



**Universidad Internacional del Ecuador**

**Facultad de Medicina**

**Especialización en Cirugía Pediátrica**

**Tesis previa a la obtención del Título de:**

**Especialista en Cirugía Pediátrica**

**CORRELACIÓN DE LOS HALLAZGOS DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y  
LA SOBREVIDA EN LOS PACIENTES CON ATRESIA DE VIAS BILIARES  
EN LOS ÚLTIMOS DIEZ AÑOS**

Autor: Md. Jenny Elizabeth Arboleda Bustán

Director de Tesis: Dr. Paúl Esteban Astudillo Neira

Director Metodológico: Dr. Phd. Freud Cáceres Aucatoma

ABRIL DEL 2016

## UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DEL ECUADOR

## DECLARACION Y AUTORIZACION

YO, Jenny Elizabeth Arboleda Bustan con CI No.0704541051

Autor del trabajo de graduación intitulado: CORRELACIÓN DE LOS HALLAZGOS DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y LA SOBREVIVENCIA EN LOS PACIENTES CON ATRESIA DE VIAS BILIARES EN LOS ÚLTIMOS DIEZ AÑOS, previo a la obtención del título profesional de ESPECIALISTA EN CIRUGÍA PEDIÁTRICA EN LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA SALUD Y LA VIDA DE LA UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DEL ECUADOR:

1. Declaramos tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Universidad Internacional del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión Pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizamos a la Universidad Internacional del Ecuador a difundir a través del sitio web de la biblioteca de la UIDE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

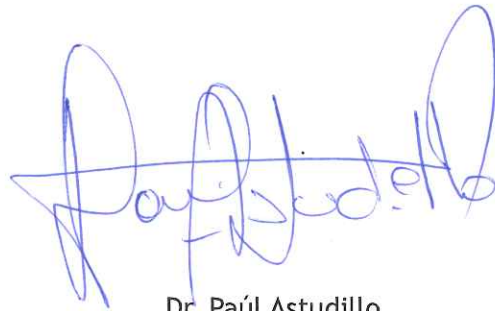
Quito abril 12, 2016



Md. Jenny Arboleda

CI: 0704541051

Doctor Paúl Astudillo Neira en calidad de Director del Posgrado de Cirugía Pediátrica de la UIDE certifica que el trabajo de Investigación CORRELACIÓN DE LOS HALLAZGOS DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y LA SOBREVIVENCIA EN LOS PACIENTES CON ATRESIA DE VIAS BILIARES EN LOS ÚLTIMOS DIEZ AÑOS ha sido realizado por la Médico Jenny Arboleda como trabajo de graduación, requisito previo para la obtención de su título profesional de Cirugía Pediátrica otorgado por la Facultad de Medicina de la Universidad Internacional del Ecuador.



Dr. Paúl Astudillo

CI: 0101384352

Director del Posgrado de Cirugía

## **Dedicatoria**

A Dios por permitirme cumplir mis metas,  
a mi madre que me inculco los valores para luchar por mis sueños,  
A mis profesores ya que de ellos aprendí  
a mis hermanos por apoyarme en mis decisiones,  
a mi familia que siempre me apoya en cada nuevo reto que la vida me pone.

## **Agradecimiento**

Al Doctor Paúl Astudillo Neira, Director del Postgrado de la Universidad Internacional del Ecuador, Médico Tratante del Hospital Metropolitano de la ciudad de Quito; Director de este trabajo de investigación, por sus enseñanzas, y apoyo durante mi formación profesional.

Al Dr. Freud Cáceres, Médico Tratante del Hospital Metropolitano de la ciudad de Quito, Director metodológico por su dedicación e intangible apoyo durante la realización de este trabajo de investigación.

Al Doctor Severino Rey y a la Doctora Sonia Zumárraga por las enseñanzas brindadas para la lectura de las placas de histopatología, por su tiempo y paciencia durante el desarrollo de mi trabajo. Así también al personal de patología de los Hospitales Baca Ortiz y Hospital del Sur, ten especial a Ángeles Pulles ya que sin su dedicación no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

A los Hospitales Baca Ortiz y Metropolitano de la ciudad de Quito por su apertura a la realización de esta investigación.

## Resumen

El presente trabajo de tesis correlaciona los hallazgos de la biopsia hepática y la sobrevida de los pacientes de atresia de vías biliares desde el 2004 hasta el 2014 en los Hospitales Pediátrico Baca Ortiz y Metropolitano de Quito. Es un estudio longitudinal de cohorte, en el que se incluyeron a 11 pacientes pediátricos que cumplieron con los criterios de inclusión. El análisis se realizó utilizando el programa SPSS versión 20. Los resultados obtenidos revelan que el sexo masculino fue el más afectado con histopatología no favorable. El grupo de edad fue de 1 mes hasta 4 meses, el predominio del tipo III de atresia de vías biliares; Se encontró que hay un patrón de atresia de vías biliares como fibrosis, concreciones biliares, y ductulitis que tiene una evolución favorable, Sin embargo sí encuentra además de lo citado células gigantes, degeneración plumosa esto revelaría signos de patrón no favorable. El patrón de biopsia favorable fue mas frecuente en el sexo femenino, con nivel de albumina 3,6g/dl, bilirrubinas 8,2mg/dl mientras que el patrón de biopsia no favorable el sexo masculino fue mas afectado, con niveles promedio de albúmina 2,8g/dl y bilirrubinas 10,2, con p mayor a 0,05 comparando los dos grupos, pero la ALT, AST, GGT tuvieron mas de 2 DS y no hubo relación con los patrones estudiados. Los pacientes sometidos a Kasai tuvieron complicaciones como la colangitis en el 63.8% no relacionándose con el patrón de la biopsia hepática, la sobrevida fue del 63,6%.

Palabras claves: Atresia de vías biliares, sobrevida, fibrosis

## **Abstract**

This thesis correlates pathology anatomy and overlife in patients with biliary atresia during the period from 2004 to 2014 in the Pediatric Hospital Baca Ortiz and Metropolitan Hospital of Quito. This is cohort longitudinal study, That includes 11 pediatrics patients whose cases met the inclusion criterion. The analysis was performed using SPSS version 20. The results show that the masculine sex was the most affected and they have a negative histopathology. The group age was heterogeneous from 1 to 4 months. It was found that there is a pattern of biliary atresia as fibrosis, concretions and ductulitis that have favorable evolution but if giant cells, this indicates a poor prognosis. The favorable histopathological pattern was more frequent in females, level of albumina 3,6g/dl, bilirubin 8,2 mg/dl while the unfavorable pattern males was most affected, with average level of albumina 2,8g/dl with p more 0,05, and bilirubin 10.2, but ALT, AST, GGT had 2 DS and there was no unrelated to the patterns studied. The patients who were exposed to the Kasay procedure had complications as colangitis in the 63,8% not being related to the pattern of liver biopsy, survival was 63,6

Key word: biliary atresia, survival, fibrosis

## Índice

Tesis previa a la obtención del Título de	1
Especialista en Cirugía Pediátrica	1
Autor: Jenny Arboleda Bustán	1
Certificación	I–II
Dedicatoria	III
Agradecimiento	IV
Resumen	V
Abstract	VI
Índice	VII
Lista de Tablas	X
Lista de Figuras	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
I. Introducción	2 – 6
II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 MARCO TEÓRICO	8
2.1.1 Epidemiología	9
2.1.2 Teorías de la atresia de vías biliares	10
2.1.2.1 Injuria inmunológica	10–11
2.1.2.2 Factores genéticos	12
2.2.1 Evaluación clínica	13
2.2.1.1 Factores ambientales	13
2.2.1.2 Déficit de alfa 1 antitripsina	14
2.2.1.3 Colestasis intrahepática progresiva familiar	14



2.3 Exámenes	
2.3.1 Exámenes de laboratorio	15
2.3.2 Exámenes de imagen	15
2.3.3 Histopatología	16–18
2.4 Cirugía	18
2.4.1 Técnica quirúrgica	18
2.4.2 Pronóstico	19
2.4.3 Estudios Experimentales	19–20
Problema de investigación	21
Hipótesis	22
Objetivos	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Diseño metodológico	25
3.1.1. Tipo de estudio	25
3.1.2 Criterios de inclusión y de exclusión	25
3.1.3 Universo y muestra	25–26
3.1.4 Procesamiento de la recolección de la información	27
3.1.5 Plan de análisis de los datos	27
3.1.6 Técnica de análisis	28
IV. RESULTADOS	29–39
4.1. Análisis de impacto	40
4.1.1 Resultados demográficos	41

V. DISCUSIÓN		IX
Discusión	42–45	
VI CONCLUSIONES	47	
Conclusiones	48	
VII. RECOMENDACIONES	49	
Recomendaciones	50	
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51–62	
IX. ANEXOS	63–86	

## Lista de Tablas

Tabla 1: Instrumento de recolección de datos	pág. 64
Tabla 2: Factores etiológicos de la atresia de vías biliares	pág. 70
Tabla 3: Tipos de atresia de vías biliares	pág. 71
Tabla 4: Diferencias histopatológicas entre colestasis y atresia de vías biliares.	pág. 71
Tabla 5: Pruebas de función hepática	pág. 68



## **I. INTRODUCCIÓN**

## I. Introducción

### INTRODUCCIÓN

La atresia de vías biliares es una colangiopatía obstructiva neonatal<sup>1</sup> caracterizada por cambios obstructivos progresivos tanto de la vía intra como extra hepática, que se acompaña de fibrosis y obliteración de estas, lo que puede llevar a la cirrosis hepática e incluso ser fatal en un corto periodo<sup>2</sup>.

La frecuencia de atresia de vías biliares reportada a nivel mundial varía de 1 por cada 9000 a 12000 recién nacidos vivos<sup>1-3-6</sup>, sin embargo, corresponde al 50% de las colestasis neonatal como indicación de trasplante hepático<sup>1</sup>. Un estudio realizado en Japón con 1386 pacientes (en 132 instituciones) en 30 años muestran que su incidencia es de 10.4 en 100.000 nacidos vivos y varía de acuerdo a la ubicación geográfica, en Polinesia se reporta el más alto índice con 32 por 100.000 nacidos vivos. En algunas series se describe del 30 al 40% como causa de colestasis neonatal, seguida por hepatitis neonatal con el 30%; en nuestro país no se registra como atresia de vías biliares ya que solo se cuenta con registros del INEC el mismo que reporta como: otras enfermedades del hígado teniendo un número real de 4635 casos en el 2014. En nuestro país tomando en cuenta los nacidos vivos en el 2014 y los hospitalizados en ese mismo año con esa patología obtenemos una la incidencia del 0,79.

Los fenotipos clínicos asociados a esta patología son: la forma aislada y la asociada a otras malformaciones extra hepáticas. El fenotipo aislado corresponde al 70-80% de los casos<sup>1</sup>, mientras que del 15-30% restante se asocia a otras malformaciones tales como: poliesplenia, anomalías de la vena porta, malrotación, situs inverso y cardiopatía congénita. La etiología y patogenia aún no están absolutamente aclaradas, por lo que se postulan diversas teorías como son las causadas por virus o la predisposición genética que llevan a una lesión del tejido ductal como consecuencia de un

proceso inflamatorio, esclerosante, que posteriormente compromete la vía extra hepática<sup>3</sup>, esto se podría dar por un proceso viral perinatal, inmunológicos o genéticos. Mack y Cols afirman que la infección por virus colangiotropos sería el factor desencadenante del daño y la subsecuente obstrucción. Entre los virus más estudiados que se describen están: el reovirus, rotavirus C y el citomegalovirus que actuarían produciendo esta agresión. Además, en ciertos estudios se han presentado antígenos del sistema de histocompatibilidad HLA B12, A95 y B5 como factores asociados<sup>1</sup>. Asimismo estos pacientes presentarían un cierto grado de vulnerabilidad inmunológica que los hacen más susceptibles a la progresión descrita. La biopsia hepática permite confirmar el diagnóstico en un 97-98% de los casos, por lo que debemos conocer la anatomía normal de la unidad funcional.

### **Hígado normal**

La unidad del hígado es el lobulillo hepático clásico de Kiernan, estructura hexagonal; en cada ángulo se encuentran los espacios porta y en la porción central la vena o vénula centro-lobulillar (llamada también vénula hepática terminal o vénula aferente). La unidad funcional se conoce con el nombre de Acino de Rappaport basada en la circulación y de acuerdo a ello, el centro del lobulillo es el espacio portal y los límites periféricos se localizan entre dos venas centrales vecinas. El Acino de Rappaport se ha dividido entre zonas, la zona 1 es la más próxima al espacio porta; la zona 2 es la porción intermedia; la zona 3 es la que rodea la vena central (Gráfico 1).

El espacio porta contiene conductos biliares, rama de la vena porta y de la arteria hepática, linfáticos y filetes nerviosos. Estos elementos se encuentran inmersos en un estroma de tejido fibroso laxo y normalmente hay escasos linfocitos y macrófagos. El parénquima hepático está constituido por láminas de hepatocitos dispuestas en hileras (dos en hileras en menores de 8 años). Los sinusoides confluyen en la vena centro lobulillar su diámetro varia de 6-15 micras y su calibre puede aumentar hasta 30 veces. Los sinusoides carecen de membrana basal. El espacio de Disse se

encuentra entre los hepatocitos y la pared sinusoidal que se comunican con las lámina del hepatocitos y la periferia del lobulillo, este el asiento del tejido fibroso portal. En padecimientos crónicos puede depositarse una membrana en el espacio de Disse que se conoce como “capilarización” y es capaz de causar hipertensión portal. El sinusoide está revestido por células endoteliales con numerosas fenestraciones que comunican la luz vascular con el espacio de Disse y las células hepáticas. Las células de Kupffer son células fagocíticas que se encuentran en la luz del sinusoide.

### **Guía diagnóstica**

El examen del hígado a poco aumento permite establecer el número de lobulillos que contiene la biopsia. Primero hay que contar el número de espacios porta completos y evaluar si se mantiene o no la arquitectura lobulillar. En general, se acepta que una buena biopsia debe tener al menos 5 espacios porta pero cuando es un proceso crónico se considera que debe tener entre 11-15 espacios porta para determinar fehacientemente el diagnóstico. Los conductos biliares son del tamaño de la arteria hepática y, se sitúan en el centro, cuando proliferan están en esta unión con las láminas hepáticas, hay que ver la pared y la luz para buscar concreciones de bilis.

Proliferación ductular: los colangios son las estructuras que unen los conductos biliares con los canalículos. La proliferación ductular se presenta en casos de colestasis. La evaluación de la fibrosis en el espacio porta es importante en esta patología. Los hallazgos más típicos de la atresia de vías biliares son la proliferación de los conductos biliares, fibrosis portal, estasis biliar canalicular y transformación gigantocelular, esta es menos intensa que en la hepatitis neonatal. En los casos precoces, es posible observar escasos conductos biliares en vez de proliferación, por lo que ante la sospecha clínica se recomienda hacer biopsias seriadas. Se reconocen dos tipos de atresia de vías biliares



- a) El embrionario o congénito con colestasis presente al nacer, que representa el 15% de los casos, caracterizados por su asociación a otras anomalías: extra hepática (poliesplenía, situs inverso, vena porta preduodenal, malrotación intestinal, cardiopatía congénita).
- b) El clásico postnatal o adquirido, en que la ictericia y acolia se manifiesta luego de las primeras dos semanas de vida y no hay malformaciones asociadas. Es posible que en la base de la forma embrionaria estén implicados factores genéticos, o factores ambientales, los casos familiares no son frecuentes.

La cantidad de conductos biliares en espacios porta periféricos varía con la edad gestacional. En niños prematuros menores de 38 semanas solamente el 40% de los conductos lobulillares se han desarrollado, el recién nacido a término tiene todos los conductos lobulillares por lo que la relación CB/EP es menor a 1 (0.9 para la mayoría de los autores).

Se debe recordar que la proliferación ductal puede ser tardía en algunos pacientes, ni el hallazgo de los conductos biliares normales ni la ductopenia excluyen el diagnóstico de atresia de vía biliares. La biopsia muestra un patrón de colestasis que es característico. Se observa proliferación de los conductos biliares, colestasis ductular y a nivel del espacio portal fibrosis con extensión fibrosa peri-portal. Datos recientes sugieren que las formas que se presentan más tempranamente (menos de 30 días) tienen peor pronóstico<sup>4</sup> ya que son las formas que se iniciaron en la etapa embrionaria. Al comienzo, antes de la cuarta semana de vida, es posible que la única alteración histológica encontrada sea la colestasis hepatocítica y canalicular. Alrededor de la cuarta semana, la proliferación de conductos biliares ya es prominente. Las alteraciones lobulillares son menos acentuadas aunque pueden verse elementos lobulillares de hepatitis con transformación gigantocelular en el 15% de los casos, hay diferencias entre la hepatitis neonatal y la atresia de vía biliares (tabla 4).

Luego de la cirugía de derivación, del 40-60% de los pacientes tienen uno o más episodios de colangitis; estos pacientes con historia de colangitis tienen más oportunidad de desarrollar cirrosis; a pesar de una oportuna derivación bilio-digestiva muchos pacientes requieren un trasplante hepático.

La ductopenia es la reducción del número de conductos biliares intrahepáticos de tipo interlobulillar en presencia del árbol biliar extrahepático permeable; para determinar la ductopenia hay un índice de calculo que es el CB/EP, que debe ser de 0,9 a 1,8. Se define la ductopenia cuando es inferior a 0,5, y se requieren de 10 a 20 espacios para calcular este índice; se puede presentar en una forma sindrómica y otra no sindrómica; la forma clínica de la sindrómica es el Síndrome de Alagille y la no sindrómica constituye un grupo heterogéneo de enfermedades. La atresia de vías biliares en su evolución va a producir ductopenia en raros casos estas alteraciones pueden encontrarse en la primera biopsia<sup>5-29</sup>.

El tratamiento de elección es la hepatoenterostomía, mediante la técnica de Kasai, esta permite restablecer el flujo biliar en el caso de que existan aun canalículos intrahepáticos y prevenir el desarrollo de la cirrosis y posterior disfunción hepática. La principal complicación asociada a la corrección quirúrgica son los cuadros de colangitis que pueden empeorar la disfunción hepática basal. Hay estudios que demuestran la sobrevida de los pacientes sin trasplante hepático; como el realizado por Lykavieris et al, que reportó una sobrevida del 23% de 271 pacientes, pero presentan dentro de su evolución el síndrome colestásico e hipertensión portal esperados.<sup>6-19</sup> Los casos reportados de carcinoma hepático han ido aumentando en las series que realizan seguimientos de estos pacientes<sup>7-8-28</sup>. En las series con supervivencia larga y seguimiento continuado se demuestra el riesgo de carcinoma hepático<sup>7,8,28</sup>.

