



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Atresia de vías biliares: Análisis de SOX9 y perfil inflamatorio en biopsias hepáticas

Jenny Elizabeth Arboleda-Bustán



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

Atresia de vías biliares: Análisis de SOX9 y perfil inflamatorio en biopsias hepáticas

Memoria de tesis doctoral presentada por

Jenny Elizabeth Arboleda-Bustán

para optar al grado de doctor por la Universitat de Barcelona

Dirigida por

Teresa Ribalta Farrés

Catedrática de Anatomía Patológica del Departamento de Fonaments Clínics de la Universitat de Barcelona,
consultora sénior del Hospital Clínic e investigadora del IDIBAPS

y Asteria Albert Cazalla

Cirujana Pediátrica del Hospital Clínic de Barcelona-Hospital Sant Joan de Déu (jubilada), exprofesora
asociada de Pediatría de la Universitat de Barcelona (directora y tutora)

Programa de doctorado Medicina i Recerca Translacional
Facultat de Medicina y Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona

Septiembre, 2023



AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que han contribuido de manera significativa a la realización de esta tesis y al Hospital Sant Joan de Déu.

Primero y ante todo, quiero agradecer a Dios por cada oportunidad.

A mi madre por enseñarme a no renunciar a las metas trazadas.

A mis directoras de tesis, Prof. Teresa Ribalta y Dra. Asteria Albert, por su orientación constante, apoyo incansable y sabiduría invaluable. Sin su orientación experta esta tesis no habría sido posible.

Agradezco a mis familiares y amigos por su paciencia, comprensión y aliento constante durante este arduo proceso. Sus palabras de aliento y apoyo emocional han sido fundamentales para mantenerme enfocada.

Por último, pero no menos importante, agradezco a todos los participantes de mi estudio, cuya contribución fue esencial para la recopilación de datos y la obtención de resultados significativos.

En resumen, esta tesis es el resultado de un esfuerzo colectivo y del apoyo de muchas personas y una institución. Estoy profundamente agradecida a todos ellos por su contribución a este logro académico.

Jenny E. Arboleda-Bustán

Septiembre 2023

FINANCIACIÓN

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo del Hospital Sant Joan de Déu de Esplugues de Llobregat-Barcelona.

ÍNDICE

1. Lista de acrónimos	
2. Índice de tablas y figuras	
3. Enumeración de artículo	
4. Resumen de la Tesis	
5. Introducción.....	1
5.1 Atresia de vías biliares.....	1
5.2 Evaluación anatomopatológica de la biopsia hepática: Interpretación e importancia clínica.....	15
5.3 SOX9.....	30
5.4 Inflamación en la AVB.....	31
6. Hipótesis.....	36
7. Objetivos.....	37
8. Material, métodos y resultados	38
9. Discusión.....	60
9.1 SOX9.....	61
9.2 Reacción inflamatoria.....	64
9.3 Relación entre SOX9 y reacción inflamatoria.....	67
9.4 Fortalezas y limitaciones del estudio.....	69
9.5 Utilidad del trabajo y nuevas perspectivas.....	70
10. Conclusiones.....	72
11. Bibliografía.....	74
12. Anexo	81

1. LISTA DE ACRÓNIMOS

AVB: Atresia de vías biliares

ATP: Trifosfato de adenosina

BASM: Biliary Atresia-Splenic Malformation

CMV: Citomegalovirus

DPM: Malformación de la placa ductal

HLA: Antígeno leucocitario humano

Índice CB/EP: N° de conductos biliares/N° de espacios porta

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

LES: Lupus eritematoso sistémico

SOX9: Gen "Sex determining region Y-box 9"

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

T-CD4: Células T colaboradoras (*T-helper*)

T-CD8: Células T citotóxicas (*T-killer*)

2. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1: Causas de hiperbilirrubinemia directa en el neonato

Tabla 2: Diagnóstico diferencial de la hiperbilirrubinemia directa en lactantes

Tabla 3: Lista de anticuerpos del estudio inmunohistoquímico

Tabla 4: Tabla de puntuación de datos para la evaluación inmunohistoquímica

Tabla 5: Datos demográficos, clínicos y serológicos de los grupos

Tabla 6. Resultados inmunohistoquímicos de marcadores de células inmunitarias

Figuras

Figura 1: Hígado normal

Figura 2: Biopsia hepática percutánea

Figura 3: Biopsia hepática en cuña

Figura 4: Reacción ductular

Figura 5: Fibrosis portal con puentes fibrosos

Figura 6: Hígado cirrótico

Figura 7: Interfaz fibrosis-parénquima lobulillar

Figura 8: Inflamación portal

Figura 9: Tapones biliares en ductos portales

Figura 10: Necrosis lobulillar focal con pigmento libre

Figura 11: Hepatocitos gigantes multinucleados

Figura 12: SOX9 y ductos reactivos

Figura 13: Grados de intensidad de expresión de SOX9

Figura 14: SOX9 y malformación de la placa ductal

Figura 15: SOX9 en interfaz porto-lobulillar

Figura 16: SOX9 en caso control

Figura 17: Escala SOX9

Figura 18: Área bajo la curva ROC

Figura 19: Curva de Kaplan-Meier

Figura 20: Expresión inmunohistoquímica de CD20

Figura 21: Expresión inmunohistoquímica de CD4

Figura 22: Expresión inmunohistoquímica de CD8

Figura 23: Expresión inmunohistoquímica de CD8 en caso control

Figura 24: Expresión inmunohistoquímica de Tia-1

3. ENUMERACIÓN DE ARTÍCULO

Tesis en formato clásico con un artículo publicado anexo

La tesis consta de 3 objetivos y un artículo publicado

Referencia completa del artículo:

Arboleda-Bustan JE, Ribalta T, Albert A, Cuadras D, Martín-Solé O. Expression of Protein SOX9 in Biliary Atresia. J Pediatr Gastroenterol Nutr [Internet]. 2022 Feb;74(2):e21–6. Available from:

<https://journals.lww.com/10.1097/MPG.0000000000003356>

Factor de impacto: 3,3555

Cuartil Q1 del Journal Citation Reports (JCR)

JPGN es la revista oficial de la European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition y de la North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition.

4. RESUMEN DE LA TESIS

La atresia de vías biliares es una colangiopatía obstructiva neonatal infrecuente, caracterizada por cambios obstructivos progresivos tanto en la vía intrahepática como en la extrahepática, que se acompaña de fibrosis y obliteración, lo que conduce precozmente a cirrosis hepática. La presentación clínica es progresiva y semejante a la de otras colestasis más frecuentes y menos graves. El tratamiento y pronóstico dependen de un diagnóstico precoz y certero. La prueba más fidedigna es la colangiografía intraoperatoria con biopsia hepática. El examen histopatológico es fundamental para obtener información precisa sobre el estado del hígado y ayudar al manejo de la enfermedad; sin embargo, la rentabilidad de la biopsia puede disminuir debido a múltiples factores. En este trabajo se explora la reactivación de SOX9 y las características de la inflamación en el hígado de los lactantes con AVB, buscando información complementaria clínicamente relevante que ayude al diagnóstico y al tratamiento de la enfermedad.

Hipótesis

1. El hígado de lactantes con atresia de vías biliares sobreexpresa SOX9.
2. El aumento en la expresión de SOX9 está en relación con la inflamación en el momento de la biopsia.
3. La distribución del infiltrado inflamatorio se relaciona con el daño hepático.

Objetivos

1. Estudiar si el aumento en la expresión de SOX9 es específico de los lactantes con atresia de vías biliares (AVB).
2. Explorar si la expresión de SOX9 se correlaciona con el grado de daño fibroinflamatorio en el lactante con AVB y, por ende, predice el grado de progresión del daño hepático.
3. Analizar la actividad inflamatoria en el hígado de lactantes con AVB en el momento de la reparación quirúrgica. Para ello:

3a. Estudiar el inmunofenotipo y la distribución de diferentes tipos de células inflamatorias.

3b. Determinar si existe correlación entre la expresión de SOX9 y la celularidad inflamatoria.

Método

Se han revisado las biopsias hepáticas de pacientes con AVB en el momento del diagnóstico, tomadas entre 1998 y 2018 durante la portoenterostomía de Kasai o inmediatamente antes. Estas biopsias forman el grupo AVB. El grupo Control son muestras de hígado obtenidas en autopsias o biopsias de lactantes sin enfermedad hepática primaria. Se emparejaron dos controles de la misma edad (± 2 meses) con cada caso de AVB. Para investigar la especificidad del SOX9 en la AVB se comparó también un tercer grupo de biopsias de pacientes con otras hepatopatías (grupo OH); estas biopsias se seleccionaron sólo para coincidir con la edad de los pacientes con AVB, independientemente del diagnóstico. Se estudió la expresión inmunohistoquímica de SOX9 y de diversos tipos de células inflamatorias que expresaran CD20, CD4, CD8, CD138 y Tia-1. Se examinó la cantidad de células marcadas, la intensidad de la tinción y la localización dentro de la microarquitectura hepática. Se compararon los resultados con información clínica como edad, infección vírica o supervivencia del hígado nativo. Se compararon los grupos y se buscaron correlaciones entre SOX9 y los distintos marcadores de celularidad inflamatoria. Para ello se utilizaron las pruebas estadísticas adecuadas según el tipo de datos (semicuantitativos o numéricos, continuos o no, de distribución paramétrica o no). Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo. El análisis estadístico se realizó utilizando SPSS 23 (IBM Corp, Armonk, NY).

Resultados

Los grupos de estudio fueron 26 AVB, 52 Control y 16 OH, con edades medias de 2,1, 1,1 y 3,5 meses. Con el método semicuantitativo utilizado se le ha dado un valor numérico entre 0 y 11 a la expresión de SOX9 en cada biopsia. De esta manera se ha obtenido un *score*, la Escala SOX9. La puntuación en la Escala SOX9 fue (media

± desviación estándar) de $7,62 \pm 2,06$ en el grupo AVB, $0,58 \pm 0,84$ en los Controles y $3,56 \pm 2,12$ en el grupo OH ($p < 0,001$). Todos los casos AVB puntuaron ≥ 4 , mientras que todos los casos Control tuvieron < 4 puntos. El punto de corte en 4 resultó tener una sensibilidad del 100% y especificidad del 88,24% para diferenciar AVB de Controles y de OH. La expresión de SOX9 fue intensa en los núcleos de los ductos proliferados en los espacios porta y los puentes fibrosos. No se pudo hallar relación entre SOX9 y supervivencia hepática. Todas las biopsias del grupo AVB mostraron algún grado de inflamación; ésta fue leve en 4 casos (15,4%), moderada en 15 (57,7%) y severa en 7 (26,9%), mientras que en el grupo Control sólo 16 casos (30,8%) presentaron inflamación leve, y los 36 restantes (69,2%) no mostraron ningún signo de reacción inflamatoria ($p < 0,001$). El estudio inmunohistoquímico evidenció una expresión predominante de linfocitos T citotóxicos en todos los casos AVB. Estos linfocitos CD8+ se concentraban en los espacios porta y los puentes fibróticos, con menor presencia en el compartimento lobulillar. Otros linfocitos T, B y células plasmáticas se veían con menor frecuencia o estaban ausentes en los diferentes compartimentos hepáticos. Se confirma una correlación positiva fuerte entre linfocitos T CD8+ y la Escala SOX9.

Conclusiones

1. En el hígado del lactante con AVB, SOX9 se expresa sobre todo en el epitelio ductular reactivo, según un patrón claramente distinto del de lactantes sin AVB. La Escala SOX9, por lo tanto, puede tener interés diagnóstico.
2. Los linfocitos T activados son los elementos clave de la inflamación en la AVB en el momento de la portoenterostomía.
3. Ya que estas células son actores necesarios en la progresión del daño hepático, sería teóricamente posible que un tratamiento dirigido a modular la inflamación en estadios precoces de la enfermedad aportase algún beneficio, enlenteciendo o deteniendo su progresión.

5. INTRODUCCIÓN

5.1 Atresia de vías biliares

Definición

La atresia de vías biliares (AVB) es una colangiopatía obstructiva neonatal (1) caracterizada por cambios obstructivos progresivos tanto en la vía intrahepática como en la extrahepática, que se acompaña de fibrosis y obliteración, lo que conduce precozmente a cirrosis hepática (2).

Epidemiología

La AVB es una enfermedad que se presenta habitualmente de forma aislada. Su incidencia se estima en alrededor de 1 caso por cada 15.000 recién nacidos vivos en Gran Bretaña (1). Sin embargo, las variaciones en la incidencia en entre diferentes regiones del mundo son amplias, por ejemplo en la Polinesia alcanza los 32 casos por cada 100.000 nacimientos vivos (más de 5 veces más frecuente que en nuestro medio. En un estudio de 30 años en Japón (1386 pacientes en 132 instituciones) la incidencia fue de 10,4 casos por cada 100.000 recién nacidos (35% más que en Europa occidental y EEUU). Este contraste en las cifras subraya la influencia que pueden tener diversos factores en el desarrollo de la AVB en distintas áreas geográficas (1,2).

Clasificación

Desde el punto de vista malformativo:

- Formas no sindrómicas: la AVB es una malformación aislada en el 70-80% de los casos (1).

- Formas sindrómicas: el 15-30% de los casos de AVB se asocia a poliesplenía, anomalías de la vena porta, malrotación intestinal y *situs inversus*, lo que constituye en conjunto el síndrome BASM (Biliary Atresia-Splenic Malformation). En ocasiones se ha asociado también a cardiopatía congénita(3,4).

Desde el punto de vista quirúrgico:

- Atresia tipo I: Obliteración del colédoco, con libre tránsito por los conductos biliares proximales.

- Atresia tipo II: Obstrucción del conducto hepático, con dilatación quística de los conductos a nivel del hilio hepático. De este tipo se distinguen dos formas:

II a) Conductos cístico y colédoco abiertos

II b) Conducto cístico y colédoco obliterados

- Atresia tipo III: Es la atresia del colédoco, del cístico y de la vesícula biliar. Esta es la forma más frecuente (90%), y quizás en el futuro sea la única forma reconocida de AVB, ya que su etiología podría ser diferente de la de las otras formas. Es también la variante que tiene peor pronóstico porque es progresiva.

Etiopatogénesis

Ha sido motivo de controversia durante décadas y todavía no se conoce bien. En la actualidad se cree que la AVB puede ser un final común a una agresión precoz al epitelio ductal; la agresión podría tener diversas etiologías (5):

- Vírica

El factor desencadenante del daño epitelial ductal y la subsecuente obstrucción progresiva de los conductos sería la infección por virus colangiotropos. Los reovirus, rotavirus C y citomegalovirus (CMV) pueden estar implicados (6–8)

- Tóxica

Entre los numerosos insultos endógenos y exógenos postulados en la patogénesis de la AVB se incluyen sustancias consumidas durante la gestación como las anfetaminas y el alcohol, fitotóxicos como herbicidas o pesticidas, micotóxicos,

productos agrícolas y toxinas industriales u otras sustancias químicas; en definitiva todos estos factores pueden contribuir en la patogénesis, pero no han sido suficientemente estudiados (9,10).

Genética

En la AVB sindrómica (BASM) se han identificado genes con un papel potencial en su desarrollo. Entre estos genes se encuentran CFC1, que codifica la proteína CRYPTIC, y PDG(11). Estos genes muestran un funcionamiento alterado que impacta la estructura de los hepatocitos y modifica su función, lo que a su vez activa la respuesta inflamatoria en los conductos biliares. Esta reacción conduce a la fibrosis de los espacios porta y a la formación de puentes fibróticos que alteran la microarquitectura hepática, disminuyendo el transporte canalicular de ácidos biliares, que es lo que sucede en la fase inicial de la enfermedad(12).

Otras mutaciones:

Una mutación en el gen PKD1 ha sido vinculada con la AVB en algunos estudios. PKD1 está relacionado con la enfermedad renal poliquística autosómica dominante, y existe evidencia que sugiere su posible implicación en la patogénesis de la AVB (13). El gen GPR98, asociado originalmente con trastornos auditivos y vestibulares, ha mostrado mutaciones en casos de AVB, sugiriendo una posible relación con el desarrollo del sistema biliar. Mutaciones en el gen ATP8B1 se asocian con el síndrome de Byler, una enfermedad rara que afecta el transporte de bilis y puede dar lugar a la obstrucción de las vías biliares(13–15).

Todos estos hallazgos genéticos están aún en el campo de la investigación; hasta la actualidad no se conocen genes con implicación clínica confirmada en la AVB.

- Inmunológica

En estudios de histocompatibilidad se ha observado que los pacientes HLA B12, A95, y B5, tienen cierto grado de vulnerabilidad inmunológica que los haría más susceptibles a la colangiopatía progresiva de la AVB(16–19).

Presentación clínica

- Neonato icterico

Los lactantes con AVB en general parecen saludables al nacer. Sin embargo, debutan con ictericia poco después del nacimiento, lo que puede ser clínicamente indistinguible de la ictericia por hiperbilirrubinemia no conjugada o indirecta. Por lo tanto, la colestasis debe ser investigada en todo neonato cuya ictericia se prolonga más de 15 días(20,21). El primer paso es reconocer los signos de colestasis, que son inespecíficos: ictericia, coluria, acolia, hepatomegalia (22). El laboratorio, las pruebas de imagen y la biopsia hepática son los que darán el diagnóstico.

En el caso de BASM además se deben estudiar las posibles anomalías cardíacas. En la Tabla 1 se resumen las principales causas de hiperbilirrubinemia directa.

Tabla 1: Causas de hiperbilirrubinemia directa en el neonato

Trastornos hereditarios	Colestasis intrahepática	Colestasis extrahepática
Síndrome de Dubin-Johnson Síndrome de Rotor	- Víricas: CMV, Epstein-Barr - Autoinmunes: Cirrosis biliar primaria* Colangitis esclerosante* Déficit de α -1 antitripsina - Inmunológicas: LES neonatal Hemocromatosis neonatal - Lesiones primarias de los conductillos: AVB Cirrosis biliar primaria* Colangitis esclerosante*	Litiasis biliar obstructiva Quiste de colédoco

* Enfermedades autoinmunes con lesión primaria de los conductillos biliares.

-Diagnóstico diferencial

Es necesario hacerlo con las causas de hiperbilirrubinemia en lactantes.

Las causas de hiperbilirrubinemia conjugada o directa, que son mucho menos comunes que las causas de hiperbilirrubinemia indirecta o no conjugada, incluyen infecciones como toxoplasmosis, rubéola, CMV, herpes y hepatitis B, así como alteraciones genéticas tales como el síndrome de Alagille, la deficiencia de α -1 antitripsina, la fibrosis quística, la colestasis intrahepática familiar progresiva y las hepatopatías mitocondriales. En la Tabla 2 se describen las principales características de dichas enfermedades.

Tabla 2: Diagnóstico diferencial de la hiperbilirrubinemia directa en lactantes

Enfermedades	Infecciosas	AVB	Síndrome de Alagille	Déficit de α -1 antitripsina	Colestasis intrahepática progresiva familiar
Colestasis en	30-50%	100%	10-15%	5-10%	10%
Genética		BASM puede asociarse a mutaciones	JAG1 88% NOTCH2 \leq 1%	Cr 14 Autosómica recesiva	PFIC Autosómica recesiva
Clínica	Variable según agente causal	Acolia, coluria, ictericia	Facies peculiar, estenosis pulmonar, colestasis crónica, malformación vertebral	Enfisema pulmonar, cirrosis hepática	Ictericia, prurito, hepatomegalia, retraso del crecimiento y desarrollo. Progresión rápida en los casos graves
Cirrosis	-	Sí	30% adolescencia	30%	Varía según el gen afectado
Requiere trasplante	-	Sí	Sí	Sí	Sí

-Exámenes de laboratorio

Los exámenes de laboratorio deben confirmar la hiperbilirrubinemia directa y descartar otras patologías como las previamente comentadas mediante el estudio inmunológico y genético pertinente. Además se debe examinar la función hepática y evaluar la función metabólica. En los pacientes con AVB es común observar hiperbilirrubinemia y elevación de las transaminasas, glutamiltranspeptidasa y fosfatasa alcalina. Las dos últimas enzimas pueden estar elevadas debido a otras causas de colestasis, aunque la glutamiltranspeptidasa es más específica de la AVB. Un análisis temprano puede descartar también otros diagnósticos como galactosemia, hepatitis vírica o hipotiroidismo, especialmente cuando la ictericia persiste.

El análisis de la función hepática mediante la determinación de albúmina y tiempos de coagulación proporciona información sobre el grado de daño hepático. Además, la historia médica de la madre y de la familia del paciente puede ofrecer indicios de otros síndromes posibles, como el síndrome de Alagille (23).

-Pruebas de imagen

Ecografía

No es posible ver la AVB intrahepática mediante ecografía. También es difícil poder afirmar en el neonato, en ausencia de dilatación, si la vía biliar extrahepática es o no permeable. Sin embargo, la ecografía abdominal puede revelar diversas anomalías, como la existencia de masas tumorales, quiste de colédoco, dilatación de las vías biliares, anomalías vasculares, poliesplenía o signos de hipertensión portal.

Un signo característico de la AVB es el signo del tridente. Este signo se describe como una disposición anormal de las estructuras biliar y vascular en la ecografía que adopta la forma de un tridente. Sin embargo, este signo no está presente en los casos de AVB quística o tipo II. El signo del tridente tiene una especificidad del 98% y una sensibilidad del 85%(24,25).

Se han evaluado numerosos parámetros ecográficos con interés diagnóstico en AVB: grosor del cordón fibroso, diámetro de la vena porta diámetro de la arteria hepática, tamaño del bazo, vesícula biliar visible, longitud y anchura de la vesícula biliar, relación longitud-anchura, contenido de la vesícula biliar y mucosa de la vesícula biliar (24). Como conclusión, hay tres hallazgos ecográficos cuya combinación brinda la máxima fiabilidad para el diagnóstico de la AVB, con una especificidad del 98%, un *odds ratio* (razón de posibilidades) de 11 y una *likelihood ratio* (razón de verosimilitud) de 10,6. Se trata de una relación longitud-anchura de la vesícula biliar superior a 4,1 un diámetro de la arteria hepática mayor de 1,2mm y un diámetro de la vena porta mayor de 4,4mm.

La ecografía Doppler, por su parte, permite evaluar signos de hipertensión portal y otras anomalías vasculares.

Medicina nuclear

La gammagrafía hepática se realiza utilizando derivados del ácido iminodiacético marcados con tecnecio-99m (IDA, DISIDA). Este radiofármaco debe ser captado por el sistema reticuloendotelial hepático y excretado por la bilis, de forma que si la vía biliar es permeable tiene que identificarse el radiofármaco en el duodeno en poco tiempo. Previamente a la prueba, se requiere una preparación de 5 a 7 días con fenobarbital para estimular la excreción de bilirrubina en la bilis y mejorar la captación del radiotrazador por los conductos biliares; con dicha preparación se obtienen imágenes más claras y precisas. Esta prueba tiene una sensibilidad del 82% y una especificidad del 91% (26).

Resonancia magnética

La resonancia magnética con colangiopancreatografía es concluyente entre un 71 y un 82% de casos.

Colangiografía

La colangiografía intraoperatoria durante una laparotomía exploradora es, en última instancia, la prueba clave en el diagnóstico de la AVB. Si la colangiografía intraoperatoria muestra obstrucción biliar (es decir, si el contraste no llena el árbol biliar o no llega al intestino), es necesario realizar una derivación biliar.

Biopsia hepática

El examen histopatológico es esencial tanto para confirmar el diagnóstico en pacientes con sospecha de AVB pero con hallazgos clínicos, biológicos y radiológicos no concluyentes, como para evaluar el grado del daño hepático y ayudar en la toma de decisiones clínicas (27).

La precisión diagnóstica global de la biopsia hepática en la AVB varía del 60% al 95% y depende en parte de la fase de evolución evolutiva de la enfermedad y también de la experiencia del evaluador. Puede llegar a tener una sensibilidad del 100% y una especificidad del 76% (2); sin embargo, los hallazgos histopatológicos varían dependiendo de la edad del lactante y del momento de la enfermedad. Si la biopsia se ha tomado en niños de 6 a 9 semanas de edad, el diagnóstico puede realizarse con seguridad sólo en el 80-90% de los casos (28). El diagnóstico es todavía más desafiante en menores de 6 semanas, ya que no ha transcurrido suficiente tiempo para que sean evidentes los cambios histológicos característicos de la AVB y es posible que la biopsia muestre conductos biliares intactos, sin proliferación (29). En estos pacientes, podría ser necesario repetir la biopsia después de algunas semanas para confirmar la enfermedad (29) aunque una segunda biopsia no estaría indicada en aquellos niños que requieren una resolución quirúrgica inmediata.

-Evolución natural de la enfermedad

La evolución natural de un paciente con AVB varía poco de un individuo a otro. Por lo general, la enfermedad tiende a progresar en una serie de etapas. Inicialmente aparece la colestasis, que se caracteriza por una acumulación de bilirrubina y otros compuestos en la sangre debido a la obstrucción del flujo de bilis; la ictericia que genera la colestasis tiene en el prurito uno de los síntomas más molestos, que además es difícil de tratar. Con el tiempo, esta colestasis da lugar a la formación de fibrosis hepática. La fibrosis progresa hasta ocasionar cirrosis hepática, que es una etapa en la que el daño al hígado se torna más severo: el tejido hepático se va estrangulando y se afecta su función.

