



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO FACULTAD DE MEDICINA**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO HOSPITAL
MÉDICA SUR

**PROPUESTA DE LISTA DE VERIFICACIÓN (*CHECKLIST*) PARA EL REPORTE
Y DIAGNÓSTICO DE BIOPSIAS HEPÁTICAS UTILIZANDO COMO EJEMPLO
CASOS DE ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO.**

TRABAJO DE
TITULACIÓN

PARA OBTENER EL TÍTULO EN LA ESPECIALIDAD DE
ANATOMÍA PATOLÓGICA

AUTOR:
ALEJANDRA RODRÍGUEZ PRADO

TUTOR:
DR. CARLOS ORTIZ HIDALGO

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INVESTIGADORES:

INVESTIGADOR RESPONSABLE: DR. CARLOS ORTIZ HIDALGO. JEFE DEL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA.

Firma _____

INVESTIGADOR PRINCIPAL: ALEJANDRA RODRÍGUEZ PRADO, RESIDENTE DE LA ESPECIALIDAD EN ANATOMÍA PATOLÓGICA EN LA FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR.

Firma _____

SEDE.

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR.

ÍNDICE

I.	ANTECEDENTES	4
II.	MARCO DE REFERENCIA	6
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
IV.	JUSTIFICACIÓN	8
V.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	8
VI.	OBJETIVOS	10
VII.	HIPÓTESIS	10
VIII.	DISEÑO	11
IX.	MATERIAL Y MÉTODOS	12
X.	VALIDACIÓN DE DATOS	17
XI.	CONSIDERACIONES ÉTICAS	17
XII.	DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS	18
XIII.	PROCESO DE HISTOQUÍMICA	19
XIV.	PROCESO DE INMUNOHISTOQUÍMICA	20
XV.	ANÁLISIS DE DATOS	22
XVI.	RESULTADOS	42
XVII.	DISCUSIÓN	61
XVIII.	CONCLUSIONES	65
XIX.	REFERENCIAS	67

ANTECEDENTES

En la actualidad, se utilizan diversos sistemas para clasificar y estadificar diversas patologías en un intento de estandarizar información entre diferentes observadores, con el objetivo de no pasar por alto datos importantes que un informe de patología debe llevar. Ejemplo de esto son los protocolos para reportar neoplasias del Colegio Americano de Patólogos (CAP) escritos a manera de listas de verificación (*checklist*, por sus siglas en inglés). Estas listas de verificación fueron implementadas a raíz de que en informes de patología quirúrgica neoplásica, se observó que elementos básicos como tamaño tumoral, profundidad de la invasión, márgenes de resección y grado histológico del tumor fueron consistentemente excluidos en un estudio de 15,940 reportes. (1)

En 1981, surgió un sub-comité dentro de la CAP llamado *Committee on the Pathologist as a Consultant in Cancer Patient Management*. Este órgano funcionaba como productor de guías que proveían una consulta rápida, apropiada y diagnóstica con implicaciones en la selección de terapia del paciente, en el establecimiento de pronóstico y en la evaluación de resultados, sobre todo tras un tratamiento específico. (2) La primera publicación de esta naturaleza se realizó en febrero de 1986 en la revista de *Pathologist* en donde incluían una guía para reportar especímenes de carcinoma de mama, tracto urinario y linfoma de Hodgkin; mientras que los primeros protocolos como se conocen hoy en día se publicaron en febrero y agosto 1994, correspondiendo a carcinoma colorrectal y prostático, respectivamente. Estos protocolos son útiles para asegurar la calidad del examen patológico en el contexto diagnóstico y para facilitar la comprensión del informe microscópico. (2) Actualmente existen 90 protocolos de informes para neoplasias malignas y además de estos, para la estandarización del reporte de biomarcadores. Estas plantillas reflejan la necesidad actual de facilitadores de información para la interpretación de resultados. (3)