## **II REVISION BIBLIOGRAFICA**

## **2.1 MARCO TEÓRICO**

### 2.1.1 Epidemiología

### 2.1.2 Teorías de la atresia de vías biliares

#### 2.1.2.1 Injuria inmunológica

#### 2.1.2.2 Factores genéticos

### 2.2.1 Evaluación clínica

#### 2.2.1.1 Factores ambientales

#### 2.2.1.2 Déficit de alfa 1 antitripsina

#### 2.2.1.3 Colestasis intrahepática progresiva familiar

### 2.3 Exámenes

#### 2.3.1 Exámenes de laboratorio

#### 2.3.2 Exámenes de imagen

#### 2.3.3 Histopatología

### 2.4 Cirugía

#### 2.4.1 Técnica quirúrgica

#### 2.4.2 Pronóstico

#### 2.4.3 Estudios Experimentales

### **2.1.1.1 Epidemiología**

La atresia de vías biliares es una colangiopatía obliterante progresiva de etiología no conocida que afecta a 1 en 15,000 niños o 32 en 100.000 dependiendo de la raza del paciente los más afectados corresponden a la población asiática; en Reino Unido 1 cada 15.000, en Estados Unidos 1 en 14.000<sup>8</sup>. La mayoría de estos niños tienen peso normal al nacer presentando ictericia, coluria, acolia, signos que nos llevan a un diagnóstico temprano y a la cirugía correctiva. La etiología sindrómica (asplenia, atresia de vías biliares BAMS) o la no sindrómica que afecta al 80–90 % de la población que a la vez tiene otra sub-etología tipo fetal, dilatación quística del remanente de la vía biliar. Los tipos de atresia de vías biliares reportadas por Davenport publicadas en el 2005 son: Tipo I que se presenta en el –5% de los casos, el tipo II que se presenta menos del 2% de los casos y el tipo III representando más del 90% de los casos (tabla 3). Esta patología puede evolucionar favorablemente con la cirugía descrita por Kasai, pero en otros casos a pesar de llevar el tratamiento adecuado requieren trasplante hepático, según reporta la literatura puede darse hasta en el 70% de los casos.

#### **Etiología**

La atresia de vías biliares es el resultado del daño de la vía biliar intrauterino dado por una severa colestasis en el periodo neonatal. Varias partes del sistema biliar intra-hepático son afectadas por una falla en el desarrollo normal de esta estructura<sup>11, 12</sup>. Esta se puede presentar de 3 formas:

1.– La forma embrionaria (BAMS) coexiste con múltiples malformaciones, lo que sugiere que el daño se desarrolla en la fase primaria del desarrollo fetal; sin embargo hoy en día se postulan múltiples causas (tabla 2, gráfico 2), como poliesplenia o asplenia, desórdenes viscerales (situs inversus, malrotación intestinal), malformaciones vasculares intrabdominales (ausencia de la vena cava inferior, vena porta pre-duodenal) y anomalías cardíacas, generalmente estos pacientes son

niñas de madres con patología preexistente como diabetes, tirotoxicosis que afectaría el ambiente materno–fetal.

Entre la quinta y sexta semana de gestación, presentando una mutación de los genes Ch2q 11.1 CFC1 como ocurre en el 50% de las pacientes en Francia<sup>54,55,56</sup>.

2.– La segunda es la asociada con otros síndromes como maullido de gato (coloboma, atresia rectal), esto se da por una mutación en el gen Ch22<sup>54,55,56</sup>.

3.– Finalmente está la forma no sindrómica, pero esta se asocia a otras malformaciones congénitas como atresia de esófago, atresia yeyunal, atresia rectal; sin embargo, son anomalías que no tienen alteración genética<sup>54,55,56</sup>.

## **2.2.1 Teorías de la etiología de la atresia de vías biliares**

### **Injuria inmunología**

La presencia de infiltrados mononucleares en la vecindad del acino evidencia daño intra–hepático este progresa a un epitelio de regeneración en el acino demostrando el daño celular en varios estudios <sup>17–18</sup>. Los linfocitos T presentan a los antígenos por lo que disparan los mecanismos inmunológicos sustentado esta teoría. Respecto a esto Mack et al <sup>19</sup> identificó el incremento de linfocitos (CD 4 y CD8) y el perfil de citoquinas TH1 (expresadas por la interleucinas 2, interferón, factor de necrosis tumoral, interleucina 2<sup>12</sup>) lo que comparado con el estudio de otras colestasis neonatales, evidenció que estos cambios son característicos de la atresia de vías <sup>19–20</sup>. Narayanaswamy et al <sup>21</sup> ha revisado el panel inflamatorio para la atresia de vías biliares, el panel inflamatorio (IL 2, 4, 10,18, factor de necrosis tumoral, interferón gama) y el de reacción celular (adhesión intercelular molecular 1) en 21 pacientes con atresia de vías biliares por lo que los autores concluyen que la inflamación de las vías biliares es un proceso no polarizado y muestra una sobre

expresión celular de las moléculas de adhesión en el epitelio biliar y en los vasos que disminuyen luego del procedimiento de Kasai. Adicionalmente los macrófagos, las células de Kupffer, las células asesinas naturales y los mastocitos también son identificados en los infiltrados de la atresia de las vías biliares,<sup>19,22,23</sup>. Shivakumar et al<sup>24</sup>, describe la presencia de células asesinas naturales en la vecindad del conducto intrahepático acompañados de la sobre expresión que desencadena la citotoxicidad. Harada et al<sup>131</sup> sugiere el rol receptor de TLH en la atresia de vías biliares que le lleva a la apoptosis, lo que sugiere que es una respuesta innata. Además del sistema de HLA expresado y demostrado en los aloinjertos en el hígado con atresia de vías biliares<sup>27</sup>. En el 2004, Suski et al<sup>29</sup>, usando el cromosoma X y Y con hibridación del HLA identificó un alto número de células maternas en el hígado de pacientes con atresia de vías biliares en comparación con los pacientes de hepatitis neonatal. Muraji y Cols<sup>32</sup> en Japón identificaron principalmente a CD8, en la pared celular de los pacientes con atresia de vías biliares, lo que lleva a la hipótesis de "micro química–materna" y la posibilidad de que exista aloinmunidad injerto contra el huésped.

### **Infección viral**

El reporte de la variación estacional<sup>34</sup>, y casos reportados en estudios experimentales evidencian que los virus inducen a la atresia de vías biliares tanto en animales<sup>35, 36</sup>, como en el caso de humanos<sup>5, 37, 38</sup>. El posible rol de los numerosos virus han llevado a la investigación de los virus hepatotróficos (virus de la hepatitis B), citomegalovirus, herpes, papilomavirus, grupo C rotavirus, y reovirus<sup>43</sup>. El mayor interés por el reovirus es porque la inoculación intraperitoneal en ratas recién nacidas induce al desarrollo de fibrosis, mientras que con el rotavirus induce a la inflamación extrahepática y daño ductular intrahepático lo que lo hace similar a la atresia biliar en humanos. El reovirus fue detectado en los remanentes de la atresia de vías biliares en roedores con pruebas inmohistoquímicas muy similar a la reacciones en humanos<sup>43</sup>.

## **Factores genéticos**

Uno de los genes identificados en la minoría de los casos de atresia de vías biliares es el CFC1 que codifica la proteína CRYPTIC, mientras que los defectos intrauterinos con el síndrome Alagille la mutación está en el gen Jagged 1 (JAG1).

Un estudio comparativo reportó la mutación JAG1 en 6 de 28 pacientes con atresia de vías biliares (21,4%) de los que requieren trasplante hepático temprano después del procedimiento de Kasai (después de 5 años) en comparación con 4 de 72 pacientes (4,1%) que no se había sometido a un trasplante de hígado. Este gen suprime la inmunoregulación de la interleucina 8. La mutación en el cromosoma 4 causa anomalías en el desarrollo del sistema hepatobiliar en ratones<sup>57,58</sup>, pero no está confirmado en humanos, los alelos HLA y el gen VEGF y los polimorfismos pueden asociarse con atresia de vías biliares, aunque hay evidencia de la contribución de varias anomalías genéticas en la patogénesis de la atresia de vías biliares, su papel exacto está todavía bajo investigación.

## **Anormalidades vasculares**

La hipótesis de la trombosis de la arteria hepática en la vida fetal que lleva a la atresia de vías biliares fue postulada por Pickett y Briggs<sup>65</sup>, quienes realizaron estudios experimentales para probar su teoría. Ho y colaboradores confirman dicha teoría reportando la presencia de restos de la arteria hepática en las muestras estudiadas de 11 pacientes, evidenciando una pared arterial hipertrófica, lo que llevaría a sustentar la teoría de la atresia de vías biliares por el proceso de anomalías vasculares.



## **Factores ambientales**

Numerosos insultos exógenos pueden ser postulados para la patogénesis de la atresia de las vías biliares incluyendo uso de drogas durante la gestación (anfetaminas, alcohol), fitoxinas, micotoxinas, toxinas de productos agrícolas y toxinas industriales.

## **Evolución clínica**

La colestasis y la hiperbilirrubinemia en el periodo neonatal ameritan investigación clínica, de laboratorio e imagen que establezcan la causa de la patología para prevenir el daño hepático.

## **Presentación clínica**

El primer paso es reconocer los signos y síntomas como: ictericia, coluria, acolia, hepatomegalia, en el caso de BAMS las anomalías cardíacas.

## **Diagnóstico diferencial**

### **El síndrome de Alagille**

Representa un 10–15% de los casos de colestasis neonatales. Se caracteriza por la asociación de cinco criterios mayores: facies peculiar (frente abombada, mentón pequeño y puntiagudo, hipertelorismo), embriotaxon posterior, anomalías vertebrales del tipo “vértebras en alas de mariposa“, estenosis periférica de las ramas pulmonares de la arteria pulmonar y colestasis crónica debida a escasez de vías biliares interlobulillares. El diagnóstico se basa en la asociación de al menos tres de los cinco criterios.

La escasez de vías biliares se define como la ausencia de vías biliar visible en más del 50% de los espacios porta en una biopsia hepática que contenga al menos diez espacios porta completos presentes.

La evolución hacia la cirrosis no es constante y puede aparecer desde la adolescencia. Puede estar indicado un trasplante hepático más precoz en caso de ictericia persistente desde el nacimiento

asociado a xantomas y a prurito grave. La mutación genética es del gen Jagged 1 situado en el cromosoma 20, este gen codifica una proteína que une un receptor transmembrana (Notch), implicado en la diferenciación celular en las etapas precoces del desarrollo. Se dispone de un diagnóstico prenatal molecular, pero en dos tercios de los casos las mutaciones son esporádicas.

### **Déficit de alfa –1 antitripsina**

Esta enfermedad representa sólo un 5–10% de los casos de colestasis neonatal. Se transmite de forma autonómica recesiva. Es el único fenotipo que se asocia a enfermedad hepática. En Francia, la frecuencia de homocigotos ZZ se estima en un caso de cada 10.000 nacimientos. Tan sólo un 15–20% de los niños ZZ presentarán colestasis neonatal, y cerca de un 30% de ellos desarrollará una cirrosis que indicará el trasplante hepático. El diagnóstico suele sugerir la ausencia de pico de globulinas alfa–1 en la electroforesis de proteínas plasmáticas y se confirma mediante la cuantificación de alfa–1 antitripsina y el estudio fenotipo y genotípico. El gen se sitúa en el cromosoma 14 y tiene la sustitución del ácido glutámico–lisina en la posición 342 de la secuencia de los aminoácidos.

### **Colestasis intrahepáticas progresivas familiares (PFIC1–3)**

Las enfermedades hepáticas agrupadas bajo este nombre corresponden a un grupo heterogéneo de entidades, inicialmente denominadas enfermedad de Byler, que representa un 10% de los casos de colestasis neonatal y que hace poco han sido separadas. Se trata de una colestasis de transmisión autosómica recesiva, de origen hepatocelular y que generalmente evoluciona hacia la insuficiencia hepatocelular en la adolescencia. En los dos primeros tipos (PFC1,PFC2), la colestasis se caracteriza por un inicio a menudo neonatal, prurito intenso, y GGT siempre normal. La PFC1 se debe a una mutación en el gen F1C1, situado en el cromosoma 18 y cuya función no se conoce bien. La PFIC2 se debe a una mutación en el gen BSEP, situado en el cromosoma 2, que codifica al

transportador canicular implicado en la secreción de ácidos biliares<sup>132</sup>. El PFIC3 hay una mutación en el cromosoma 7, que se presenta: inicio tardío con hipertensión portal y la insuficiencia hepatocelular más tardía, si GGT elevada, proliferación ductal pese a que las vías biliares son normales. El tratamiento para estos pacientes es el trasplante hepático, pero pueden beneficiarse del ácido ursodesoxicólico o una derivación biliar externa.

### **Pruebas de laboratorio**

Los exámenes de laboratorio van encaminados a vigilar la función hepática, búsqueda de lesión hepática y función metabólica, estos pacientes muestran hiperbilirrubinemia y elevación de las transaminasas, glutamiltranspeptidasa, fosfatasa alcalina, pueden estar elevado por otras causas de colestasis, mientras que glutamiltranspeptidasa es más específica para la atresia de vías biliares, un análisis temprano puede excluir el diagnóstico de galactosemia, hepatitis viral, hipotiroidismo y quiste de colédoco. El estudio de la función hepática como la albúmina y los tiempos puede dar el grado del insulto hepático (tabla 5). La historia materna y familiar puede hacer pensar en otros síndromes como síndrome de Alagille o fibrosis quística.

### **Estudios de imagen**

Los estudios de imagen se utilizan para realizar el diagnóstico diferencial, se puede empezar con la ecografía en la que se puede evidenciar, masa, quiste de colédoco, dilataciones, anomalías vasculares, poliesplenía y signos de hipertensión portal. El signo clásico de la atresia de vías biliares es el cordón triangular en la vecindad de la vena porta pero puede tener una sensibilidad (85%) y especificidad (100%) (gráfico 4), en el caso que se detecte una dilataciones en el periodo intrauterino se debe seguir en el periodo post-natal <sup>72</sup>. La Gammagrafía (DISIDA) con preparaciones previa de 5 a 7 días con fenobarbital tiene una sensibilidad del 82% y especificidad del 91%. La resonancia magnética (colangiopancreatografía) lleva al diagnóstico del 71 al 82%, pero el Gold estándar es el colangiograma transoperatorio con la biopsia hepática.

## Patrones histopatológicos

En colestasis neonatal se puede establecer por biopsia con trucut el 93 al 94% de los casos según algunas series <sup>74, 75</sup>. La histología con tinciones como la hematoxilina, eosina, tricromico. El estudio realizado por Daenport en Londres 2003, utiliza la siguiente escala para valorar los grados de fibrosis:

0 = no fibrosis

1= No fibrosis en el espacio porta

2= No puentes de fibrosis porto–septales

3= Puentes de fibrosis porto septales

4= Cirrosis

En un estudio reciente realizado por el centro de investigación de atresia de vías biliares (BARC) en el que 16 parámetros histopatológicos fueron evaluados por 10 patólogos, pudieron distinguir dos patrones histopatológicos usando un análisis de regresión logística describen a la atresia de vías biliares como patrón obstructivo:

1 Patrón favorable: grados de fibrosis I y II, menor grado de proliferación ductal, concreciones biliares.

2 Patrón no favorable: presenta mayor grado de fibrosis III y IV además mayor reacción ductular, presencia de células gigantes.

La fibrosis es la base para el diagnóstico de atresia de vías biliares ya que es progresivo una biopsia en el segundo mes de vida la muestra fibrosis avanza y la reacción ductular e inflamación leve, mostrando un patrón obstructivo, el grado de edema periductal se expande al tracto portal, la mucosa biliar expresa múltiples receptores intra–celulares (IRAK–1), lo que le lleva la inmunidad intra biliar en los que juegan un papel importante moléculas pro–inflamatorias como IL–6, FNT– $\delta$ , IL–8, CX3CL1 y CCL2 que pueden persistir en la inflamación periductal.

La presentación de la injuria biliar extra-hepática es la causa de todas las manifestaciones clínicas, el daño y destrucción de los conductos extra-hepáticos ocurre después de las manifestaciones clínicas y es un importante factor que lleva a la falla hepática<sup>12, 69, 82</sup>. Sin embargo hay pocos estudios que identifiquen en forma temprana los linfocitos intra-epiteliales como signo de daño epitelial, alargamiento del nucléolo, pérdida del citoplasma, destrucción de los conductos esto se ha reportado en el 31 al 94% de los casos estudiados<sup>77, 87, 88</sup> con la pérdida de los conductos biliares en aproximadamente 8% de los casos demostrada en la biopsia inicial.

La IGG4 es un anticuerpo monoclonal que reacciona con los procesos inflamatorios.

La malformación de la placa del conducto (DPM) la lesión es atípica en los casos de atresia de vías biliares que desarrolla una fibrosis circular que le da el aspecto nodular como la enfermedad fibropoliquística del hígado esto se ve en el 10 al 48,8% de los pacientes con atresia de vías biliares, con pobres resultados<sup>88, 90</sup>. La asociación de atresia de vías biliares y BAMS (forma embrionaria), representan un pobre pronóstico luego de la cirugía de Kasai<sup>90,94</sup>.

En la inflamación los linfocitos se presentan en el tracto biliar, otras células inflamatorias incluyen los eosinófilos, células plasmáticas y macrófagos, es más frecuente en los pacientes con BAMS (forma embrionaria).

Dentro del diagnóstico diferencial al momento de ver las placas se debe tomar en cuenta la hematopoyesis extramedular puede ser confundida con otras colestasis neonatales que tienen situaciones específicas como: la transformación a células gigantes, reacción ductular, tapones biliares fuera del conducto biliar, fibrosis en la base portal, edema portal, ausencia de fibrosis sinusoidal, mientras que la atresia de vías biliares tiene las características como: proliferación ductular, agrandamiento del espacio porta, concreciones biliares, estasis biliar en los canalículos y escasa afectación lobulillar que se contrasta con la hematopoyesis extramedular. La transformación de células gigantes obligan a buscar otras causas de colestasis neonatal (Tabla 4).

Zerbini publicó que la biopsia hepática tiene una sensibilidad del 100% y especificidad del 76%, en niños de más de 6 a 9 semanas el diagnóstico de atresia de vías biliares puede hacerse con seguridad en el 80 – 90% de los casos<sup>136</sup>. El diagnóstico es más difícil en los menores de 6 semanas ya que no ha habido suficiente tiempo para que los cambios histológicos característicos de la atresia biliar (proliferación ductular, agrandamiento del espacio porta, concreciones biliares, estasis biliar en los canalículos y escasa afectación lobulillar) sean manifiestos. En estos pacientes puede ser necesario repetir la biopsia después de algunas semanas para excluir la obstrucción biliar.