La cirrosis sustituye el tejido hepático por tejido fibroso, creando un obstáculo al flujo de la sangre desde la vena porta, que se desvía retrógradamente hacia territorios a menor presión (la vena esplénica, el bazo, los vasos cortos gástricos y las venas hemorroidales), ingurgitándolos y dando lugar a varices esofágicas, hemorroides y ascitis; a ésta última contribuye también la hipoalbuminemia generada por el deterioro de la función hepática (33). Éste es responsable de la presencia de metabolitos potencialmente neurotóxicos en sangre circulante, que normalmente se neutralizarían en el hígado; las hemorragias digestivas y la absorción intestinal de los productos de la sangre, que pasarán por los shunts portosistémicos directamente a la circulación general, también contribuyen a la llamada encefalopatía hepática. La enfermedad no tratada progresa hacia la insuficiencia hepática(30).

-Tratamiento

Derivar la salida de bilis hacia el intestino salvando la obstrucción de la vía biliar extrahepática era la única manera posible de abordar el problema antes de la era del trasplante. Es una maniobra “desesperada”, ya que no puede actuar sobre la

atresia de la vía biliar intrahepática. En palabras de los cirujanos pediátricos de los años 70 y 80, es una operación sin sentido para tratar un problema que aún no entendemos.

Hepatoportoenterostomía o cirugía de Kasai

Fue en Japón donde se inició el tratamiento quirúrgico de la AVB, seguramente por el interés y la necesidad subsecuente a la incidencia más alta de esta enfermedad en oriente. La técnica de Kasai, también conocida como portoenterostomía hepática con Y de Roux, fue descrita por Kasai y Suzuki en 1959 (31).

Técnica quirúrgica

Consta de varios pasos:

1. Incisión subcostal derecha, se explora el lecho hepático. Se identifica la vesícula biliar o alguna estructura biliar que conserve la luz. Se punciona con contraste para realizar una colangiografía. Si no hay paso de contraste hacia el duodeno, se confirma la AVB.
2. Se realiza una biopsia hepática en cuña.
3. Se explora el abdomen en busca de posibles anomalías como bazos accesorios (que podrían indicar BASM).
4. Se realiza una escisión de todo el árbol biliar extrahepático, incluyendo la placa fibrosa en la que ha degenerado el *porta hepatitis*, en el hilio hepático.
5. Luego se anastomosa un asa yeyunal al *porta hepatitis*, ascendida en Y de Roux desde 10 centímetros por debajo del ángulo de Treitz.

Cada vez es posible en más centros llevar a cabo esta técnica por vía laparoscópica, a pesar de la dificultad del tamaño de los pacientes que suelen pesar entre 3,5 y 6 kg (32,33).

La cirugía de Kasai es la primera oportunidad de tratamiento para los pacientes con atresia de vías biliares(34). Después de someterse a una portoenterostomía (cirugía de Kasai), más del 50% de los pacientes normaliza los niveles de bilirrubina en los primeros seis meses. En el resto, la derivación biliar resulta ineficaz.

Son varios los factores que influyen en los resultados:

1. Edad del paciente: La cirugía después de los 3 meses de vida se asocia con un peor pronóstico de supervivencia por la progresión intrahepática de la atresia (35,36).
2. Histología: A mayor grado de fibrosis y concreciones biliares en la biopsia hepática, peor es el pronóstico. Un diámetro menor de 50 micras de los canalículos patentes en el *porta hepatis* en el momento de la resección y la anastomosis también pronostican el fracaso del Kasai.
3. La experiencia quirúrgica: Tanto la experiencia del cirujano como la del centro quirúrgico influyen en los resultados a corto y largo plazo. Mayor experiencia se relaciona con mejores resultados.
4. La evolución hacia la fibrosis y la aparición de complicaciones. Las complicaciones postquirúrgicas, y en especial los episodios de colangitis más allá de los primeros seis meses del Kasai aceleran el deterioro del hígado nativo y precipitan la indicación de trasplante hepático (37).

-Evolución y complicaciones

La evolución viene determinada en primer lugar por la eficacia de la portoenterostomía; en segundo, por la complicación propia de este tipo de derivación, que es la colangitis ascendente; y en última instancia, por la disponibilidad de un trasplante hepático en el momento en que el deterioro de la función hepática o la recurrencia de complicaciones lo hagan necesario para mantener la calidad de vida del paciente (un buen estado nutricional, crecimiento y desarrollo aceptable, y posibilidad de vivir una vida activa de niño, alejada lo más posible del hospital).

La fibrosis del lecho de resección en el *porta hepatis* puede causar el cese del drenaje de bilis inmediatamente después de la cirugía (26). El uso de corticoides ha demostrado mejorar el pronóstico en algunos pacientes con este problema (46); si

no se restablece el flujo biliar, es recomendable revisar quirúrgicamente y ampliar unos milímetros la resección de la placa en el *porta hepatis*.

El paciente que se decolora, pigmenta las heces y normaliza su bilirrubina a los días o semanas del postoperatorio, tendrá un buen pronóstico a corto plazo y podrá conservar su hígado con una función aceptable hasta la edad adulta, si se mantiene libre de colangitis. Cuando esto no sucede, o se acelera la fibrosis hepática por algún motivo, aparecerá la cadena de complicaciones de la cirrosis (hipertensión portal, ascitis, esplenomegalia, varices esofágicas, hemorragias digestivas, trastornos nutricionales y metabólicas), precipitando el tratamiento de rescate con trasplante hepático (38).

Colangitis

Una de las principales complicaciones asociadas a la cirugía de Kasai es la colangitis. La colangitis suele presentarse inmediatamente después de la portoenterostomía, pero también puede hacerlo en cualquier momento del seguimiento. La colangitis es la principal complicación quirúrgica después de la portoenterostomía; puede afectar del 40% al 90% de los pacientes. Esta infección aguda agrava la disfunción hepática preexistente.

Los signos de la colangitis incluyen fiebre, elevación de los niveles de bilirrubina y enzimas hepáticas, así como de reactivos de fase aguda. En algunos casos se pueden observar hallazgos ecográficos compatibles, como la dilatación de la vía biliar intrahepática. La colangitis puede ser causada por traslocación bacteriana a través de la linfa, la vía hematógena a través del sistema venoso, o bien por la colonización de bacterias retrogradas del asa intestinal en la Y de Roux (41,42).

Después de la cirugía de derivación, un 40 a 60% de los pacientes experimentan uno o más episodios de colangitis. Esta complicación aumenta el riesgo de desarrollar cirrosis, lo que en última instancia va a requerir un trasplante hepático (36), por lo que es crucial un diagnóstico temprano y un tratamiento agresivo; es más, está recomendada su profilaxis. Para la profilaxis de colangitis se puede utilizar

la combinación antibiótica trimetoprim-sulfametoxazol (4 mg/kg/día - 20 mg/kg/día), alternando cada 15 días con amoxicilina-clavulánico (10 mg/kg/día) una vez al día, durante los primeros 6 meses(39). En el tratamiento debe ser específico, y para ello debe identificarse el germen. Se puede utilizar piperacilina/tazobactam a una dosis de 300 mg/kg/día, administrada cada 6-8 horas durante 14 días por vía intravenosa (50).

Malignización

La malignización, ya sea como carcinoma hepatocelular o como colangiocarcinoma, es una complicación poco frecuente pero significativa que padecen pacientes con enfermedad hepática crónica, incluida la AVB. Para detectar cualquier posible malignización de manera temprana y poder intervenir oportunamente, se recomienda una monitorización con ecografías, α fetoproteína y otros marcadores tumorales(55).

-Trasplante hepático

La AVB es la indicación más común de trasplante hepático en pacientes pediátricos. Entre el 60% y el 80% de los pacientes con atresia de vías biliares han requerido un trasplante hepático en algún momento de su vida principalmente los que tienen colangitis recurrentes(40); por lo que la mayoría de los pacientes con AVB requieren remplazo funcional hepático.

Muchos expertos consideran hoy que la cirugía de Kasai y el trasplante hepático son parte de una secuencia en el tratamiento de los pacientes con atresia de vías biliares (37).

El trasplante hepático pediátrico tiene complejidades adicionales a las del adulto, por lo que es del máximo interés prolongar la vida útil del hígado nativo, a la vez que mantener al paciente con un estado metabólico y nutricional adecuado y libre de complicaciones.

Las indicaciones específicas para el trasplante en pacientes con AVB son el fracaso de la cirugía de Kasai, colangitis recurrentes, hipertensión portal refractaria, síndrome hepatopulmonar, síndrome hepatorenal (41–44) y otras complicaciones graves de la enfermedad hepática (40,56–58). Debe existir un compromiso entre retrasar lo más posible la edad del trasplante y evitar el deterioro que genera las complicaciones, por lo que el trasplante hepático debe ser realizado de forma oportuna antes de que el paciente llegue a la cirrosis. Es indispensable que esta intervención y su seguimiento se realicen en centros especializados; eso, junto con un trasplante oportuno (sin esperar a que el paciente empiece a deteriorarse) y de donante vivo, son los factores que hacen que la tasa de sobrevida del injerto sea más favorable(49).

La disponibilidad y el acceso a los trasplantes hepáticos varían en América Latina respecto a los países desarrollados debido a diferencias económicas y de prioridades estratégicas y políticas en la región. Aunque algunos países iberoamericanos han establecido programas de trasplante hepático, las barreras económicas y políticas pueden afectar la continuidad de estos programas y limitar el acceso de los pacientes a este tratamiento vital(45,46).

-Pronóstico

La supervivencia del hígado nativo a los 5 años de la cirugía va del 30 al 60%, y sólo el 20% de los pacientes logran mantener su hígado nativo más de 18 años (47). En la actualidad la supervivencia a largo plazo sólo está garantizada donde se pueda ofrecer un trasplante hepático cuando el hígado nativo ya no sea funcional. Cuando se encuentra en la literatura la información de que se trasplantan entre el 60 y el 80% de los pacientes en algún momento de su vida, la única interpretación de este dato es que entre el 40 y el 20% murieron antes de ser trasplantados (tenemos en cuenta que en casos históricos no todos los pacientes con criterio de trasplante se llegaban a trasplantar).

La función hepática influye en el neurodesarrollo del lactante y del niño pequeño. Se ha observado que los niños que continúan en una situación de colestasis o que sufren un fracaso de la cirugía de Kasai y esperan un trasplante hepático entre los 12 y los 24 meses de edad tiene un riesgo cuatro veces mayor de deterioro en su neurodesarrollo (28,51).

En términos de supervivencia global y supervivencia sin trasplante, un estudio multicéntrico reportó que la supervivencia global a los 3 años del trasplante post-Kasai fue del 94%, con una supervivencia del trasplante del 87%(40). Además, la supervivencia de los pacientes con trasplante de donante vivo fue hasta del 91% dependiendo del centro donde se realice (38).

Dado que los pacientes con un drenaje biliar exitoso pueden desarrollar cirrosis más adelante, la hepatopuertoenterostomía y el trasplante hepático son ya parte de una secuencia en el tratamiento de los pacientes con atresia de vías biliares(46).

5.2 Evaluación anatomopatológica de la biopsia hepática: interpretación e importancia clínica

El examen histopatológico es fundamental para obtener información precisa sobre el estado del hígado y apoyar en la planificación de tratamientos adecuados para las diferentes etiologías de colestasis neonatal (Fig.1).

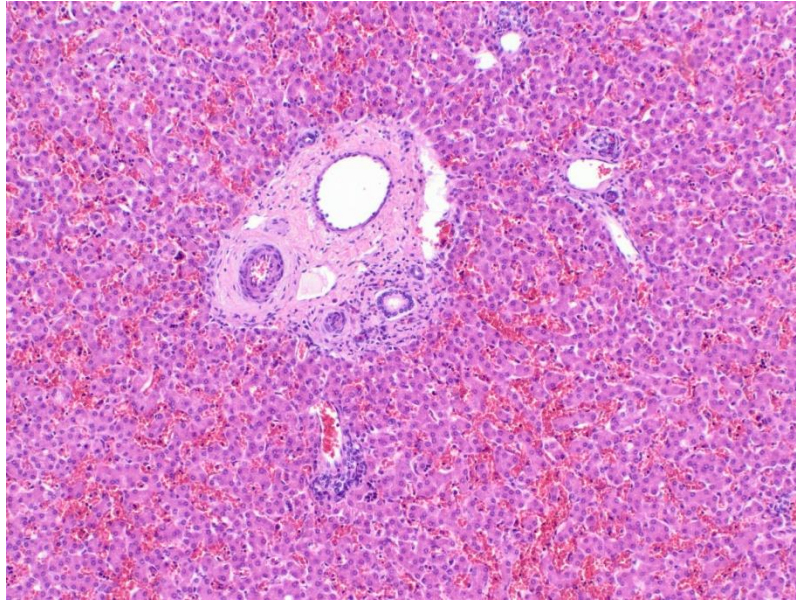


Figura 1: Hígado de un caso Control. En el centro se observa un espacio porta con su tríada normal (arteria, vena y ducto biliar). Está rodeado por el parénquima lobulillar con los hepatocitos formando trabéculas separadas por los sinusoides que contienen elementos circulantes (hematoxilina y eosina; 200x).

En muchos centros, se practican biopsias por punción percutánea con aguja, obteniéndose un cilindro hepático de unos 1 cm de longitud x 0,2 cm de grosor (Fig.2). Estas muestras se consideran en general una herramienta adecuada para el diagnóstico pre-laparotomía de obstrucción biliar, con una precisión diagnóstica reportada de hasta el 94% en grandes series (48).

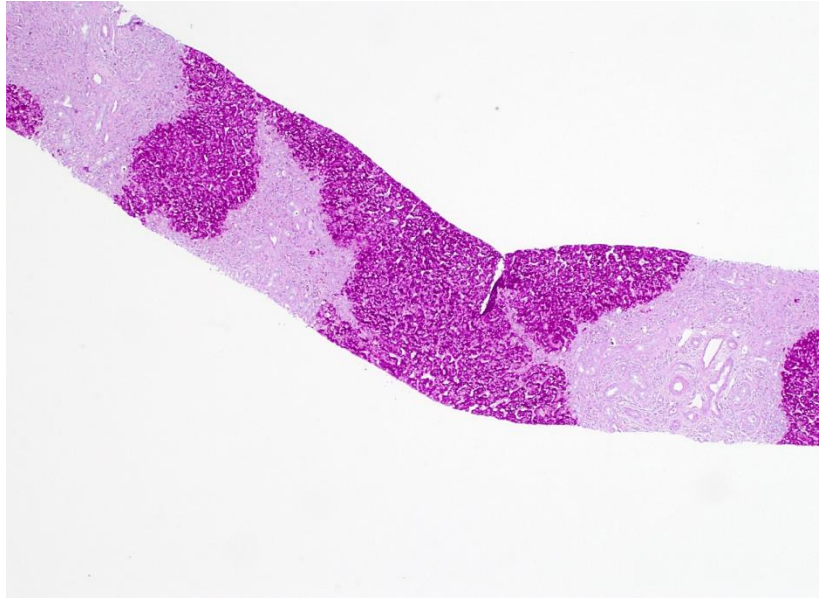


Figura 2: Biopsia hepática percutánea. Sección histológica del cilindro hepático obtenido por biopsia percutánea de un caso de AVB. En esta tinción de P.A.S., el compartimento hepatocitario que es PAS+ está marcadamente disminuido a expensas de una expansión de los espacios porta negativos (PAS, 100x)

Otra opción es obtener biopsias en cuña por laparoscopia, o abiertas, durante la intervención de Kasai (Fig.3). Las biopsias en cuña proporcionan muestras de mayor tamaño para la evaluación histopatológica, pero si son superficiales, la fibrosis subcapsular, que es más patente en dicha región, puede dar una falsa impresión de fibrosis avanzada.

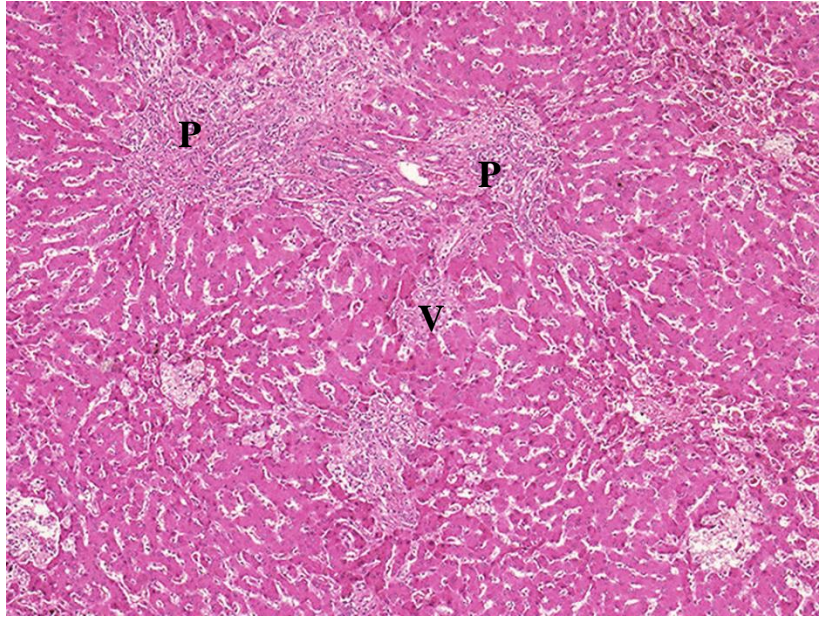


Figura 3: Biopsia hepática en cuña. Aspecto microscópico del hígado de un caso de AVB. Se observan varios espacios porta (P) agrandados por cambios fibroinflamatorios y unidos entre sí por puentes fibrosos. También hay puentes fibrosos entre espacios porta y venas centrales (V) (hematoxilina y eosina; 200x).

El estudio microscópico de rutina de la biopsia se realiza tras fijación en formol e inclusión en parafina. Las secciones histológicas se tiñen con técnicas habituales, como la hematoxilina y eosina para estudiar la morfología general, y una técnica tricrómica para evaluar de forma precisa el grado de depósito anormal de colágena. En casos puntuales se pueden aplicar técnicas histoquímicas como la reticulina para evaluar el colapso debido a pérdida hepatocitaria, o el P.A.S. (ácido peryódico de Schiff) para el glucógeno hepatocitario (Fig. 2), o técnicas inmunohistoquímicas para poner de manifiesto tipos celulares que no son aparentes con las técnicas de rutina, como los miofibroblastos del estroma fibroso (anticuerpo anti-actina de músculo liso), o para distinguir entre tipos celulares diferentes (anti-citoqueratinas de distintos pesos moleculares, marcadores de subpoblaciones de células inflamatorias, etc.).

En la AVB se produce una combinación de cambios fibroinflamatorios y signos de obliteración o estenosis del árbol biliar extrahepático que conducen a la obstrucción del flujo biliar en el parénquima hepático, y consiguientemente a la ictericia colestática. Los criterios en los que se basa la evaluación anatomopatológica incluyen los cambios en los espacios o tractos porta y en los lobulillos hepáticos, es decir en el compartimento hepatocitario.

Las alteraciones que se observan en los espacios porta son: 1. Proliferación de conductillos biliares, también denominada proliferación ductular o reacción ductular; 2. Edema portal; 3. Fibrosis estromal (fibrosis portal que puede extenderse hacia el compartimento lobulillar en forma de tractos o puentes fibrosos, desestructurando la microarquitectura; 4. Inflamación; 5. Tapones o trombos biliares; y 6. Malformación de la placa ductal.

1. La reacción ductular es uno de los principales hallazgos patológicos diagnósticos y permite distinguir la AVB de otras enfermedades colestáticas no obstructivas como la hepatitis neonatal, o el síndrome de Alagille, este último caracterizado por una disminución significativa de los conductos biliares intrahepáticos. La reacción ductular se define como la presencia de más de 5 conductillos biliares por espacio porta y se gradúa de acuerdo con un sistema de puntuación semicuantitativo en: grado leve, de 5 a 9 conductillos biliares por espacio porta; grado moderado, 10 o más conductillos; y grado severo, 10 o más conductillos de morfología angulada o elongada, sin luz patente(49) (Fig. 4). El grado de severidad de la reacción ductular se ha relacionado con el pronóstico(50) y con la supervivencia del niño tras la intervención de derivación biliar(51). También se ha demostrado que existe una correlación directa entre el grado de proliferación ductular y la extensión de la fibrosis(52).

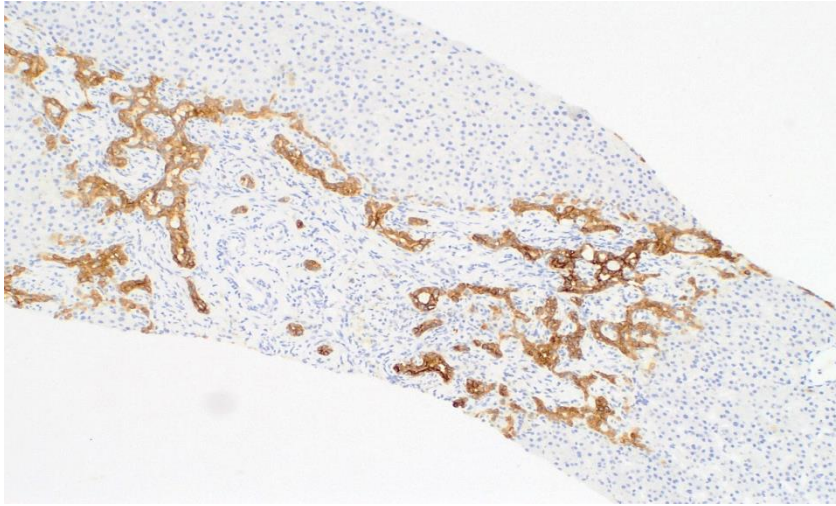


Figura 4: Reacción ductular. La proliferación ductular se resalta mucho más con el marcaje de la citoqueratina CK7 (inmunohistoquímica CK7;250x)

2. El edema portal se caracteriza por un aspecto más laxo del estroma que muestra separaciones o espacios claros de la matriz extracelular en la tinción de hematoxilina y eosina, lo que produce su expansión.

3. La fibrosis estromal es la proliferación patológica reactiva de fibroblastos y miofibroblastos con depósito extracelular progresivo de fibras de colágena, que se produce primariamente en los espacios porta y puede extenderse hacia el compartimento hepatocitario, pero sin acompañarse de fibrosis pericelular; éste se considera un proceso progresivo e irreversible que va distorsionando la arquitectura hepática hasta alcanzar el grado máximo, que es la cirrosis hepática. Dado que la fibrosis se relaciona con la evolución del proceso, la evaluación de su grado es muy relevante para el pronóstico de la cirugía de Kasai(54,55) y es un indicador de la necesidad de trasplante hepático(56).

El sistema de puntuación para la gradación de la fibrosis reconoce

particularmente la fibrosis portal con puentes fibrosos y contempla tres grados de severidad(49,57): grado I (leve), si afecta a menos del 50% de los espacios porta presentes en la muestra hepática estudiada; grado II (moderado), si los puentes fibrosos afectan a más del 50% de los espacios porta sin arquitectura hepática nodular; y grado III (severa), si los puentes fibrosos son porto-portales y porto-centrales (es decir, de espacio porta la vena centrolobulillar) (Fig. 5), afectan a más del 50% de espacios porta y se asocian a arquitectura hepática nodular, es decir a cirrosis hepática morfológicamente establecida (Fig. 6 y 7).



Figura 5: Cilindro hepático con marcada fibrosis de los espacios porta que se expanden y forman puentes fibrosos porto-portales y porto-centrales (color verde) (tricrómico de Masson, 400x).

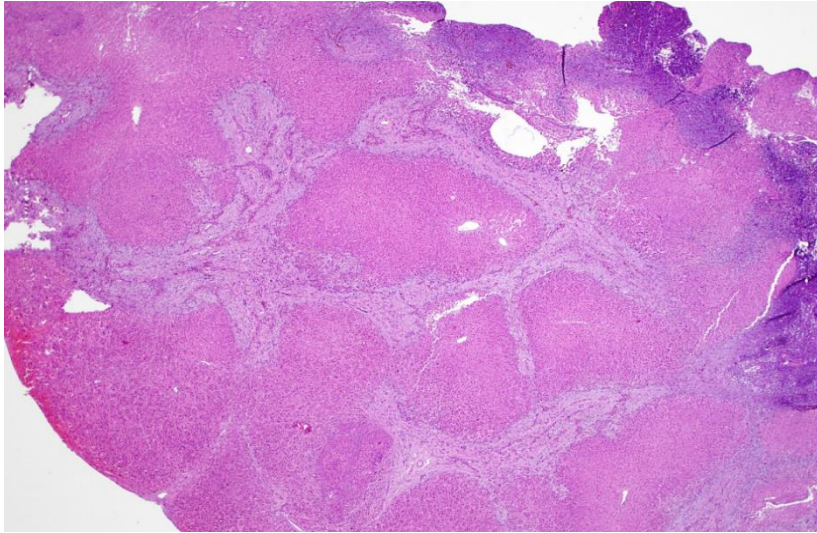


Figura 6: Aspecto general de un hígado desestructurado perteneciente a un caso de AVB en fase avanzada que muestra múltiples nódulos hepatocitarios totalmente rodeados de bandas de fibrosis. En dichas áreas fibróticas hay abundantes ductos reactivos e inflamación, indistinguibles a este aumento (hematoxilina y eosina; 100x).