Además de la CAP, existen otros organismos internacionales que también ofrecen protocolos para el reporte de carcinomas. Ejemplo de estos son la *Royal College of Pathologists* del Reino Unido, *European Society of Pathology*, *Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology*, *Royal College of Australasia*; Todos estos, incluidas la CAP, se basan en la clasificación de tumores de la Organización Mundial de la Salud (OMS). De hecho, dichas organizaciones han trabajado juntas para lograr armonizar la información en protocolos reproducibles y equiparables a nivel global, con fines de investigación. (4)

En lo concerniente al informe histopatológico de biopsias de hígado, existe el protocolo del CAP de carcinoma hepatocelular (5) y de ductos biliares intra y extra-hepáticos. (6,7) Sin embargo, la mayor parte de la atención se ha enfocado en patología neoplásica.

CAP	Colegio Americano de Patólogos
IHQ	Inmunohistoquímica
EHGNA	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
OMS	Organización Mundial de la Salud
HGNA	Hígado graso no alcohólico
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
CK	Citoqueratina
NAS	<i>Non-alcoholic steatohepatitis Activity Score</i>

MARCO DE REFERENCIA

En 1995, se describió por primera vez una lista de verificación para hígado no neoplásico por Foschini. (8) Esta lista es extensa y contiene más de sesenta variables a informar por el patólogo, incluyendo una descripción de la fibrosis, esteatosis, daño hepatocelular, inflamación lobulillar y portal, presencia de ductulos, granulomas, cuerpos acidófilos, células de Kupffer, etcétera. Se debe considerar que no fue hasta 1999 que se propuso por primera vez una gradificación y estadificación de la fibrosis, esteatosis, inflamación y balonización por Elizabeth Brunt, facilitando la descripción de muchas de estas variables propuestas inicialmente por Foschini. (9)

Foschini defiende el uso de estas listas como herramientas ahorradoras de tiempo en la redacción de informes patológicos, y menciona la importancia de evaluar todas las características histológicas para no pasar por alto alguna lesión potencialmente pronóstica o de relevancia para el médico tratante. (8) Los informes de patología quirúrgica que son a texto libre son propensos a omisión de información e inconsistencias en el formato. (10) Aún así, actualmente la mayoría de los patólogos no redactan informes estructurados en lo que respecta a hígado no neoplásico, (11) y quienes más realizan informes reproducibles son patólogos expertos en hígado. (12)

Hablando específicamente sobre la enfermedad de hígado grado no alcohólica (EHGNA), esta se divide en hígado graso no alcohólico (HGNA) y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Actualmente existen diversos sistemas de clasificación de la actividad y de la fibrosis, lo que en ocasiones dificultan la comunicación entre el patólogo y el médico tratante, e incluso entre patólogos. Aún más sorprendente, es que no existe una definición universalmente aceptada de la EHNA. (13) Se ha estimado que entre el 6 al 55% de los pacientes con EHGNA tienen EHNA, según la definición empleada. (14) En otro estudio se encontró que la variación de la prevalencia de la EHNA fue del 24 al 98%. (12)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que se ha recomendado el uso de estas listas como un medio para garantizar que no se omita información potencialmente útil y a no pasar por alto ninguna lesión histológica, no se usan rutinariamente en lesiones hepáticas no neoplásicas. Los protocolos finalmente son herramientas educativas que asisten a los patólogos en el informe de lesiones que incluyen requerimientos mínimos y recomendaciones que reflejan la opinión de expertos. (15)

El uso de una lista de verificación (*checklist*) facilitaría la captura de datos, interoperabilidad e intercambio de información en el tema de investigación y academia. (10) También, puede fomentar el involucramiento del papel que juega el patólogo en equipos multidisciplinarios para el manejo de pacientes (2). Asimismo, en el caso específico de un paciente, permitiría observar puntualmente el avance de alguna lesión en diferentes puntos del tiempo al utilizar el mismo sistema de evaluación de actividad o fibrosis.

Es importante mencionar la calidad de la biopsia al médico que obtuvo la biopsia para tener retroalimentación de su método o técnica, así como al médico tratante para tener el conocimiento de que la biopsia pudiera ser insuficiente para un diagnóstico global de la enfermedad hepática.