En el estudio realizado por Delgado cita que en la AVB, las longitudes máximas de las estructuras biliares de los espacios porta y su número y la menor proliferación están relacionadas directamente con el pronóstico de la enfermedad. También es muy influyente el tipo de atresia de vías biliares según la clasificación anteriormente citada (el tipo tres tiene peor pronóstico)<sup>126</sup>.

### **Técnica quirúrgica**

La técnica fue descrita por Kasai y Suzuki en 1959, el procedimiento de Kasai (portoenterostomía hepática con Y de Roux), consiste en la escisión de todo el árbol biliar extrahepático con transacción de la placa fibrosa portal cerca del hilo del hígado a continuación se restablece el flujo biliar con asa yeyunal con la técnica de Y de Roux: se precede con una incisión en el cuadrante superior derecho, explorando se busca bazo accesorios que los lleva a pensar en BAMS, se procede con la inspección del hígado, identificación de la placa biliar, se realiza la colangiografía transoperatoria, se confirma la atresia se toma la biopsia hepática y se precede a la disección de la placa portal y la anastomosis a la Y de roux a 10 centímetros del ángulo de Treitz, el extremo distal, destinado al cuadrante superior derecho debe ser de 40 a 50 centímetros, se realiza la anastomosis yeyuno–yeyunal y finalmente la anastomosis yeyuno–porta hepática. Esta es la primera oportunidad de tratamiento seguido por el trasplante hepático en el 50 % de los casos, en el primer año de vida los pacientes operados tuvieron múltiples episodios de colangitis. Ohi reportó que un episodio de colangitis se

asocia con la disminución del flujo de bilis<sup>7</sup>. Esta complicación condena a la resección del tejido fibroso portal, se realiza una anastomosis bilio–enterica., para devolver el flujo de bilis, disminuyendo el daño hepático.

La controversia surgida por el uso de la laparoscopia en la técnica de Kasai fue superada ya que en muchos centros del mundo realizan esta técnica vía laparoscópica<sup>120, 122</sup>, muchos estudios prospectivos indican la cirugía desde los 6 a los 24 meses de vida <sup>122</sup> y al transplante lo ven como una técnica complementaria al Kasai <sup>133</sup>.

La colangitis es una complicación importante del Kasai que se presenta entre el 45–60% de los pacientes<sup>128</sup>, más de la mitad de los niños tiene episodios de colangitis en los primeros 6 meses, el 90% en el primer año<sup>128</sup>. En una serie de más de 20 años de seguimiento la sobrevida es del 50%(10), con episodios de colangitis 3 veces cada año. El principal mecanismo para el desarrollo para la colangitis sería por la translocación bacteriana vía linfática 40%, hematogena por el sistema venoso y luminal por la colonización del asa intestinal en la Y de Roux.

### **Pronóstico de sobrevida de los pacientes con atresia de vías biliares**

Según el estudio realizado por Delgado respecto a la sobrevida de los pacientes con atresia de vías biliares, este lo enfoca en tres puntos principales:

- 1.\_ Edad de la cirugía: mayor de 3 meses peor pronóstico de vida
- 2.\_ Histología: reporta que a mayor grado de fibrosis y concreciones biliares tiene peor pronóstico
- 3.\_ La experiencia quirúrgica: del cirujano y del centro quirúrgico, tres estudios dos en Gran Bretaña y uno en Francia han demostrado sin margen de duda que los resultados a corto y largo plazo de los niños con atresia tratados quirúrgicamente se relacionan estrechamente con la experiencia adquirida.

Los factores pronósticos tomados en cuenta en la literatura son la fibrosis y los episodios de colangitis de los pacientes luego de 6 meses del Kasai<sup>3</sup>. La colangitis es una complicación seria,

ocasionalmente hay el cese del drenaje de bilis en el post-operatorio inmediato, así también puede afectar los resultados a largo plazo, un estudio realizado por Lunzmann and Schweizer reporta que el 50% de los pacientes que presentaron episodio de fibrosis presentó cirrosis a los 12,5 años<sup>4</sup>. El uso de los corticoides en estos pacientes mejoró su pronóstico<sup>5</sup>.

### **Estudios experimentales**

Un estudio experimental demuestra que la pentoxifilina disminuye la inflamación y grados de fibrosis en ratas<sup>6</sup>. Los estudios genéticos indican que los colangiocitos y la proliferación de fibrina están relacionados con el N-Ras que lleva al paciente a una inmunidad inapropiada. El p62 es una proteína ubiquitina a cargo de la autofagia esto lleva a la severidad de la enfermedad biliar<sup>9</sup> esta se ha relacionado con el reoviridae ARN (dsARN), que desarrolla fibrosis particularmente en los estadios iniciales, que activa el IFN- $\beta$ 1, que lleva a la apoptosis producida por TRAIL en el 70% , y lleva a la obliteración de los conductos, la autofagia es regulada por TGF- $\beta$ /Smad3<sup>10</sup>.

Los resultados en que los niveles de IGG se elevan en suero, se detecta el virus VP6; en cambio, en rotavirus los niveles no son detectables en suero. La IG A es protectora para el rotavirus en el intestino del animal.

El estudio realizado por By Anil en ratas mide en el suero ácido hialurónico como marcador de un buen pronóstico al igual que la intervención realizada antes de los 3 meses de vida.<sup>11</sup>

El trasplante hepático ofrece a estos pacientes posibilidades de seguir viviendo, el órgano puede ser de donante cadavérico o de donante vivo. Cuando el hígado donado es de adultos se usa la técnica de Split siendo una práctica quirúrgica establecida por Broelsch et al en 1991, logrando la sobrevida hasta el 100%, a largo plazo se describe fibrosis en las biopsias realizadas a estos pacientes 22% en el primer año, 43 % a los 5 años, y el 64% a los 10 años. El marcador inmunohistoquímico CD34 demuestra una neovascularización aumentando la fibrosis portal en



biopsias<sup>125</sup>. Un estudio realizado en Japón con 1386 en 30 años muestra que la edad de la cirugía es el factor pronóstico más importante<sup>136</sup>, la incidencia de la colangitis según este estudio se incrementó luego de que hicieron una modificación a la técnica quirúrgica con una válvula "Suruga II".

### **Problema de la investigación**

¿Existe alguna correlación entre los hallazgos de histopatología en la biopsia hepática y la sobrevida de los pacientes diagnosticados de atresia de vías biliares?

## **Hipótesis**

Existe patrones histopatológicos hallados en la biopsia de hígado vinculados con el pronóstico y la sobrevida de los pacientes con diagnóstico de atresia de vías biliares

## Objetivos

### Objetivo general

Determinar si existe correlación entre los hallazgos de anatomía patológica y la sobrevida de los pacientes diagnosticados con atresia con vías biliares en los Hospitales Pediátrico Baca Ortiz y Hospital Metropolitano en los últimos 10 años.

### Objetivos específicos

- Determinar los factores socio-demográficos relacionados con el paciente (edad, sexo, etnia, lugar de nacimiento)
- Determinar los factores relacionados con el diagnóstico (laboratorio, gammagrafía, colangiografía trans-quirúrgica, determinar patrones en base a los hallazgos de histopatología: grados de fibrosis, inflamación ductular, colestasis, concreciones biliares, transformación gigantocelular) y; así como con el tratamiento quirúrgico si lo hubo.
- Determinar la situación actual del paciente, qué comorbilidades ha desarrollado (hipertensión portal, Colestasis) y, así como respuesta a un cuestionario de calidad de vida.

### **III MATERIALES Y METODOS**

## **3.1 Diseño metodológico**

### **3.1.1 Tipo de estudio**

Estudio longitudinal de una cohorte. (cross Study)

### **3.1.2 Criterios de inclusión y de exclusión**

Los criterios de inclusión para el estudio:

- Niños/as diagnosticados de atresia de vías biliares que sean atendidos en los servicios de cirugía pediátrica de los Hospitales Baca Ortiz y Metropolitano en los últimos 10 años, con biopsia hepática.

**Los criterios de exclusión para el estudio serán:**

- Niños/as que no hayan sido diagnosticados de atresia de vía biliar.
- Otras causas de colestasis

### **3.1.3 Universo y muestra**

El universo constituye los niños/as diagnosticados de atresia de vías biliares en los servicios de cirugía pediátrica de los hospitales Baca Ortiz y Metropolitano, en los últimos 10 años

Se tomará a todos los pacientes con diagnóstico de atresia de vía biliar.

El nivel de confianza: para una seguridad del 95%=1.96

Precisión: 5%

Prevalencia: 1: 10.000 con atresia de vía biliar.<sup>(1)</sup>

$$n = \frac{z^2 \cdot p \cdot q}{d^2} = \frac{(1.96)^2 \cdot 0.18 \cdot (1-0.18)}{(0.05)^2} = 11$$

En los servicios de cirugía pediátrica se vio a pacientes con colestasis en los últimos 10 años, en las dos unidades de salud del estudio.

En base a estos datos se incluirán en el estudio a 19 niños/as con diagnóstico de atresia de vía biliar en los Hospital Baca Ortiz y Metropolitano.

La selección de los hospitales se basó en su ubicación geográfica y la demanda de usuarios. Además, las unidades de salud participantes en el presente estudio, son centros docentes que mantienen convenio vigente con la Universidad Internacional del Ecuador y en la cual la autora ha realizado y aprobado los créditos académicos.

### **3.1.4 Procesamiento de la recolección de la información**

- La recolección de la información se realizará a partir de una base de datos estructurada para recolectar los datos concernientes al diagnóstico, tratamiento y sobrevida de los pacientes con atresia de vías biliares que sean atendidos por el servicio de cirugía pediátrica de los hospitales mencionados. (ANEXO 1)
- Se revisarán los bloques de histopatología de los pacientes con diagnóstico de atresia de vías biliares para cuantificar los cambios con las diferentes tinciones.
- Se contactará con los familiares de los pacientes para determinar su estado actual (cuestionario de calidad de vida)
- La recolección de los datos será realizada enteramente por la autora.

### **3.1.5 Plan de análisis de los datos**

Se han codificado los factores demográficos de los pacientes ( ver tabla operacionalización de las variables). En cuanto al diagnóstico de laboratorio, imagen, patología, tipo de cirugía realizada los códigos a utilizar son: 1= Si, 2= No.

Para la variable escolaridad del cuidador, se consideró la definición establecida en el del VI Censo de Población y V de Vivienda 2010.<sup>(29)</sup> Se definió como nivel de escolaridad al número promedio de años lectivos aprobados por la población mayor de 10 años en instituciones de educación formal en todos los niveles.



### 3.1.6 Técnica de análisis

La base de datos y el análisis se realizarán mediante el Paquete Estadístico SPSS.

El análisis univariado de variables cuantitativas será descrito con medidas de tendencia central (mediana) y dispersión (rangos)

La asociación se realizará con razón de momios de prevalencia (RMP) e intervalo de confianza (IC) 95% y el factor de correlación de Spermán ( $\rho$ ). Se usará la Chi de Mantel y Haenszel. Para la supervivencia se usarán las curvas Kaplan Meyer. Se considerará como resultado significativo una  $p > 0.05$ .

## **IV. RESULTADOS**

## Resultados

### Análisis demográfico

Sexo

	Frecuencia	Porcentaje
<b>Masculino</b>	6	54,5
<b>Femenino</b>	5	45,5
<b>Total</b>	11	100

Tabla 1: El sexo masculino presenta mayor prevalencia.

Lugar de nacimiento:

	Frecuencia	Porcentaje
<b>Pichincha</b>	6	54,5
<b>Imbabura</b>	2	18,2
<b>Cotopaxi</b>	2	18,2
<b>Pastaba</b>	1	9,1
<b>Total</b>	19	100

Tabla 2: La mayoría de los pacientes se encuentran en Pichincha.

## Edad de l a cirugía

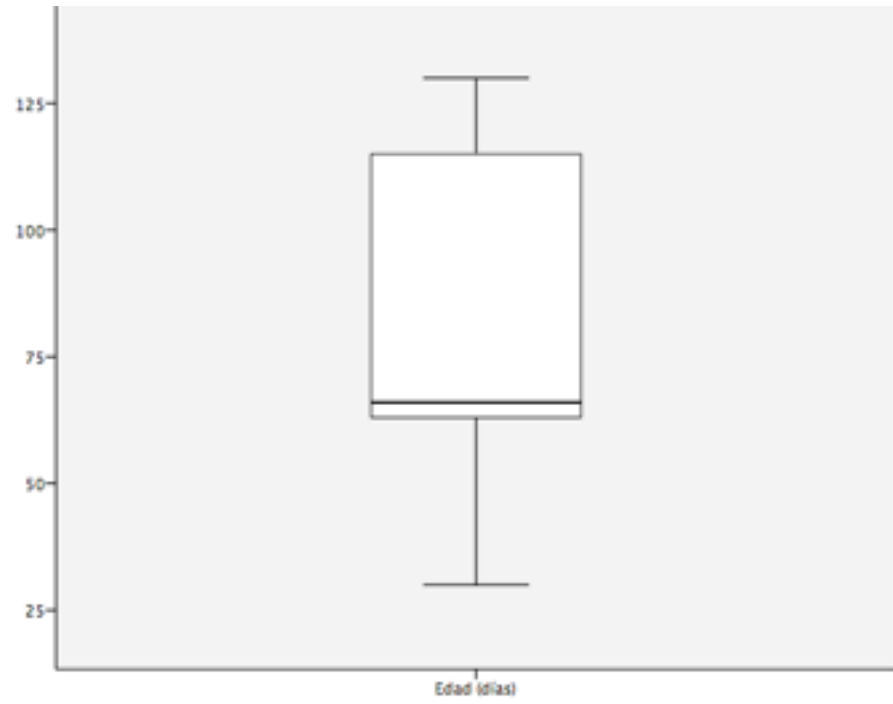


Gráfico 1: muestra la edad de la intervención quirúrgica en la que hay pacientes con un mínimo de 25 días y un máximo de 130 días de vida.

## Exámenes de laboratorio

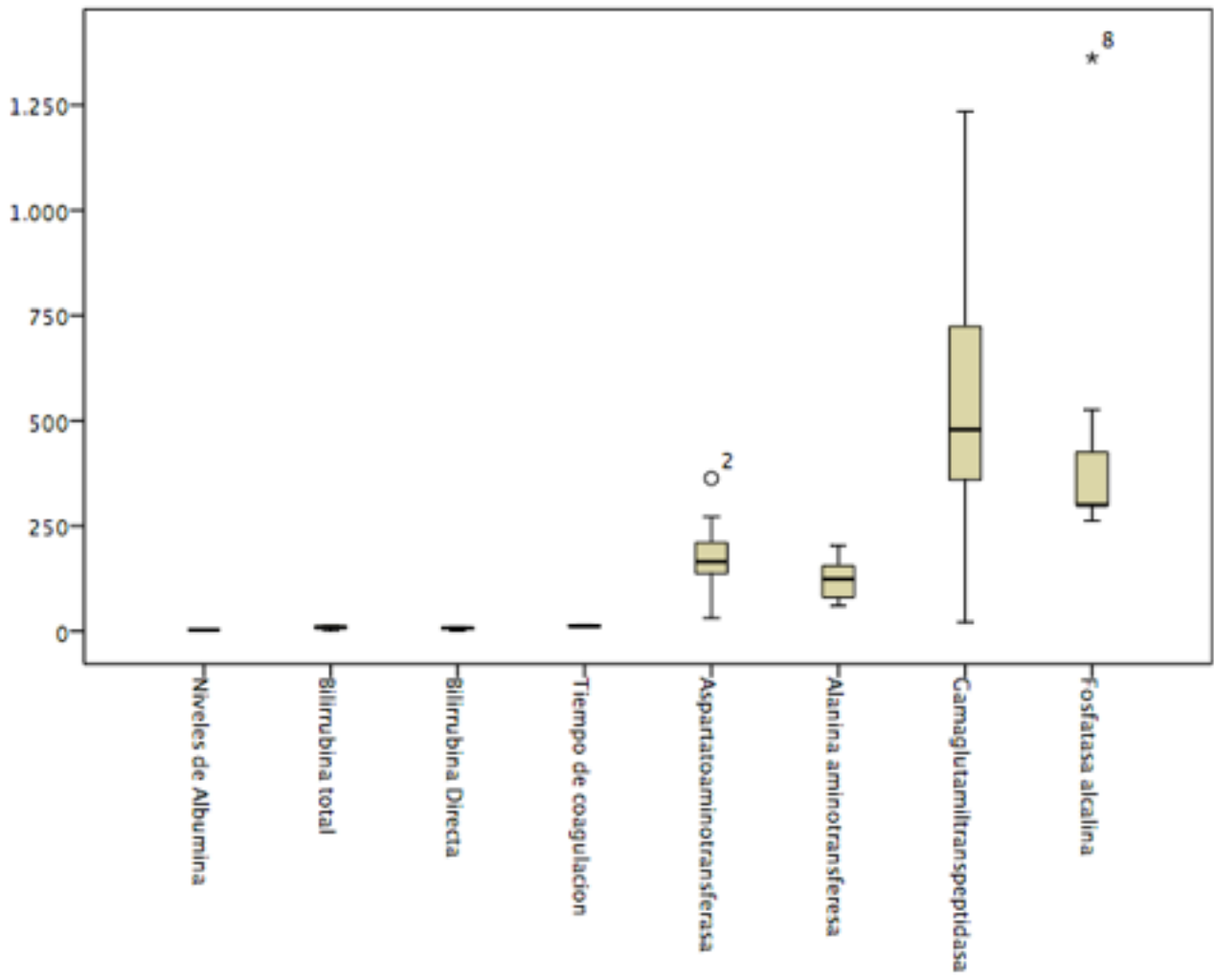


Gráfico 2: Los exámenes de laboratorio tomando en cuenta las funciones hepáticas son: la función excretora: las bilirrubinas estuvieron en rangos de mayores 9,5 mg/dl. La función sintética la albúmina tuvo rangos desde 1,7 hasta 4, el tiempo de protrombina fue de 11– 13. La función Integridad hepática el AST, ALT > DS, GGT elevaciones de > 1000, FA se elevó también.

## Estudios de Imagen

## Gabinete

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	Ecografía	3	27,3
	Eco + gammagrafía	8	72,7
	Total	11	100,0

A la mayoría se le hicieron ecografía y gammagrafía.