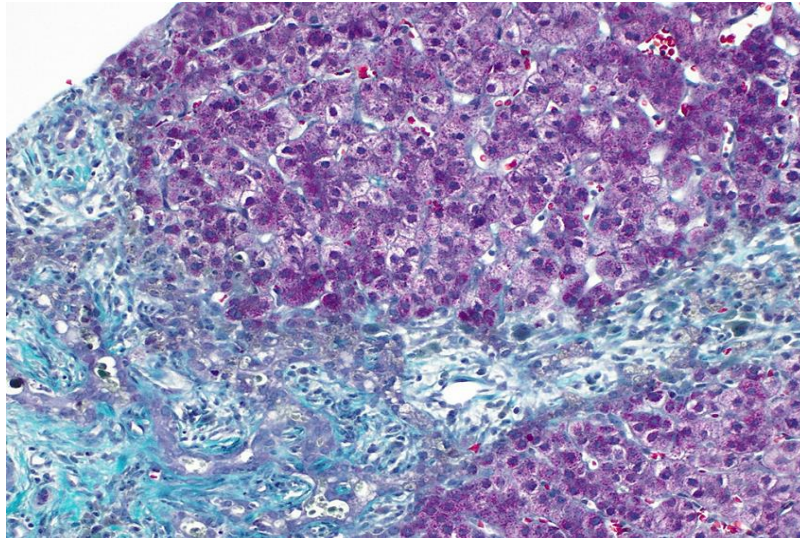


Figura 7: Interfaz entre dos nódulos de cirrosis (color rojo) y el estroma fibroso interpuesto (color verde). Las áreas fibrosas contienen abundantes ductos biliares reactivos anastomosados (canalículos en gris) (tricromico de Masson, 400x).

4. La inflamación estromal, portal y periportal, incluidos los puentes fibrosos, consiste en una combinación de células inflamatorias con predominio de células mononucleadas (linfocitos maduros, macrófagos, ocasionales células plasmáticas y una proporción variable de polimorfonucleares neutrófilos (Fig. 8). La inflamación se gradúa en tres grados: leve, si se afectan menos de 1/3 de los tractos portales presentes en la biopsia; moderada, si hay células inflamatorias en más de 1/3 y hasta 2/3 de los espacios porta; y severa, si la inflamación es densa y afecta a más de 2/3 de los espacios porta(53). Los restos de hematopoyesis que pueden persistir en el hígado del lactante pequeño se asemejan a los infiltrados inflamatorios, pero se distinguen de ellos por la tendencia al agrupamiento y la diferencia de tamaños de los núcleos de las células hematopoyéticas que se encuentran en diferentes estadios de maduración.

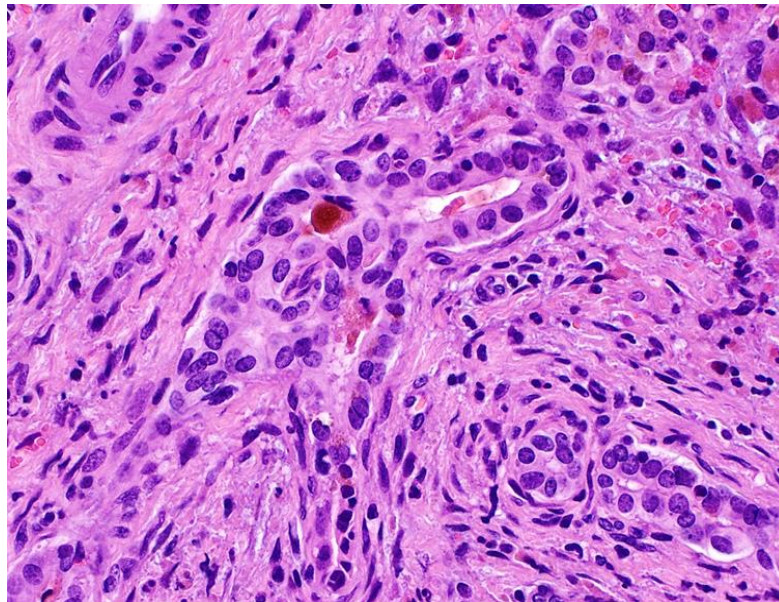


Figura 8: Espacio porta con fibrosis y ductos reactivos rodeados por células inflamatorias que infiltran y lesionan el epitelio ductular. Obsérvese un tapón biliar en la luz de un ducto biliar con núcleos irregulares (H&E, 400x).

5. Los tapones o trombos biliares son acúmulos densos de material biliar que se observan en las luces de los ductos biliares portales y periportales (Fig. 9). El acúmulo se produce también en los hepatocitos en forma de pequeños gránulos intracitoplasmáticos y en los canalículos biliares, y queda libre cuando hay necrosis hepatocitaria (Fig. 10). Cualquier acúmulo de material biliar en el sistema ductal hepático es signo histológico de colestasis extrahepática. La colestasis extrahepática en la biopsia se gradúa en: ausente; leve, si hay acúmulo de bilis restringida a los hepatocitos centrolobulillares; moderada, si hay bilis acumulada en zonas centrolobulillares y periportales, y en ductos biliares portales; y severa, si además existen infartos biliares (53).

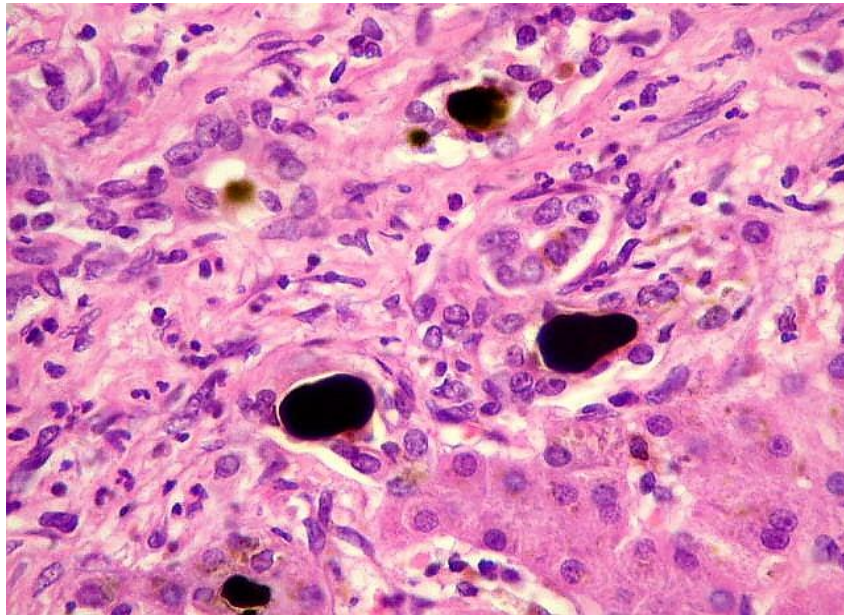


Figura 9: Trombos o tapones biliares de color pardoverdoso oscuro en la luz de varios ductos reactivos (hematoxilina y eosina; 600x).

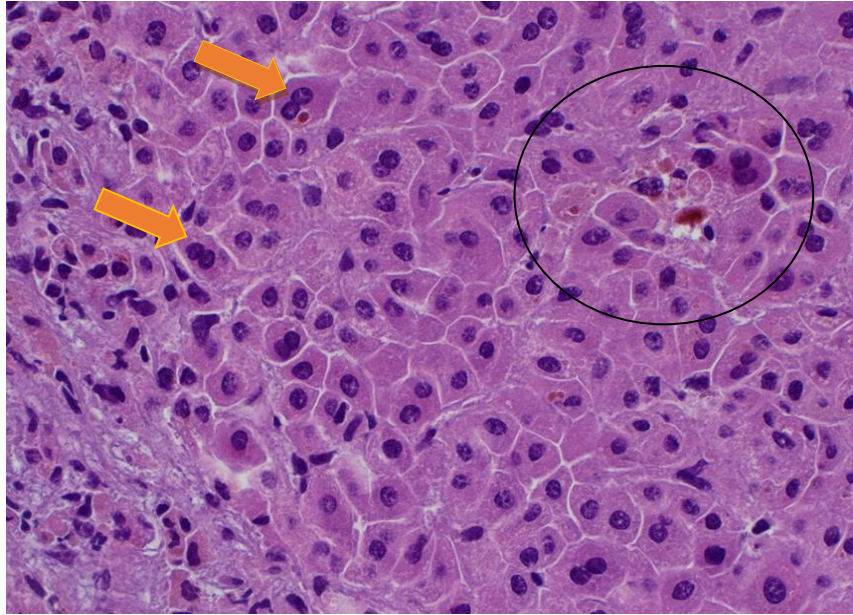


Figura 10. Necrosis hepatocitaria focal con pigmento biliar libre (circunferencia) y hepatocitos binucleados regenerados (flechas) en un caso de AVB. También se observan algunas células inflamatorias en el estroma portal (abajo izquierda) (H&E; 600x).

6. La malformación de la placa ductal es una característica de los conductos biliares intrahepáticos que conservan la configuración fetal. Durante la embriogénesis, el conducto biliar intrahepático se forma cuando las células progenitoras hepáticas bipotenciales (doble potencialidad de diferenciarse a hepatocitos o a epitelio biliar) entran en contacto con el mesénquima de la vena porta. Estas células progenitoras están dispuestas en forma circular alrededor de la vena porta y se diferencian para formar las placas ductales. En un período posterior, las placas ductales son remodeladas para formar los conductos biliares maduros. El fracaso en este proceso de remodelación da como resultado la presencia de estructuras embrionarias de los conductos biliares en los tractos portales, que es el proceso denominado malformación de la placa ductal(52). El hallazgo de malformación de la placa ductal en AVB sugiere que la enfermedad puede

implicar el desarrollo anormal de los conductos biliares intrahepáticos que comienza en el período prenatal y se ha considerado un signo de mal pronóstico(53).La malformación de la placa ductal se identifica por la presencia de conductos biliares incurvados formando anillos concéntricos alrededor de un vaso o punto fibrovascular en los espacios porta(53,58). La estimación de su incidencia varía ampliamente según los estudios entre 21% y 63%(59), lo que puede deberse a la dificultad de diferenciar este proceso de la proliferación ductular propia de la AVB.

Además de las alteraciones descritas, se pueden observar cambios de transformación gigantocelular de los hepatocitos(27) (Fig. 11). Se considera que los hepatocitos gigantes multinucleados en el neonato representan una forma de reacción focal de los hepatocitos inmaduros. La transformación de los hepatocitos en células gigantes no es específica de la AVB y se encuentra en un espectro de enfermedades como respuesta a diversas agresiones, tales como estrés oxidativo, modificaciones ambientales u hormonales, y también a aquellas lesiones celulares que afectan la integridad de la membrana celular y ocasionan perturbaciones en la organización de los filamentos intermedios citoplasmáticos de los hepatocitos. Cuando se encuentran hepatocitos gigantes en la biopsia de un paciente colestásico con sospecha clínica de AVB es fundamental descartar otras causas de colestasis neonatal, como las infecciones víricas, la hepatitis neonatal y el síndrome de Alagille entre otras, si bien en la mayoría de casos no se aclara la etiología y se clasifican como colestasis idiopáticas(52,53).

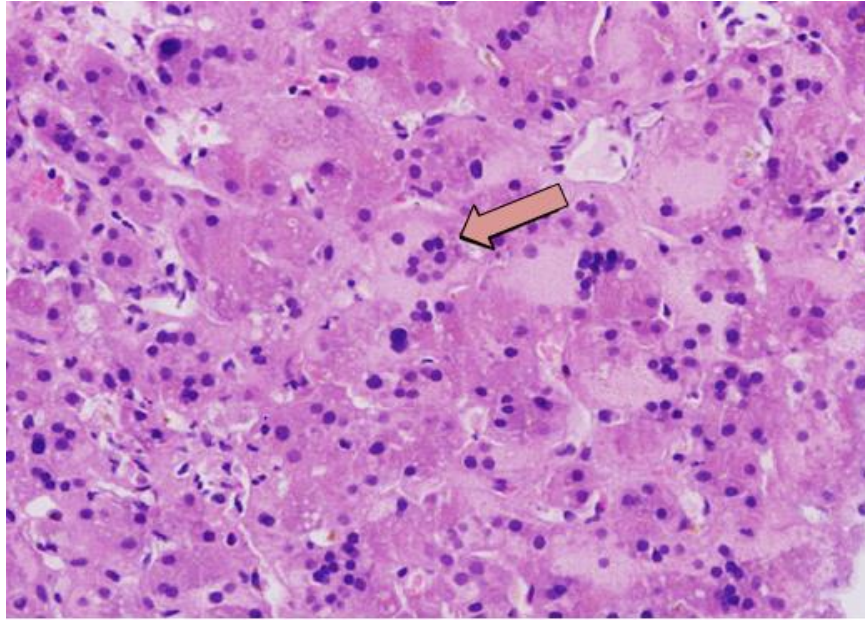


Figura 11: Caso de AVB con focos de hepatocitos gigantes multinucleados (flecha) (H&E, 400X).

Como se ha mencionado anteriormente, la biopsia hepática juega un papel fundamental en el diagnóstico de la colestasis en lactantes. Es de vital importancia detectar rápidamente la presencia de obstrucción biliar para poder realizar la portoenterostomía lo antes posible. Sin embargo, la interpretación de las biopsias hepáticas en la colestasis infantil a menudo representa un desafío para el patólogo, ya que las características histológicas de muchos trastornos que causan colestasis en lactantes se superponen, y además son dinámicas y varían con la edad(29).

Hay toda una serie de enfermedades hepáticas no AVB en el neonato que pueden simular morfológicamente la AVB; las principales son: síndrome de Alagille, hepatitis neonatal idiopática, hepatitis por CMV, fibrosis quística, Niemann-Pick tipo C, colestasis con displasia opticoseptal y déficit de α -1 antitripsina. A menudo, cuando los cambios observados no son concluyentes, el diagnóstico acaba siendo de colestasis indeterminada. En un estudio para intentar identificar aquellos parámetros morfológicos que ayudan a distinguir entre AVB y no AVB en la biopsia

hepática, Russo y cols.(62) identificaron ocho hallazgos histológicos discriminantes en el análisis univariante: trombos biliares, moderada o marcada reacción ductular generalizada; edema estromal portal, fibrosis marcada; pseudorosetas prominentes; infiltrados de neutrófilos peribiliares en cantidad moderada a marcada y daño ductal biliar interlobulillar, que fueron significativos en la AVB, mientras que los hepatocitos gigantocelulares, paucidad de ductos biliares, macroesteatosis y hematopoyesis extramedular lobulillar se asociaron más con otras colestasis. En el análisis multivariante, después de ajustar variables clínicas como la edad en el momento de la biopsia y la presencia de otras alteraciones histológicas, se identificaron cinco cambios independientes como predictores histológicos del diagnóstico de AVB, que fueron los trombos biliares, edema portal, ausencia o paucidad de ductos biliares, ausencia o muy ocasionales células gigantes y ausencia o mínima hematopoyesis. Cuando una biopsia cumplía con estos cinco criterios morfológicos, había un índice de concordancia para el diagnóstico de AVB vs colestasis no AVB de 0.89 (95% CI: 0.84, 0.93), lo que resalta la importancia de estos hallazgos histológicos en el diagnóstico precoz de la AVB. En efecto, la identificación de parámetros histopatológicos fiables que se relacionen mejor con la AVB en biopsias tempranas de pacientes con colestasis clínicamente no aclarada puede contribuir a reducir la proporción de laparotomías negativas y la morbilidad, especialmente en países en vías de desarrollo(63).

La precisión diagnóstica de la biopsia hepática en la AVB varía entre el 60% y 95%(62), dependiendo de si la serie de pacientes publicada pertenece a una sola o a varias instituciones, de la experiencia del evaluador y de la fase evolutiva de la enfermedad. En lactantes de 6 a 9 semanas, el diagnóstico anatomopatológico de seguridad es factible hasta en el 90% de los casos, mientras que en edades inferiores los cambios histológicos característicos suelen ser menos aparentes y pueden resultar inespecíficos. En el trabajo de Russo y cols.(62) se comparó el diagnóstico clínico final con el diagnóstico anatomopatológico de la biopsia por

aguja pre-laparotomía en un subgrupo de 136 pacientes confirmados de AVB y 91 pacientes con colestasis no-AVB (básicamente síndrome de Alagille, hepatitis neonatal idiopática y déficit de α -1 antitripsina), extraído de un estudio longitudinal prospectivo multicéntrico de ChiLDReN Network (PROBE; Clinicaltrials.gov NCT00061828) del National Institute of Health (NIH) de los Estados Unidos de América. Las tres categorías en las que se agruparon los diagnósticos anatomopatológicos de AVB fueron: 1. compatible con obstrucción de conductos biliares grandes (OCBG); 2. indeterminado; y 3. no compatible con OCBG. En dicho análisis, el 78,6% de los casos se diagnosticó como compatible con OCBG, y el 20,6% restante se dividió por igual entre el grupo indeterminado (10,3%) y el no compatible con OCBG (10,3%). La asignación a una de estas tres categorías no varió con la edad del niño en el momento de la biopsia.

Varios estudios han intentado correlacionar las características histológicas del hígado con el curso clínico de la AVB, pero la mayoría están basados en instituciones individuales y sus resultados son variables y a menudo conflictivos. Algunos investigadores han reportado una asociación entre el aumento de fibrosis y una mala evolución clínica (49), mientras que otros han determinado que es la inflamación lobulillar (64), o el grado de proliferación biliar (51), o la malformación de la placa ductal (65), lo que se asocia a una peor evolución. Algunos investigadores no observaron ninguna relación entre la histología del hígado y el pronóstico (66). Otros han identificado dos patrones de AVB mediante el análisis de regresión logística de 16 parámetros histopatológicos (67): 1. Patrón favorable: grados de fibrosis I y II, menor grado de proliferación ductal (leve o moderada) y presencia de tapones biliares; 2. Patrón no favorable: grados de fibrosis III y IV, mayor reacción ductular (severa) y presencia de células gigantes.

De todo lo anterior se deduce la importancia clínica de un diagnóstico lo más precoz y preciso en la biopsia de aquellos pacientes con sospecha de AVB; sin embargo,

son varios los factores que pueden mermar el rendimiento de esta prueba tan esencial. En este trabajo hemos centrado la atención en dos elementos: el estudio de la expresión de SOX9 en la AVB, un factor de transcripción esencial en el período embrionario, pero con potencial de reactivarse en la vida postnatal, y el análisis del abanico de células inflamatorias que se encuentran en el momento de la biopsia.

5.3 SOX9

El gen SOX9 (sex determining region Y-box 9) pertenece a la superfamilia de genes SOX de factores de transcripción y se localiza en el cromosoma 17q24 humano; es un regulador clave en muchos procesos del desarrollo, como la condrogénesis, la neurogénesis, el desarrollo de las gónadas masculinas, del epitelio respiratorio, del epitelio intestinal o de las válvulas y los septos cardíacos. Las mutaciones del gen provocan la displasia campomélica caracterizada por displasia esquelética y disgenesia gonadal. En el adulto, SOX9 parece ser necesario para el mantenimiento de las células madre y las células progenitoras en diferentes órganos y tejidos (68–71), incluido el hígado. En la embriología hepática, SOX9 desempeña un papel crucial en el desarrollo de los conductos biliares (69). Su expresión se observa tempranamente en los hepatoblastos cerca del mesénquima de la vena porta. Estos hepatoblastos que expresan SOX9 se diferencian en precursores de colangiocitos y forman la placa ductal, que está compuesta por una capa de células que expresan SOX9 y que recubre las ramas de la vena porta. La inactivación homocigótica de los alelos de SOX9 en ratones *knockout* conduce a la ausencia de morfogénesis del árbol biliar(69). Por lo tanto, SOX9 resulta ser el marcador más temprano del linaje biliar.

Según algunos estudios recientes en pacientes adultos, se ha observado que la proteína SOX9 se expresa en las áreas de fibrosis hepática. Esto sugiere que SOX9 podría desempeñar un papel mediador en el inicio y progresión de dicha fibrosis, planteando la posibilidad de utilizar la expresión de SOX9 como un factor adicional

para la estratificación de la fibrosis hepática (8,72). Se ha observado un aumento de las proteínas de matriz reguladas por SOX9 en el suero de pacientes, que se ha relacionado con la gravedad de la fibrosis hepática(49). Varios estudios sugieren que la expresión del gen SOX9 puede predecir la progresión a cirrosis en adultos, mientras que la falta de expresión protege contra la fibrosis hepática. Estos hallazgos resaltan la importancia de SOX9 en la formación y maduración de los conductos biliares, y sugieren que la detección de SOX9 podría ser útil en la evaluación de la patología biliar en pacientes con AVB(69,73).

En la AVB se expresa SOX9 en el epitelio ductular reactivo y, ectópicamente, en los hepatocitos, especialmente en el momento de la cirugía de Kasai(3,72); es posible, por tanto, que el SOX9 esté implicado en las fases precoces del desarrollo de la cirrosis en pacientes con AVB. La identificación temprana de alteraciones en SOX9 podría permitir un diagnóstico más preciso y una intervención más oportuna para mejorar el pronóstico de los pacientes.

La detección inmunohistoquímica de la proteína SOX9 se ha utilizado con éxito como marcador en el estudio de la formación de órganos y tejidos durante la embriogénesis, así como en el diagnóstico y pronóstico de diferentes tipos de neoplasias (50–52). En este estudio hemos investigado la expresión de SOX9 mediante inmunohistoquímica en biopsias hepáticas de pacientes con AVB con el fin de determinar la ubicación precisa de SOX9, su especificidad y su posible relevancia diagnóstica en el contexto de la AVB.

5.4 Inflamación en la AVB

La reacción inflamatoria es un hallazgo anatomopatológico llamativo y constante en la biopsia de la AVB, y es determinante en la caracterización del daño hepático (53). Su implicación en la patogénesis de la enfermedad parece cada día más evidente. La presencia de inflamación crónica prominente en los espacios porta y otras

estructuras hepáticas en la AVB sugiere que una infección vírica, un tóxico y/o algún mecanismo inmunológico podrían desencadenar la lesión ductular(54). Los estudios exhaustivos sobre diferentes virus potencialmente causales, la mayoría en modelos animales (CMV, Epstein-Barr, reovirus, rotavirus, y otros), han tenido, sin embargo, resultados no concluyentes hasta ahora(6). También se ha asociado la AVB con disbiosis de la microbiota intestinal(55,56).

Los estudios más recientes están revelando que la activación de la respuesta inmune como consecuencia de un daño al epitelio biliar juega un papel importante en la promoción del proceso inflamatorio, la liberación de citoquinas inflamatorias y la génesis y progresión de la fibrosis (57). El hecho de que la enfermedad progrese a la cirrosis en más de la mitad de los pacientes con AVB operados mediante cirugía de Kasai (44,47,58) sugiere que la fibrosis hepática no puede ser consecuencia únicamente de la obstrucción biliar y que debe haber otros mecanismos más complejos involucrados en su patogenia.

La inflamación que se observa en la biopsia hepática de la AVB se caracteriza por una infiltración de diversas células inflamatorias, entre las que predominan los linfocitos, algunos macrófagos y proporciones variables según los casos, pero siempre menores, de polimorfonucleares (59,60). Así como, en general, las alteraciones patológicas del hígado de la AVB varían a lo largo del curso de la enfermedad, el aspecto de la inflamación también es dinámico. Efectivamente, cuando se comparan los hallazgos histopatológicos en la biopsia diagnóstica prequirúrgica con la del momento del Kasai, es evidente un incremento significativo en el grado de reacción ductular, de fibrosis y de inflamación que ocurre generalmente en un corto lapso de tiempo (61). Sin embargo, en seguimientos a largo plazo después de la cirugía de Kasai, se observa que mientras que la fibrosis y la reacción ductular persisten, la inflamación se ha reducido de forma dramática (62,63).

Las principales células que integran la población inflamatoria en la AVB son linfocitos y macrófagos, y el sistema inmunitario en el que participan es el

adaptativo. A diferencia del denominado sistema inmunitario innato formado por diferentes barreras celulares capaces de dar respuestas defensivas inmediatas, como las células fagocíticas, los mastocitos, los eosinófilos y basófilos, y las células *natural killer* (NK), el sistema inmune adaptativo es más evolucionado y permite una respuesta defensiva mayor y más específica, así como el establecimiento de la denominada “memoria inmunológica”. Este concepto se refiere a que cada patógeno es “recordado” por su antígeno (Ag) característico y permite generar respuestas futuras rápidas y eficaces adaptadas a cada situación particular (64). Esta respuesta específica del sistema inmunológico juega un papel clave en la defensa contra agentes patógenos y en la regulación de la inflamación en los tejidos afectados. Este es un tema clave pero enormemente complejo, del que vamos a resumir tan sólo aquellos puntos que interesan al tema que nos ocupa.

Los linfocitos son la clase más importante de células del sistema inmunitario adaptativo; se distinguen dos subtipos principales:

- Linfocitos T CD4: También conocidos como T-colaboradores (*T-helper*), cumplen funciones reguladoras y ayudan a coordinar la respuesta inmunitaria al estimular a otras células del sistema inmunitario, como los macrófagos, para aumentar su actividad fagocítica, a los linfocitos B para la posterior formación de anticuerpos y a los linfocitos T CD8 para combatir infecciones u otros patógenos.
- Linfocitos T CD8: También denominados T-citotóxicos (*T-killer*) están capacitados para destruir células infectadas o dañadas. Se marcan positivamente con el anticuerpo anti-CD8 que también puede marcar algunas células NK de la inmunidad innata. La propiedad citolítica de los linfocitos T CD8 se pone de manifiesto mediante la demostración inmunohistoquímica de gránulos Tia-1 u otros como granzima o perforina, en el citoplasma de estas células. Los gránulos Tia-1 contienen un antígeno intracelular que se expresa en proporciones mínimas en las células T CD8+ no estimuladas y en algunos clones de T CD4, pero de forma marcada solamente en los

linfocitos T CD8 activados. Su expresión significa que los linfocitos T CD8 están preparados para ejercer su función aniquiladora. Por el contrario, Tia-1 no se expresa en los linfocitos B.