Es importante hacer notar que la limitante más importante al usar una lista de verificación (*checklist*) es que pudiera nublar el juicio integrado del patólogo, al no ver el tejido de la biopsia como un proceso de enfermedad sino como una lista que debe llenarse. Sin embargo la lista debe igualmente manejarse como incentivo al aprendizaje, a la revisión constante de literatura, como herramienta que puede modificarse y adaptarse a las necesidades específicas de cada población y debe fungir como motivante para la mejoría activa del informe de biopsias hepáticas (8). Además, se ha informado que la lista debe contener elementos esenciales o no ser tan extensa puesto que correlaciona con una menor tasa de reportaje. (10)

En el presente trabajo, se decide estudiar específicamente las biopsias hepáticas con EHGNA, de los cuales resultaron 53 casos, como ejemplo de la utilidad de las listas de verificación como herramientas para el informe microscópico de lesiones hepáticas no neoplásicas. Se pretende comparar los diagnósticos originales con los nuevos utilizando dicha lista de verificación.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Es de utilidad el empleo de una lista de verificación para reportar biopsias hepáticas no neoplásicas?

JUSTIFICACIÓN

Es importante el uso de una lista de verificación en lesiones hepáticas no neoplásicas porque apoya al diagnóstico, es descriptivo y permite incluir diversas lesiones histológicas de interés, facilita la comunicación entre patólogos y médicos tratantes, y reduce la variabilidad intra e inter-observador. El uso de informes mediante lista de verificación es una medida de calidad que asegura la consistencia, uniformidad y completitud de un diagnóstico. (16)

Se decide estudiar específicamente la EHGNA dentro de toda la patología hepática debido a que la mayoría de las variables mencionadas en la lista verificación propuesta, se pueden observar en el hígado graso. La lista de verificación presentada (Anexo 1) es una adaptación de las investigaciones de autores expertos en patología hepática como lo son Elizabeth Brunt, David Kleiner y Michael Torbenson. Elizabeth Brunt tiene hasta la fecha 311 artículos publicados en revistas indexadas sobre todo en temas de EHGNA y fue quien inicialmente sugirió la gradificación y estadificación de lesiones histológicas de la EHNA en 1999. (9) David Kleiner tiene 392 artículos en revistas indexadas y en 2005, junto con Elizabeth Brunt y la *Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network*, diseñaron y validaron el uso de un sistema de clasificación histológica para la EHGNA con base en un puntaje llamado *Non-alcoholic steatohepatitis Activity Score (NAS)*. (17)

Michael Torbenson publicó un libro que aborda la interpretación de biopsias hepáticas, donde menciona los hallazgos histológicos más destacables incluyendo aquellos de enfermedades hepáticas no hígado graso, como hepatitis virales y autoinmunes. (13) Adicionalmente, tiene 144 artículos publicados hasta la fecha en su mayoría de patología hepática.

Torbenson menciona que la descripción microscópica extensa puede tener un valor agregado para estudios de investigación o para la formación de residentes, sin embargo no debe obviarse el diagnóstico final histopatológico, el cual debe ser integral, conciso y claro. (13)

Además, se decide estudiar la EHGNA debido a su prevalencia en aumento en México, debido a que existe una susceptibilidad genética comprobada en la población mexicana y debido a que la mayoría de las cirrosis criptogénicas probablemente sean dadas por esta entidad. (18–20)

OBJETIVOS

Principal: Proponer una lista de verificación para estandarizar la descripción microscópica del informe de biopsias hepáticas no neoplásicas en el servicio de Anatomía Patológica, Fundación Clínica y Hospital Médica Sur.

Secundario: Evaluar la funcionalidad de la lista de verificación a manera de comparación entre los informes originales (sin uso de la *checklist*) y los nuevos (con uso de la *checklist*) para el reporte de enfermedad de hígado graso no alcohólico en biopsias hepáticas recibidas durante el periodo 2014 – 2021 en el servicio de Anatomía Patológica, Fundación Clínica y Hospital Médica Sur.