## Comparación de los datos

BIOPSIA HEPATICA	LABORATORIO		
A) Favorable	FUNCION EXCRETORA	BILIRRUBINAS	menor 9,5
		ALBUMINA	> 2,7
	SINTETICA	TP	Indiferente
		GGT	Indiferente
		AST	Indiferente
	INTEGRIDAD	ALT	Indiferente
		FA	Indiferente
B) No favorable	FUNCION EXCRETORA	BILIRRUBINAS	> 9,5
		ALBUMINA	menor 2,7
	SINTETICA	TP	Indiferente
		GGT	Indiferente
		AST	Indiferente
	INTEGRIDAD	ALT	Indiferente
		FA	Indiferente

Tomando en cuenta los patrones de la biopsia hepática en los pacientes con atresia de vías biliares, se encontró que para el patrón favorable tenemos un promedio de albúmina mayor a 2,7 g/dl y bilirrubinas menor de 9,5mg/dl, mientras que en el no favorable la bilirrubina es mas alta y la albúmina mas baja, con una  $p= 0,27$  para las bilirrubinas y una  $p= 0,19$  para la albúmina.

Relación entre en patrón de la biopsia hepática y los datos de los pacientes

BIOPSIA HEPATICA	LABORATORIO		
A) Favorable	FUNCION EXCRETORA	BILIRRUBINAS	menor 9,5
	SINETICA	ALBUMINA	> 2,7
		TP	Indiferente
	INTEGRIDAD	GGT	Indiferente
		AST	Indiferente
		ALT	Indiferente
		FA	Indiferente
B) No favorable	FUNCION EXCRETORA	BILIRRUBINAS	> 9,5
	SINETICA	ALBUMINA	menor 2,7
		TP	Indiferente
	INTEGRIDAD	GGT	Indiferente
		AST	Indiferente
		ALT	Indiferente
		FA	Indiferente

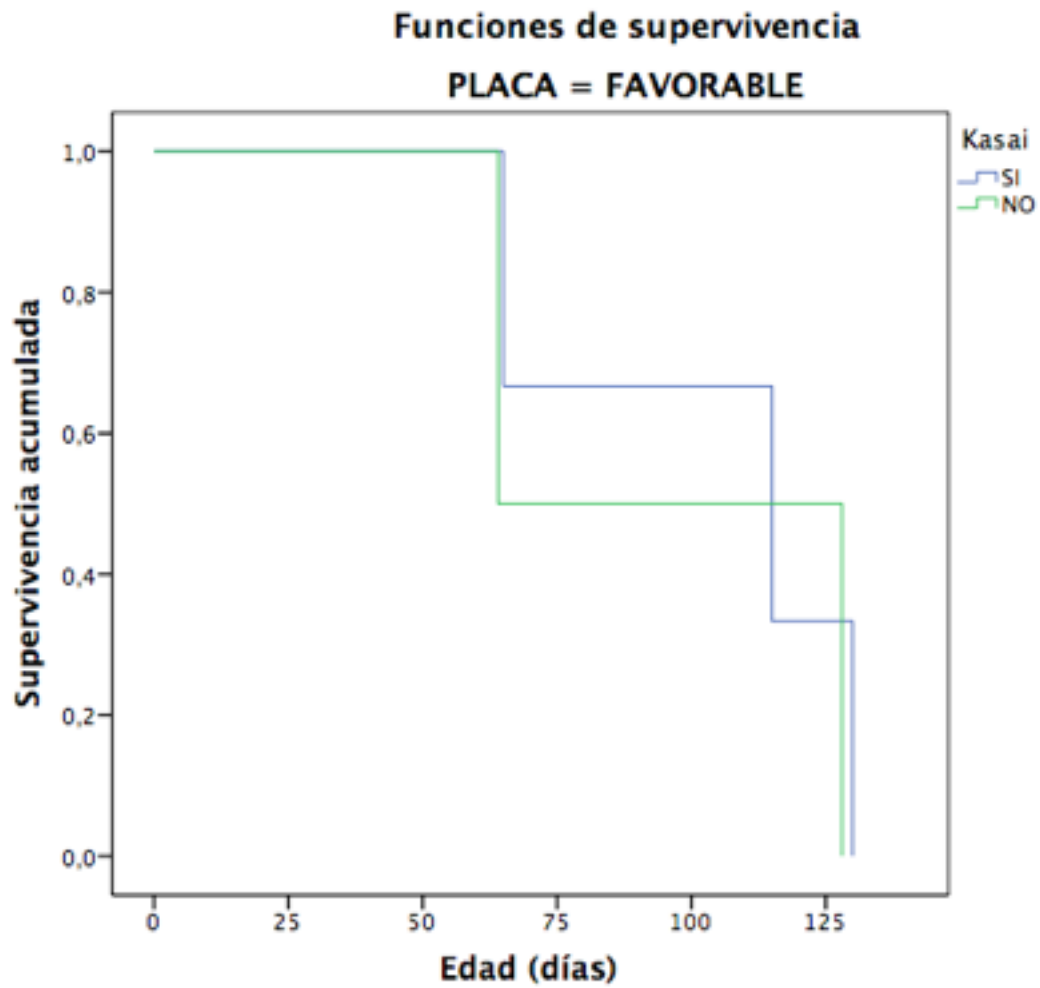
El patrón favorable de las biopsias hepáticas tienen sus características: mayor en el género femenino, con edad promedio la intervención es a los 100 días de vida, con niveles promedio de albúmina de

	Patrón favorable	Patrón no favorable
Número de sujetos	3	5
Sexo Masculino	1	3
Femenino	2	2
Edad meses (promedio)	100	78,4
Bilirrubinimas (promedio)	8,2	10,2
Albúmina (promedio)	3,6	2,82

3,6 g/dl, y de bilirrubinas de 8,2 mg/dl. El patrón no favorable de la biopsia hepática muestra: predilección por el sexo masculino, la edad promedio de la intervención quirúrgica fue de 78,4 días, con niveles promedio de albúmina 2,8 g/dl, y de bilirrubina 10,2 mg/dl.

Sobrevida con Kaplan Meyer

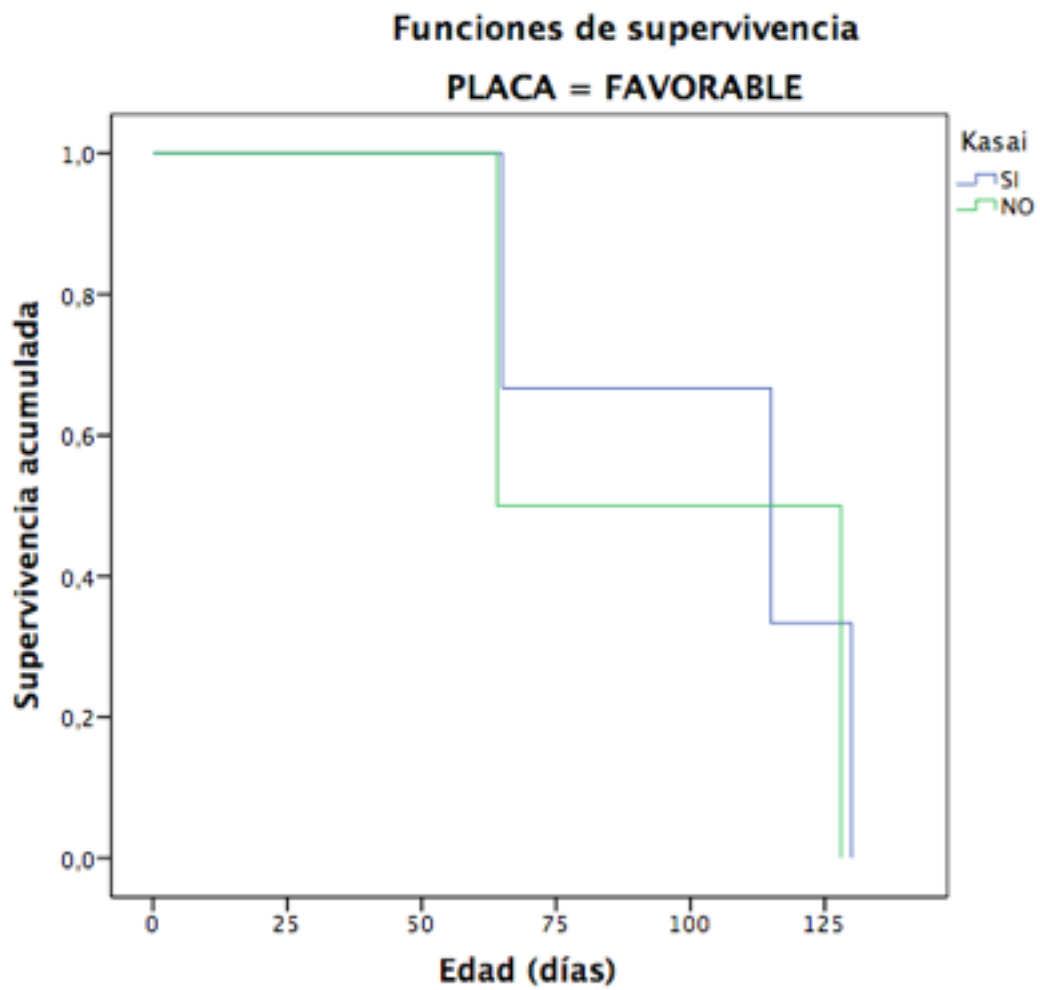
Patrón de biopsia hepática favorable



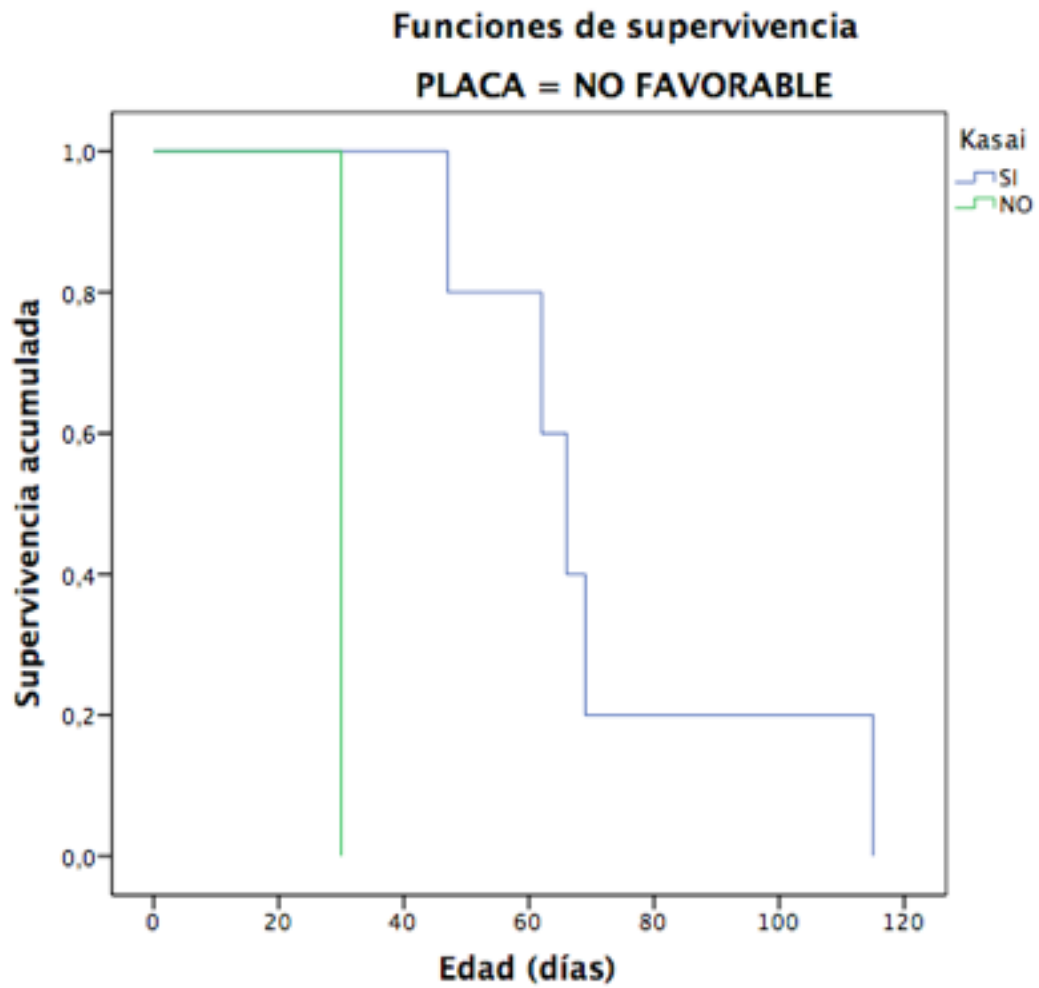
Pertenece uno al patrón de biopsia favorable.

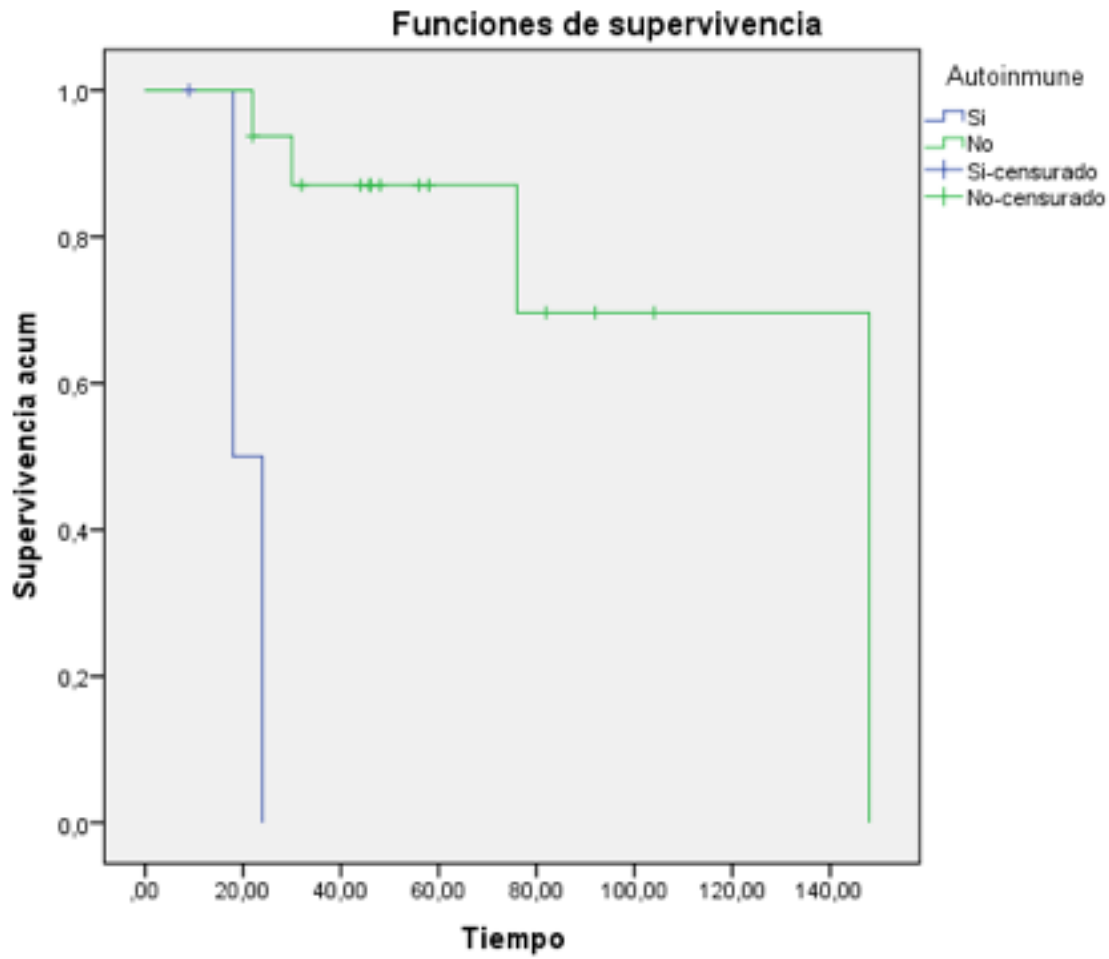


Patrón de biopsia hepática no favorable



Pertenecen tres al patrón de biopsia no favorable.





La sobrevida en comparación con la Igg4, pertenece al patrón de biopsia hepática no favorable.

## Colangiografía

**Colangiografía tranopeatoria**

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	Si	11	100
	Total	11	100,0

Se realizó colangiografía transoperatoria al total de los pacientes

## Cirugía de Kasai

**Kasai**

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	Si	8	72,7
	No	3	27,3
	Total	11	100,0

**Tipo de atresia**

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	II	1	5,3
	III	10	94,7
	Total	11	100,0

Al 57,9 5 se realizó Kasai, la mayoría con atresia tipo III

**Estado actual**

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	Vivo	7	63,6
	Muerto	4	36,4
	Total	11	100,0

Los pacientes vivos corresponden al 63%

## Complicaciones

## Complicaciones

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	Colangitis	7	63,8
	Hipertensión portal	2	18,1
	Encefalopatía hepática	2	18,1
	Total	11	100,0

La colangitis es una de las principales complicaciones descritas

## Patologías acompañantes

## Asociadas

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	Síndrome de Down con cardiopatía	1	9,0
	Ninguna	7	63,8
	Síndrome de bilis espesa	3	27,2
	Total	11	100,0

La mayoría no presento patologías acompañantes.

Se registraron 11 pacientes con AVB, 10 con AVB aislada, y 1 formando parte del síndrome Biliary Atresia Splenic Malformatio (BASM).

La edad de la intervención fue con mínimo de un mes y un máximo de 4 meses de vida, perteneciendo la mayoría al sexo masculino el mismo que guarda relación con el patrón no favorable de las biopsias hepáticas.

Para que se pueda deducir que es BAMS, se encontraron antecedentes patológicos asociados, tales como malrotación intestinal subtipo no rotación (n 1), BASM (n 1), comunicación interventricular (n 1), trisomía 21 (n 1), en el mismo paciente.

La ictericia, acolia, coluria fue el síntoma predominante en 11/11.

En todos los pacientes se realizó ecografía abdominal (no apreciado la luz de la vesícula biliar en el 68,9%) y gammagrafía con tecnecio 99, contrastando en el 73,7% ausencia del paso de contraste a la luz del intestino, se realizó una colangiografía transoperatoria en todos los pacientes.

Del mismo modo, El patrón favorable de las biopsias hepáticas tienen sus características: mayor en el género femenino, con edad promedio la intervención es a los 100 días de vida, con niveles promedio de albúmina de 3,6 g/dl, y de bilirrubinas de 8,2 mg/dl. El patrón no favorable de la biopsia hepática muestra: predilección por el sexo masculino, la edad promedio de la intervención quirúrgica fue de 78,4 días, con niveles promedio de albúmina 2,8 g/dl, y de bilirrubina 10,2 mg/dl, sumándose a este resultado que este patrón no favorable la tinción con IGG4 es positivo; comparando los dos grupos se encontró que para las bilirrubinas la  $p=0,27$  y para la albúmina la  $p=0,19$ .

