing. *Ann Surg* 1989; 209:479-483.
24. Breslin RJ, Wasserkrug HL, Efron G, Barbul A. Suppressor cell generation during normal wound healing. *J Surg Res* 1988; 44:321-325.
25. Efron JE, Frankel HL, Lazarou SA, Wasser Krug HL, Barbul A. Wound healing and T-lymphocytes. *J Surg Res* 1990; 48:460-463.
26. Barbul A, Shawe T, Frankel HL, Efron JE, Wasserkrug HL. Inhibition of wound repair by thymic hormones. *Surgery* 1989; 106:373-377.
27. Múgica P, Portugal P, García-Alonso I, Bilbao J, López de Tejada I, Méndez J. Metodología para el estudio de las primeras fases del proceso de cicatrización. *Cir Esp* 1992; 52:281-285.
28. Blair JT, Thompson AW, Wahiting PH, Davidson RJL, Sympton JG. Toxicity of the immunosuppressant cyclosporin A in the rat. *J Pathol* 1982; 138:163-178.
29. Ota B, Bradley M. Side effects of cyclosporin in 100 renal allograft recipients. *Transplant Proc* 1983; 15:3.150-3.155.
30. Bartold PM. Regulation of human gingival fibroblast growth and synthetic activity by cyclosporine-A in vitro. *J Periodont Res* 1989; 24:314-321.
31. Werbin N. The spleen and wound healing. *Eur Surg Res* 1983; 15:73-78.

Fe de errores

En el número 3, correspondiente a Marzo de 1993, de CIRUGÍA ESPAÑOLA, en la pág. 233, "Sesión plenaria de comunicaciones y pósters seleccionados", en el póster 37 bis titulado "Gastroplastia vertical antiobesidad..." existe el siguiente error: donde dice *Hospital Universitario de Valdecilla, Santander*, debiera decir *Servicio de Cirugía General B, Hospital Clínico Universitario, Zaragoza*.