Terciario: Describir el espectro de enfermedad de hígado graso no alcohólico en biopsias hepáticas recibidas durante el periodo 2014 – 2021 en el servicio de Anatomía Patológica, Fundación Clínica y Hospital Médica Sur.

HIPÓTESIS

Debido a que se trata de un estudio descriptivo, se describirá la experiencia del servicio de Anatomía Patológica, Fundación Clínica y Hospital Médica Sur, utilizando una lista de verificación para estandarizar el informe microscópico de biopsias hepáticas usando como ejemplo, casos con enfermedad de hígado graso.

DISEÑO

Manipulación por el investigador

Observacional

Grupo de comparación

Descriptivo (estudia una muestra poblacional)

Seguimiento

Transversal (los datos se obtienen en una sola ocasión)

Asignación de la maniobra

No aleatorio

Evaluación

Abierto

Participación del investigador.

Observacional

Recolección de datos

Retrolectivo

Diseño

Casos y controles: se tiene el efecto y se busca hacia atrás la causa.

MATERIALES Y MÉTODO

Universo de estudio. Población de estudio.-

Todas las laminillas de biopsias hepáticas diagnosticadas como hígado graso no alcohólico o esteatohepatitis no alcohólica en la Fundación Clínica y Hospital Médica Sur.

Tamaño de la muestra.

Todas las laminillas de biopsias hepáticas diagnosticadas como hígado graso no alcohólico o esteatohepatitis no alcohólica en la Fundación Clínica y Hospital Médica Sur de enero 2014 a mayo 2021.

Muestreo.

No probabilístico

Consecutivo

Criterios de Selección:

Criterios de Inclusión.

Todas las laminillas de biopsias hepáticas diagnosticadas como hígado graso no alcohólico o esteatohepatitis no alcohólica durante un periodo de seis años (enero de 2014 a mayo de 2021) en el servicio de Anatomía Patológica, Fundación Clínica y Hospital Médica Sur.

Criterios de exclusión.

Laminillas de biopsias hepáticas con otro diagnóstico simultáneo (hepatitis autoinmune, malignidad) o que no cuenten con tinciones especiales (Masson, Retículo).

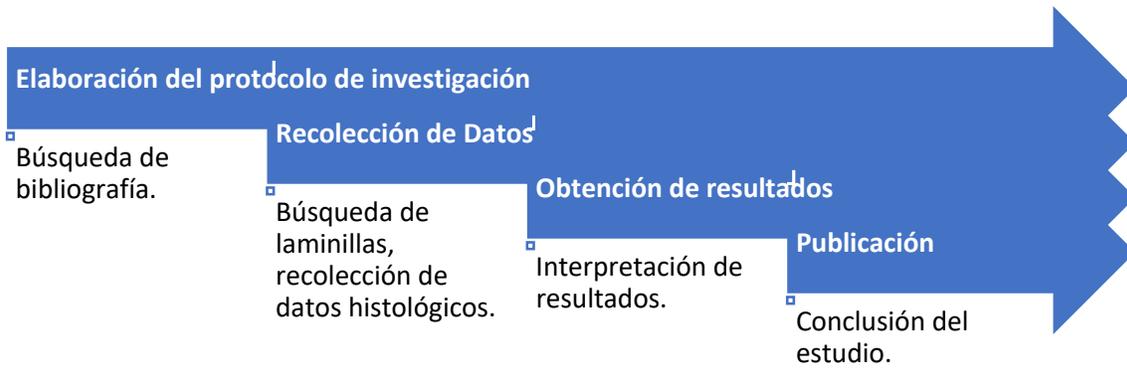
Criterios de eliminación.

Se eliminarán aquellos casos en donde no se cuente con el material histológico dentro del servicio de Anatomía Patológica de la Fundación Clínica y Hospital Médica Sur.