Según los estudios realizados por Archana Rastogi es más frecuente en la hepatitis neonatal (80% de los casos) en comparación con la atresia de vías biliares que solo se presenta en el 21% de los

casos. En este estudio se ha encontrado 1 caso con células gigantes y con IGG4 positiva, lo que indica un proceso de colestasis no relacionada con la atresia de vías biliares.

Los signos patognomónicos en la atresia de vías biliares es la fibrosis portal y la degeneración ductal, encontrándose en el presente estudio en el 57% de las biopsias analizadas (patrón favorable), mientras que en otro estudio se reportan como mal pronóstico a los cambios internos de los hepatocitos vistos con microscopio electrónico y se presenta en el 31 al 94% de los casos (patrón no favorable).

La AVB tipo III fue predominante en el 94,7% de los casos, el 5,3% lo describen con presencia de vesícula porque se trataría de un tipo II. Se pudo observar que conforme aumentaba la edad de los pacientes era mayor el grado de fibrosis siendo en su mayoría grado II en pacientes menores de 60 días y, grado III en mayores de 90 días. La complicación temprana fue la colangitis, presente el 36,8 % de los casos.

Se evaluó en la consulta las complicaciones postquirúrgicas de hipertensión portal (ascitis, hemorragia digestiva), que comparando con las biopsias hepática no favorable.

Se observó que al mes de la intervención de Kasai, 7 de los pacientes se encontraban asintomáticos, 4 fallecieron, siendo la mortalidad precoz posterior a la técnica de Kasai del 36,4%.

## **V. DISCUSIÓN**



La AVB representa la principal causa de trasplante hepático en el periodo neonatal. Se ha descrito como causa del 30–40 % de las colestasis neonatal, seguidas por la hepatitis neonatal siendo patologías semejantes que se pueden diferenciar con inmunohistopatología como se demuestra en el presente estudio.

Existe una serie de factores claramente asociados con el pronóstico de la AVB; sin embargo, el resultado en cada individuo resulta impredecible.

Se han descrito dos fenotipos clínicos asociados a esta patología, la forma aislada y la asociada a otras malformaciones extrahepáticas. El fenotipo aislado corresponde al 70–80%. El 15 al 30% restante se relaciona con otras malformaciones tales como la asociación BASM, malrotación intestinal, situs inverso y cardiopatía congénita. En este estudio se encontró un caso que corresponde al 5,2%. En esta experiencia se observa resultados similares, siendo la mayoría forma de AVB aislada, y un 5,2 % asociada a otra patologías, estas últimas constituyen un factor pronóstico importante, debido al mayor índice de morbimortalidad al cual este se asocia.

La edad de diagnóstico de la AVB es de los 60–120 días según distintas series, siendo la manifestación clínica más frecuente la ictericia tardía tras las dos primeras semanas de vida<sup>14–16</sup>. Son diversas las series que establecen que a mayor edad de la derivación bilio digestiva existe un riesgo superior de progresión a cirrosis; sin embargo, esto depende fundamentalmente de la variante de AVB y del subtipo y patrón de la biopsia hepática, Se demuestra en este estudio que la edad de la intervención fue mayor a los 90 días pero con patrón de la biopsia favorable y presentaron mayor sobrevida.

Se ha observado que el patrón favorable de las biopsias hepáticas tienen sus características y se presenta: mayor en el género femenino, con edad promedio la intervención es a los 100 días de vida, con niveles promedio de albúmina de 3,6 mg/dl, y de bilirrubinas de 8,2 mg/dl. El patrón no favorable de la biopsia hepática muestra: predilección por el sexo masculino, la edad promedio de

la intervención quirúrgica fue de 78,4 días, con niveles promedio de albúmina 2,8 mg/dl, y de bilirrubina 10,2 mg/dl, sumándose a este resultado que este patrón no favorable la tinción con IGG4 es positivo, la p no es estadísticamente significativa. El estudio realizado por Delgado, en Barcelona muestra que el grado de fibrosis y, la ductulitis están directamente relacionados con el pronóstico de la enfermedad. La tinción con inmunoglobulina 4 (siendo positivo en los tejidos inflamatorios) fue positiva en un 31,6%, lo que se correlaciona con mal pronóstico llegando a la cirrosis luego de los 60 días; así también, se asocia al STORCH positivo, alfa 1 antitripsina positivo. En series publicadas se revela el escaso valor pronóstico de las características microscópicas de los elementos hepatobiliares. Sin embargo, los conductos residuales sí comprometen el pronóstico, siendo más beneficiosa la presencia de ductos > 300 micras <sup>16</sup>.

Las biopsias hepáticas con patrón no favorable muestran un deterioro en la función hepática de síntesis (albumina) y de excreción (bilirrubinas).

La centralización de los pacientes con este tipo de patología marca su pronóstico por lo que deberían existir en nuestro país un solo centro que maneje de forma integral a estos pacientes.

Varios autores han llevado a cabo el empleo de corticoides en la terapéutica de la AVB, debido a sus efectos en la respuesta inflamatoria y además por el aumento de la fracción independiente de sales biliares en el flujo biliar. Solo existe un estudio prospectivo a doble ciego en el que, empleado dosis de 2mg/kg/día de prednisolona, se demostró una disminución significativa de la ictericia; sin embargo, no se puede traducir en una menor necesidad de trasplante o que mejore la supervivencia <sup>17</sup>.

Del mismo modo Davenport y Cols. hablan en su publicación sobre los mismos efectos beneficiosos en los niveles de bilirrubina postoperatoria tras el empleo de dosis de 5 mg/kg/día.

En la serie los pacientes que recibieron corticoides presentaron menor estadía hospitalaria y, concretamente menor estancia en UCIP, con menor índice de complicaciones en el postoperatorio.

Estos resultados son similares a los publicados por Toshihiro Muraji y cols, tras la revisión de 285

pacientes tratados con corticoides con distintas pautas, concluyen que los pacientes tratados mostraron considerablemente mejor pronóstico <sup>18</sup>.

En resumen, se puede concluir que el patrón de biopsia hepática no favorable y IGG 4 positiva representan peor pronóstico de vida para los pacientes con atresia de vías biliares, en este estudio a diferencia de los otros se evidenció que es más importante el patrón de biopsia hepática que la edad del paciente ya que el promedio de edad entre los dos grupos fue menor para el patrón no favorable y eso no disminuyó su mortalidad. El diagnóstico como la derivación portoentérica precoz, mejoran el pronóstico en la AVB, sin embargo, las formas sindrómicas cursan con peor pronóstico a corto y largo plazo.

## **VI CONCLUSIONES**

## Conclusiones

- Se describen dos patrones histologicamente definidos cuyas principales características son:
  - Patrón favorable: proliferación ductular escasa, agrandamiento del espacio porta, concreciones biliares escasas, estásis biliares en los canalículos
  - Patrón no favorable: fibrosis III, transformación de células gigantes, mayor reacción ductular, IGG 4 positivo.
- La sobrevida de los pacientes con atresia de vías biliares en 10 años es del 63.6%, y la sobrevida con el patrón favorable es de 66%, y el patrón no favorable es de 40%.
- En el presente estudio se demostró mayor incidencia en la provincia de Pichincha y en el sexo masculino con un mediana de edad (1 a 4 meses).
- En los exámenes de laboratorio se relacionaron con los patrones de la biopsia hepática y en el patrón favorable la bilirrubinas eran menores de 9,5mg/dl y albúmina de mayor a 2,7 g/dl, no hubo diferencia estadísticamente significativa. La ecografía se realizó en el 27,3% de los pacientes, ecografía y gammagrafía se realizó al 72,7%, y la colangiografía trasnoperatoria en el 100%. Kasai se realizó en el 72,7% de los casos.
- En el 21% de los pacientes se presentaron complicaciones postquirúrgicas. Los pacientes vivos representaron el 63,6%, con una mortalidad del 36,4% en los pacientes con atresia de vías biliares.

## **VII. RECOMENDACIONES**

## Recomendaciones

- Se recomienda concentrar el manejo de estos pacientes, en los centros especializados que cuenten un equipo multidisciplinario para el manejo integral del paciente.
- Se debe seguir las guías de manejo internacional
- Tener en cuenta el patrón de la biopsia hepática para atresia de vías biliares.

## **VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## 8. Referencias Bibliográficas

- 1.–Mark D. Stringer, Suzanne M. Davison: Kasai porteenterostomy: 12–years experience with a novel adjuvant therapy regimen, *Journal of Pediatric Surgery* (2007) 42, 1324–1328.
- 2.– By M. Davenport, V Pucicelli, P. Warrant, N. hadzic, G. Mieli–Vergani, B. Portmann, and E.R. Howard. The Outcome of the older (>100 days) Infant with biliary atresia.
- 3.– By Barbara E. Wildhaber, Arnold G. Coran, Robert A. Drangowski, Ronald B. Hirsch, James D. Geiger, Joseph L. Lelli, and daniel H Tietelbaum. The Asai portoenterostomy for Biliar Atresia: A review of a 27– years Experience with 81 patients, Ann Arbor, Michigan
- 4.– By Masaki Nio, Nobuyuki Sano, Tomohiro Ishii, Hideyuki Sasaki, Yutaka Hayashi, ah Ryoji Ohi: Cholangitis as a late complication in long term survivors after surgery for biliar atresia, Japan.
- 5.– Mauricio A. Escobar, Collen L. Jay, Ronald M. Brooks, Karen W. West, Frederick J Rescorla, Jean P. Molleston, Jay L. Grosfeld. Effect of corticosteroid on outcomes in biliary atareisa after Asai Portoenterostomy, *Journal of Pediatric Surgery* (2006), 41, 99–103.
- 6.– Wagner de Castro Andrade, Uenes Tannuri, Luiz Fernando Farraz da Silva, Venancini Ferreira Alves: Effects of the administration of pentoxifylline and prednisolone in the evolution of portal fibrogenesis secondary to biliary obstruction – an experimental study in growing animals, *Jornal of Pediatric Surgery* (2009) 44, 2071–2077.
- 7.– Ohi R: Surgery for biliary atresia. *Oliver* 21:175–182, 2001
- 8.– Shimoda S, Harada K, Niuro H, Shirabe K, Taketomi A, Maehara Y, et al. Interaction between Toll-like receptors and natural killer cells in the destruction of bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2011;53:1270-81.
- 9.– Harada K, Chiba M, Okamura A, Hsu M, Sato Y, Igarashi S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 derived from biliary innate immunity contributes to hepatic fibrogenesis. *J Clin Pathol*. 2011;64:660-5.
- 10.–Ikeda H, Sasaki M, Ishikawa A, Sato Y, Harada K, Zen Y, et al. Interaction of Toll-like receptors with bacterial components induces expression of CDX2 and MUC2 in rat biliary epithelium in vivo and in culture. *Lab Invest*. 2007;87:559-71

- 11.– By Anil Dhawan, Premila Trivedi, Azul Cheesema, et al Serum Hyaluronic Acid as an Early Prognostic Marker in Biliary Atresia, *Journal of Pediatric Surgery*, vol 36, No 3 (March), 2001: pp 443–446.
12. Mack CL, Tucker RM, Sokol RJ, et al. Biliary atresia is associated with CD4+ Th1 cell-mediated portal tract inflammation. *Pediatr Res*. 2004;56(1):79– 87.
13. Shinkai M, Shinkai T, Puri P, Stringer MD. Elevated expression of IL2 is associated with increased infiltration of CD8+ T cells in biliary atresia. *J Pediatr Surg*. 2006;41(2):300–305.
14. Narayanaswamy B, Gonde C, Tredger JM, et al. Serial circulating markers of inflammation in biliary atresia—evolution of the post-operative inflammatory process. *Hepatology*. 2007;46(1):180–187.
15. Davenport M, Gonde C, Redkar R, et al. Immunohistochemistry of the liver and biliary tree in extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Surg*. 2001;36(7): 1017–1025.
16. Uddin Ahmed AF, Ohtani H, Nio M, et al. Intrahepatic mast cell population correlates with clinical outcome in biliary atresia. *J Pediatr Surg*. 2000;35(12):1762–1765.
17. Shivakumar P, Sabla GE, Whittington P, Chougnnet CA, Bezerra JA. Neonatal NK cells target the mouse duct epithelium via Nkg2d and drive tissue-specific injury in experimental biliary atresia. *J Clin Invest*. 2009;119(8): 2281–2290.
18. Kobayashi H, Puri P, O’Briain DS, Surana R, Miyano T. Hepatic overexpression of MHC class II antigens and macrophage-associated antigens (CD68) in patients with biliary atresia of poor prognosis. *J Pediatr Surg*. 1997; 32(4):590–593.
19. Reynoso-Paz S, Coppel RL, Mackay IR, et al. The immunobiology of bile and biliary epithelium. *Hepatology*. 1999;30(2):351–357.
20. Liu C, Chiu JH, Chin T, et al. Expression of fas ligand on bile ductule epithelium in biliary atresia—a poor prognostic factor. *J Pediatr Surg*. 2000; 35(11):1591–1596.
21. Funaki N, Sasano H, Shizawa S, et al. Apoptosis and cell proliferation in biliary atresia. *J Pathol*. 1998;186(4):429–433.

22. Suskind DL, Rosenthal P, Heyman MB, et al. Maternal microchimerism in the livers of patients with biliary atresia. *BMC Gastroenterol*. 2004;4:14.
23. Kobayashi H, Tamatani T, Tamura T, et al. Maternal microchimerism in biliary atresia [discussion in *J Pediatr Surg*. 2007;42(6):991]. *J Pediatr Surg*. 2007; 42(6):987-991.
24. Muraji T, Hosaka N, Irie N, et al. Maternal microchimerism in underlying pathogenesis of biliary atresia: quantification and phenotypes of maternal cells in the liver. *Pediatrics*. 2008;121(3): 517–521.
25. Muraji T, Suskind DL, Irie N. Biliary atresia: a new immunological insight into etiopathogenesis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009;3(6):599–606.
26. Makin E, Quaglia A, Kvist N, et al. Congenital biliary atresia: liver injury begins at birth. *J Pediatr Surg*. 2009;44(3):630–633.
27. Caton AR, Druschel CM, McNutt LA. The epidemiology of extrahepatic biliary atresia in New York State, 1983–98. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2004; 18(2):97–105.
28. Wang W, Zheng S, Shong Z, Zhao R. Development of a guinea pig model of perinatal cytomegalovirus-induced hepatobiliary injury. *Fetal Pediatr Pathol*. 2011;30(5):301–311.
29. Wang W, Donnelly B, Bondoc A, et al. The rhesus rotavirus gene encoding VP4 is a major determinant in the pathogenesis of biliary atresia in newborn mice. *J Virol*. 2011;85(17):9069–9077.
30. Soomro GB, Abbas Z, Hassan M, et al. Is there any association of extra hepatic biliary atresia with cytomegalovirus or other infections? *J Pak Med Assoc*. 2011;61(3):281–283
31. Yaghoobi R, Didari M, Gramizadeh B, et al. Study of viral infections in infants with biliary atresia. *Indian J Pediatr*. 2011;78(4):478–481.
32. Landing BH. Considerations of the pathogenesis of neonatal hepatitis, biliary atresia and choledochal cyst—the concept of infantile obstructive cholangiopathy. *Prog Pediatr Surg*. 1974;6:113–139.

33. Domiati-Saad R, Dawson DB, Margraf LR, et al. Cytomegalovirus and human herpesvirus 6, but not human papillomavirus, are present in neonatal giant cell hepatitis and extrahepatic biliary atresia. *Pediatr Dev Pathol.* 2000;3(4): 367–373.
34. Drut R, Drut RM, Gómez MA, Cueto Ru' a E, Lojo MM. Presence of human papillomavirus in extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998; 27(5):530–535.
35. Riepenhoff-Talty M, Gouvea V, Evans MJ, et al. Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. *J Infect Dis.* 1996;174(1):8– 15.
36. Tyler KL, Sokol RJ, Oberhaus SM, et al. Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts. *Hepatology.* 1998;27(6):1475–1482.
37. Bangaru B, Morecki R, Glaser JH, Gartner LM, Horwitz MS. Comparative studies of biliary atresia in the human newborn and reovirus-induced cholangitis in weanling mice. *Lab Invest.* 1980;43(5):456–462.
38. Szavay PO, Leonhardt J, Czech-Schmidt G, Petersen C. The role of reovirus type 3 infection in an established murine model for biliary atresia. *Eur J Pediatr Surg.* 2002;12(4):248–250.
39. Riepenhoff-Talty M, Schaekel K, Clark HF, et al. Group A rotaviruses produce extrahepatic biliary obstruction in orally inoculated newborn mice. *Pediatr Res.* 1993;33(4, pt 1):394–399.
40. Morecki R, Glaser JH, Cho S, Balistreri WF, Horwitz MS. Biliary atresia and reovirus type 3 infection. *N Engl J Med.* 1984;310(24):1610.
41. Morecki R, Glaser JH, Johnson AB, Kress Y. Detection of reovirus type 3 in the porta hepatis of an infant with extrahepatic biliary atresia: ultrastructural and immunocytochemical study. *Hepatology.* 1984;4(6):1137–1142.
42. Brown WR, Sokol RJ, Levin MJ, et al. Lack of correlation between infection with reovirus 3 and extrahepatic biliary atresia or neonatal hepatitis. *J Pediatr.* 1988;113(4):670–676.

43. Steele MI, Marshall CM, Lloyd RE, Randolph VE. Reovirus 3 not detected by reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction analysis of preserved tissue from infants with cholestatic liver disease. *Hepatology*. 1995; 21(3):697–702.
44. Mack CL, Tucker RM, Lu BR, et al. Cellular and humoral autoimmunity directed at bile duct epithelia in murine biliary atresia. *Hepatology*. 2006;44(5): 1231–1239.
45. Bobo L, Ojeh C, Chiu D, et al. Lack of evidence for rotavirus by polymerase chain reaction/enzyme immunoassay of hepatobiliary samples from children with biliary atresia. *Pediatr Res*. 1997;41(2):229–234.
46. Bamford RN, Roessler E, Burdine RD, et al. Loss-of-function mutations in the EGF-CFC gene CFC1 are associated with human left-right laterality defects. *Nat Genet*. 2000;26(3):365–369.
47. Jacquemin E, Cresteil D, Raynaud N, Hadchouel M. CFC1 gene mutation and biliary atresia with polysplenia syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2002; 34(3):326–327.
48. Kohsaka T, Yuan Z-R, Guo S-X, et al. The significance of human jagged 1 mutations detected in severe cases of extrahepatic biliary atresia. *Hepatology*. 2002;36(4, pt 1):904–912.
49. Campbell KM, Arya G, Ryckman FC, et al. High prevalence of alpha-1- antitrypsin heterozygosity in children with chronic liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;44(1):99–103.
50. Mazziotti MV, Willis LK, Heuckeroth RO, et al. Anomalous development of the hepatobiliary system in the *Inv* mouse. *Hepatology*. 1999;30(2):372–378.
51. Yokoyama T, Copeland NG, Jenkins NA, et al. Reversal of left-right asymmetry: a situs inversus mutation. *Science*. 1993;260(5108):679–682.
52. Schön P, Tsuchiya K, Lenoir D, et al. Identification, genomic organization, chromosomal mapping and mutation analysis of the human *INV* gene, the ortholog of a murine gene implicated in left-right axis development and biliary atresia. *Hum Genet*. 2002;110(2):157–165.
53. Silveira TR, Salzano FM, Donaldson PT, et al. Association between HLA and extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1993;16(2):114– 117.