- Linfocitos B: Esta clase de linfocitos, una vez activados, son los responsables de segregar anticuerpos (Ac) específicos. Muy brevemente, cuando los Ac de la superficie de los linfocitos B se unen por primera vez a Ag foráneos se forman complejos Ag-Ac que pasan al interior del linfocito B, donde son procesados y descompuestos en péptidos. Los péptidos se expresan en la membrana linfocitaria unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH II), y esta combinación atrae a los linfocitos T CD4. Estas células poseen receptores complementarios al complejo Ag-CMH II y su unión provoca en el linfocito T la liberación de linfoquinas (citoquinas liberadas por linfocitos) que activan al linfocito B para dividirse y segregar millones de copias del Ac que reconoce a ese Ag (65). Los Ac se unen a los patógenos que portan estos Ag dejándolos marcados para su destrucción por la activación del complemento o por la fagocitosis.
- Otras células: Los macrófagos se encuentran en cantidades inferiores y proporciones variables. Los macrófagos y las células dendríticas relacionadas pueden provenir del mismo hígado o de los monocitos circulantes. Son importantes moduladores de la respuesta inflamatoria crónica mediante la producción de quimiocinas, citoquinas inflamatorias y la activación o inducción de la apoptosis de células, digestión de matriz extracelular y promoción de la regeneración tisular (66). Las células plasmáticas derivan de los linfocitos B y secretan inmunoglobulinas, y los polimorfonucleares son células de la inflamación aguda que se entremezclan ocasionalmente con el resto de las células inflamatorias.

El estudio de las células inflamatorias en esta enfermedad puede ayudar a comprender la patogénesis y desarrollar enfoques terapéuticos más efectivos. En la

AVB, lo mismo que en cualquier otra hepatopatía fibrosante, la fibrosis es irreversible una vez establecida, pero puesto que la reacción inflamatoria precede al depósito progresivo de tejido fibroso en el estroma hepático(67), podría especularse que un tratamiento dirigido a reducir la inflamación en etapas precoces de la enfermedad podría aportar algún beneficio en la evolución clínica.

La reacción inflamatoria se ha estudiado ya desde diversos puntos de vista, entre los que se incluye el perfil genético (17,21,55), pero se ha prestado escasa atención a la localización microanatómica de las células inflamatorias en los distintos compartimentos hepáticos o a la correlación de las subclases celulares con el grado de severidad de la enfermedad (59,68). Hasta ahora no se ha estudiado la posible relación entre la inflamación y la expresión de SOX9 en la AVB.

El conocimiento de estas interrelaciones entre elementos patológicos y su distribución espacial podría tal vez aportar información nueva útil en un futuro para el mejor manejo clínico de la AVB.

6. HIPÓTESIS

- 1- El hígado de lactantes con atresia de vías biliares sobreexpresa SOX9.
- 2- El aumento en la expresión de SOX9 está en relación con la inflamación en el momento de la biopsia.
- 3- El tipo y distribución del infiltrado inflamatorio se relaciona con el daño hepático.

7. OBJETIVOS

- 1- Estudiar si el aumento en la expresión de SOX9 es específico de los lactantes con atresia de vías biliares (AVB).

- 2- Explorar si la expresión de SOX9 se correlaciona con el daño fibroinflamatorio hepático en el lactante con AVB y, por ende, predice la progresión de la enfermedad.

- 3- Analizar la actividad inflamatoria en el hígado de lactantes con AVB en el momento de la reparación quirúrgica. Para ello:
 - 3a- Estudiar la presencia y la distribución de diferentes tipos de células inflamatorias.

 - 3b- Determinar si existe correlación entre la expresión de SOX9 y la celularidad inflamatoria.

8. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

8.1. Material y métodos

Para dar respuesta a las hipótesis planteadas, se revisaron todas las biopsias hepáticas disponibles de pacientes con atresia de vías biliares (AVB) diagnosticados en el Hospital Sant Joan de Déu de Esplugues de Llobregat, Barcelona, entre enero de 1998 y diciembre de 2018. El diagnóstico de AVB se había confirmado mediante colangiografía intraoperatoria y examen histopatológico de las muestras, tomadas durante la portoenterostomía de Kasai o inmediatamente antes. Se seleccionaron para este estudio las biopsias que estaban en buen estado de conservación y de las que existía suficiente muestra. Esas biopsias forman el grupo AVB.

Con el fin de realizar un estudio de casos y controles, se constituyó un grupo Control con muestras de hígado obtenidas en autopsias o biopsias de lactantes sin enfermedad hepática primaria (neonatos y lactantes pequeños fallecidos por otros motivos). Las muestras de este grupo se seleccionaron por su buena conservación morfológica y antigénica, constatada mediante inmunohistoquímica de marcadores habituales en biopsia hepática. Se emparejaron dos controles de la misma edad (\pm 2 meses) con cada caso de atresia de vías biliares.

Para investigar la especificidad del SOX9 en la AVB se comparó también un tercer grupo de biopsias de pacientes con otras hepatopatías (grupo OH); estas biopsias se seleccionaron sólo para coincidir con la edad de los pacientes con atresia de vías biliares, independientemente del diagnóstico.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Sant Joan de Déu (número de registro: PIC-96-18).

Los datos de los pacientes se obtuvieron de las historias clínicas. Se recogió la edad en el momento de la biopsia y cualquier información clínica o bioquímica relevante, incluido el tiempo de supervivencia del hígado nativo (tiempo desde la biopsia

hepática y la portoenterostomía hasta el trasplante). Los datos de los controles emparejados y del grupo OH se obtuvieron de las historias clínicas y de los informes de anatomía patológica.

Todas las muestras de tejido habían sido fijadas en formalina, incluidas en parafina (FFPE) y teñidas en el momento del diagnóstico siguiendo técnicas estándar. Las laminillas se obtuvieron de los archivos del Servicio de Anatomía Patológica y las evaluó una patóloga experta para determinar su idoneidad para este estudio. Se verificaron y se clasificaron sistemáticamente las características histopatológicas:

- Fibrosis del tracto portal
- Proliferación de conductos biliares
- Concreciones biliares resultantes de la colestasis
- Inflamación

Para ello se utilizó un sistema de puntuación semicuantitativo con una escala de tres grados: leve, moderado y grave, siguiendo la literatura específica sobre hígado neonatal y AVB(23,61,67). También se registró la transformación de los hepatocitos a células gigantes.

Para el estudio inmunohistoquímico se hicieron tinciones en secciones FFPE de 3 µm. Para SOX9 se utilizó un anticuerpo anti SOX9 de conejo policlonal (Sigma-Aldrich/Merck HPA001758, 1:50; Darmstadt, Alemania). Se utilizó un pretratamiento de recuperación de antígenos inducido por calor a bordo para restaurar los epítomos. Para el inmunofenotipaje para las células inflamatorias se utilizaron anticuerpos para células B (CD20), células T (CD4 y CD8), células T citotóxicas –*T-cell intracellular antigen 1* (TIA1)–, células plasmáticas (CD138) y SOX9. El origen de los anticuerpos y sus células diana se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Lista de anticuerpos empleados en el estudio inmunohistoquímico, su origen y sus células diana

	Origen	Célula reactiva
CD20	Clona MJ1 Ready-to-Use Leica	Pan Linfocitos B (no cél. plasmáticas)
CD4	Clona 4B12 Ready-to-Use Leica	Linfocitos T helper (LTh)
CD8	Clona 4B11 Ready-to-Use Leica	Linfocitos T citotóxicos (LTc)
TIA-1	Clona TIA1 Ready-to-Use Leica	Linfocitos T con potencial citolítico
CD138	Clona MI15 Ready-to-Use Leica	Cél. plasmáticas productoras de Ig, células preB y B inmaduras
SOX9	Sigma-Aldrich/Merck	Colangiocitos, fibroblastos, hepatocitos, otras células

Los núcleos celulares se tiñeron ligeramente con hematoxilina. Como control positivo para SOX9 se utilizaron tejido de carcinoma de mama, tejido cerebral con gliosis reactiva y testículo normal. Para el resto de anticuerpos no era necesario tejido de control positivo, excepto para CD138 y TIA-1, para los que se usaron secciones de amígdala y linfoma de células NK/T respectivamente. Para las secciones de control negativo, el anticuerpo primario se omitió en uno de los casos positivos.

La investigadora recibió previamente el entrenamiento necesario para llevar a cabo una evaluación precisa de los parámetros cuantificables con un set de biopsias hepáticas genéricas, con el fin de armonizar las interpretaciones individuales. Dos personas evaluaron manualmente al microscopio, de forma ciega e independiente, la expresión de los diferentes antígenos (TRF, patóloga experta, y JAB, investigadora de este trabajo). Cada evaluadora puntuó de 0 a 3 según la cantidad de células teñidas (0: ≤5%; 1: 6-25%; 2: 26-50%; 3: > 50%), de 0 a 4 la intensidad de la tinción (0: ausente; 1: trazas; 2: débil; 3: moderada; 4: fuerte), de 0 a 2 la

localización (0: ninguna; 1: espacios portales; 2: espacios portales y puentes fibróticos), 0 o 1 la tinción en células epiteliales perifibróticas (0: ausente o muy ocasional; 1: presente) y 0 o 1 la tinción en células lobulillares (0: ausente o muy ocasional; 1: presente) (Tabla 4). La suma de las puntuaciones tiene una amplitud de 0 a 11.

Tabla 4. Tabla de puntuación de datos para evaluación inmunohistoquímica

Cantidad de células teñidas	Intensidad de la tinción	Localización	Tinción células epiteliales perifibróticas (sólo SOX9)	Tinción células lobulillares (sólo SOX9)
0: ≤5%	0: Ausente	0: Ninguna	0: Ausente	0: Ausente
1: 6-25%	1: Trazas	1: Espacios porta	1: Presente	1: Presente
2: 26-50%	2: Débil	2: Espacios porta		
3: > 50%	3: Moderada	y puentes fibróticos		
	4: Fuerte			

La tinción nuclear se evaluó de la siguiente manera: tinción nuclear débil cuando sólo era visible a un aumento de 200x o más; tinción nuclear fuerte si era visible a 100x. También se registró, cuando era necesario, la presencia o no de tinción citoplasmática. Si hubiera discrepancias entre las observadoras se discutirían entre ambas *a posteriori* para llegar a un consenso.

Se examinaron los anticuerpos CD20, CD3, CD4, CD8 y CD138 mediante un método semicuantitativo la cantidad de inmunoreactividad y la localización dentro de los espacios porta/puentes fibróticos y compartimentos lobulares. Los resultados

de los marcadores inflamatorios se compararon con los de SOX9, en busca de alguna correlación.

Estudio estadístico:

Esta parte del trabajo se ha llevado a cabo con la asesoría del Dr. Daniel Cuadras, del Departamento de Estadística, Fundació Sant Joan de Déu.

Los resultados de los tres grupos se compararon utilizando la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para las variables no paramétricas continuas, y el test t de Student para las variables con distribución normal (paramétricas). Se evaluó la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene, y se comprobó la normalidad con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y la gráfica de probabilidad normal estandarizada. Se evaluó la correlación entre la Escala SOX9 y las variables continuas utilizando el coeficiente de correlación de Spearman. Las variables categóricas se compararon entre grupos mediante la prueba de chi-cuadrado o el test exacto de Fisher. La supervivencia hepática se evaluó con el método de Kaplan-Meier. Se utilizó una curva ROC para evaluar la precisión de la Escala SOX9 como factor predictivo para la AVB, y se calculó el área bajo la curva (AUC). Se hizo estadística descriptiva para cada variable de interés. A continuación se llevó a cabo una comparación entre grupos para hallar diferencias. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo. El análisis estadístico se realizó utilizando SPSS 23 (IBM Corp, Armonk, NY).

8.2. Resultados

Grupos de estudio

Durante el período de estudio se diagnosticaron de AVB 26 pacientes, que forman el grupo AVB. El grupo Control consta de 52 biopsias hepáticas de pacientes sin

enfermedad hepática primaria, escogidos por la edad similar al grupo AVB y por la calidad de preservación de las muestras. La edad media de los pacientes del grupo AVB fue de 2,1 meses (rango: 1,1 a 4,6) y 13 (50%) eran varones. La edad media de los pacientes del grupo Control fue de 1,1 meses (0,53 a 1,7) y 23 (44%) eran varones. Las características demográficas y clínicas se resumen en la Tabla 2, junto con los resultados serológicos. La IgG para CMV, virus de Epstein-Barr y parvovirus fueron positivas en el 42%, 11% y 7,6% de los casos de AVB, respectivamente. Las biopsias hepáticas de 16 pacientes diagnosticados de hepatopatía diferente de la AVB constituyen el grupo OH (otras hepatopatías). Su edad media fue de 3,56 meses (rango: 2,1 a 4,04), y 10 eran varones (62,5%).

Tabla 5: Datos demográficos, clínicos y serológicos de los grupos AVB, Control y OH

	AVB (n=26)	Control (n=52)	OH (n=16)	p
Edad en meses x (rango)	2,1 (1,1-2,6)	1,1 (0,53-1,7)	3,56 (2,1-4,04)	0,01 ⁺
Varones	13 (50%)	23 (44%)	10 (62,5%)	0,53 ⁺⁺
BAMS	4 (15,3%)			
IgG CMV	11/26 (42%)	2/52 (3,8%)		0,02 ⁺
IgG virus Epstein Barr	3/26 (11%)	No se hizo		
IgG parvovirus	2/26 (7,6%)	No se hizo		
Ecografía: Signo del tridente	55/26 (19,2%)			
Vesícula biliar pequeña	15/26 (57,6%)			
Gammagrafía hepática	23/26 (88,4%)			

Biopsia hepática prequirúrgica	4/26 (15,3%)			
Colangiografía intraoperatoria	18 (69,2%)*			
Trasplante hepático	9 (34,6%)			
Tiempo del Kasai al trasplante en meses x (rango) **	18 (2,18-56,25)			

AVB = atresia de vías biliares; BASM = Biliary Atresia Splenic Malformation syndrome; IgG= inmunoglobulina G; CMV = citomegalovirus.

*p= 0,01 con test t de Student. **No significativo con test χ^2 .

* Sólo es posible en los pacientes con vesícula biliar o cístico conservados.

** Una paciente fue al trasplante hepático a los 4,6 meses de edad como primera opción quirúrgica. Al resto de los pacientes se les practicó primero una derivación tipo Kasai.

Todas las AVB eran tipo 3 (atresia a nivel del *porta hepatis*). En cuatro casos (15,3%) la AVB coexistía con otras malformaciones; esos casos se clasificaron como síndrome BASM. Las biopsias hepáticas que se han estudiado en el presente trabajo se tomaron de forma intraoperatoria al inicio de la portoenterostomía de Kasai en 22 casos; en los otros cuatro pacientes se hizo una biopsia hepática diagnóstica abierta antes de la portoenterostomía, salvo en una paciente, que fue directamente a trasplante hepático primario a los 5 meses de edad. El tiempo medio de seguimiento de los pacientes con AVB ha sido de 26,4 meses (rango: 5 a 232 meses). Un paciente se perdió en el seguimiento; dos fallecieron con su hígado nativo a los 43 y a los 147 meses respectivamente. Nueve pacientes han recibido ya un trasplante hepático, a una edad media de 12 meses (rango: 5 a 117 meses). Catorce pacientes todavía tenían su hígado nativo cuando se cerró este estudio.

En el grupo Control el hallazgo más común en las autopsias fue una lesión cerebral hipóxico-isquémica en 18 casos; otras causas identificadas de muerte fueron: infección (8 casos), malformación cardíaca compleja (8 casos), hernia diafragmática

(6 casos), enterocolitis necrotizante (4 casos), lipofuscinosis (2 casos), síndrome de Edwards (1 caso), síndrome de Ohtahara (1 caso) y rhabdomioma (1 caso). Dos de las muestras del grupo control fueron biopsias hepáticas de pacientes con diagnósticos de hemangioma hepático y tumor rabdoide, obtenidas lejos de la lesión tumoral. Los diagnósticos clínicos e histológicos en el grupo OH fueron 4 sepsis, 3 hepatitis neonatales, 3 ductopenias no filiadas, 2 colestasis intrahepática familiar progresiva, 2 síndromes de Alagille 1, hepatitis tóxica y 1 hepatitis crónica.

Estudio de SOX9

En los hígados del grupo AVB, SOX9 se expresó mayoritariamente en los núcleos del epitelio ductal reactivo (Fig. 12-14) y, en menor medida, en las células epiteliales cerca de los espacios porta y los puentes fibróticos (Fig. 15); en los citoplasmas mostraba una tinción más variable. Se observó una tinción de débil a moderada en las células epiteliales perifibróticas —que casi siempre formaban hileras—, en las células estromales del tejido fibrótico y los hepatocitos lobulillares. No hubo diferencias ni discrepancias entre los dos observadores.

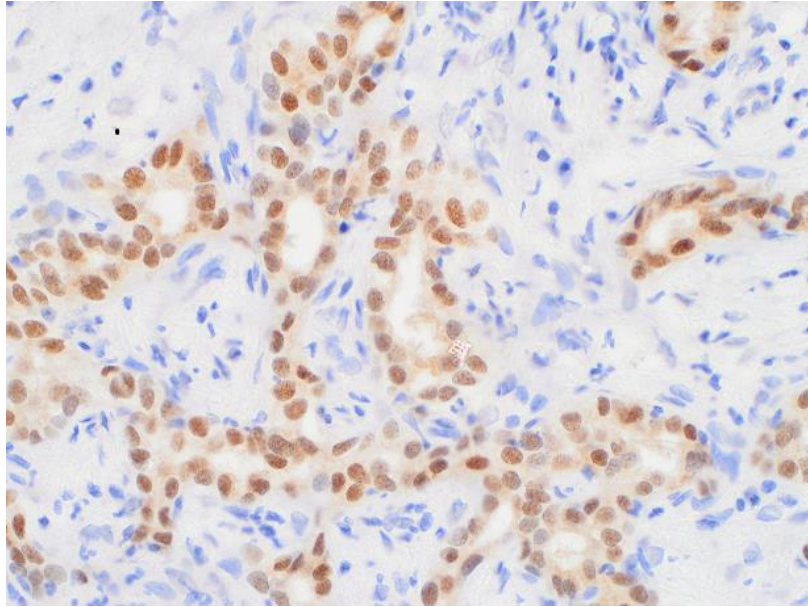


Figura 12: Expresión fuerte de SOX9 en los ductos reactivos de un caso de AVB. Obsérvese la positividad nuclear del epitelio biliar reactivo (intensidad grado 4), una tenue tinción citoplasmática de estas células y la negatividad del resto de elementos (inmunohistoquímica SOX9;400x).

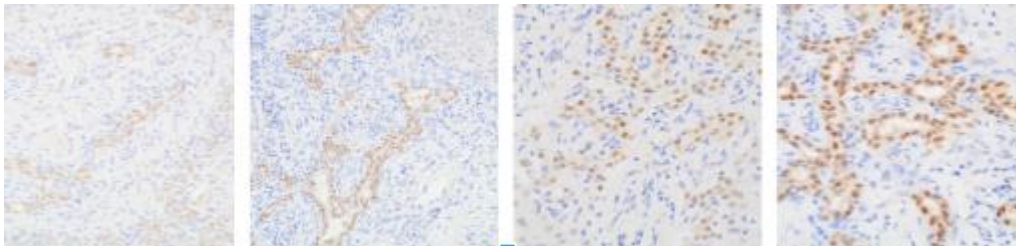


Figura 13: Grados de intensidad de expresión de SOX9 del 1 a 4 (de izquierda a derecha) (inmunohistoquímica SOX9; 200x - 400x).

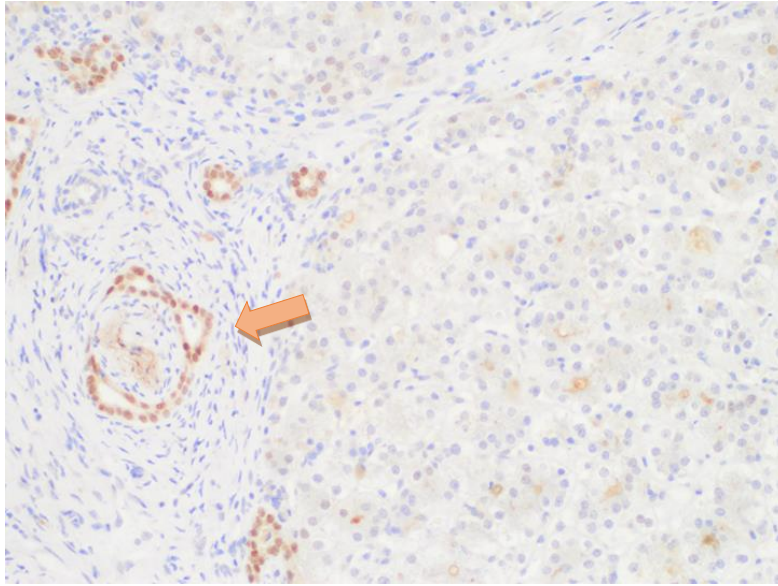


Figura 14: SOX9 en un caso de AVB con persistencia de conductos biliares embrionarios alrededor de la rama de la vena porta del espacio porta (malformación de la placa ductal) (inmunohistoquímica SOX9; 400x).

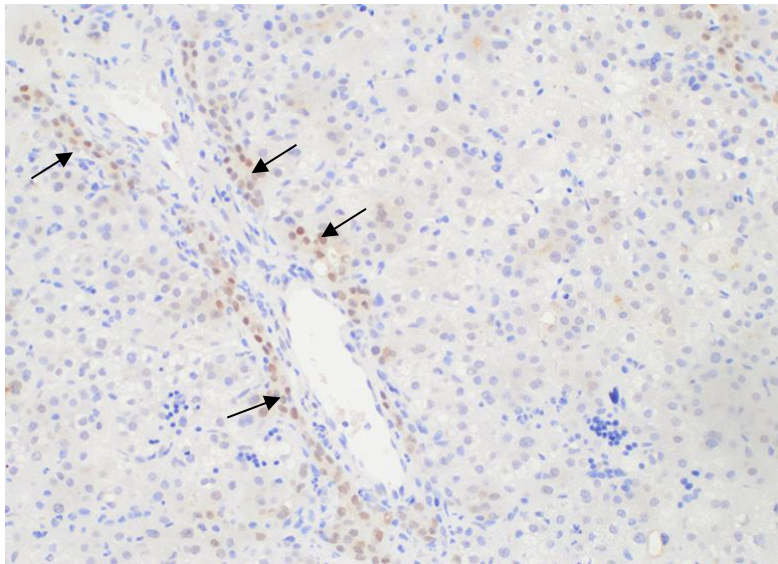


Figura 15: Interfaz porto-lobulillar de un caso de AVB teñido con SOX9. Se observan células con tinción nuclear positiva de intensidad leve-moderada para SOX9 en la vecindad del estroma fibroso del espacio porta (flechas). En esta biopsia había grupos de células hematopoyéticas residuales en el parénquima lobulillar (grupos de núcleos pequeños e irregulares (inmunohistoquímica SOX9; 400x).

Este patrón fue claramente diferente del observado en hígados sin AVB, tanto en el grupo Control como en el grupo OH, lo que responde al primero de los Objetivos planteados; en estos grupos no se expresaba SOX9 (Fig. 16) o la expresión era muy baja, limitada a algunos de los tractos portaes. Sólo una muestra en el grupo Control, de un paciente con infección por CMV, mostró una fuerte expresión de SOX9. Tan sólo en una de las 16 muestras de hígado del grupo OH la expresión de SOX9 fue fuerte en los conductos reactivos y en las células epiteliales perifibróticas. Esta muestra correspondía a una paciente de 87 días que sufrió una sepsis por enterovirus a los cinco días de edad y desarrolló hepatomegalia subsiguiente. Su biopsia reveló una fibrosis portal y periportal extensa con puentes; su diagnóstico histológico era compatible con *status post sepsis*, pero no concluyente.

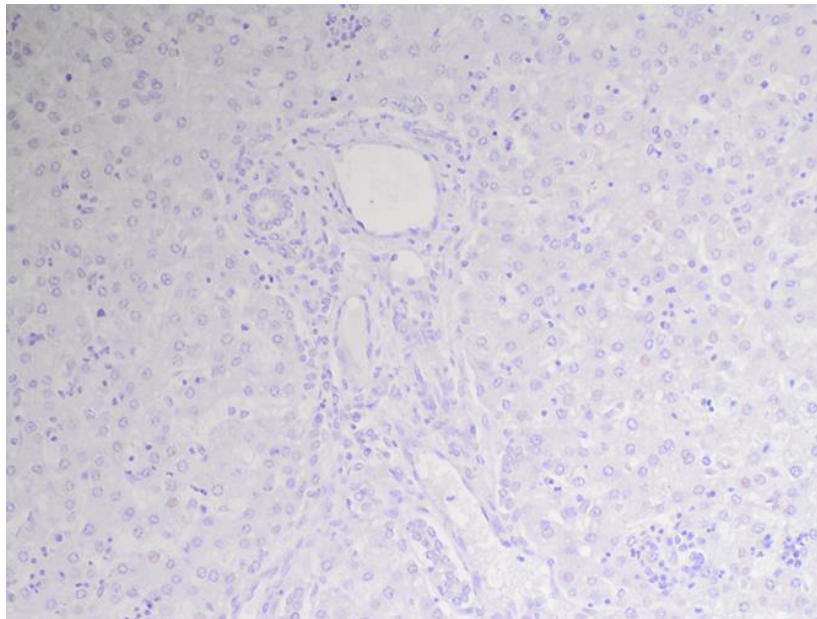


Figura 16: Caso control. En el centro se observa un espacio porta normal con la típica tríada (arteria, vena y ducto biliar). Obsérvese la negatividad para SOX9 de todos los compartimentos (inmunohistoquímica SOX9; 400x).

El método semicuantitativo utilizado permite dar un valor numérico entre 0 y 11 a la expresión de SOX9 en cada biopsia (de 0 a 4 según la intensidad de la tinción, de

0 a 2 según la localización, 0 o 1 por la tinción en células epiteliales perifibróticas, y 0 o 1 si no hay o hay tinción en células hepatocitos). De esta manera se ha obtenido un score, la Escala SOX9, que ha resultado un parámetro sencillo de comparar.