Definición de variables (Ver Anexo 1 y 2) (13,17,21)

Independientes.		Dependientes.	
Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)	Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)
Tamaño macroscópico Tamaño microscópico	- Cm - Cm	Puntaje NAS	Intervalo (0-8)
Número de espacios porta	Número		
Grado de fibrosis	Clasificación de CRN (1-4)		
Vénulas hepáticas terminales	Presente/ausente		
Grado de esteatosis	Clasificación de CRN (0-3)		
Grado de balonización	Clasificación de CRN (0-2)		
Grado de inflamación lobulillar	Clasificación de CRN (0-3)		
Grado de inflamación portal	Clasificación de Brunt (0-3)		
Actividad de interfase	Presente/ausente		
Esteatosis microvesicular	<i>(para el resto de las variables)</i>		
Daño de conductos			
Proliferación ductular			
Cuerpos de Mallory-Denk			
Núcleos glucogenados			
Megamitocondrias			
Macrófagos pigmentados			
Lipogranulomas			
Microgranulomas			
Cuerpos acidófilos			
Colestasis			
Hepatocitos en vidrio esmerilado			

Diagrama de flujo



Hoja de captura de datos.

Tamaño macroscópico (cm)
Tamaño microscópico (cm)
Fragmentación por fibrosis (P/A)
Número espacios porta
Grado de fibrosis (1-4)
Vénulas hepáticas terminales (P/A)
Grado de esteatosis (0-3)
Grado de balonización (0-2)
Grado de inflamación lobulillar (0-3)
Puntaje NAS (0-8)
Grado de inflamación portal (0-3)
Actividad de interfase (P/A)
Esteatosis microvesicular (P/A)
Daño de conductos (P/A)
Proliferación ductular (P/A)
Cuerpos de Mallory-Denk (P/A)
Núcleos glucogenados (P/A)
Megamitocondrias (P/A)
Macrófagos pigmentados (P/A)
Lipogranulomas (P/A)
Microgranulomas (P/A)
Cuerpos acidófilos (P/A)
Colestasis (P/A)
Hepatocitos en vidrio esmerilado(P/A)

Calendario.

Marzo-Junio 2021	Julio-Agosto 2021	Septiembre 2021	Octubre 2021	Noviembre 2021	Diciembre 2021
Revisión bibliográfica					
	Elaboración del protocolo				
		Obtención de información			
			Procesamiento y análisis de datos		
				Elaboración del informe final	
					Divulgación de los resultados

Recursos.

Recursos Humanos.

Investigador: Dra. Alejandra Rodríguez Prado

Actividad: Recolección de laminillas, base de datos, revisión de la bibliografía y reporte de resultados.

Número de horas por semana: 20 horas.

Investigador: Dr. Carlos Ortiz Hidalgo

Actividad: Revisión de todos los pasos y revisar laminillas de todos los pacientes.

Número de horas por semana: 10 horas.

Recursos materiales.

Los recursos que se requiere adquirir son:

Lápices, plumas, hojas en blanco, libreta, regla.

Recursos financieros.

No se requieren recursos financieros puesto que el material histológico se encuentra disponible y almacenado en el archivo del Departamento de Anatomía Patológica de la Fundación Clínica y Hospital Médica Sur.

VALIDACIÓN DE DATOS.

Se utilizará estadística descriptiva: medidas de tendencia central y dispersión: rango, media, mediana, moda, desviación estándar, proporciones o porcentajes.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

1. Se utilizará un enlistado para presentar el objetivo principal.
2. Se utilizarán tablas y gráficas para describir el objetivo secundario.
3. Se utilizarán tablas y gráficas para describir el objetivo terciario.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección I, investigación sin riesgo, no requiere consentimiento informado. Ej.- Cuestionarios, entrevistas, revisión de expedientes clínicos, etc. En los que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta.

Los datos personales serán protegidos al utilizar solamente el número quirúrgico de la biopsia como método de identificación del paciente. No se requiere consentimiento informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

No aplica.

DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS

Se realizó una revisión de literatura sobre las variables más importantes que deben incluirse en un informe histopatológico de biopsias hepáticas no neoplásicas, incluyendo lesiones características de diversas etiologías como EHGNA, cirrosis, hepatitis autoinmune, hepatitis virales, lesiones por almacenamiento, enfermedades granulomatosas y hepatitis colestásica. Después de recolectar las variables más reconocidas de lesiones hepáticas no neoplásicas se englobó en una *checklist* (anexo 1).

Posteriormente, se recolectaron todos los casos de EHGNA diagnosticados en biopsia hepática en un periodo de 6 años (2014 a 2021). Estas se encontraban en el archivo de laminillas de la Fundación Clínica y Hospital Médica Sur. Se contabilizó el número presente en el archivero, que se encontrara en buen estado, y que contara con tinción de hematoxilina y eosina (HE), así como las tinciones especiales (Masson y Retículo) para corroborar el diagnóstico. Después se procedió a evaluar cada una de las variables de la *checklist*, llenando la casilla correspondiente en una base de datos utilizando Google Drive con el apoyo del jefe del servicio y patólogo Dr. Carlos Ortiz Hidalgo, quien apoyaba al microscopio.

Posteriormente, se utilizó esta información para vaciarse en gráficas comparativas usando medidas de tendencia central en el software Microsoft Office Excel.

PROCESO DE HISTOQUÍMICA

Tricrómico de Masson (22)

Se desparafinizó e hidrató hasta llegar al agua destilada cada bloque al que se le haría esta tinción. Debido a que estas secciones fueron fijadas en formol, se aplicó solución de Bouin por una hora en el horno a 56°C. Después se permite enfriar por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó con agua corriente hasta que las secciones se aclararon, se enjuagó con agua destilada y coloreó con tinción de hematoxilina de hierro de Weigert por 10 minutos. Después se dejó lavando con agua corriendo por 10 minutos y se enjuagó con agua destilada. Seguido de esto, se coloreó con tinción de fucsina ácida-escarlata de Biebrich durante 15 minutos. Nuevamente, se procedió a enjuagar con agua destilada. Se aplicó solución de ácido fosfatotúngstico-fosfomolibdico durante 10 a 15 minutos. Se contrastó con solución azul de anilina por 5 a 10 minutos y posteriormente se enjuagó con agua destilada. Se aplicó ácido acético al 1% durante 3 a 5 minutos. Finalmente, se deshidrató con etanol al 95%, alcohol etílico absoluto y xileno y se montó en un medio con resina.

Tinción para Retículo (fibras reticulares) (22)

Inicialmente, los bloques con parafina deben ser desparafinizados e hidratados hasta llegar a agua destilada. Después se oxidaron en permanganato de potasio por 1 minuto y se lavó en agua posteriormente. Se debe diferenciar con metabisulfito de potasio durante 1 minuto y volver a lavar con agua. Se sensibilizó en solución sulfato férrico de amonio por 1 minuto y se lavó con agua. Se impregnó con solución de plata por 1 minuto y se lavó con agua destilada. Posteriormente, se pasó por una solución reductora de formol durante 3 minutos y se lavó con agua. Se aplicó solución cloruro de oro y nuevamente lavó con agua destilada. Se aplicó solución de metabisulfito de potasio por 1 minuto y se fijó con tiosulfato de sodio durante 1 minuto y lavó con agua. Finalmente, se deshidrató con alcoholes del 96%, absoluto y posteriormente se pasó por xilol para montarse con resina.

PROCESO DE INMUNOHISTOQUÍMICA

El estudio inmunohistoquímico se inicia con la obtención de cortes en blanco, de 2 micras de espesor. Se colocaron en laminillas electro-cargadas, las cuales se etiquetaron con el nombre del anticuerpo a utilizar, en este caso CK8/18 (23), y se dejaron calentando en la estufa de secado a una temperatura de 65°C por 35 minutos.