53. Silveira TR, Salzano FM, Howard ER, Mowat AP. Congenital structural abnormalities in biliary atresia: evidence for etiopathogenic heterogeneity and therapeutic implications. *Acta Paediatr Scand.* 1991;80(12):1192–1199.
54. Yuasa T, Tsuji H, Kimura S, et al. Human leukocyte antigens in Japanese patients with biliary atresia: retrospective analysis of patients who underwent living donor liver transplantation. *Hum Immunol.* 2005;66(3):295–300.
55. Donaldson PT, Clare M, Constantini PK, et al. HLA and cytokine gene polymorphisms in biliary atresia. *Liver.* 2002;22(3):213–219.
56. Klippel CH. A new theory of biliary atresia. *J Pediatr Surg.* 1972;7(6):651–654.
57. Pickett LK, Briggs HC. Biliary obstruction secondary to hepatic vascular ligation in fetal sheep. *J Pediatr Surg.* 1969;4(1):95–101.
58. Ho CW, Shioda K, Shirasaki K, et al. The pathogenesis of biliary atresia: a morphological study of the hepatobiliary system and the hepatic artery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1993;16(1):53–60.
59. dos Santos JL, da Silveira TR, da Silva VD, Cerski CT, Wagner MB. Medial thickening of hepatic artery branches in biliary atresia: a morphometric study. *J Pediatr Surg.* 2005;40(4):637–642.
60. Kim WS, Cheon J-E, Youn BJ, et al. Hepatic arterial diameter measured with US: adjunct for US diagnosis of biliary atresia. *Radiology.* 2007;245(2):549–555.
61. Santos JL, Carvalho E, Bezerra JA. Advances in biliary atresia: from patient care to research. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43(6):522–527.
62. Manolaki AG, Larcher VF, Mowat AP, et al. The prelaparotomy diagnosis of extrahepatic biliary atresia. *Arch Dis Child.* 1983;58(8):591–594.
63. Liu CS, Chin TW, Wei CF. Value of gamma-glutamyl transpeptidase for early diagnosis of biliary atresia. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei).* 1998;61(12): 716–720.

64. Caponcelli E, Knisely AS, Davenport M. Cystic biliary atresia: an etiologic and prognostic subgroup. *J Pediatr Surg.* 2008;43(9):1619–1624.
65. Yang J-G, Ma D-Q, Peng Y, Song L, Li C-L. Comparison of different diagnostic methods for differentiating biliary atresia from idiopathic neonatal hepatitis. *Clin Imaging.* 2009;33(6):439–446.
66. Brough AJ, Bernstein J. Conjugated hyperbilirubinemia in early infancy: a reassessment of liver biopsy. *Hum Pathol.* 1974;5(5):507–516.
67. Ferry GD, Selby ML, Udall J, Finegold M, Nichols B. Guide to early diagnosis of biliary obstruction in infancy: review of 143 cases. *Clin Pediatr (Phila).* 1985;24(6):305–311.
68. Lefkowitz JH. Biliary atresia. *Mayo Clin Proc.* 1998;73(1):90–95.
69. Russo P, Magee JC, Boitnott J, et al. Design and validation of the biliary atresia research consortium histologic assessment system for cholestasis in infancy. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011;9(4):357.e2–362.e2.
70. Zerbini MC, Gallucci SD, Maezono R, et al. Liver biopsy in neonatal cholestasis: a review on statistical grounds. *Mod Pathol.* 1997;10(8):793–799.
71. Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology.* 2004;39(6):1739–1745.
72. Lee H, Kang J, Kim KM, et al. The clinicopathological parameters for making the differential diagnosis of neonatal cholestasis. *Korean J Pathol.* 2009; 43:43.
73. Landing BH, Wells TR, Ramicone E. Time course of the intrahepatic lesion of extrahepatic biliary atresia: a morphometric study. *Pediatr Pathol.* 1985;4(3–4): 309–319.
74. Hartley J, Harnden A, Kelly D. Biliary atresia. *BMJ.* 2010;340:c2383.
75. Azar G, Beneck D, Lane B, et al. Atypical morphologic presentation of biliary atresia and value of serial liver biopsies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002;34(2):212–215.
76. Sergi C, Benstz J, Feist D, et al. Bile duct to portal space ratio and ductal plate remnants in liver disease of infants aged less than 1 year. *Pathology.* 2008; 40(3):260–267.

77. Raweily EA, Gibson AA, Burt AD. Abnormalities of intrahepatic bile ducts in extrahepatic biliary atresia. *Histopathology*. 1990;17(6):521–527.
78. Yamaguti DCC, Patrício FR. Morphometrical and immunohistochemical study of intrahepatic bile ducts in biliary atresia. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011;23(9):759–765.
79. Das P, Dattagupta S, Kumar L, Gupta DK. Liver and portal histopathological correlation with age and survival in extra hepatic biliary atresia. *Pediatr Surg Int*. 2011;27(5):451–461.
80. Davenport M, Tizzard SA, Underhill J, et al. The biliary atresia splenic malformation syndrome: a 28-year single-center retrospective study. *J Pediatr*. 2006;149(3):393–400.
81. Pacheco MC, Campbell KM, Bove KE. Ductal plate malformation-like arrays in early explants after a Kasai procedure are independent of splenic malformation complex (heterotaxy). *Pediatr Dev Pathol*. 2009;12(5):355–360.
82. Arii R, Koga H, Arakawa A, et al. How valuable is ductal plate malformation as a predictor of clinical course in postoperative biliary atresia patients? *Pediatr Surg Int*. 2011;27(3):275–277.
83. Shimadera S, Iwai N, Deguchi E, et al. Significance of ductal plate malformation in the postoperative clinical course of biliary atresia. *J Pediatr Surg*. 2008;43(2):304–307.
84. Low Y, Vijayan V, Tan CEL. The prognostic value of ductal plate malformation and other histologic parameters in biliary atresia: an immunohistochemical study. *J Pediatr*. 2001;139(2):320–322.
85. Poddar U, Thapa BR, Das A, et al. Neonatal cholestasis: differentiation of biliary atresia from neonatal hepatitis in a developing country. *Acta Paediatr*. 2009;98(8):1260–1264.
86. Roy P, Chatterjee U, Ganguli M, et al. A histopathological study of liver and biliary remnants with clinical outcome in cases of extrahepatic biliary atresia. *Indian J Pathol Microbiol*. 2010;53(1):101–105.
87. Torbenson M, Hart J, Westerhoff M, et al. Neonatal giant cell hepatitis: histological and etiological findings. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(10):1498–1503. 96. Santos JL, Almeida H, Cerski CT, Silveira TR. Histopathological diagnosis of intra- and extrahepatic neonatal cholestasis. *Braz J*



Med Biol Res. 1998;31(7): 911–919.

88. Rastogi A, Krishnani N, Yachha SK, et al. Histopathological features and accuracy for diagnosing biliary atresia by prelaparotomy liver biopsy in developing countries. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(1):97–102.

89. Chandra RS, Altman RP. Ductal remnants in extrahepatic biliary atresia: a histopathologic study with clinical correlation. *J Pediatr.* 1978;93(2):196–200.

90. Baerg J, Zuppan C, Klooster M. Biliary atresia—a fifteen-year review of clinical and pathologic factors associated with liver transplantation. *J Pediatr Surg.* 2004;39(6):800–803.

91. Langenburg SE, Poulik J, Goretsky M, Klein AA, Klein MD. Bile duct size does not predict success of portoenterostomy for biliary atresia. *J Pediatr Surg.* 2000;35(6):1006–1007.

92. Sharma S, Das P, Dattagupta S, Kumar L, Gupta DK. Liver and portal histopathological correlation with age and survival in extra hepatic biliary atresia. *Pediatr Surg Int.* 2011;27(5):451–461.

93. Tan CE, Davenport M, Driver M, Howard ER. Does the morphology of the extrahepatic biliary remnants in biliary atresia influence survival: a review of 205 cases. *J Pediatr Surg.* 1994;29(11):1459–1464.

94. Hussein A, Wyatt J, Guthrie A, Stringer MD. Kasai portoenterostomy— new insights from hepatic morphology. *J Pediatr Surg.* 2005;40(2):322–326.

95. Takahashi A, Masuda N, Suzuki M, et al. Evidence for segmental bile drainage by hepatic portoenterostomy for biliary atresia: cholangiographic, hepatic venographic, and histologic evaluation of the liver taken at liver transplantation. *J Pediatr Surg.* 2004;39(1):1–5.

96. Hadz'ic' N, Quaglia A, Portmann B, et al. Hepatocellular carcinoma in biliary atresia: King's College Hospital Experience. *J Pediatr.* 2011;159(4): 617.e1–622.e1.

97. Nio M, Ohi R, Miyano T, et al. Five- and 10-year survival rates after surgery for biliary atresia: a report from the Japanese Biliary Atresia Registry. *J Pediatr Surg.* 2003;38(7):997–1000.

98. Ibrahim M, Miyano T, Ohi R, et al. Japanese Biliary Atresia Registry, 1989 to 1994. *Tohoku J Exp Med.* 1997;181(1):85–95.
99. Kasai M. Treatment of biliary atresia with special reference to hepatic porto-enterostomy and its modifications. *Prog Pediatr Surg.* 1974;6:5–52.
100. Altman RP. Results of re-operations for correction of extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Surg.* 1979;14(3):305–309.
101. Altman RP, Lilly JR. Technical details in the surgical correction of extrahepatic biliary atresia. *Surg Gynecol Obstet.* 1975;140(6):952–956.
102. Kimura K, Tsugawa C, Kubo M, Matsumoto Y, Itoh H. Technical aspects of hepatic portal dissection in biliary atresia. *J Pediatr Surg.* 1979;14(1):27–32.
103. Suruga K, Miyano T, Arai T, Deguchi E. A study on hepatic portoenterostomy for the treatment of atresia of the biliary tract. *Surg Gynecol Obstet.* 1984;159(1):53–58.
104. Endo M, Katsumata K, Yokoyama J, et al. Extended dissection of the portahepatis and creation of an intussuscepted ileocolic conduit for biliary atresia. *J Pediatr Surg.* 1983;18(6):784–793.
105. Nakajo T, Hashizume K, Saeki M, Tsuchida Y. Intussusception-type antireflux valve in the Roux-en-Y loop to prevent ascending cholangitis after hepatic portojejunostomy. *J Pediatr Surg.* 1990;25(3):311–314.
106. Tanaka K, Shirahase I, Utsunomiya H, et al. A valved hepatic portoduodenal intestinal conduit for biliary atresia. *Ann Surg.* 1991;213(3):230–235.
107. Ando H, Ito T, Nagaya M. Use of external conduit impairs liver function in patients with biliary atresia. *J Pediatr Surg.* 1996;31(11):1509–1511.
108. Maksoud JG, Fauza DO, Silva MM, et al. Management of biliary atresia in the liver transplantation era: a 15-year, single-center experience. *J Pediatr Surg.* 1998;33(1):115–118.

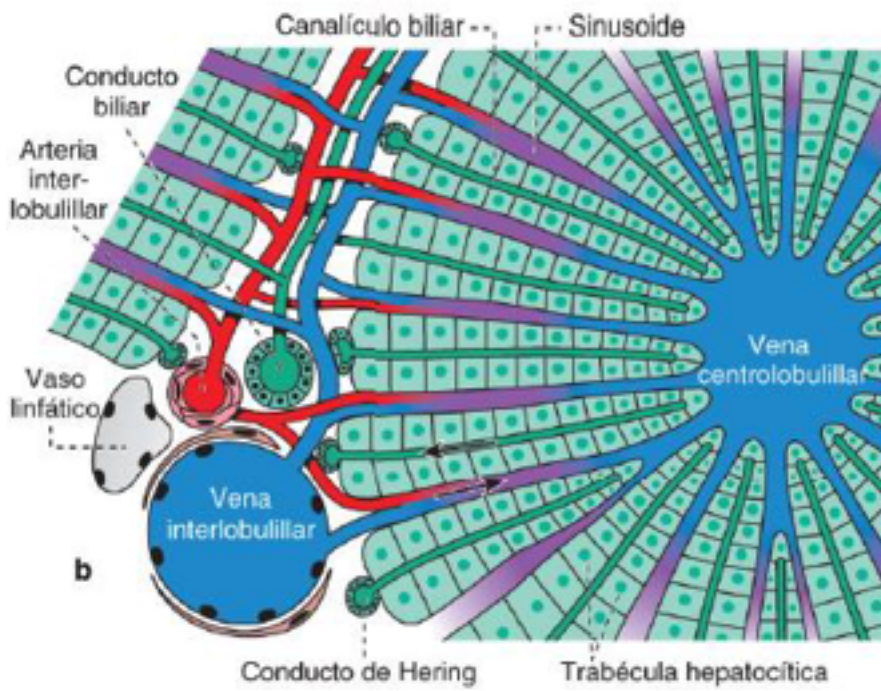
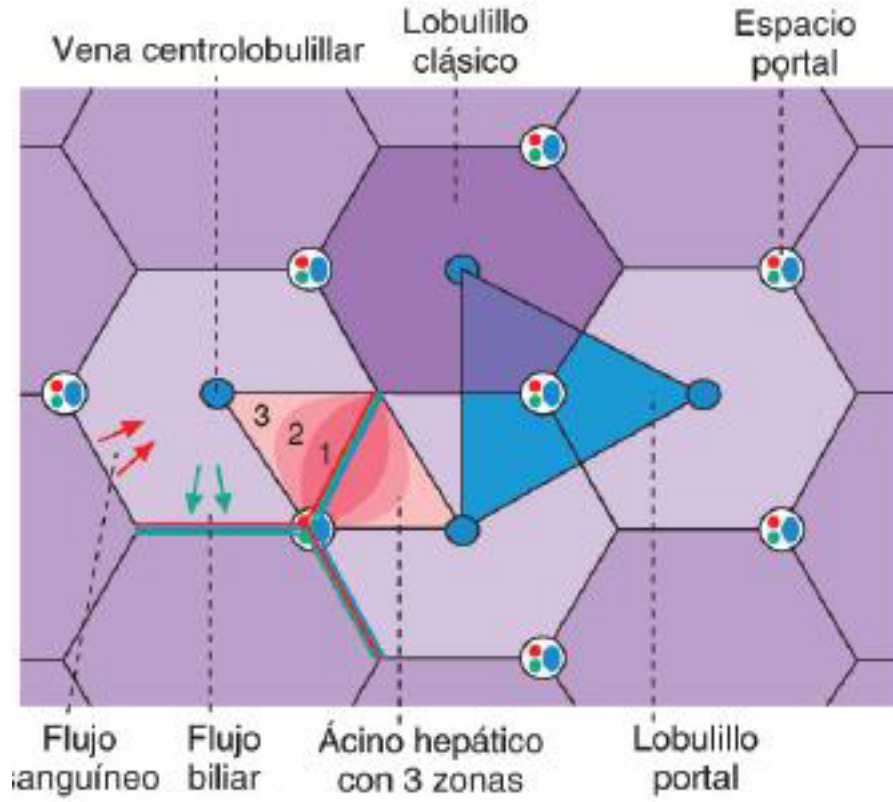
109. Ogasawara Y, Yamataka A, Tsukamoto K, et al. The intussusception antireflux valve is ineffective for preventing cholangitis in biliary atresia: a prospective study. *J Pediatr Surg.* 2003;38(12):1826–1829.
110. Tsao K, Rosenthal P, Dhawan K, et al. Comparison of drainage techniques for biliary atresia. *J Pediatr Surg.* 2003;38(7):1005–1007.
111. Lee H, Hirose S, Bratton B, Farmer D. Initial experience with complex laparoscopic biliary surgery in children: biliary atresia and choledochal cyst [discussion in *J Pediatr Surg.* 2004;39(6): 804–807]. *J Pediatr Surg.* 2004;39(6): 804–807.
112. Martinez-Ferro M, Esteves E, Laje P. Laparoscopic treatment of biliary atresia and choledochal cyst. *Semin Pediatr Surg.* 2005;14(4):206–215.
113. Ure BM, Kuebler JF, Schukfeh N, et al. Survival with the native liver after laparoscopic versus conventional Kasai portoenterostomy in infants with biliary atresia: a prospective trial. *Ann Surg.* 2011;253(4):826–830.
114. Wong KKY, Chung PHY, Chan K-L, Fan S-T, Tam PKH. Should open Kasai portoenterostomy be performed for biliary atresia in the era of laparoscopy? *Pediatr Surg Int.* 2008;24(8):931–933.
115. Azarow KS, Phillips MJ, Sandler AD, Hagerstrand I, Superina RA. Biliary atresia: should all patients undergo a portoenterostomy? [discussion in *J Pediatr Surg.* 1997;32(2):172–174]. *J Pediatr Surg.* 1997;32(2):168–172.
116. Kasai M, Mochizuki I, Ohkohchi N, Chiba T, Ohi R. Surgical limitation for biliary atresia: indication for liver transplantation. *J Pediatr Surg.* 1989;24(9): 851–854.
117. Wood RP, Langnas AN, Stratta RJ, et al. Optimal therapy for patients with biliary atresia: portoenterostomy (“Kasai” procedures) versus primary transplantation [discussion in *J Pediatr Surg.* 1990;25(1):160–162]. *J Pediatr Surg.* 1990; 25(1):153–160.
118. Altman RP, Lilly JR, Greenfeld J, et al. A multivariable risk factor analysis of the portoenterostomy (Kasai) procedure for biliary atresia: twenty-five years of experience from two centers [discussion in *Ann Surg.* 1997;226(3):353–355]. *Ann Surg.* 1997;226(3):348–353.