La puntuación en la Escala SOX9 fue (media \pm desviación estándar) de $7,62 \pm 2,06$ en el grupo AVB, $0,58 \pm 0,84$ en los controles y $3,56 \pm 2,12$ en el grupo OH, con una distribución no normal. La prueba de Wilcoxon mostró una diferencia significativa entre los tres grupos ($p < 0,001$) (Fig. 17).

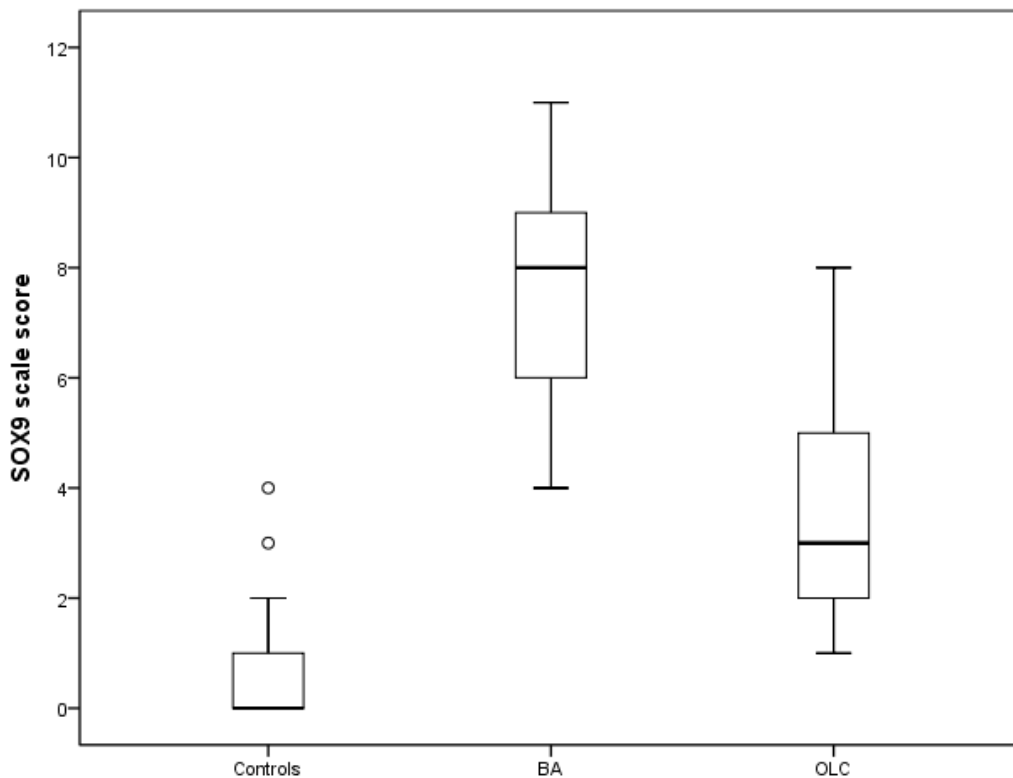


Figura 17: Resultados de la expresión SOX9 en cada grupo aplicando la Escala SOX9. El grupo Control puntuó ($\bar{X} \pm SD$) $0,58 \pm 0,84$, mientras que el grupo AVB puntuó $7,62 \pm 2,06$ y el grupo OH puntuó $3,56 \pm 2,03$. Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0,001$ entre los grupos).

El área bajo la curva ROC fue de 0,9989 (IC del 95%: 0,9964 a 1,000), por lo que la Escala SOX9 que diseñamos ha sido útil para diferenciar entre hígados con AVB e hígados sin AVB: un valor de 4 como punto de corte tuvo una sensibilidad del 100% y una especificidad del 88,24% (Fig. 18).

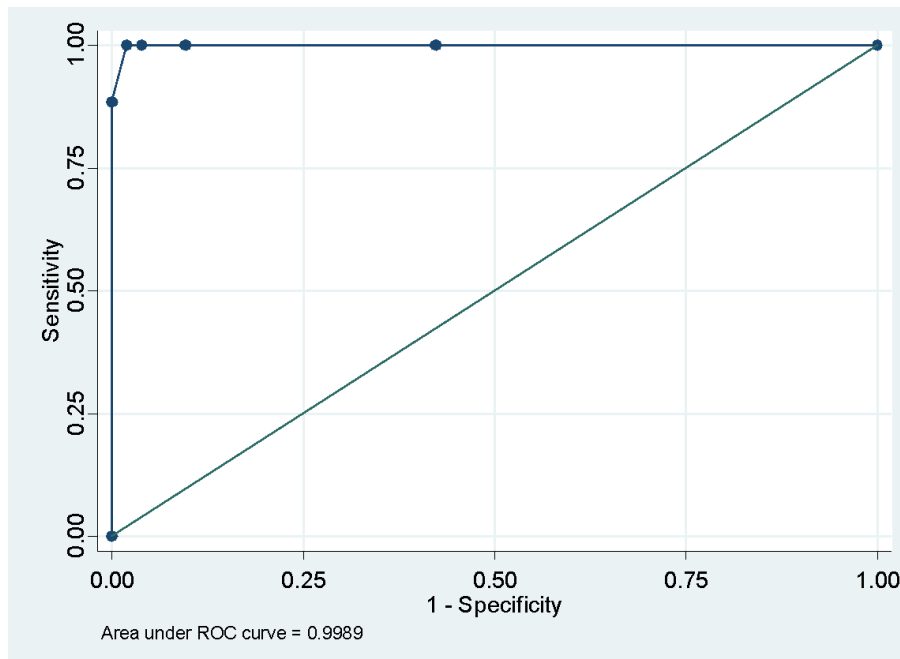


Figura 18: Utilizando un valor de 4 en la Escala SOX9 como punto de corte, área bajo la curva ROC = 0.9989 (95% CI: 0.9964 a 1.0000).

La expresión de SOX9 mostró en los casos de AVB una correlación positiva significativa con los demás parámetros histológicos evaluados: fibrosis, proliferación ductal, transformación de células gigantes, concreciones biliares e inflamación (coeficientes de correlación: 0,83, 0,88, 0,72, 0,82, 0,75 respectivamente, $p < 0,001$), lo que responde al Objetivo 2 planteado en este trabajo; sin embargo, SOX9 no se correlacionó significativamente con los parámetros bioquímicos en suero (bilirrubina total, bilirrubina conjugada, gamma glutamil transpeptidasa, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y albúmina). La relación entre la

edad en el momento de la biopsia y la puntuación en la Escala SOX9 tampoco alcanzó significación estadística en nuestros pacientes ($\rho=0,197$, $p=0,355$). La Figura 19 muestra la supervivencia hepática en una curva de Kaplan-Meier para los casos con puntuación en la Escala SOX9 ≤ 7 y los casos con puntuación ≥ 8 . Una puntuación en la Escala SOX9 por debajo de 7 se ha asociado a un mejor pronóstico hepático; sin embargo, la diferencia no alcanzó significación ($p=0,143$ en la prueba de Mantel-Cox o *log-rank*). Los pacientes que ya han sido trasplantados tuvieron un promedio de puntuación en la Escala SOX9 de 8,33, mientras que los pacientes que todavía tenían su hígado nativo al cerrar el estudio puntuaron una media de 7,24 en el momento de la portoenterostomía. La puntuación de la Escala SOX9 en los dos pacientes que fallecieron con su hígado nativo ha sido de 4 y 7 respectivamente.

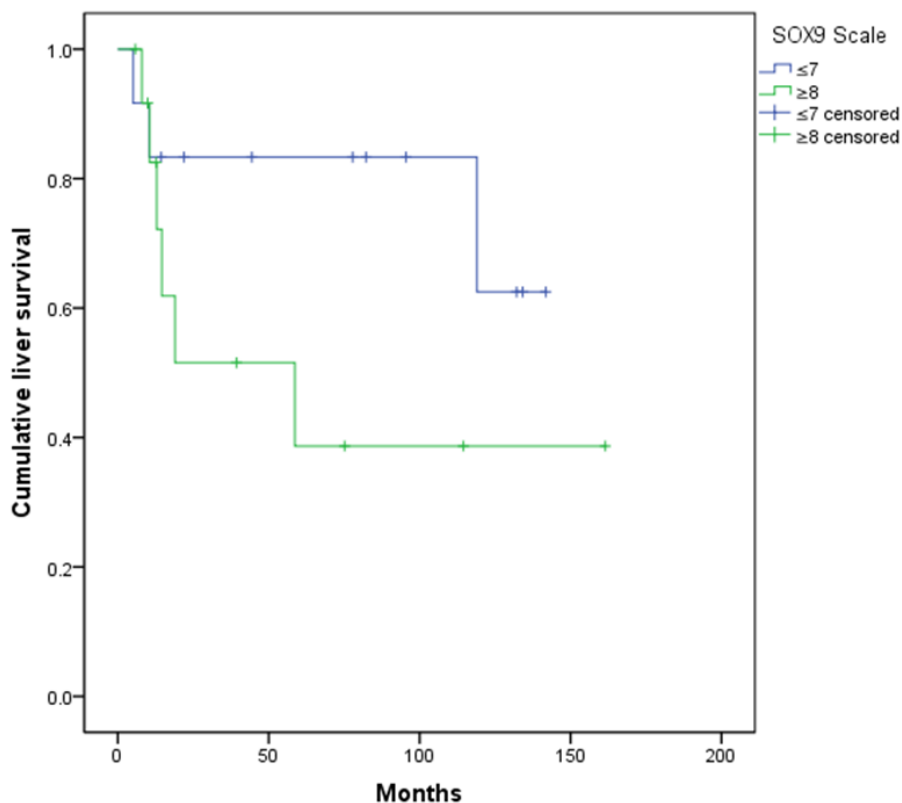


Figura 19: Curva de Kaplan-Meier que estima la supervivencia acumulada del hígado nativo para hígados con puntuación ≤ 7 en la Escala SOX9 (azul) y ≥ 8 (verde) en el momento

de la portoenterostomía. La diferencia no alcanza significación estadística en la prueba de Mantel-Cox (*log-rank* $p=0,143$). Los puntos señalados como censurados indican la edad en el momento del cierre del estudio.

Todos los resultados presentados hasta ahora han sido publicados en el artículo que se adjunta en el Anexo. Los que siguen son inéditos, y están pendientes de publicación.

Estudio de la actividad inflamatoria

Todas las biopsias del grupo AVB mostraron algún grado de inflamación; ésta fue leve en 4 casos (15,4%), moderada en 15 (57,7%) y severa en 7 (26,9%), mientras que en el grupo Control sólo 16 casos (30,8%) presentaron inflamación leve, y los 36 restantes (69,2%) no mostraban ningún signo de reacción inflamatoria. Esta diferencia es significativa ($p<0,001$).

En el grupo AVB las células inflamatorias consistían principalmente en linfocitos, combinados de manera variable con macrófagos, células plasmáticas y polimorfonucleares ocasionales. La reacción inflamatoria se concentraba en las áreas fibrosas de los espacios porta y en los puentes fibrosos (Fig. 8). Se identificaban células linfoides en menor cantidad dentro del compartimento lobulillar entre los hepatocitos. En esta ubicación específica se hallaron focos hematopoyéticos residuales en varios casos de AVB. Estos focos eran fácilmente distinguibles de las células inflamatorias por su forma redondeada característica, su variabilidad celular y los tamaños nucleares. La celularidad inflamatoria presente en casi 1/3 de los hígados Control fue de linfocitos, lo que es un hallazgo habitual en hígado neonatal. Esta es la respuesta al Objetivo 3a.

Los resultados de los marcadores de células inmunitarias en tejido hepático de los grupos AVB y Control se resumen en la Tabla 6. Se observaron diferencias

significativas entre los grupos en la expresión de CD8, mientras que los demás marcadores inmunitarios, incluido CD4, fueron en general poco frecuentes.

Tabla 6. Resultados inmunohistoquímicos de los marcadores de células inmunitarias en hígado de AVB y de controles

	% Células expresoras*	Grupo AVB		Grupo Control		p
		Casos/Testados**	(%)	Casos/Testados**	(%)	
CD20 porta/puentes	Escaso	15/25	60	28/52	53,8	n.s
	Leve	7/25	28	17/52	32,7	
	Moderado	1/25	4	7/52	13,5	
	Marcado	2/25	2	0/52	0	
CD20 lobulillar	Escaso	8/25	32	21/52	41,2	n.s
	Leve	14/25	56	25/52	49	
	Moderado	2/25	8	5/52	9,8	
	Marcado	1/25	4	0/52	0	
CD4 porta/puentes	Escaso	24/26	92,4	52/52	100	n.s
	Leve	1/26	3,8	0/52	0	
	Moderado	1/26	3,8	0/52	0	
	Marcado	0/26	0	0/52	0	
CD4 lobulillar	Escaso	24/26	92,3	15/52	28,8	
	Leve	2/26	7,7	0/52	0	
	Moderado	0/26	0	0/52	0	

	Marcado	0/26	0	0/52	0	n.s
CD8 porta/puentes	Escaso	6/25	24	16/52	30,8	p=0.065
	Leve	11/25	44	33/52	63,4	
	Moderado	7/25	28	3/52	5,8	
	Marcado	1/25	4	0/52	0	
CD8 lobulillar	Escaso	1/25	4	28/52	53,8	p< 0.001
	Leve	11/25	44	18/52	34,6	
	Moderado	9/25	36	6/52	11,6	
	Marcado	4/25	16	0/52	0	
CD138 porta/puentes	Escaso	3/9	33,3	8/13	61,5	n.s
	Leve	6/9	66,7	4/13	30,8	
	Moderado	0/9	0	1/13	7,7	
	Marcado	0/9	0	0/13	0	
CD138 lobulillar	Escaso	0/9	0	0/13	0	n.s
	Leve	0/9	0	0/13	0	
	Moderado	0/9	0	0/13	0	
	Marcado	0/9	0	0/13	0	

* Escaso: <5% de células que lo expresan; Leve: 6-25%; Moderado: 26-50%; Marcado: > 50%

** El número total de casos estudiados varía para los distintos anticuerpos por razones técnicas o por otras causas.

CD20: marcador de linfocitos B; CD4: marcador de linfocitos T-*Helper* o T colaboradores; CD8: marcador de linfocitos T-*Killer* o T citotóxicos; CD138: marcador de células plasmáticas.

Tanto en las muestras del grupo AVB como en las del grupo Control había una presencia relativamente escasa de células B con inmunexpresión del marcador CD20 (CD20+) (Figura 20). Estas células se encontraron en el estroma de espacios porta y áreas de fibrosis y también infiltrando el parénquima hepático. Cabe destacar que únicamente el 14,3% de los individuos con AVB presentaba una expresión marcada de CD20 en ambos compartimentos.

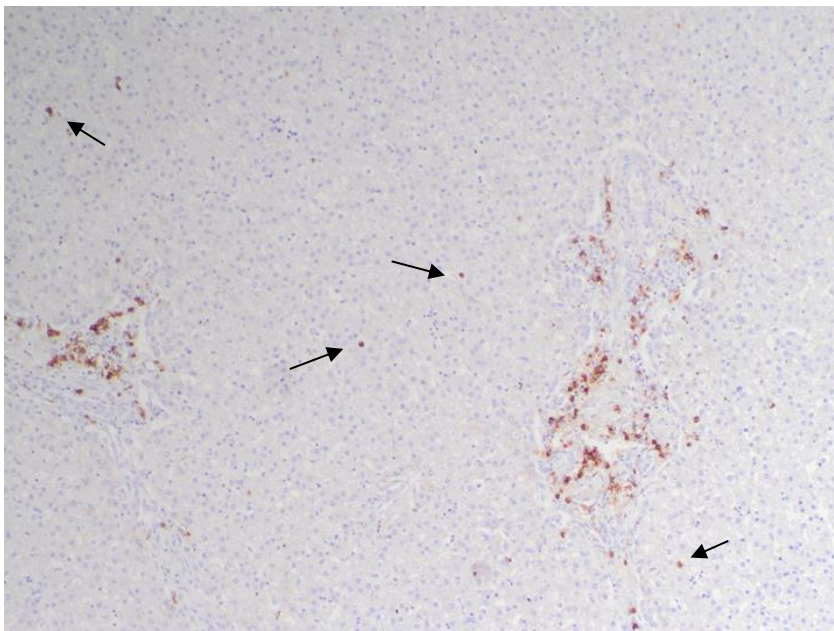


Figura 20: Panorámica del hígado de un caso de AVB con el marcador linfocitario de línea B CD20. Obsérvese la presencia moderada de linfocitos B CD20+ en espacios porta y más ocasional entre los hepatocitos lobulillares (flechas) (inmunohistoquímica CD20; 200x).

El número de linfocitos T CD4+ fue escaso en ambos grupos; sólo algunos casos de AVB mostraron una infiltración leve o moderada en áreas fibrosas o en el parénquima lobulillar (Fig. 21).

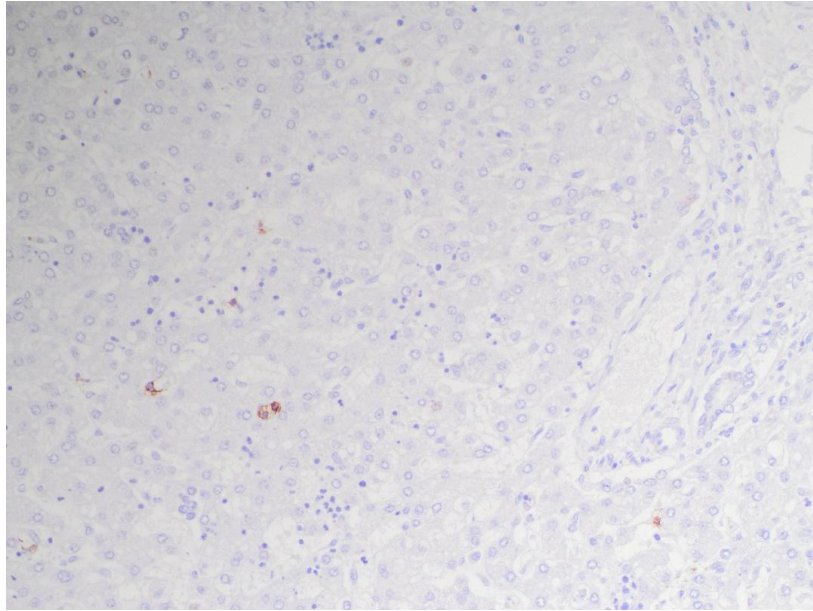


Figura 21: Linfocitos T CD4+ (T colaboradores, T-*helper*) en un caso de AVB. Obsérvese la presencia ocasional de estas células en el parenquima lobulillar (inmunohistoquímica CD4; 400x).

Por el contrario, la presencia de linfocitos T CD8+ fue mayor (Fig. 22), con predominio de leve y moderada, tanto en el compartimento fibroso como en el lobulillar de los hígados con AVB, mientras que el grupo de Control presentó mayoritariamente una cantidad escasa o leve de células CD8+ (Fig. 23). Estas diferencias resultaron ser estadísticamente significativas, especialmente en el compartimento lobulillar ($p < 0,001$). Cabe destacar que se observó una infiltración moderada o marcada de linfocitos T CD8+ en las áreas fibrosas y el parénquima en el 32% y 53,8% de los casos del grupo AVB, respectivamente, mientras que el 94% del grupo Control mostró una infiltración escasa o leve de células CD8+ en los espacios porta y el 89% en el parénquima. Además, solo el 11,6% de los controles presentaron una celularidad moderada de células CD8+ en el compartimento lobular y ninguno de ellos mostró una infiltración marcada de CD8+.

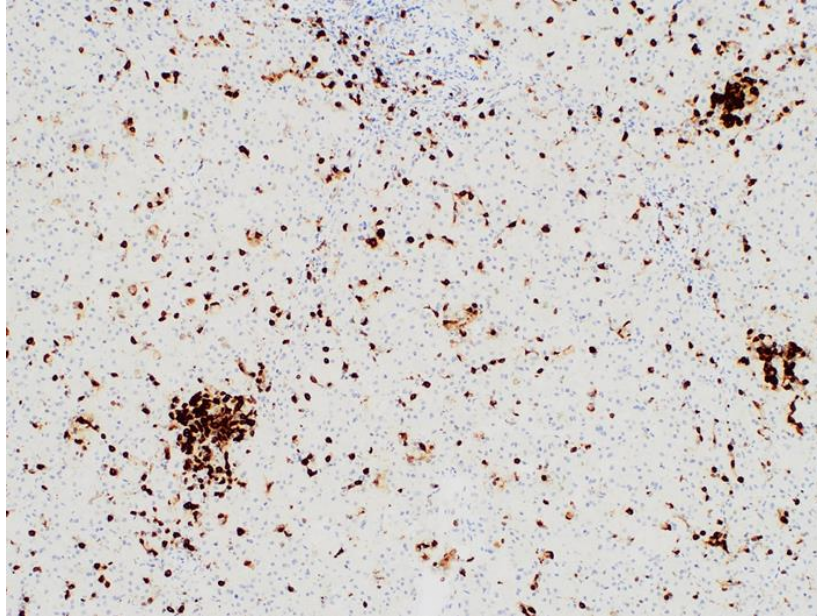


Figura 22: Linfocitos T CD8+ (T citotóxicos, T-*killer*) en un caso de AVB. Obsérvese que las células inflamatorias se agrupan densamente en el estroma fibrosado de espacios porta y puentes, y se dispersan de forma abundante por el parénquima lobulillar (inmunohistoquímica CD8; 200x).

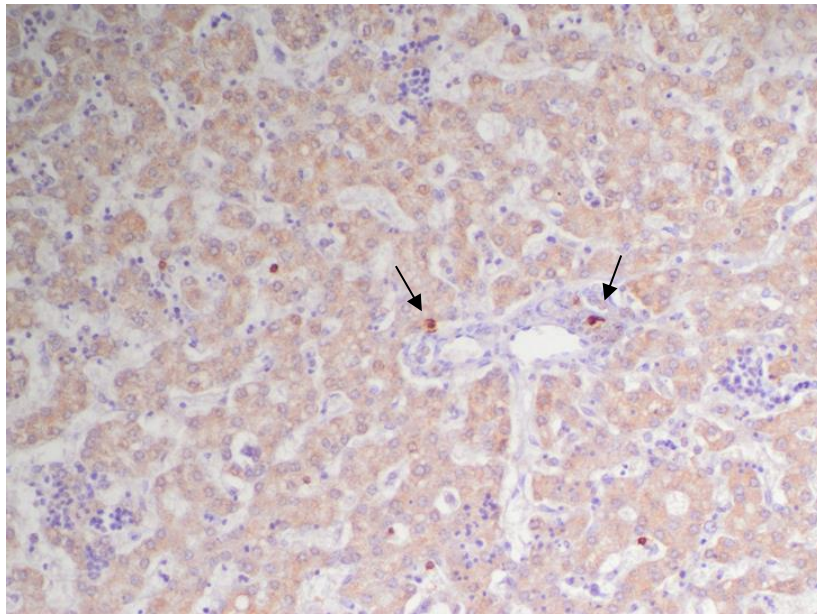


Figura 23. Ocasionales CD8+ en el espacio porta y parénquima lobulillar en un caso control (inmunohistoquímica CD8; 200x).

En los casos de AVB un número variable de linfocitos T CD8+ exhibió gránulos intracitoplasmáticos positivos para Tia-1, tanto en áreas fibróticas como en el compartimento lobulillar (Fig.24). En el grupo AVB se detectaron células plasmáticas CD138+ en escasa (33,3%) o moderada cantidad (66,7%); no hubo casos que mostraran una infiltración mayor en ninguno de los compartimentos. Todo lo relatado en este apartado responde al Objetivo 3b.

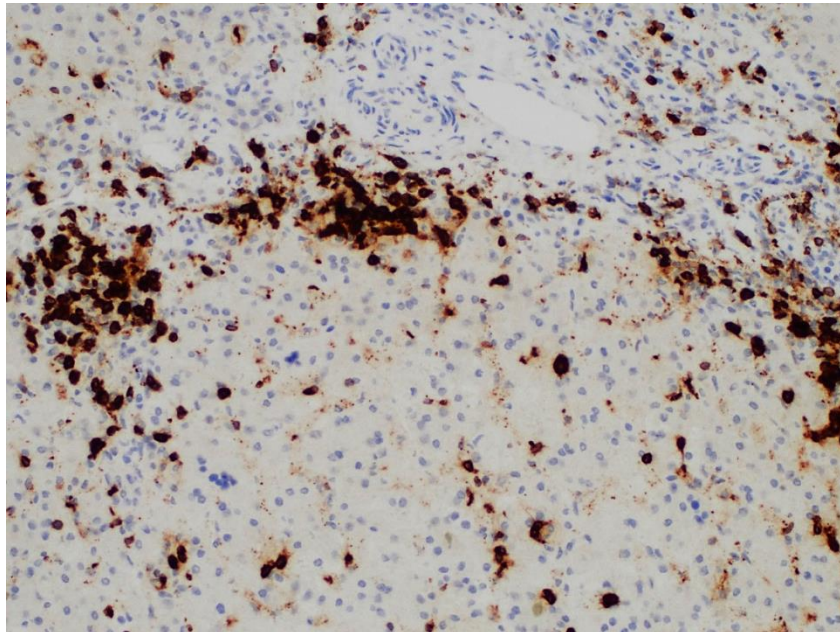


Figura 24: Tinción para Tia-1. En los casos de AVB un número variable de linfocitos T CD8+ exhibió gránulos intracitoplasmáticos positivos para Tia-1, tanto en áreas fibróticas, como en el compartimento lobulillar, especialmente en la interfaz porto-lobulillar y junto a los hepatocitos lobulillares (inmunohistoquímica CD8; 400x).