119. Superina R, Magee JC, Brandt ML, et al. The anatomic pattern of biliary atresia identified at time of Kasai hepatoportoenterostomy and early postoperative clearance of jaundice are significant predictors of transplant-free survival. *Ann Surg*. 2011;254(4):577–585.
120. de Vries W, de Langen ZJ, Groen H, et al. Biliary atresia in The Netherlands: outcome of patients diagnosed between 1987 and 2008. *J Pediatr*. 2012;160(4):638.e2–644.e2.
121. Bassett MD, Murray KF. Biliary atresia: recent progress. *J Clin Gastroenterol*. 2008;42(6):720–729.
122. Harada K, Sato Y, Itatsu K, et al. Innate immune response to double-stranded RNA in biliary epithelial cells is associated with the pathogenesis of biliary atresia. *Hepatology*. 2007;46(4):1146–54.
123. Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, et al. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* 1998;20:233-8.
124. Davenport M, Kerkar N, Mieli-Vergani G, et al. Biliary atresia—The King’s College Hospital experience (1974-1995). *J Pediatr Surg* 1997;32:479 - 85.
125. Bowles BJ, Abdul-Ghani A, Zhang J, et al. Fifteen years’ experience with an antirefluxing biliary drainage valve. *J Pediatr Surg* 1999;34: 1711 - 4.
126. Janne S, Suomine, Hanna Lampela, Paivi Heikkila, et al. APRi predicts native liver survival by reflecting portal fibrogenesis and hepatic neovascularization at the time portoenterostomy in biliary atresia. *J Pediatric Surg*. 2014.11.46
127. Gustavo Delgado, Atresia de vías biliares: pronóstico a largo plazo, Universidad Autónoma de Barcelona.

## **IX. ANEXOS**



Gráfico 1: Acino Rappaport con las tres zonas



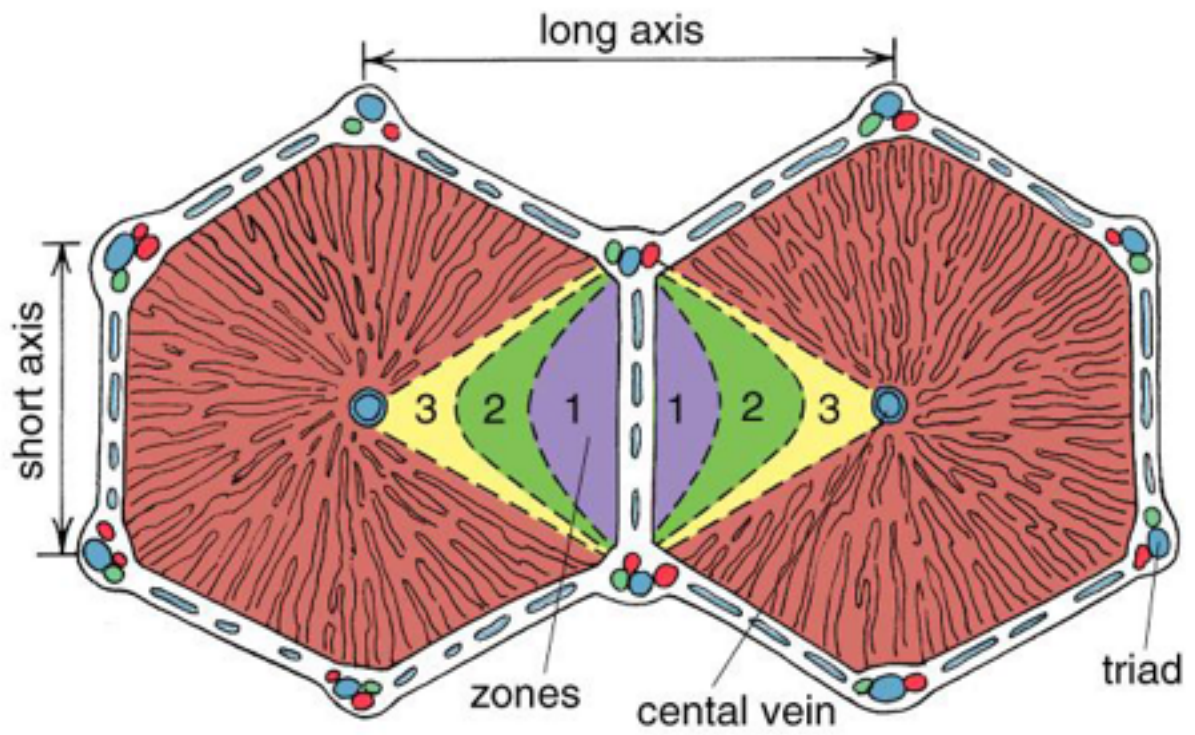


Figure 17.6. The liver acinus.

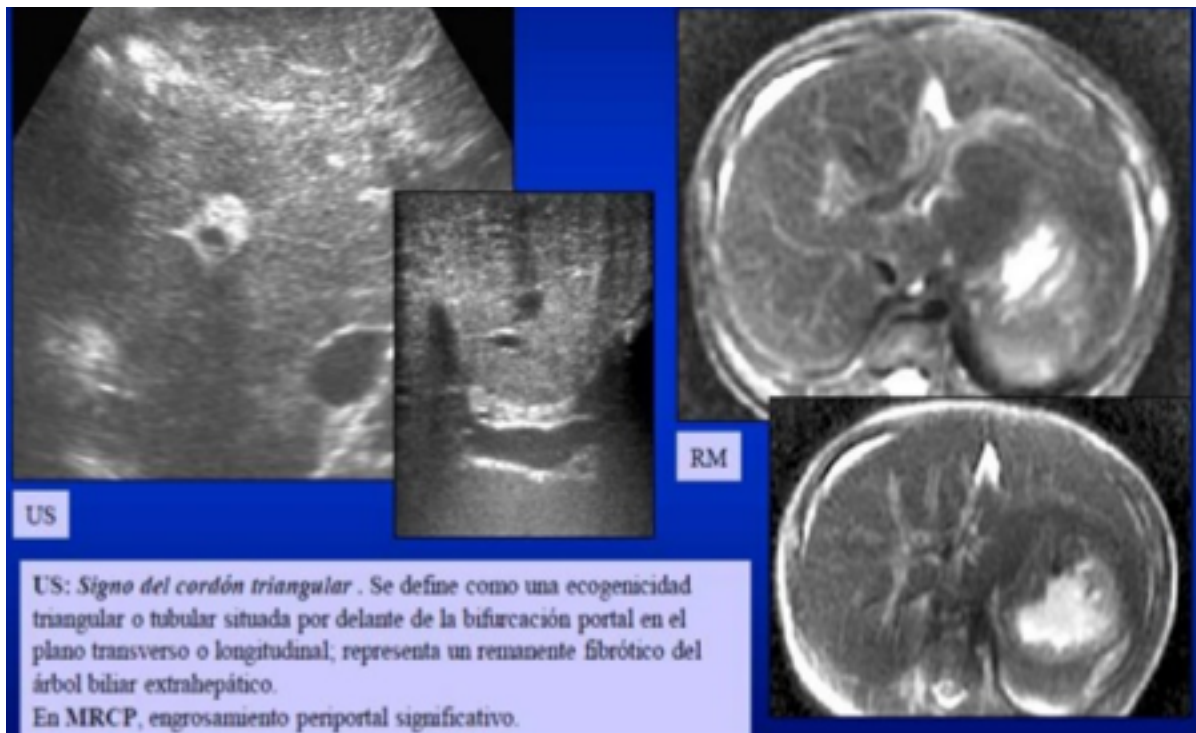




**Tabla 5: Pruebas de función hepática****MARCADORES BIOQUIMICOS HEPATICOS-1**

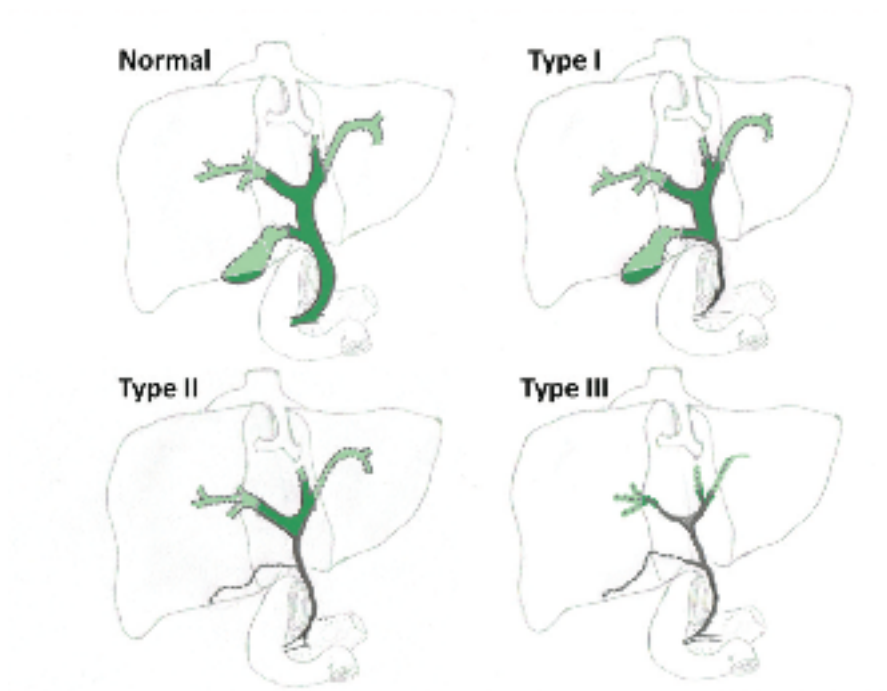
SISTEMA O FUNCION	MARCADOR	SITIO O IMPORTANCIA	FUNCION
<b>INTEGRIDAD DEL HEPATOCITO</b>	AST, ALT	HIGADO, CORAZON, RIÑON, CEREBRO, ERITROCITOS	CATABOLIZAN AMINOACIDOS,
<b>COLESTASIS</b>	FA	HUESO, INTESTINO, HIGADO, PLACENTA	ENZIMA CANALICULAR
	GGT	UNE FA INDICA DAÑO HEPATOCITO	CANALIZA LA TRANSFERENCIA DE GRUPO GAMA GLUTAMIL DE PEPTIDOS A OTROS AMINO ACIDOS
	BILIRRUBINAS	ALTERACION HEPATICA	HEM
<b>FUNCION HEPATICA</b>	ALBUMINA	DIETA O HEPATICA	HIGADO SINTETIZA ALBUMNA
	TP	HIGADO, VITAMINA K	SALES BILIARES, VITAMINAK

**Gráfico 3:** Signo del cordón fibroso en la ecografía en los pacientes con atresia de vías biliares, y en la derecha las imágenes con resonancia.



**Tabla 2:** Factores etiológicos de la atresia de vías biliares.

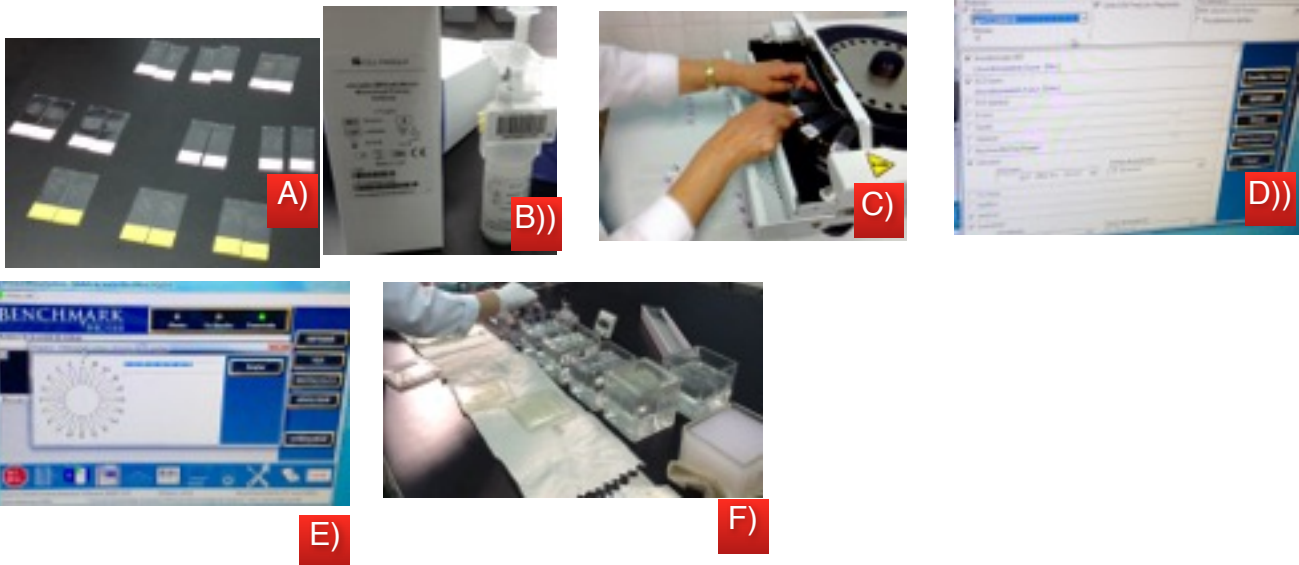
<b>Tabla 1. factores de la atresia de vías biliares</b>	
<p><b>Inmunológico</b></p> <p><b>Sobreexpresión de la adhesión molecular en el epitelio</b></p> <p><b>Expresión aberrante de la HLA I, II</b></p> <p><b>Expresión Fas ligada e incrementada apoptosis en el epitelio del conducto biliar</b></p> <p><b>Microquímica materna (inflamación del epitelio biliar)</b></p> <p><b>Respuesta T1, 2</b></p> <p><b>Inmunidad innata (células asesinas naturales, receptores naturales)</b></p> <p><b>Viral</b></p> <p><b>Reovirus tipo 3</b></p> <p><b>Rotavirus</b></p> <p><b>CMV</b></p> <p><b>Papilomavirus</b></p> <p><b>Otros</b></p> <p><b>Genético y Metabólico</b></p> <p><b>Gen CFC 1/ proteína CRYPTIC</b></p> <p><b>Gen VEGF</b></p> <p><b>Jagge-1</b></p> <p><b>Ge Inv</b></p> <p><b>Deficit de alfa 1 antitripsina</b></p> <p><b>Insulto vascular</b></p> <p><b>estudio de ímanes e hipertrofia de la arteria hepática</b></p> <p><b>Medioambiente y misceláneos</b></p> <p><b>Uso de drogas durante el embarazo (anfetaminas, alcohol)</b></p> <p><b>Micotoxinas</b></p> <p><b>Toxinas industriales</b></p> <p><b>Diabetes gestacional, edad materna.</b></p>	

**Tabla 3:** Tipos de atresia de las vías biliares según Davenport**Tabla 4:** Cuadro de diferencias entre la atresia de vías biliares y colestasis neonatal a nivel histopatológico.

**Table 2. Reported Frequency of Selected Histopathologic Features Distinguishing Biliary Atresia From Nonobstructive Etiologies of Neonatal Cholestasis**

	Biliary Atresia, %	Nonobstructive Diseases, %	Source, y
Ductular reaction (moderate to severe)	76–100	13.4–22	Russo et al, <sup>27</sup> 2011; Lee et al, <sup>40</sup> 2009; Rastogi et al, <sup>28</sup> 2009
Fibrosis (at least fibrous expansion of portal tracts)	53.6–100	6.7–87.8	Russo et al, <sup>27</sup> 2011; Lee et al, <sup>40</sup> 2009; Rastogi et al, <sup>28</sup> 2009
Advanced fibrosis (bridging fibrosis or cirrhosis)	42.9–70	0–14	Russo et al, <sup>27</sup> 2011; Lee et al, <sup>40</sup> 2009; Torbenson et al, <sup>29</sup> 2010; Rastogi et al, <sup>28</sup> 2009
Ductal/ductular bile plugs	42.9–69	0–23	Russo et al, <sup>27</sup> 2011; Rastogi et al, <sup>28</sup> 2009
Sinusoidal fibrosis (zone 3)	20	32	Russo et al, <sup>27</sup>
Hepatocyte swelling	30	23	Russo et al, <sup>27</sup>
Giant cell transformation of hepatocytes (>mild/focal)	14–43	23–80	Davenport et al, <sup>9</sup> 1993; Russo et al, <sup>27</sup> 2011; Lee et al, <sup>40</sup> 2009; Rastogi et al, <sup>28</sup> 2009
Extramedullary hematopoiesis	47–56	16–68.2	Russo et al, <sup>27</sup> 2011; Lee et al, <sup>40</sup> 2009
Acute cholangitis	17.9–37	14–20	Russo et al, <sup>27</sup> 2011; Rastogi et al, <sup>28</sup> 2009
Portal inflammation (at least moderate)	28	20	Russo et al, <sup>27</sup> 2011
Hepatocellular necrosis	35	37	Russo et al, <sup>27</sup> 2011
Duct plate malformation	10–48.8	0–0.5	Davenport et al, <sup>9</sup> 1993; Russo et al, <sup>27</sup> 2011; Raweily et al, <sup>41</sup> 1990; Yamaguti & Patricia, <sup>42</sup> 2011; Pacheco et al, <sup>43</sup> 2009; Shimadera et al, <sup>44</sup> 2008; Low et al, <sup>45</sup> 2001; Poddar et al, <sup>46</sup> 2009; Rastogi et al, <sup>28</sup> 2009
Bile duct inflammation	31	18.5	Russo et al, <sup>27</sup> 2011
Bile duct loss	7.3–8.5	0–95 <sup>a</sup>	Lee et al, <sup>40</sup> 2009; Raweily et al, <sup>41</sup> 1990; Yamaguti & Patricia, <sup>42</sup> 2011; Torbenson et al, <sup>29</sup> 2010

## Anexo 2: Marcador biológico para atresia de vías biliares



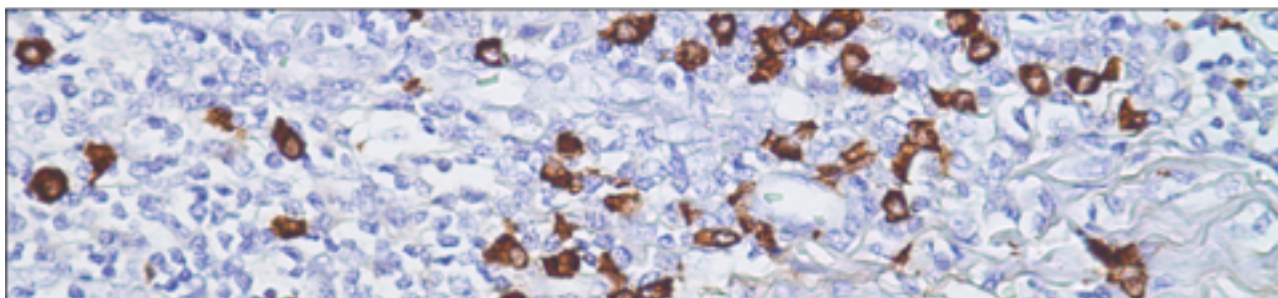
Pasos que se siguieron para la tinción con Inmunoglobulina G4

- a) Las placas seleccionadas de atresia de vías biliares y un control con tejido de amígdala
- b) El envase de la Inmunoglobulina G4 que es un anticuerpo monoclonal de rata
- c) Colocación de las muestras en el máquina lectora de las inmunoglobulinas
- d) Lectura de las placas
- e) Inicio del proceso que dura aproximadamente 5 horas
- f) Se pasa en los diferentes concentraciones de alcoholes para la lectura de la inmunoglobulinas.

## **IGG4**

### **Anti-IgG4 (MRQ-44)**

Mouse Monoclonal Primary Antibody



#### Materials and Reagents Needed But Not Provided

The following reagents and materials may be required for staining but are not provided with the primary antibody:

#### Specimen Collection and Preparation for Analysis

Routinely processed, neutral-buffered formalin-fixed, paraffin-embedded tissues are suitable for use with this primary antibody when used with Ventana Roche detection systems and a Ventana Roche automated slide stainer (see Materials and Reagents Needed, But Not Provided section). The recommended tissue fixative is 10% neutral buffered formalin. Variable results may occur as a result of prolonged fixation or special processes such as decalcification of bone marrow preparations.

Each section should be cut to the appropriate thickness (approximately 3  $\mu\text{m}$ ) and placed on a positively charged glass slide. Slides containing the tissue section may be baked for at least 2 hours (but not longer than 24 hours) in a 58-60°C  $\pm$  5°C oven.

#### WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. Take reasonable precautions when handling reagents. Use disposable gloves and lab coats when handling suspected carcinogens or toxic materials (example: xylene).
2. Avoid contact of reagents with eyes and mucous membranes. If reagents come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.



3. Patient specimens and all materials contacting them should be handled as biohazardous materials and disposed of with proper precautions. Never pipette by mouth.
4. Avoid microbial contamination of reagents, as this could produce incorrect results.
5. Incubation times and temperatures other than those specified may give erroneous results.
6. The reagents have been optimally diluted, and further dilution may result in loss of antigen staining. The user must validate any such change.
7. When used according to instructions, this product is not classified as a hazardous substance. The preservative in the reagent is less than 0.1% sodium azide and does not meet the OSHA (USA) criteria for hazardous substance at the stated concentration. See MSDS.
8. The user must validate any storage conditions other than those specified in the package insert.
9. Diluent may contain bovine serum albumin and supernatant may contain bovine serum. The products containing fetal bovine serum and products containing bovine serum albumin are purchased from commercial suppliers. Certificates of Origin for the animal source used in these products are on file at Cell Marque. The certificates support that the bovine sources are from countries with negligible BSE risk and state sources of bovine from USA and Canada.
10. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
  1. Positive and negative control tissue
  2. Microscope slides, positively charged
  3. Drying oven capable of maintaining a temperature of  $58-60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$
  4. Bar code labels (appropriate bar code labels for negative control and the primary antibody being tested)
  5. Staining jars or baths

## 6. Timer

7. Amplifier (when applicable)

8. Xylene or xylene substitute

9. Ethanol or reagent alcohol

10. Deionized or distilled water

11. ES<sup>®</sup>, NexES IHC<sup>®</sup>, BenchMark<sup>®</sup>,  
 BenchMark<sup>®</sup> XT, and BenchMark<sup>®</sup> ULTRA automated slide stainers

12. iVIEW<sup>™</sup> DAB (preferred), ultraView<sup>™</sup>, AEC, V Red (ALK PHOS) and Enhanced V Red detection kits

## Storage and Handling

Store at 2-8°C. Do not freeze.

13. Detection system specific software (ES<sup>®</sup> automated slide stainer only)

14. APK Wash Solution (ES<sup>®</sup> and NexES IHC<sup>®</sup> automated slide stainers)

15. Liquid Coverslip<sup>™</sup> solution (ES<sup>®</sup> and NexES IHC<sup>®</sup> automated slide stainers)

16. EZ Prep<sup>™</sup> solution (BenchMark<sup>®</sup>, BenchMark<sup>®</sup> XT, and BenchMark<sup>®</sup> ULTRA automated slide stainers)

17. Reaction Buffer (BenchMark<sup>®</sup>, BenchMark<sup>®</sup> XT, and BenchMark<sup>®</sup> ULTRA automated slide stainers)

18. LCS (BenchMark<sup>®</sup>, BenchMark<sup>®</sup> XT, and Benchmark<sup>®</sup> ULTRA automated slide stainers)
19. Hematoxylin or other counterstain
20. Negative Control Reagent 21. Mounting medium
22. Cover glass
23. Light microscope (40-400x)

To ensure proper reagent delivery and stability of the antibody after every run, the cap must be replaced and the dispenser must be immediately placed in the refrigerator in an upright position.

Every antibody dispenser is expiration dated. When properly stored, the reagent is stable to the date indicated on the label. Do not use reagent beyond the expiration date for the prescribed storage method.

There are no definitive signs to indicate instability of this product; therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with unknown specimens. Contact Cell Marque customer service if there is a suspected indication of reagent instability.

### Step by Step Procedure

Cell Marque's primary antibodies have been developed for use on Ventana Roche automated slide stainers in combination with Ventana Roche detection kits and accessories.

### Dispenser Preparation, Handling & Storage Instructions

#### Preparing For Use:

Where Used: For NexES<sup>®</sup> IHC, BenchMark<sup>®</sup> Series and Discovery<sup>®</sup> automated instruments, software version 8.0 and higher.

#### 1. Shipping Key Removal

To remove the Shipping Key (shown in Figure A), remove the Nozzle Cap, hold the dispenser upright and pull the Key Tab to disengage it from each end. DO NOT cover the nozzle tip as it could permanently damage the dispenser. DO NOT depress the dispenser while removing the key as it could waste reagent. Discard the shipping key.

#### 2. Preparing the Dispenser for Use

Remove the Nozzle Cap and place on the Nozzle Cap Holder. Fluid may be present inside the Nozzle Cap. Install the dispenser on the reagent carousel. The Inline Dispenser has been

<sup>®</sup> designed to be "Prepared for Use" by the NexES<sup>®</sup> software Version 8.0 or higher. Before each run, the software will detect a new dispenser on the carousel and prime it automatically. Manually priming the dispenser is not necessary and should NEVER be done

as it could waste reagent and decrease the number of available dispenses.

Note - All earlier software installations: After removing the shipping key, remove the nozzle cap and CHARGE THE DISPENSER BY RAPIDLY PUMPING 3 to 4 TIMES, keeping the

dispenser in an upright position. Charging is only necessary prior to first time use. (See Inspect Prime Before Use section.)

### 3. Dispenser Storage & Handling

To insure reliable operation, the dispenser must always be capped when not in use and should NEVER be manually dispensed. (See the Do's and Don'ts section.)

## Do's and Don'ts

### DO:

1. Check priming chamber and meniscus before each use. (See Inspect Prime Before Use below).
2. Store nozzle cap on dispenser. A holder is provided.
3. Cap dispenser when not in use to prevent evaporation. Dispensers mounted on the reagent tray can be capped (from underneath the tray) when not in use.
4. Store dispensers in an upright position in a rack and on the reagent carousel.
5. When mounting the dispenser on the carousel, grasp the coupler to avoid accidental manual dispensing.

### DON'T:

1. Do not manually dispense when inverted (upside down). Prime will be lost and may be impossible to restore.
2. Do not manually dispense with the nozzle cap in place. This can permanently damage the dispenser.
3. Do not manually dispense or prime prior to each use. This is not necessary and wastes reagent.

4. Do not hold the barrel in the down position. Fluid can leak from the dispenser when the barrel is depressed.
5. Do not stack carousels with dispensers installed. This can cause the dispensers to leak.

Inspect Prime Before Use:

Remove the nozzle cap and refer to Figure B. Dispenser is ready for use when:

1. A meniscus is present in the area shown in Figure B. 2. The priming chamber contains liquid.

The procedures for staining on the Ventana Roche automated slide stainers are as follows. For more detailed instructions and additional protocol options refer to your Operator's Manual.

Recommended Staining Protocols for 760-4614:

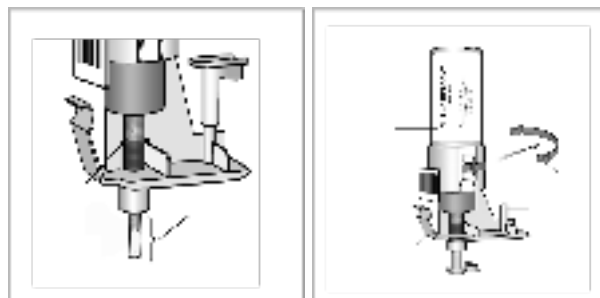
ultraView™:

1. Load slides, antibody, and ultraView™ detection kit dispensers onto BenchMark®\* instrument.
2. Select Protease 1 (8 minutes) pretreatment.
3. Antibody incubation should be set for 16 minutes at 37°C.
4. Start the run.
5. When the staining run is complete, move slides from instrument and rinse well with wash buffer.
6. Coverslip.

## QUALITY CONTROL PROCEDURES

### Positive Tissue Control

A positive tissue control must be run with every staining procedure performed. This tissue may contain both positive and negative staining cells or tissue components and serve as both the positive and negative control tissue. Control tissues should be fresh autopsy, biopsy or surgical specimens prepared or fixed as soon as possible in a manner identical to the test sections. Use of a tissue section fixed or processed differently.



Depressing the top of the barrel will manually dispense a drop. (See Do's & Don't section)

Lot number printed on label

Barcode label and dispenser serial number

Coupler

Top

Bottom

Barrel is scaled with milliliter graduations

Shipping Key

Key Tab

Nozzle Cap Holder

Nozzle Cap

(2) The Priming Chamber must contain liquid. Some small bubbles may be present.

(1) A meniscus should be visible between the base and tip of the nozzle, as shown.

---

IgG4 (MRQ-44)

p. 3



6600 Sierra College Blvd. • Rocklin, CA 95677 USA • 916-746-8900 CMC46140004

••••••••

from the test specimen will serve to provide control for all reagents and method steps except fixation and tissue processing.

A tissue with weak positive staining is more suitable for optimal quality control and for detecting minor levels of reagent degradation. Positive tissue control for the stated primary antibody (760-4614) may include the following:

Known positive tissue controls should be utilized only for monitoring the correct performance of processed tissues and test reagents, not as an aid in determining a specific diagnosis of patient samples. If the positive tissue controls fail to demonstrate appropriate positive staining, results with the test specimens must be considered invalid.

Negative Tissue Control

The same tissue used for the positive tissue control may be used as the negative tissue control. The variety of cell types present in most tissue sections offers internal negative control sites, but this should be verified by the user. The components that do not stain should demonstrate the absence of specific staining, and provide an indication of non-specific background staining. If specific staining occurs in the negative tissue control sites, results with the patient specimens must be considered invalid.

### Unexplained Discrepancies

Unexplained discrepancies in controls should be referred to your local Ventana Roche office immediately. If quality control results do not meet specifications, patient results are invalid. See the Troubleshooting section of this insert. Identify and correct the problem, then repeat the entire procedure with the patient samples.

### Negative Control Reagent

A negative control reagent must be run for every specimen to aid in the interpretation of results. A negative control reagent is used in place of the primary antibody to evaluate nonspecific staining. The slide should be treated with negative control reagent, matching the host species of the primary antibody, and ideally having the same IgG concentration. The incubation period for the negative control reagent should equal the primary antibody incubation period.

## INTERPRETATION OF RESULTS

The immunostaining procedure run on Ventana Roche automated slide stainers causes a colored reaction product to precipitate at the antigen sites localized by the primary antibody. Refer to the appropriate detection system package insert for expected color reactions.

A qualified pathologist experienced in immunohistochemistry procedures must evaluate positive and negative tissue controls before interpreting results.

### Positive Tissue Control

The stained positive tissue control should be examined first to ascertain that all reagents are functioning properly. The presence of an appropriately colored reaction product within the target cells is indicative of positive reactivity. Refer to the package insert of the detection system used for expected color reactions. Depending on the incubation length and potency of the hematoxylin used, counterstaining will result in a pale to dark blue coloration of cell nuclei. Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results. If the positive tissue control fails to demonstrate appropriate positive staining, any results with the test specimens are considered invalid.

### Negative Tissue Control

The negative tissue control should be examined after the positive tissue control to verify the specific labeling of the target antigen by the primary antibody. The absence of specific staining in the negative tissue control confirms the lack of antibody cross reactivity to cells or cellular components. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimen are

considered invalid. Nonspecific staining, if present, will have a diffuse appearance. Sporadic light staining of connective tissue may also be observed in sections from tissues that are not optimally

fixed. Intact cells should be used for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells show non-specific staining.

#### Patient Tissue

Patient specimens should be examined last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any background staining of the negative reagent control. As with any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen in question was not detected, not that the antigen is absent in the cells or tissue assayed. A panel of antibodies may aid in the identification of false negative reactions (see Summary of Expected Results section). The morphology of each tissue sample should also be examined utilizing a hematoxylin and eosin stained section when interpreting any immunohistochemical result. The patient's morphologic findings and pertinent clinical data must be interpreted by a qualified pathologist.

#### LIMITATIONS

1. This reagent is “for professional use only” as immunohistochemistry is a multiple step process that requires specialized training in the selection of the appropriate reagents, tissues, fixation, processing; preparation of the immunohistochemistry slide; and interpretation of the staining results.
2. For laboratory use only.
3. For in vitro diagnostic use.
4. Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning, or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may result from variations

#### Tonsil

#### Cytoplasmic

in fixation and embedding methods, as well as from inherent irregularities within the tissue.

5. Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.
6. The clinical interpretation of any positive staining, or its absence, must be evaluated within the context of clinical history, morphology, other histopathological criteria as well as other diagnostic tests. This antibody is intended to be used in a panel of antibodies. It is the responsibility of a qualified pathologist to be familiar with the antibodies, reagents and methods used to produce the stained preparation. Staining must be performed in a certified, licensed laboratory under the supervision of a pathologist who is responsible for reviewin



the stained slides and assuring the adequacy of positive and negative controls.

7. Cell Marque provides antibodies at optimal dilution for use as instructed. Any deviation from recommended test procedures may invalidate expected results. Appropriate controls must be employed and documented. Users who deviate from recommended test procedures must accept responsibility for interpretation of patient results.
8. This product is not intended for use in flow cytometry; performance characteristics have not been determined.
9. Reagents may demonstrate unexpected reactions in previously untested tissues. The possibility of unexpected reactions even in tested tissue groups cannot be completely eliminated because of biological variability of antigen expression in neoplasms, or other pathological tissues. Contact Cell Marque customer service with documented unexpected reactions.
10. Tissues from persons infected with hepatitis B virus and containing hepatitis B surface antigen (HBsAg) may exhibit nonspecific staining with horseradish peroxidase.
11. When used in blocking steps, normal sera from the same animal source as the secondary antisera may cause false negative or false positive results because of the effect of autoantibodies or natural antibodies.
12. False positive results may be seen because of nonimmunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by pseudoperoxidase activity (erythrocytes), endogenous peroxidase activity (cytochrome C), or endogenous biotin (example: liver, brain, breast, kidney) subject to the type of immunostaining technique used.
13. As with any immunohistochemistry test, a negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells or tissue assayed.

#### Specific Limitations

1. The antibody is optimized for the incubation time specified in the Instructions for Use section in combination with Ventana Roche detection kits and the Ventana Roche automated slide stainers. Because of variation in tissue fixation and processing, it may be necessary to increase or decrease the primary antibody incubation time on individual specimens.
2. Cell Marque antibodies, when used in combination with Ventana Roche detection systems and accessories, detects antigen(s) that survive routine formalin fixation, tissue processing, and sectioning. Users who deviate from recommended test procedures are responsible for interpretation and validation of patient results.

1. If the positive control exhibits weaker staining than expected, other positive controls run during the same instrument run should be checked to determine if it is because of the primary antibody or one of the common secondary reagents.
2. If the positive control is negative, it should be checked to ensure that the slide has the proper bar code label. If the slide is labeled properly, other positive controls used on the same instrument run should be checked to determine if it is because of the primary antibody or one of the common secondary reagents. Tissues may have been

improperly collected, fixed or deparaffinized. The proper procedure should be followed for collection, storage and fixation.

3. If excessive background staining occurs, high levels of endogenous biotin may be present. A biotin blocking step should be included unless a biotin-free detection system is being used in which case any biotin present would not be a contributing factor to background staining.
4. If all of the paraffin has not been removed, the deparaffinization procedure should be repeated.
5. If specific antibody staining is too intense, the run should be repeated with incubation time shortened by 4 minute intervals until the desired stain intensity is achieved.
6. If tissue sections wash off the slide, slides should be checked to ensure that they are positively charged.

For corrective action, refer to the Step By Step Procedure section, the automated slide stainer Operator's Manual, or contact Cell Marque customer service.

## REFERENCES

1. Noriyuki, Sakata et al. IgG4-positive plasma cells in inflammatory abdominal aortic aneurysm: the possibility of an aortic manifestation of IgG4-related sclerosing disease. *Am J SurgPathol* April 2008; 32 (4):553-559.
2. Sudhir, Dhobale et al. IgG4 related sclerosing disease with multiple organ involvements and response to corticosteroid treatment. *J ClinRheumatol* 2009; 15:354-357.
3. Yaqiong, Li et al. Immunohistochemistry of IgG4 can help subclassify Hashimoto's autoimmune thyroiditis. *Pathology International* 2009; 59: 636-641.
4. Wah, Cheul, et al. IgG4-related sclerosing mastitis: description of a new member of the IgG4-related sclerosing diseases. *Am J SurgPathol* 2009; 33:1058-1064.

5. Vikram, Deshpande et al. IgG4-associated cholangitis: a comparative histological and immunophenotypic study with primary sclerosing cholangitis on liver biopsy material. *Modern Pathology* 2009; 22:1287-1295.
6. Yasuharu, Sato et al. Systemic IgG4-related lymphadenopathy: a clinical and pathologic comparison to multicentric Castleman's disease. *Modern Pathology* 2009; 22: 589-599.
7. Masanori, Koyabu et al. Analysis of regulatory T cells and IgG4- positive plasma cells among patients of IgG4-related sclerosing cholangitis and autoimmune liver diseases, *J Gastroenterol* Published online: 20 January 2010.
8. Terumi, Kamisawa et al. Sclerosing cholangitis associated with autoimmune pancreatitis differs from primary sclerosing cholangitis. Published online: May 21, 2009.