Se ha estudiado la posible relación entre el conjunto de los marcadores linfocitarios y la Escala SOX9 descrita previamente (Arboleda-Bustan 2022); entre ellos resulta haber una correlación positiva casi significativa ($p=0,051$ en el test de la U de Mann-

Whitney). Existe también una correlación positiva significativa entre los linfocitos T CD8+ en los espacios porta/puentes fibrosos y la puntuación en la Escala SOX9 ($\rho=0,442$, $p=0,027$), y una correlación positiva casi significativa entre los linfocitos T CD8+ lobulillares y la Escala SOX9 ($\rho=0,372$, $p=0,067$). Del mismo modo, los casos de AVB con una presencia leve de células plasmáticas CD138+ tienen una puntuación en la Escala SOX9 más alta que aquellos con expresión CD138+ escasa. Por el contrario, no se halló relación significativa entre la presencia de linfocitos B CD20+ o de linfocitos T CD4+ y la puntuación en la Escala SOX9. Este apartado responde al Objetivo 3c. El estudio de la actividad inflamatoria y su relación con SOX9 están enviados para publicación a día de hoy.

9. DISCUSIÓN

La atresia de vías biliares (AVB) sigue siendo una enfermedad enigmática en cuanto a su origen y manifestaciones. La corriente actual de pensamiento sugiere que la colangiopatía obliterante de la AVB pueda ser, más que una única entidad con una sola etiología, un fenotipo común resultante de diversos factores(81,82). En todo caso, la relación causal entre la reacción fibroinflamatoria y la lesión destructiva biliar en la AVB sigue siendo incierta(17,78,83). Aunque aún queda por descubrir una explicación definitiva que aclare completamente su etiología y patogenia, es más probable que se descubran nuevas perspectivas en el campo del tratamiento temprano si se logra comprender en profundidad las alteraciones subyacentes que ocasionan el daño hepático. Este trabajo de tesis doctoral se ha enfocado en el estudio de las biopsias hepáticas de los pacientes con AVB de nuestro hospital mediante técnicas inmunohistoquímicas. El objetivo principal ha sido evaluar dos elementos aparentemente no relacionados: la reactivación de SOX9 y el perfil inmunofenotípico de la inflamación en el tejido hepático obtenido durante la portoenterostomía. A partir de nuestros hallazgos, hemos encontrado evidencia concluyente de que SOX9 se reactiva de forma específica en el hígado de los pacientes con AVB. Además hemos identificado una correlación significativa entre la presencia de linfocitos T en el infiltrado inflamatorio y el grado de daño hepático, y hemos observado una correlación entre el perfil inmunofenotípico de la reacción inflamatoria y la expresión de SOX9. Estos resultados sugieren la existencia de nuevas oportunidades terapéuticas para abordar de manera temprana esta enfermedad.

9.1 SOX9

En este estudio hemos observado que en el hígado de pacientes con AVB SOX9 se expresa principalmente en el epitelio ductular reactivo, las células epiteliales perifibróticas (es decir, las células con morfología ambivalente situadas en la frontera entre los hepatocitos lobulillares y los espacios porta y puentes fibrosos), y las células de la fibrosis estromal. Por otro lado, la expresión de SOX9 es focal en los hepatocitos lobulillares. Por el contrario, en muestras de hígado de pacientes sin enfermedad hepática primaria o con otras hepatopatías, SOX9 está generalmente ausente o se encuentra sólo de forma focal. Además, hemos visto que hay una correlación entre la extensión de la inmunoreactividad de SOX9 y el grado de fibrosis y reacción ductular en los hígados de los pacientes con esta enfermedad.

El tejido hepático presenta un gran potencial de regeneración y reparación ante la lesión, tanto en situaciones agudas como crónicas(81,82) La regeneración hepática, que implica la sustitución de las células parenquimatosas dañadas por células similares, se produce a través de la proliferación de células epiteliales hepáticas diferenciadas, como los hepatocitos y los colangiocitos o células ductales biliares. En respuesta a la lesión, los hepatocitos, que normalmente tienen una baja tasa de reproducción y se encuentran en la fase de reposo del ciclo celular (fase G0), entran en división celular. Por otro lado, las células epiteliales del árbol biliar se dividen de manera continua, lo que les permite reponer constantemente las células perdidas y mantener la homeostasis.

En los últimos años se ha observado que existe plasticidad entre los hepatocitos y el epitelio biliar intrahepático, y se ha identificado la presencia de células bipotenciales que expresan marcadores inmunohistoquímicos tanto de hepatocitos como de epitelio biliar. Este fenómeno no es sorprendente, dado que ambos tipos de células derivan de un progenitor fetal común, que es el hepatoblasto. Estas células bipotenciales pueden compensar la pérdida de hepatocitos y células epiteliales biliares en el hígado postnatal(83). Por otro lado, la reparación del tejido

hepático tiene lugar desde el tejido conectivo de los espacios porta a través de la proliferación de fibroblastos y miofibroblastos residentes en esa área. Sin embargo, cuando persiste la lesión hepática, el mecanismo de regeneración celular se agota y se desencadena un proceso fibroinflamatorio reactivo, lo que conduce a la progresión del daño hepático hacia una enfermedad hepática irreversible (15-17).

Recientemente se han identificado redes de regulación génica compuestas por *c/EBP α* , *TGFBR2* y *SOX9*, que permiten tres estados celulares distintos: hepatocitos, colangiocitos y células progenitoras hepáticas(84). Estas redes de regulación desempeñan un papel crucial en el control de la plasticidad celular y en las decisiones de destino celular, tanto durante el desarrollo como en la regeneración hepática.

Al igual que otros investigadores(6), en nuestro estudio hemos encontrado una relación notoria entre el grado de proliferación ductular, la fibrosis y la expresión de *SOX9* en la AVB. Esta fuerte correlación entre la proliferación ductular y la expresión de *SOX9* en los hígados con AVB refuerza la propuesta del posible papel de *SOX9* en la activación de células progenitoras epiteliales hepáticas que se encuentran en la interfaz entre los hepatocitos lobulillares y el tejido conectivo estromal(7, 18). La expresión de *SOX9* en los hepatocitos podría inducir un estado bipotencial en estas células(13).

Dado que los marcadores bioquímicos no son específicos ni suficientes para el diagnóstico de la AVB y la evaluación del daño hepático(13,18-20), es necesario investigar marcadores adicionales. En esta tesis nos propusimos evaluar el posible papel diagnóstico y pronóstico de *SOX9* en el hígado de pacientes con AVB; hemos desarrollado una escala de puntuación para evaluar su expresión: la escala *SOX9*(85) que permite discriminar claramente entre los grupos de casos y controles (AVB *versus* sin enfermedad hepática primaria). También era importante comprender cómo se expresaría *SOX9* en otras hepatopatías con similitudes clínicas y/o patológicas con la AVB; para ello incorporamos un tercer grupo de

muestras hepáticas con otras enfermedades colestásicas bien filiadas (grupo OH) y observamos una clara diferencia en la expresión de SOX9 entre los hígados de pacientes con AVB y los hígados con otras enfermedades colestásicas. Mientras que SOX9 se expresa intensamente en la mayoría de los casos de AVB, su expresión era débil o ausente en casi todas las demás enfermedades colestásicas, incluso en casos con grados de proliferación ductular y fibrosis comparables a los observados en la AVB. Esta destacada diferencia en la expresión de SOX9 podría ser el resultado de un mecanismo patogénico específico en la AVB y podría ser útil para diferenciarla de otras causas de ictericia neonatal. El hallazgo de un punto de corte claro en la escala SOX9 para discriminar la AVB de los casos no AVB apunta la posible utilidad de SOX9 como herramienta para evaluar el daño hepático en pacientes con AVB.

La inclusión de SOX9 como parte de un panel de tinciones complementarias podría ser de ayuda en casos de biopsias hepáticas de pacientes con situaciones clínicas complejas y/o hallazgos microscópicos inciertos, permitiendo una mayor precisión y consistencia en la evaluación del daño hepático. Por otra parte, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en etapas tempranas de la enfermedad es una necesidad urgente en la AVB. SOX9 podría emerger en este sentido como un candidato prometedor para enfoques terapéuticos dirigidos.

En resumen, los resultados de este estudio indican que la tinción inmunohistoquímica de SOX9 puede ser una herramienta clínicamente relevante en el diagnóstico de la AVB y posiblemente también en su manejo inicial. Sin embargo, para validar y ampliar estos hallazgos es necesario llevar a cabo investigaciones en cohortes mayores de pacientes. Es importante también comprender mejor el papel de SOX9 en cada etapa del proceso de la AVB, así como de los mecanismos subyacentes que regulan su expresión. Al mismo tiempo habrá que explorar el alcance de las implicaciones clínicas y terapéuticas de la expresión de SOX9 en esta enfermedad, que puede ser crucial para el beneficio de los pacientes.

9.2 Reacción inflamatoria

El análisis del perfil inmunocelular y la localización de la respuesta inflamatoria en los hígados de lactantes se ha hecho en el momento del diagnóstico y el inicio del primer tratamiento de la AVB. En todos los casos de AVB de esta serie observamos una inflamación significativa compuesta principalmente por células mononucleares con claro predominio linfocitario. Esta inflamación está presente tanto en las áreas fibrosas como en el compartimento hepatocitario de los lobulillos hepáticos.

El hallazgo más destacado ha sido la observación de una sobrerrepresentación significativa de linfocitos T citotóxicos, especialmente en las áreas fibrosas de los hígados con AVB. También hay linfocitos T auxiliares (*T helper* o Th) y, en menor proporción, linfocitos B, aunque en estas células no se observan diferencias significativas en comparación con el grupo control. Las células plasmáticas son ocasionales en ambos grupos estudiados y restringidas a las áreas fibrosas. Estos hallazgos indican que en el hígado de los pacientes con AVB predomina una respuesta inmunológica celular activa, destacando particularmente la participación de los linfocitos T citotóxicos.

El ambiente inflamatorio presente en el hígado de pacientes con AVB es similar al de otras enfermedades colestásicas. El análisis de las regiones variables de la cadena β del receptor de células T (TCR β) ha revelado la presencia de expansiones oligoclonales de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ en el hígado y conductos extrahepáticos de lactantes con AVB lo que valida la presencia de células T activadas por estímulos antigénicos específicos(86). Se ha demostrado la acumulación de células T CD4+, CD8+ y macrófagos CD68+ en los espacios porta de la AVB en estudios inmunohistoquímicos en biopsias, con un perfil de citoquinas proinflamatorias (interleuquina 2 -IL-2, interferón gamma -IFN- γ , factor de necrosis tumoral -FNT e IL-12) que está presente también en los casos de colestasis por nutrición parenteral total, pero no en hígados normales o con otras hepatopatías colestásicas pediátricas como la hepatitis neonatal o el quiste de colédoco(84). En

un modelo de ratones con AVB inducida por rotavirus rhesus (RRV) el bloqueo de la producción de IFN- γ previno la obstrucción inflamatoria y fibrótica de los conductos biliares extrahepáticos(87). Todos estos trabajos muestran un entorno inflamatorio característico en los tractos portales en la AVB que implica la inmunidad mediada por células T y sugieren que la inflamación no es una mera respuesta secundaria a la colestasis, sino más bien una respuesta inmunológica específica que interviene en la patogénesis de la enfermedad.

Los cambios inflamatorios con degeneración de los colangiocitos en las áreas portales se han reconocido clásicamente como características histopatológicas distintivas en la AVB, pensándose en un principio que podrían ser el resultado de una inflamación crónica inespecífica. Sin embargo, esta presentación histológica se asemeja mucho a la enfermedad aguda del injerto contra el huésped (o *graft versus host disease* -GVHD) que ocurre tras el trasplante de médula ósea o el rechazo celular agudo después del trasplante hepático. Ohya et al.(75) observaron que todos sus pacientes con AVB presentaron degeneración de los conductos biliares intrahepáticos con infiltración linfocitaria, mientras que sólo se observaron estos cambios en dos de 9 controles con quiste de colédoco y en ningún caso de hepatitis neonatal; esos hallazgos, y los de el presente trabajo, se parecen a ese tipo de reacción inflamatoria e indican que la degeneración de los conductos biliares intrahepáticos con infiltración linfocitaria intraepitelial es persistente, y por lo tanto más grave, en la AVB que en otras de hepatopatías. Nuestros resultados son congruentes con el conocimiento actual del papel de la autoinmunidad en la AVB y están avalados por muchos estudios(10,17,76,78,79,85).

De acuerdo con una teoría ampliamente aceptada sobre la forma aislada de la AVB, se postula que la infección viral o la exposición a toxinas pueden dañar inicialmente los colangiocitos, lo que a su vez desencadena una respuesta autoinmune o autoinflamatoria exagerada específicamente dirigida a las células epiteliales de los conductos biliares. En efecto, se ha demostrado que la infección viral transitoria de los colangiocitos conduce a la regulación al alza de los receptores de tipo TLR (*Toll-*

like receptors), lo que a su vez activa el sistema inmunológico innato, involucrando a macrófagos, células dendríticas y células T *natural killer* o citotóxicas naturales. La señalización de TLR en estas células inmunitarias innatas tiene un efecto indirecto en la diferenciación y proliferación de las células T, promoviendo la producción de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias. Las células T auxiliares activadas y diferenciadas, especialmente Th-1 y Th-17, reclutan células T citotóxicas en el proceso(88). Una vez activadas, estas células T citotóxicas, en conjunto con las células B activadas y los macrófagos, desempeñan un papel en la perpetuación del daño en el árbol biliar. El proceso ocurriría sin un control adecuado por parte de los linfocitos T reguladores (Tregs), los cuales podrían estar en niveles reducidos. A medida que avanza la enfermedad, todo ello conduce a la fibrosis y obstrucción de los conductos biliares(89,90). Es importante destacar que dicha respuesta autoinmune persiste incluso después de la resolución de la infección viral o la eliminación de las toxinas, lo que provoca un daño continuo en las células epiteliales de los conductos biliares a lo largo de todo el árbol biliar.

En este estudio hemos demostrado que los linfocitos T citotóxicos penetran también en el compartimento lobulillar y se localizan entre los hepatocitos. La presencia de gránulos citotóxicos intracitoplasmáticos demostrada mediante inmunohistoquímica con Tia-1 en estos linfocitos lobulillares indica que su capacidad citolítica está activada también en estas áreas, lo que potencia todavía más la destrucción parenquimatosa del hígado.

Estos hallazgos, junto con el perfil celular y su localización observada en este estudio, respaldan la hipótesis de una respuesta autoinmune alterada como patogénesis de la AVB, donde la acumulación de células T, macrófagos y la producción de IFN- γ contribuirían al daño en los conductos biliares y a la fibrosis asociada. Es más, el daño a los conductos biliares en la AVB y el comienzo de la cascada autoinmune descrita no sólo ocurriría poco después del nacimiento, sino también durante el desarrollo fetal(91,92). En vista de estas alteraciones, la supresión o la modulación de la actividad linfocitaria podría ser beneficiosa en las

fases iniciales de la AVB. Se requiere más investigación para comprender completamente los mecanismos subyacentes y el papel concreto de cada elemento de la constelación de células y mediadores inflamatorios en la progresión de la enfermedad.

Se ha estudiado el repertorio de inmunoglobulinas (Ig) en los ductos biliares remanentes de pacientes con AVB y se ha demostrado oligoclonalidad(93). Asimismo, se ha observado que se depositan autoanticuerpos IgM e IgG a lo largo de la membrana basal del epitelio biliar(94), y también que autoanticuerpos dirigidos contra la α -enolasa del epitelio ductal portal exhiben reactividad cruzada con antígenos virales en lactantes con AVB(95). También se han encontrado significativamente elevados los anticuerpos en sangre de lactantes con AVB(82). En nuestros casos no hemos estudiado los depósitos de Ig en las biopsias hepáticas, pero tampoco hemos observado un aumento de Ig circulantes ni una población significativa de linfocitos B y células plasmáticas en tejido hepático.

9.3 Relación entre SOX9 y reacción inflamatoria

En este trabajo de investigación también analizamos la relación entre la expresión de SOX9 y los diferentes tipos de células inflamatorias. Descubrimos que hay una correlación positiva significativa entre linfocitos T CD8+ y la puntuación en la “Escala SOX9” definida en la primera parte del trabajo, cuya publicación se adjunta en forma de anexo (66). Ahí se demuestra que, en biopsias de pacientes con AVB, SOX9 se correlaciona con la severidad de la fibrosis hepática. Esta relación ha sido corroborada tanto experimentalmente en modelos animales de fibrosis con inactivación de SOX9 como en pacientes adultos (96). Hay numerosos estudios que respaldan un papel de SOX9 como regulador de componentes clave de la matriz extracelular de la fibrosis hepática y en otros órganos(64,97). Es importante destacar que, en el adulto, la abundancia de SOX9 en biopsias para la detección del grado de severidad y predicción de la progresión de la enfermedad supera otros

factores de riesgo(64). Sin embargo, el papel de SOX9 en la reacción inflamatoria todavía se conoce muy poco; los escasos estudios hasta la fecha se han centrado especialmente en su papel oncogénico(98,99). Sobre la implicación de diversos componentes de la familia SOX en diferentes tumores, se ha demostrado que los macrófagos del microambiente tumoral secretan TGF- β , el cual contribuye a aumentar la expresión de SOX9 y la progresión tumoral (98). En ciertos linfomas se ha demostrado que SOX9 estimula la proliferación celular e inhibe la apoptosis. En patología no neoplásica, también hay evidencias relevantes en diferentes enfermedades: se ha visto que la combinación de SOX9 y TGF- β acelera sustancialmente la condrogénesis y, por tanto, la regeneración y síntesis de matriz extracelular en discos intervertebrales degenerados, sugiriendo que el efecto sinérgico de ambos elementos podría utilizarse terapéuticamente en la estabilización del cartílago (100). Más interesante todavía es el trabajo de Scharf y cols. en ratón (84) en el que demuestran que SOX9 regula negativamente mediadores proinflamatorios de los fibroblastos de cicatrices fibrosas de infarto de miocardio *in vivo* e *in vitro*. La inactivación de SOX9 en los fibroblastos elimina en gran medida la reacción inflamatoria que se observa en el infarto miocárdico en fases tardías, es decir, que la delección de SOX9 en los fibroblastos reduce la fibrosis y la inflamación. Al igual que nosotros, estos investigadores consideran que la manipulación de SOX9 podría tener una alta relevancia clínica en el futuro. Estudios similares se han desarrollado en fibrosis pulmonar, demostrándose que SOX9 media la regulación de IGF-II en los factores de crecimiento como TGF β 2 y 3, COL3A1 y otros en fibroblastos, concluyendo que esta vía IGF-II - SOX9 puede ser utilizada para el desarrollo de nuevas intervenciones terapéuticas para la fibrosis pulmonar(85). También en pulpa dental inflamada, SOX9 parece jugar un papel en la regulación de la matriz extracelular, el proceso inflamatorio y la respuesta inmune(13). En un estudio de la inflamación del hígado graso no alcohólico del adulto, se confirmó que la caspasa 6 controla la interacción NR4A1-SOX9 que conduce a inflamación hepática(86).

Bien es cierto que se necesitan más estudios antes de vislumbrar la traducción de estos experimentos a la medicina clínica. En el campo de la AVB, habrá que investigar posibles herramientas terapéuticas para manipular SOX9; también será necesario identificar las vías de señalización que activan este factor de transcripción, así como su papel en cada tipo celular implicado en la evolución de la patología hepática de la AVB.

9.4 Fortalezas y limitaciones del estudio

Esta serie de casos ha sido suficiente para demostrar el potencial clínico de la inmunexpresión de SOX9 en las biopsias hepáticas de pacientes con AVB. La posibilidad de utilizar muestras hepáticas de autopsia, sin alteraciones aparentes, como controles ha dado una mayor robustez al estudio estadístico. Los hallazgos diferenciales observados en el grupo de AVB fueron tan llamativos que no hubo posibilidad de sesgo por parte de los dos observadores, lo cual compensa el hecho de que las observaciones se realizaron en preparaciones antiguas con diagnósticos conocidos.

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones a tener en cuenta: En primer lugar, el diseño fue retrospectivo y las muestras se seleccionaron según su disponibilidad. Además, nuestra institución no es un centro de trasplante hepático pediátrico, por lo que el número de casos de AVB no es grande. Además, las biopsias hepáticas de AVB se realizaron una vez que la enfermedad ya estaba establecida, lo que deja fuera el estudio en fases más tempranas, que podría ofrecer información valiosa sobre la dinámica de las alteraciones.

Aún queda por determinar si la expresión de SOX9 en la enfermedad hepática colestática, ya sea AVB o de otro tipo, cambia con el tiempo o se mantiene estable. Como sólo verificamos una muestra de hígado por paciente, no podemos responder a esta pregunta. Por lo tanto, para llegar a comprender la dinámica de la expresión

de SOX9 en esta enfermedad hepática es necesario realizar más investigaciones que sean prospectivas, que involucren a más pacientes y que permitan un seguimiento a largo plazo.

9.5 Utilidad del trabajo y nuevas perspectivas

Este trabajo resulta útil en varios aspectos. En primer lugar, ofrece una visión más profunda y detallada de la expresión de SOX9 en el hígado de los pacientes con atresia de vías biliares (AVB) y su relación con la respuesta inmunitaria. Eso puede contribuir a una mejor comprensión de la patogénesis de la enfermedad y de cómo SOX9 y el sistema inmunológico estarían involucrados en el desarrollo y progresión de la AVB.

Además, el trabajo presenta un nuevo enfoque para el diagnóstico y pronóstico de la AVB. Gracias a la “Escala SOX9” descrita aquí, SOX9 se incorporará al arsenal diagnóstico como una herramienta útil para evaluar de forma más precisa el daño hepático y diferenciar la AVB de otras afecciones hepáticas. Esto podría tener un impacto clínico importante al brindar a los clínicos una herramienta adicional para tomar decisiones informadas sobre el tratamiento y la gestión de pacientes con AVB.

En términos de nuevas perspectivas, este estudio abre la puerta a una serie de investigaciones adicionales y aplicaciones clínicas significativas. Algunas de estas perspectivas podrían incluir:

1. Diagnóstico diferencial: La capacidad de SOX9 para diferenciar entre la AVB y otras enfermedades hepáticas colestásicas del lactante podría tener un impacto significativo en el diagnóstico temprano y preciso de la enfermedad, lo que a su vez podría permitir intervenciones más oportunas y efectivas para los pacientes.
2. Enfoques inmunomoduladores: La asociación encontrada entre la expresión de SOX9 y la infiltración de células inmunes abre nuevas oportunidades para

el desarrollo de terapias que regulen la respuesta inmunológica en pacientes con AVB.

3. Predictores pronósticos: La correlación entre la expresión de SOX9 y la gravedad del daño hepático en pacientes con AVB es prometedora para la identificación temprana de pacientes en riesgo de progresión rápida. Esto, a su vez, podría facilitar la adopción de estrategias de tratamiento y manejo, mejorando la evolución clínica.
4. Terapias dirigidas: La relación entre la expresión de SOX9 y la respuesta inflamatoria y progresión de la enfermedad en la AVB podría conducir al desarrollo de terapias específicas centradas en modular la expresión de SOX9, con el objetivo de mejorar la evolución de la enfermedad.
5. Investigación básica: El papel de SOX9 en la regulación de las células progenitoras epiteliales hepáticas y los hallazgos de este trabajo motivan una investigación más profunda sobre cómo SOX9 influye en la regeneración y reparación hepática, así como en la diferenciación celular durante el daño hepático.

En resumen, en este trabajo se resalta la importancia de SOX9 en la patogénesis de la atresia de vías biliares y su interacción con el sistema inmunológico, proporcionando una nueva perspectiva en la comprensión de esta enfermedad hepática, lo que tiene implicaciones clínicas y terapéuticas. Por ejemplo, la manipulación de SOX9 y la redirección de la respuesta inmunológica podrían ser parte del tratamiento. Si se confirma en estudios más amplios el papel de SOX9 en la fibrosis y la respuesta inmunológica se podría llegar al desarrollo de terapias dirigidas en la AVB.

Por todo ello, este trabajo de tesis doctoral sienta los cimientos para futuras investigaciones en el campo de la AVB y puede tener implicaciones clínicas importantes en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad.

10. CONCLUSIONES

1. La escala SOX9 desarrollada en este trabajo es capaz de discriminar entre AVB y otras afecciones hepáticas semejantes del neonato y el lactante, y de proporcionar información sobre el daño hepático. Tiene, por tanto, el potencial de servir como una herramienta útil de diagnóstico y pronóstico en la toma de decisiones clínicas.
2. Existe una asociación entre expresión de SOX9, inflamación y proliferación ductular en la AVB. Existe además una correlación significativa entre la presencia de linfocitos T CD8+ y la puntuación en la Escala SOX9, lo que sugiere una interacción entre SOX9 y las células inmunológicas en el contexto de esta enfermedad.
3. En las biopsias hepáticas de pacientes con AVB obtenidas durante la portoenterostomía, SOX9 se expresa principalmente en el epitelio ductular reactivo y en menor proporción en las células estromales y en los hepatocitos.
4. Los pacientes con AVB presentan una inflamación significativa en la biopsia hepática tomada durante la cirugía de Kasai. En esta inflamación, se han identificado linfocitos T, especialmente linfocitos T citotóxicos (CD8+), que se encuentran ubicados en áreas fibrosas estromales y en proximidad a los hepatocitos lobulillares.
5. La extensión de la inflamación se correlaciona con el grado de fibrosis y reacción ductular.

6. Las características inmunocelulares observadas en este estudio respaldan la hipótesis de que la AVB puede tener una base autoinmune o autoinflamatoria. La relación entre infección viral o exposición a toxinas y respuesta inmunológica exagerada contra las células epiteliales del conducto biliar es coherente con la literatura actual

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Mc Kiernan PJ, Baker AJ. The frequency and outcome of biliary atresia in the UK and Ireland. *Lancet* 2000, 355:25–9.
2. Chaudhry Z, Forget S, Nguyen VH, Ahmed N. The role of liver biopsy in investigation of cholestatic liver disease in infancy. *J Can Assoc Gastroenterol* 2019, 2:51–6.
3. Berauer JP, Mezina AI, Okou DT, Sabo A, Muzny DM, Gibbs RA, Hegde MR, Chopra P, Cutler DJ, Perlmutter DH, Bull LN, Thompson RJ, Loomes KM, Spinner Nb, Rajagopalan R, Guthery SL, Moore B, Yandell M, Harpavat S, Magee JC, Kamath BM, Molleston JP, Bezerra JA, Murray KF, Alonso EM, Rosenthal P, Squires RH, Wang KS, Finegold MJ, Russo P, Sherker AH, Sokol RJ, Karpen SJ. Identification of polycystic kidney disease 1 like 1 gene variants in children with biliary atresia splenic malformation syndrome. *Hepatology* 2019, 70:899–910.
4. Nio M, Wada M, Sasaki H, Tanaka H, Watanabe T. Long-term outcomes of biliary atresia with splenic malformation. *J Pediatr Surg* 2015, 50:2124–7.
5. Caponcelli E, Knisely AS, Davenport M. Cystic biliary atresia: an etiologic and prognostic subgroup. *J Pediatr Surg* 2008, 43:1619–24.
6. Saito T, Terui K, Mitsunaga T, Nakata M, Ono S, Mise N, Yoshida H. Evidence for viral infection as a causative factor of human biliary atresia. *J Pediatr Surg* 2015, 50:1398–404.
7. Zani A, Quaglia A, Hadzić N, Zuckerman M, Davenport M. Cytomegalovirus-associated biliary atresia: An aetiological and prognostic subgroup. *J Pediatr Surg* 2015, 50:1739–45.
8. Sato A, Iizuka M, Nakagomi O, Suzuki M, Horie Y, Konno S, Hirasawa F, Sasaki K, Shindo K, Watanabe S. Rotavirus double-stranded RNA induces apoptosis and diminishes wound repair in rat intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2006, 21:521–30.
9. Lorent K, Gong W, Koo KA, Waisbourd-Zinman O, Karjoo S, Zhao X, Sealy I, Kettleborough RN, Stemple DK, Windsor PA, Whittaker SJ, Porter JR, Wells RG, Pack M. Identification of a plant isoflavonoid that causes biliary atresia. *Sci Transl Med* 2015, 7:286ra67.
10. Zhao X, Lorent K, Wilkins BJ, Marchione DM, Gillespie K, Waisbourd-Zinman O, So J, Koo KA, Shin D, Porter JR, Wells RG, Blair I, Pack M. Glutathione antioxidant pathway activity and reserve determine toxicity and specificity of the biliary toxin biliary atresia toxin in zebrafish. *Hepatology* 2016, 64:894–907.
11. Cheng G, Chung PHY, Chan EKW, So MT, Sham PC, Cherny SS, Kwong-Hang Tam P, Garcia-Barceló MM. Patient complexity and genotype-phenotype correlations in biliary atresia: a cross-sectional analysis. *BMC Med Genomics* 2017, 10:22.
12. Blache P, van de Wetering M, Duluc I, Domon C, Berta P, Freund JN, Freund JN, Clevers H, Jay P. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Biol* 2004, 166:37–47.
13. Luo Z, Jegga AG, Bezerra JA. Gene-disease associations identify a connectome with shared molecular pathways in human cholangiopathies. *Hepatology* 2018, 67:2.

14. Sanchez-Valle A, Kassira N, Varela VC, Radu SC, Paidas C, Kirby RS. Biliary Atresia: Epidemiology, genetics, clinical update, and public health perspective. *Adv Pediatr* 2017, 64:285–305.
15. Mezina A, Karpen SJ. Genetic contributors and modifiers of biliary atresia. In: *Digestive Diseases* 2015, 33:408–14.
16. Jee J, Mourya R, Shivakumar P, Fei L, Wagner M, Bezerra JA. Cxcr2 signaling and the microbiome suppress inflammation, bile duct injury, and the phenotype of experimental biliary atresia. *PLoS One* 2017, 12:e0182089.
17. Mack CL. What causes biliary atresia? Unique aspects of the neonatal immune system provide clues to disease pathogenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2015, 3:267-274.
18. Harada K, Sato Y, Itatsu K, Isse K, Ikeda H, Yasoshima M, Zen Y, Matsuri A, Nakanuma Y. Innate immune response to double-stranded RNA in biliary epithelial cells is associated with the pathogenesis of biliary atresia. *Hepatology* 2007, 46:1146–54.
19. Harada K, Sato Y, Ikeda H, Isse K, Ozaki S, Enomae M, Ohama K, Katayanagi K, Kurumaya H, Matsui A, Nakanuma Y. Epithelial-mesenchymal transition induced by biliary innate immunity contributes to the sclerosing cholangiopathy of biliary atresia. *J Pathol* 2009, 217:654–64.
20. Mogul D, Zhou M, Intihar P, Schwarz K, Frick K. Cost-effective analysis of screening for biliary atresia with the stool color card. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015, 60:91–8.
21. Wang L, Yang Y, Chen Y, Zhan J. Early differential diagnosis methods of biliary atresia: a meta-analysis. *Pediatr Surg Int* 2018, 34:363–80.
22. Lane E, Murray KF. Neonatal Cholestasis. *Pediatr Clin North Am.* 2017, 64:621–39.
23. Cequera A, De García León Méndez MC. Biomarcadores para fibrosis hepática, avances, ventajas y desventajas. *Rev Gastroenterol Mex* 2014, 79:187–99.
24. Choochuen P, Kritsaneepaiboon S, Charoonratana V, Sangkhathat S. Is “gallbladder length-to-width ratio” useful in diagnosing biliary atresia? *J Pediatr Surg* 2019, 54:1946-52.
25. Zhou L, Shan Q, Tian W, Wang Z, Liang J, Xie X. Ultrasound for the diagnosis of biliary atresia: A meta-analysis. *Am J Rroentgenol* 2016, 206:73–82.
26. Chusilp S, Sookpotarom P, Tepmalai K, Rajatapiti P, Chongsrisawat V, Poovorawan Y, Vejchapopat P. Prognostic values of serum bilirubin at 7th day post-Kasai for survival with native livers in patients with biliary atresia. *Pediatr Surg Int* 2016, 32:927–31.
27. Mahjoub FE, Khairkhah RH, Sani MN, Irvanloo G, Monajemzadeh M. CD 56 staining in liver biopsies does not help in differentiating extrahepatic biliary atresia from other causes of neonatal cholestasis. *Diagn Pathol* 2008, 5:1-10.
28. Zhang S, Wu Y, Liu Z, Tao Q, Huang J, Yang W. Hepatic pathology of biliary atresia: A new comprehensive evaluation method using liver biopsy. *Turk J Gastroenterol* 2016, 27:257–63.
29. Azar G, Beneck D, Lane B, Markowitz J, Daum F, Kahn E. Atypical morphologic presentation of biliary atresia and value of serial liver biopsies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002, 34:212–5.
30. Lykavieris P, Chardot C, Sokhn M, Gauthier F, Valayer J, Bernard O. Outcome in adulthood of biliary atresia: A study of 63 patients who survived for over 20 years with their native liver. *Hepatology* 2005, 41:366–71.

31. Kasai M, Mochizuki I, Ohkohchi N, Chiba T, Ohi R. Surgical limitation for biliary atresia: indication for liver transplantation. *J Pediatr Surg* 1989, 24:851–4.
32. Cazares J, Koga H, Murakami H, Nakamura H, Lane G, Yamataka A. Laparoscopic portoenterostomy for biliary atresia: single-center experience and review of literatures. *Pediatr Surg Int*. 2017, 33:1341–54.
33. Wada M, Nakamura H, Koga H, Miyano G, Lane GJ, Okazaki T, Urao M, Murakami H, Kashahara M, Sakamoto S, Ishizaki Y, Kawasaki s, Yamataka A. Experience of treating biliary atresia with three types of portoenterostomy at a single institution: Extended, modified Kasai, and laparoscopic modified Kasai. *Pediatr Surg Int* 2014, 30:863–70.
34. Hashimoto T, Otobe Y, Shimizu Y, Suzuki T, Nakamura T, Hayashi S, Matsuo Y, Sato M, Manabe T. A modification of hepatic portoenterostomy (Kasai Operation) for Biliary Atresia. *J Am Coll Surg* 1997, 185:548–53.
35. Chen G, Zheng S, Sun S, Xiao X, Ma Y, Shen W, Chen L, Song Z. Early surgical outcomes and pathological scoring values of older infants (≥ 90 d old) with biliary atresia. *J Pediatr Surg* 2012, 47:2184–8.
36. Nightingale S, Stormon MO, O’Loughlin E V, Shun A, Thomas G, Benchimol EI, Day AS, Adams S, Shi E, Ooi CY, Kamath BM, Fecteau A, Langer JC, Roberts EA, Ling SC, Ng VL . Early posthepatportoenterostomy predictors of native liver survival in biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2017, 64:203–9.
37. Townsend MR, Jaber A, M, Abi Nader H, Eid SM, Schwarz M. Factor associated with timing and adverse outcome in patients with biliary atresia undergoing Kasai hepatoportoenterostomy. *J Pediatr* 2018, 199:237–42.
38. Li QG. Liver transplantation for biliary atresia: A single-center study from mainland China. *World J Gastroenterol* 2015, 21:9638–47.
39. Tyraskis A, Davenport M. Steroids after the Kasai procedure for biliary atresia: the effect of age at Kasai portoenterostomy. *Pediatr Surg Int* 2016, 32: 193–200.
40. Superina R. Biliary atresia and liver transplantation: results and thoughts for primary liver transplantation in select patients. *Pediatr Surg Int* 2017, 33:1297–304.
41. Wang P, Xun P, He K, Cai W. Comparison of liver transplantation outcomes in biliary atresia patients with and without prior portoenterostomy: A meta-analysis. *Digestive and Liver Disease* 2016, 48:347–52.
42. Petersen C. Biliary atresia: unity in diversity. *Pediatr Surg Int* 2017, 33:1255–61.
43. Wong KKY, Wong CWY. A review of long-term outcome and quality of life of patients after Kasai operation surviving with native livers. *Pediatr Surg Int* 2017, 33:1283–7.
44. Kasahara M, Umeshita K, Sakamoto S, Fukuda, A, Furukawa H, Uemoto S. Liver transplantation for biliary atresia: a systematic review. *Pediatr Surg Int* 2017, 33:1289–95.
45. Maddrey WC. Transplantation of the liver. Maddrey WC Ed. Elsevier. New York, Amsterdam, London 1988.
46. Andraus W. Barreras y limitaciones para el acceso al trasplante hepático en Latinoamérica. *Clin Liver Dis* 2019, 13:S2–4.
47. Hukkinen M, Ruuska S, Pihlajoki M, Kyrölahti A, Pakarinen MP. Long-term outcomes of biliary atresia patients surviving with their native livers. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2022, 56–57:1001764.

48. Ferry GD, Selby ML, Udall J, Finegold M, Nichols B. Guide to early diagnosis of biliary obstruction in infancy. *Clin Pediatr* 1985, 24:305–11.
49. Arii R, Koga H, Arakawa A, Miyahara K, Lane GJ, Okazaki T, Urao M, Yamataka A. How valuable is ductal plate malformation as a predictor of clinical course in postoperative biliary atresia patients? *Pediatr Surg Int* 2011, 27:275–7.
50. Wildhaber BE, Coran AG, Drongowski RA, Hirschl RB, Geiger JD, Lelli JL, Teitelbaum DH. The Kasai portoenterostomy for biliary atresia: a review of a 27-year experience with 81 patients. *J Pediatr Surg* 2003, 38:1480–5.
51. Bittmann S. Surgical experience in children with biliary atresia treated with portoenterostomy. *Curr Surg* 2005, 62:439–43.
52. Escobar AJ, Aguirre GJ, Durán MA. Malformación de la placa ductal en el desarrollo de la fibrosis hepática congénita. Un estudio inmunohistoquímico. *Rev Med Hosp Gen Mex* 2001, 64:201–204.
53. Vuković J, Grizelj R, Bojanić K, Ćorić M, Luetić T, Batinica S, et al. Ductal plate malformation in patients with biliary atresia. *Eur J Pediatr* 2012, 171:1799–804.
54. Torbenson M, Hart J, Westerhoff M, Azzam RK, Elgendi A, Mziray-Andrew HC, et al. Neonatal giant cell hepatitis: histological and etiological findings. *Am J Surg Pathol* 2010, 34:1498–503.
55. Matta B, Cabello R, Rabinovitz M, Minervini M, Malik S. Post-infantile giant cell hepatitis: A single center's experience over 25 years. *World J Hepatol* 2019, 11:752–760.
56. Russo P, Magee JC, Anders RA, Bove KE, Chung C, Cummings OW, Finegold MJ, Finn LS, Kim GE, Lovell MA, Magid MS, Melin-Aldana H, Ranganathan S, Shehata BM, Wang LL, White FV, Chen Z, Spino C Key histopathologic features of liver biopsies that distinguish biliary atresia from other causes of infantile cholestasis and their correlation with outcome: A multicenter study. *Am J Surg Pathol* 2016, 40:1601–1615.
57. Rastogi A, Krishnani N, Yachha SK, Khanna V, Poddar U, Lal R. Histopathological features and accuracy for diagnosing biliary atresia by prelaparotomy liver biopsy in developing countries. *J Gastroenterol Hepatol* 2009, 24:97–102.
58. Mukhopadhyay SG, Roy P, Chatterjee U, Datta C, Banerjee M, Banerjee S, Basu AK, Ganguli M. A histopathological study of liver and biliary remnants in the long-term survivors (>10 years) of cases of biliary atresia. *Indian J Pathol Microbiol* 2014, 57:380–5.
59. Azarow KS, Phillips MJ, Sandler AD, Hagerstrand I, Superina RA. Biliary atresia: should all patients undergo a portoenterostomy? *J Pediatr Surg* 1997, 32:168–72.
60. Santos JL, Kieling CO, Meurer L, Vieira S, Ferreira CT, Lorentz A, Silveira TR. The extent of biliary proliferation in liver biopsies from patients with biliary atresia at portoenterostomy is associated with the postoperative prognosis. *J Pediatr Surg* 2009, 44:695–701.
61. Shimadera S, Iwai N, Deguchi E, Kimura O, Ono S, Fumino S, Higuchi K. Significance of ductal plate malformation in the postoperative clinical course of biliary atresia. *J Pediatr Surg* 2008, 43:304–7.
62. Lampela H, Kosola S, Heikkilä P, Lohi J, Jalanko H, Pakarinen MP. Native liver histology after successful portoenterostomy in biliary atresia. *J Clin Gastroenterol* 2014, 48:721–8.
63. Superina R, Magee JC, Brandt ML, Healey PJ, Tiao G, Ryckman F, Karrer FM, Iyer K, Fecteau A, West K, Burns RC, Flake A, Lee H, Lowell JA, Dillon P, Colombani P, Ricketts R, Li Y, Moore J, Wang KS. The anatomic pattern of biliary atresia identified at time of

- Kasai hepatopertoenterostomy and early postoperative clearance of jaundice are significant predictors of transplant-free survival. *Ann Surg* 2011, 254:577–85.
64. Athwal VS, Pritchett J, Martin K, Llewellyn J, Scott J, Harvey E, Zaitoun AM, Mullan AF, Zeef LAH, Friedman SL, Irving WL, Hanley NA, Guha IN, Piper Hanley K. SOX9 regulated matrix proteins are increased in patients serum and correlate with severity of liver fibrosis. *Sci Rep* 2018, 17;8:17905.
 65. Moreira RK, Cabral R, Cowles RA, Lobritto SJ. Biliary Atresia: A multidisciplinary approach to diagnosis and management. *Arch Pathol Lab Med* 2012, 136:746–60.
 66. Asai A, Miethke A, Bezerra JA. Pathogenesis of biliary atresia: Defining biology to understand clinical phenotypes, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015, 342–52.
 67. Yang L, Mizuochi T, Shivakumar P, Mourya R, Luo Z, Gutta S, Bezerra JA. Regulation of epithelial injury and bile duct obstruction by NLRP3, IL-1R1 in experimental biliary atresia. *J Hepatol* 2018, 69:1136–1144.
 68. Vischetti C, Casucci C, De Bernardi A, Monaci E, Tiano L, Marcheggiani F, et al. Sub-lethal effects of pesticides on the DNA of soil organisms as early ecotoxicological biomarkers. *Front Microbiol* 2020, 11:1892.
 69. Chusilp S, Balsamo F, Li B, Vejchapipat P, Pierro A. Development of liver inflammatory injury in biliary atresia: from basic to clinical research. *Pediatr Surg Int* 2023, 39:207.
 70. Bijl EJ, Bharwani KD, Houwen RHJ, de Man RA. The long-term outcome of the Kasai operation in patients with biliary atresia: a systematic review. *Neth J Med* 2013, 71:170–3.
 71. Ohya T, Fujimoto T, Shimomura H, Miyano T. Degeneration of intrahepatic bile duct with lymphocyte infiltration into biliary epithelial cells in biliary atresia. *J Pediatr Surg* 1995, 30:515–8.
 72. Davenport M, Tizzard SA, Underhill J, Mieli-Vergani G, Portmann B, Hadžić N. The biliary atresia splenic malformation syndrome: A 28-year single-center retrospective study. *J Pediatr* 2006, 149:393–400.
 73. El-Araby HA, Saber MA, Radwan NM, Taie DM, Adawy NM, Sira AM. Temporal histopathological changes in biliary atresia: A perspective for rapid fibrosis progression. *Ann Hepatol* 2021, 21:100263.
 74. Kerola A, Lampela H, Lohi J, Heikkilä P, Mutanen A, Jalanko H, Pakarinen MP. Molecular signature of active fibrogenesis prevails in biliary atresia after successful portoenterostomy. *Surgery* 2017, 162:548–56.
 75. Lampela H, Kosola S, Heikkilä P, Lohi J, Jalanko H, Pakarinen MP. Native liver histology after successful portoenterostomy in biliary atresia. *J Clin Gastroenterol* 2014, 48:721–8.
 76. Pancer Z, Cooper MD. The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2006, 24:497–518.
 77. Kehry MR, Hodgkin PD. B-Cell activation by helper T-Cell membranes. *Crit Rev Immunol* 1994, 14:221–38.
 78. Ortiz-Perez A, Donnelly B, Temple H, Tiao G, Bansal R, Mohanty SK. Innate Immunity and Pathogenesis of Biliary Atresia. *Front Immunol* 2020, 11:329.
 79. Bissell DM. Hepatic fibrosis as wound repair: A progress report. *J Gastroenterol* 1998, 33:295–302.

80. Mack CL, Tucker RM, Sokol RJ, Karrer FM, Kotzin BL, Whittington PF, Miller SD. Biliary atresia is associated with CD4+ Th1 cell-mediated portal tract inflammation. *Pediatr Res* 2004, 56:79–87.
81. Hora S, Wuestefeld T. Liver injury and regeneration: Current understanding, New approaches, and future perspectives. *Cells* 2023, 12:2129.
82. de Jong IEM, Bodewes SB, van Leeuwen OB, Oosterhuis D, Lantinga VA, Thorne AM, Lascaris B, van den Heuvel MC, Wells RG, Olinga P, de Meijer VE, Porte RJ. Restoration of bile duct injury of donor livers during ex situ normothermic machine perfusion. *Transplantation* 2023, 107:e161–e172.
83. Kim M, Rizvi F, Shin D, Gouon-Evans V. Update on hepatobiliary plasticity. *Semin Liver Dis* 2023, 43:013–23.
84. Sahoo S, Mishra A, Diehl AM, Jolly MK. Dynamics of hepatocyte-cholangiocyte cell-fate decisions during liver development and regeneration. *iScience*. 2022, 25:104955.
85. Arboleda-Bustan JE, Ribalta T, Albert A, Cuadras D, Martín-Solé O. Expression of protein SOX9 in biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2022, 74:e21–e26.
86. Mack CL, Falta MT, Sullivan AK, Karrer F, Sokol RJ, Freed BM, Fontenot AP. Oligoclonal Expansions of CD4+ and CD8+ T-Cells in the target organ of patients with biliary atresia. *Gastroenterology* 2007,133:278–87.
87. Shivakumar P, Mourya R, Bezerra JA. Perforin and granzymes work in synergy to mediate cholangiocyte injury in experimental biliary atresia. *J Hepatol* 2014, 60:370–6.
88. Hill R, Quaglia A, Hussain M, Hadzic N, Mieli-Vergani G, Vergani D, davenport M. Th-17 cells infiltrate the liver in human biliary atresia and are related to surgical outcome. *J Pediatr Surg* 2015, 50:1297–303
89. Brindley SM, Lanham AM, Karrer FM, Tucker RM, Fontenot AP, Mack CL. Cytomegalovirus-specific T-cell reactivity in biliary atresia at the time of diagnosis is associated with deficits in regulatory T cells. *Hepatology* 2012, 55:1130–8.
90. Wen J, Zhou Y, Wang J, Chen J, Yan W, Wu J, Yan J, Zhou K, Xiao Y, Wang Y, Xia Q, Cai W. Retracted article: Interactions between Th1 cells and Tregs affect regulation of hepatic fibrosis in biliary atresia through the IFN- γ /STAT1 pathway. *Cell Death Differ* 2017, 24: 997–1006.
91. Harpavat S, Finegold MJ, Karpen SJ. Patients with biliary atresia have elevated direct/conjugated bilirubin levels shortly after birth. *Pediatrics* 2011, 128:e1428–33.
92. Mysore KR, Shneider BL, Harpavat S. Biliary atresia as a disease starting in utero: implications for treatment, diagnosis, and pathogenesis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2019, 69:396–403.
93. Taylor SA, Malladi P, Pan X, Wechsler JB, Hulse KE, Perlman H, Whittington PF. Oligoclonal immunoglobulin repertoire in biliary remnants of biliary atresia. *Sci Rep* 2019, 9:4508.
94. Hadchouel M, Hugon Rn, Odievre M. Immunoglobulin deposits in the biliary remnants of extrahepatic biliary atresia: a study by immunoperoxidase staining in 128 infants. *Histopathology* 1981, 5:217–21.
95. Lu BR, Brindley SM, Tucker RM, Lambert CL, Mack CL. α -Enolase autoantibodies cross-reactive to viral proteins in a mouse model of biliary atresia. *Gastroenterology* 2010, 139:1753–61.

96. Adams JM, Huppert KA, Castro EC, Lopez MF, Niknejad N, Subramanian S, Zarrin-Khameh N, Finegold MJ, Huppert SS, Jafar-Nejad H. Sox9 is a modifier of the liver disease severity in a mouse model of Alagille syndrome. *Hepatology* 2020, 71:1331–1349.
97. Pritchett J, Athwal VS, Harvey E, Martin K, Llewellyn J, Ireland P, Nicolaides A, Humphries MJ, Bobola N, Hanley NA, Piper Hanley K. Epimorphin alters the inhibitory effects of SOX9 on mmp13 in activated hepatic stellate cells. *Syn WK*, editor. *PLoS One* 2014, 9:e100091.
98. Grimm D, Bauer J, Wise P, Krüger M, Simonsen U, Wehland M, Infanger M, Corydon TJ. The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2019, 67:122–53.
99. Sheng M, Weng Y, Cao Y, Zhang C, Lin Y, Yu W. Caspase 6/NR4A1/SOX9 signaling axis regulates hepatic inflammation and pyroptosis in ischemia-stressed fatty liver. *Cell Death Discov* 2023, 9:106.
100. Khalid S, Ekram S, Ramzan F, Salim A, Khan I. Co-regulation of Sox9 and TGFβ1 transcription factors in mesenchymal stem cells regenerated the intervertebral disc degeneration. *Front Med* 2023, 10:1127303.

12. ANEXO

Artículo publicado:

Arboleda-Bustan JE, Ribalta T, Albert A, Cuadras D, Martín-Solé O.
Expression of Protein SOX9 in Biliary Atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*
2022 Feb 1;74(2):e21-e26. doi: 10.1097/MPG.0000000000003356. PMID:
34789667.

Factor de impacto: 3,3555

1º Cuartil de acuerdo con el clasificador *Journal Citation Reports* (JCR)

JPGN es la única revista dedicada a la gastroenterología, hepatología y nutrición pediátricas y es la revista oficial de la *European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition* y de la *North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition*.

Expression of Protein SOX9 in Biliary Atresia

*Jenny E. Arboleda-Bustan, †Teresa Ribalta, ‡Asteria Albert, §Daniel Cuadras, and ||Oriol Martín-Solé

ABSTRACT

Objectives: Biliary atresia (BA) is still an enigmatic disease. Deeper knowledge of its pathophysiology could help develop better treatments. SOX9 regulates bile duct development, liver regeneration and fibrosis; therefore, it could be determinant in characterizing BA liver damage. Aim: To study if there is a SOX9 expression pattern in liver biopsies from BA patients.

Methods: Liver biopsies from BA patients (group BA), from age-matched infants without primary hepatic disease (group Control), and from patients with other liver conditions (group OLC) were compared. Expression of SOX9 was checked for: amount, intensity of immunoreaction, localization within ductular structures, periductular epithelial cells, and lobular cells. The scores were added to create a scale from 0 to 11 that allowed group comparison. SOX9 Scale and liver survival were also looked for a correlation.

Results: All BA cases had a score >4, while all controls scored <4. OLC livers scored 1 to 8 (3.5 ± 2.0) ($P < 0.001$ between all groups). A cut-off at 4 had 100% sensitivity and 88.24% specificity to differentiate BA from Controls and from OLC (area under receiver operating characteristic curve: 0.9989 (95% confidence interval: 0.9964–1.000)). Strong expression of SOX9 was observed mainly in the nuclei of proliferated ductules of portal spaces and fibrotic bridges. SOX9 Scale score could not be related to liver survival in this study.

Conclusion: In BA livers, SOX9 is mainly expressed in reactive ductular epithelium, following a pattern significantly different from that seen in non-BA patients; thus, SOX9 Scale may have a role in the diagnosis of BA.

Key Words: biliary atresia, immunohistochemistry, liver biopsy, SOX9

(*JPGN* 2022;74: e21–e26)

Biliary atresia (BA) is in most cases an inflammatory cholangiopathy of the neonate which results in rapidly progressive obliteration or stenosis of extrahepatic and intrahepatic bile ducts. Syndromic BA, namely biliary atresia with splenic malformation syndrome (BASM), may originate through a different mechanism.

Received March 19, 2021; accepted November 9, 2021.

From the *Department of Pediatric Surgery, Hospital Pediátrico Baca Ortiz, Quito, Ecuador, the †Department of Pathology, Hospital Sant Joan de Déu, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain, the ‡Department of Pediatric Surgery, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, the §Department of Statistics, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, and the ||Department of Pediatric Surgery, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain.

Address correspondence and reprint requests to Teresa Ribalta, MD, PhD, Department of Pathology, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain (e-mail: tribalta@clinic.cat).

Sources of Funding: This work was supported in part by Hospital Sant Joan de Déu.

The authors declare no conflict of interest.

Copyright © 2021 by European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition

DOI: 10.1097/MPG.0000000000003356

JPGN • Volume 74, Number 2, February 2022

What Is Known

- Biochemical markers are nonspecific and do not aid in the diagnosis of Biliary atresia (BA) or in the evaluation of liver damage.
- SOX9 in BA is mainly expressed in reactive ductular epithelium at the time of portoenterostomy.

What Is New

- SOX9 is highly expressed in liver biopsies of BA patients and absent in other liver conditions.
- The score we designed to evaluate SOX9 in liver clearly differentiates BA from other cholestatic liver conditions.
- Immunostaining for SOX9 could aid in complex diagnoses of BA and become a powerful biomarker of clinical utility to guide patient care.

Despite an intense investigation on possible causes (toxic, infectious, immunologic injury, genetic, environmental, etc.), the precise etiology and pathogenesis of this rare disease has not been elucidated yet (1–2).

Kasai portoenterostomy (KP), described in the 1950s (3), and its variants, is still the only immediate treatment that can be offered to these patients; however, its effectiveness is variable, good results depending mainly on an early diagnosis and surgical intervention. In case of KP failure, liver transplantation is the only alternative (4).

There are several conditions that may cause neonatal cholestatic jaundice. BA is the most common cause of extrahepatic cholestasis; other structural errors, metabolic diseases, and certain infections can also lead to extrahepatic cholestasis (5). Liver biopsy is often performed as a part of the etiological diagnosis workup, together with imaging and laboratory tests, before embarking in more aggressive surgical explorations. Nevertheless, morphologic findings in biopsy are age-dependent, may be non-specific, and interpretation is pathologist-dependent (5–8), all of it adding difficulties to the pathological diagnosis of this rare disease. Therefore, it would be desirable to find a biomarker that could increase the yield of hepatic biopsy.

SOX9 (sex determining region Y-box 9) belongs to the SOX gene superfamily of transcription factors and is a key regulator of developmental processes such as chondrogenesis, neurogenesis, development of male gonads, respiratory epithelium, intestinal epithelium, cardiac valves and septa. SOX9 is also known to regulate biliary development (9); SOX9 deficiency results in the absence of bile duct morphogenesis in mice (10). In addition, SOX9 seems to be necessary to maintain stem cells and progenitor cells in many differentiated organs and tissues (11,12).

Recent studies suggest that SOX9 may have a role as a mediator in the genesis and progression of liver fibrosis and show a

possible new use in stratification of fibrosis in adult patients (13). These studies, carried-out in humans and mice, show that SOX9 protein is expressed in fibrotic areas. SOX9 regulated matrix proteins are increased in patients' serum, their increase correlating with the severity of liver fibrosis. It has also been reported that SOX9 expression predicts progression toward cirrhosis in adult patients, while its lack of expression protects against liver fibrosis (14). In BA, SOX9 is expressed in reactive ductular epithelium and, ectopically, in hepatocytes, especially at the time of KP (15). Therefore, SOX9 could be involved in the early phases of cirrhosis development in BA patients.

Our aim has been to study SOX9 expression in liver biopsies of BA patients, to explore its specificity and its possible diagnostic role and, hence, facilitating clinical decision-making.

MATERIALS AND METHODS

A case-control study was carried out comparing liver biopsies from BA patients diagnosed at our institution between January 1998 and December 2018 (group BA) with liver samples obtained at autopsy or biopsy from age-matched infants without BA (group Control). Diagnosis of BA was confirmed by intraoperative cholangiography and histopathological examination of the liver biopsy specimens, usually taken during KP. Two age-matched controls (case age \pm 2 months) were paired with each BA case; controls were liver specimens from patients without primary liver disease, most of them being autopsy specimens from neonatal deaths. The autopsy liver samples were carefully selected for their good morphological and antigenic preservation checked through immunohistochemistry for usual biomarkers in liver biopsy. A third group of biopsies from patients with other liver conditions was also compared (group OLC), to investigate specificity of SOX9 scale in BA; these biopsies were selected only to match BA patients' age (age <24 months), regardless of diagnosis. OLC cases included cholestatic diseases of different causes in which a liver biopsy was performed, in order to offer a morphological, etiological, and diagnostic landscape to study the reactivity of the SOX9 antibody. This study was approved by the house Institutional Ethics Committee for Clinical Research (registry number: PIC-96-18).

Age at biopsy and other relevant clinical and biochemical features, including liver survival time (time from liver biopsy and KP to liver transplantation), were obtained from the clinical charts. Data from matched controls and group OLC were obtained from clinical charts and pathology reports.

All tissue samples had been formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) and stained at the time of diagnosis following standard techniques. Slides were retrieved from the Pathology Department files and were re-evaluated by an expert pathologist (TR). Histopathological features such as portal tract fibrosis, bridging fibrosis, proliferation of bile ductules, bile plugs (inspissated bile within ductular lumens) resulting from cholestasis, and inflammation, were systematically checked and graded by a semi-quantitative scoring system in a three-grade scale—mild, moderate, severe—, following specific literature on neonatal liver and biliary atresia (1,16,17). We used simplified Ishak's 7-point fibrosis staging, IS0 to IS6 (IS0 meaning absence of fibrosis and IS6 cirrhosis stage) to grade portal tract fibrosis and fibrosis bridging between portal spaces (18). The corresponding Ishak stages in our three-grade scale are: mild fibrosis (IS0-1), moderate (IS2-3) and severe disease (IS4-6). Hepatocyte giant cell transformation was also recorded.

Immunohistochemical staining was carried out on 3 μ m FFPE sections using a polyclonal rabbit anti-SOX9 antibody (Sigma-Aldrich/Merck HPA001758, 1:50; Darmstadt, Germany). The immunoreaction was detected with the automated Bond-Max staining system (Leica Biosystems). On-board heat-induced antigen

retrieval pre-treatment was used to restore epitopes. Cell nuclei were slightly counterstained with hematoxylin. Breast carcinoma, brain tissue with reactive gliosis, and normal testis served as positive control tissues. For negative control sections, the primary antibody was omitted in one of the positive cases.

Expression of SOX9 was manually assessed by two coauthors independently (TR, JAB) and blindly scored for amount of stained cells (0: <5%; 1: 6–25%; 2: 26–50%; 3: >50%), intensity of stain (0: absent; 1: traces; 2: weak; 3: moderate; 4: strong), localization (0: none; 1: portal spaces; 2: portal spaces and fibrotic bridges), stain in perifibrotic epithelial cells (0: absent or very occasional; 1: present), and stain in lobular cells (0: absent or very occasional; 1: present). Weak nuclear staining was determined when visible only at magnification 200x or more, whereas strong staining was visible at magnification 100x. Cytoplasmic staining was also recorded. A training set of typical cases was evaluated jointly by the two coauthors before starting the independent evaluation, to harmonize interpretation of individual parameters. Interobserver discrepancies were discussed by the two observers to reach consensus. The scores were added to create a semi quantitative scale—the SOX9 Scale—ranging from 0 to 11.

The results of the three groups were compared using Wilcoxon rank-sum test for continuous variables with non-normal distribution, and Student *t* test was used for variables with normal distribution. Homogeneity of variances was assessed using Levene robust test, and normality was assessed using Shapiro-Wilk normality test and the standardized normal probability plot. Correlation between SOX9 scale and continuous variables was assessed using the Spearman correlation coefficient. Categorical variables were compared between groups using chi-squared test or Fisher exact test. Liver survival was assessed using Kaplan-Meier method. A receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the accuracy of SOX9 Scale as a predictive factor for BA, and the area under the curve (AUC) was calculated. A *P*-value <0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed using SPSS 23 (IBM Corp, Armonk, NY).

RESULTS

Twenty-six patients were diagnosed of BA during the study period. Fifty-two babies form the control group. Demographic and clinical characteristics are summarized in Table 1, together with serological results. Liver biopsies from 16 children, ages two to seven months, diagnosed with cholestatic liver conditions other than BA constitute group OLC.

All BA patients had type 3 atresia (atresia at the *porta hepatis*). In four patients, BA coexisted with other malformations; those cases were classified as biliary atresia with splenic malformation syndrome (BASM). Liver biopsies were taken intraoperatively at the start of KP in 22 cases. Four patients had a liver biopsy performed before surgical treatment—one of them received primary liver transplantation at age 5 months while the other three underwent KP.

Follow up of BA patients ranged 5–232 months. One patient was lost to follow up. Two patients died at ages 43 and 147 months with their native liver. Nine patients received liver transplantation at a median age of 12 months (range: 5–117). Fourteen patients still had their native liver when this study was closed.

In the Control group, the main autopsy finding was ischemic-hypoxic brain injury (18 cases); other identified causes of death were infection (eight cases), complex cardiac malformation (eight cases), diaphragmatic hernia (six cases), necrotizing enterocolitis (four cases), lipofuscinosis (two cases), Edwards syndrome (one case), Ohtahara syndrome (one case), and rhabdomyosarcoma (one case). Two of the control samples were liver biopsies from patients

TABLE 1. Demographic, clinical and serological data of BA, Controls and OLC patients

	BA (n=26)	Controls (n = 52)	OLC (n = 16)	P value
Age in months, \bar{x} (range)	2.1 (1.1–4.6)	1.1 (0.53–1.7)	3.56 (2.1–4.04)	0.01 ⁺
Male	13 (50%)	23 (44%)	10 (62.5%)	0.53 ⁺⁺
BAMS	4 (15.3%)	Not done	Not done	
IgG CMV	11 (42%)	2 (3.8%)	Not done	0.02 ⁺⁺
IgG Epstein-Barr virus	3 (11%)	Not done	Not done	
IgG parvovirus	2 (7.6%)	Not done	Not done	
Sonographic Trident sign	55 (19.2%)	Not done	Not done	
Small gallbladder	15 (57.6%)	Not done	Not done	
Hepatobiliary scintiscan	23 (88.4%)	Not done	Not done	
Pre-surgical hepatic biopsy	4 (15.3%)	Not done	Not done	
Intraoperative cholangiography	18 (69.2%)	Not done	Not done	
Liver transplantation	9 (34.6%)	Not done	Not done	
Time from KP to liver transplantation (months) [*]	18 (2.1–56.2)	Not done	Not done	

BA = biliary atresia; OLC = other liver conditions; BAMS = Biliary Atresia Splenic Malformation syndrome; IgG = immunoglobulin G against particular viruses; CMV = cytomegalovirus. ⁺Student *t*-test. ⁺⁺Chi-squared test. ^{*}One patient had liver transplantation as her first surgical treatment at age 4.6 months. All other patients had a Kasai procedure as first surgical treatment.

with diagnoses of hepatic hemangioma and rhabdoid tumor, obtained away from the tumor lesion. Clinical and histological diagnoses in the OLC group were: neonatal hepatitis 3, non-syndromic ductopenia 3, Alagille syndrome 2, toxic hepatitis 1, sepsis 4, progressive familial intrahepatic cholestasis 2, and chronic hepatitis 1.

SOX9 Scale score was (mean \pm standard deviation) 7.62 \pm 2.06 in BA cases, 0.58 \pm 0.84 in controls and 3.56 \pm 2.12 in group OLC, showing a non-normal distribution; the Wilcoxon test showed a significant difference between the three groups ($P < 0.001$) (Fig. 1). The area under ROC curve (BA vs Control

and OLC) was 0.9989 (95% confidence interval [CI]: 0.9964–1.000), so the SOX9 Scale we designed ad hoc was useful to differentiate BA from non BA livers: a cut-off at 4 had 100% sensitivity and 88.24% specificity.

In BA livers, SOX9 was typically expressed in the nuclei of reactive ductular epithelium and, to a lesser degree, in epithelial cells near fibrotic porta spaces and fibrotic bridges, with a more variable stain in cytoplasm. Strong expression of SOX9 was observed mainly in proliferated ductules of portal spaces and fibrotic bridges. A weak to moderate stain was present in peribrotic epithelial cells, usually forming rows, stromal cells of fibrotic

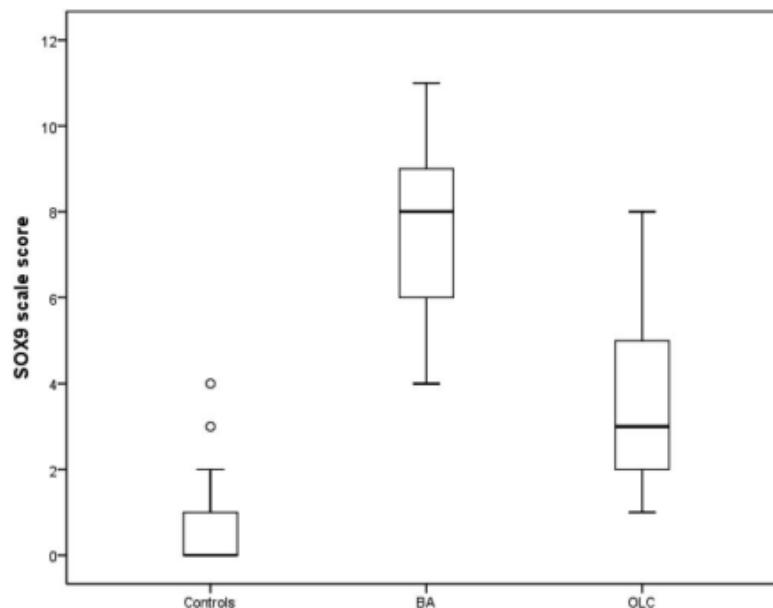


FIGURE 1. In the SOX9 scale, Controls scored ($\bar{x} \pm$ SD) 0.58 \pm 0.84, whereas BA scored 7.62 \pm 2.06 and other liver conditions (OLC) scored 3.56 \pm 2.03. All differences were statistically significant ($P < 0.001$ between all groups). BA = biliary atresia.

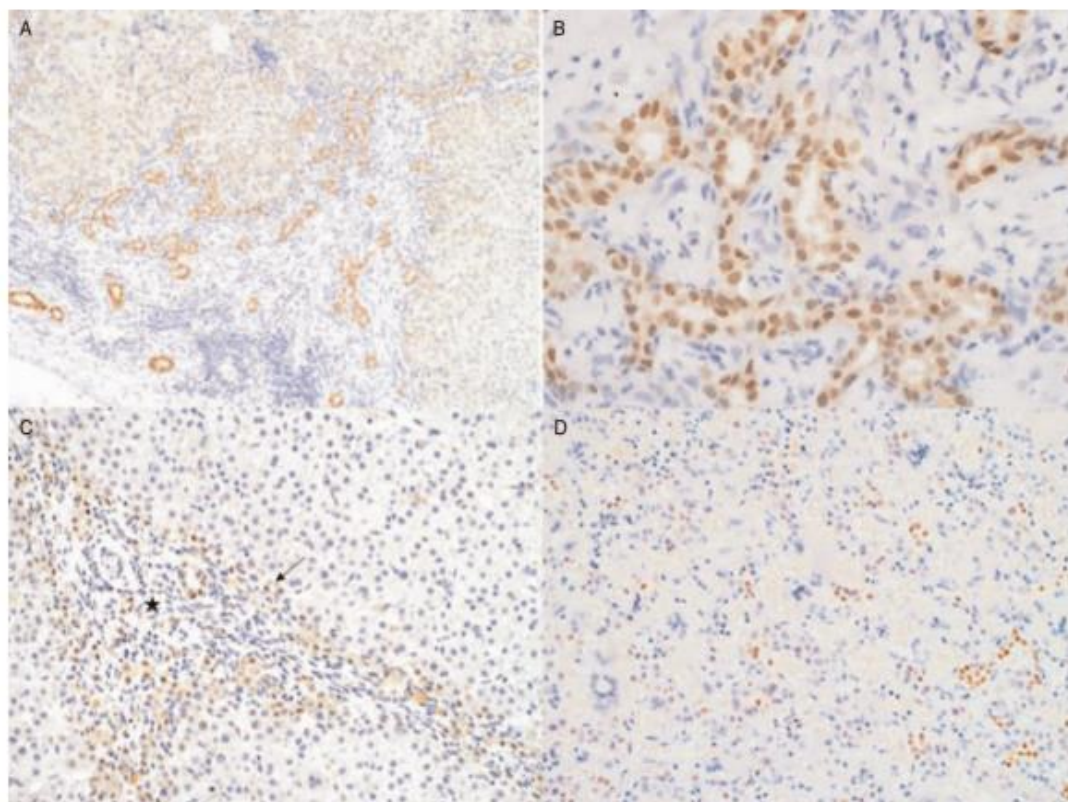


FIGURE 2. Immunohistochemical expression of SOX9 protein in the liver of BA patients: SOX9 is mainly expressed in the nuclei of reactive ductular cells (A, B) (SOX9 immunostain; A, 100 \times ; B, 400 \times). Some perifibrotic epithelial cells (arrow) and stromal cells (asterisk) (C) of portal spaces and fibrotic bridges also show faint to moderate expression (SOX9; 200 \times). In some cases, there was also expression in some lobar cells (D) (SOX9; 200 \times). BA = biliary atresia.

tissue, and lobar cells (Fig. 2). Interobserver reproducibility was extremely high, with no major discrepancies. This pattern was clearly different from that seen in non-BA livers, both controls and OLC: in these groups SOX9 expression was usually absent or very low, limited to some of the portal tracts. Only one specimen in the Control group, from a patient with cytomegalovirus infection, showed strong SOX9 expression, scoring 4 in the SOX 9 Scale. In only 1 of 16 liver specimens in group OLC SOX9, expression was strong in the reactive ducts and perifibrotic epithelial cells. This patient was a two month and 27 days-old female who had enterovirus sepsis at age five days and developed subsequent hepatomegaly. Her biopsy revealed extensive portal and periportal fibrosis with bridges; her histological diagnosis was compatible with the post-sepsis situation, but not conclusive.

SOX9 expression showed a significant correlation with other histological parameters in BA cases: portal fibrosis and bridging, ductular proliferation, giant cell transformation, bile plugs and inflammation (Correlation coefficient: 0.83, 0.88, 0.72, 0.82, 0.75 respectively, $P < 0.001$); however, SOX9 did not correlate significantly with the available serum biochemical parameters (total bilirubin, conjugated bilirubin, gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and albumin. There is also a positive correlation between age at

biopsy and SOX9 Scale score, which did not reach significance in our patients ($\rho = 0.197$, $P = 0.355$). Figure 3 shows liver survival in a Kaplan-Meier survival curve for SOX9 scores <7 and >8 . There is a better liver prognosis for scores <7 , however the difference did not reach significance ($P = 0.143$ in the log-rank test). Patients already transplanted scored an average of 8.33 while patients that still have their native liver scored 7.24 at the time of KP. SOX9 Scale score in two patients who died with their native liver was 4 and 7, respectively.

DISCUSSION

This study shows that SOX9 is mainly expressed in the reactive ductular epithelium, perifibrotic epithelial cells and stromal fibrotic cells of BA livers and is only focally expressed in lobar cells. Extension of immune expression increased with the degree of fibrosis and ductular reaction. In contrast, SOX9 was generally absent or focally expressed in liver specimens from patients without primary liver disease or with other liver conditions.

BA is a rare disease of the neonate with a variable clinical outcome after KP. In the long term, patients develop cirrhosis and will need a rescue liver transplant (19). The age at which liver transplant is necessary does influence its success and other prognostic factors, such as growth and nutrition, ability to carry out a normal child's life, and survival (19,20). Liver biopsy has long been

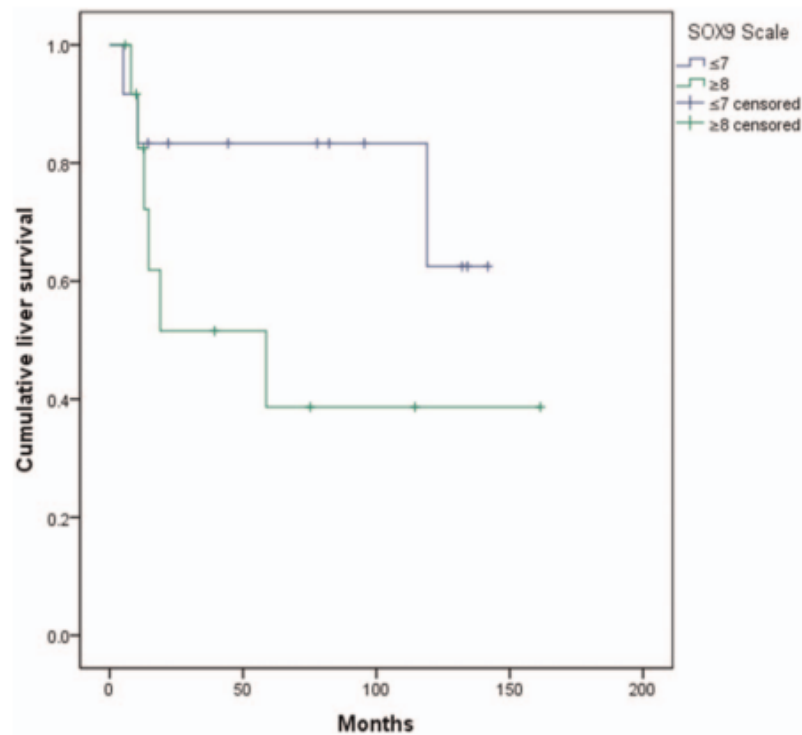


FIGURE 3. Kaplan-Meier liver survival curves for livers scoring <7 (blue) and >8 (green) in the SOX9 scale at the time of first biopsy. The difference did not reach significance ($P=0.143$ in the log-rank test). Points marked “censored” indicate age at the time the study was closed.

considered a key piece in the diagnostic evaluation of infants with cholestatic jaundice (21). Main histopathological features of BA are destruction of biliary epithelium along the ductal system, reactive ductular proliferation, and progressive hepatic fibrosis (1,17); however, morphologic findings in the biopsy may be non-specific and are age- and pathologist-dependent (22–24). According to literature, accuracy of liver biopsy in diagnosing BA ranges 60–95% (6,25). Factors influencing accuracy are timing of the liver biopsy (age of the patient), severity of the histologic features, needle versus wedge biopsy, and pathologist experience. The highest yield of liver biopsy in diagnosing BA was reached among pathologists participating in the National Institutes of Health-sponsored Biliary Atresia Research Consortium (22); nevertheless, liver biopsy added novel information to the diagnostic workup in only 36.2% of cases (7). For these reasons, any technical or scientific aid to improve the yield of liver biopsy is desirable.

Liver tissue shows a double capability of regeneration and repair after many forms of acute and chronic injury. Regeneration is mediated by proliferation of differentiated liver epithelial cells (hepatocytes or biliary ductal cells); when liver injury persists, this mechanism becomes exhausted and a reactive fibroinflammatory process is triggered, leading to progression of liver damage towards end-stage liver disease, cirrhosis, and liver failure (1,26,27). Expression of SOX9 in hepatocytes would promote a bipotent state in these cells (28).

In order to identify a possible diagnostic or prognostic role of SOX9 in the liver of BA patients, the authors designed a score to evaluate SOX9 expression in liver samples, the SOX9 Scale score.

A case-control study (BA vs no primary hepatic condition) proved SOX9 Scale to clearly discriminate those two groups. There was a need to know how other liver conditions would express SOX9; the initially designed case-control study was, therefore, broadened to a third group of livers with other cholestatic diseases. SOX9 expression in liver samples of this third group was uniformly absent or mild in all except one of the cases.

As other researchers have found (15,25,26), our study also shows a remarkable relationship between degree of ductular proliferation, fibrosis, and SOX9 expression in BA. The strong correlation between ductular proliferation and SOX9 expression in BA livers adds evidence in favor of the proposed role of SOX9 in the development of liver epithelial progenitor cell types, located in the interface between lobular hepatocytes and connective tissue (26–28).

We have also found in our population a clear difference in SOX9 expression between BA livers and livers with other cholestatic diseases: while SOX9 was intensely expressed in most BA cases, expression was weak in virtually all the other cholestatic diseases, including cases showing fibrotic changes and ductular proliferation as severe as that seen in BA. This striking difference in SOX9 expression might be the result of a different pathogenic mechanism in BA; this distinct fact could prove useful to differentiate BA from other causes of neonatal jaundice. Since biochemical markers are non-specific and do not constitute an aid to diagnosis of BA and liver damage evaluation (29,30), other markers are much needed. The finding of a clear cut-off to differentiate BA from non-BA cases announces the usefulness of SOX9 as a potential tool for