Una vez transcurrido este tiempo, los cortes histológicos se desparafinaron y rehidrataron en baños de 5 minutos cada uno en el orden siguiente: xilol, etanol absoluto, alcohol al 96% y agua destilada. Se dejó escurrir y se acomodaron en canastillas especiales; las laminillas se introdujeron en un recipiente con una solución especial llamada Declere (Buffer citratos). Se introdujeron en una olla de presión y se calentó en un horno microondas, cuando este alcanzó el máximo de presión (aproximadamente 10 minutos) se contaron 5 minutos para que se llevara a cabo la recuperación antigénica. Pasando este tiempo se detuvo el calentamiento. Se dejó enfriar la olla, se retiró el recipiente con las laminillas y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Una vez frías, se dieron dos lavados con agua destilada. Enseguida se acomodaron las laminillas en una canastilla especial, las laminillas con los tejidos problema se contrapusieron con laminillas vacías permitiendo que las marcas con cruces situadas en la parte superior derecha de cada laminilla se queden una de cada lado, así asegurando que la capilaridad se lleve a cabo de forma adecuada. Posteriormente, se colocó PBS 1X por capilaridad y a continuación se retiró este por absorción con papel. Se continuó con el paso de bloqueo de sitios inespecíficos, se tomó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3%, se incubó por 6 minutos, y posteriormente se retiró el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y se aplicaron tres lavados con PBS 1X. Se retiró este y se adicionó el anticuerpo que previamente se preparó en la dilución correspondiente, el diluyente que se utilizó es de la marca BioSb.

Los tejidos control se seleccionaron dependiendo de las indicaciones de los fabricantes en la hoja técnica de cada anticuerpo, en el caso de CK8/18 se utilizó próstata como control externo. En la tabla 1 se describe la marca y dilución del anticuerpo mencionado.

Tabla 1.

Información sobre anticuerpo CK8/18			
<u>Anticuerpo</u>	<u>Marca</u>	<u>Dilución</u>	<u>Clona</u>
<i>CK8/18</i>	BioSb	1:100	B22.1/B23.1

Una vez que se cargó el anticuerpo se incubó con 60 minutos a temperatura ambiente, al término de la incubación se retiró el anticuerpo por absorción con papel, se lavó tres veces con PBS 1X. Se incubó con Biotina durante 8 minutos, al terminar el tiempo de incubación se lavó tres veces con PBS 1X, se incubó con Streptoavidina por 8 minutos más, al término del tiempo de incubación se lavó con PBS 1X y se continuó con el revelado de las muestras.

Se adicionó una gota de Diaminobenzidina por cada mililitro de diluyente DAB que viene en el kit, el revelado se realizó observando al microscopio de luz hasta que esté completamente nítida la reacción que debe de tomar color café.

El proceso de contraste también se realizó de forma manual con hematoxilina sumergiendo las muestras durante 60 segundos. Inmediatamente se lavó con agua y se aplicó hematoxilina en una solución sobresaturada de carbonato de litio, se enjuagó en agua, y finalmente se deshidrató en baños consecutivos en el siguiente orden: alcohol al 96 °C, etanol absoluto y xilol por dos minutos cada uno, se montó con resina permanente para microscopía y con cubre objetos para ser examinado por el patólogo.

ANÁLISIS DE DATOS

Tamaño de la biopsia y número de espacios porta

Una biopsia hepática representativa y adecuada debe medir al menos 1.6 cm de largo, 1.2 a 1.8 cm de diámetro y contener al menos diez espacios porta (24,25). Los espacios porta están compuestos por tres elementos: vena porta, arteria hepática y conductillos biliares, aunque también es común encontrar vasos linfáticos. Otros autores han sugerido la presencia de entre seis y ocho espacios porta y no mencionan una medida mínima, excepto para gradificar y estadificar la hepatitis crónica (26). En esta, se pide una medición mínima de 2.0 a 2.5 cm de largo y 11 espacios porta (26). De hecho, se recomienda que en el mismo reporte de patología se describa la calidad del tejido, detallando un comentario sobre la limitación de la biopsia debido al número de espacios porta, al tamaño, fragmentación o la medición de la extensión de la fibrosis limitada por la localización subcapsular de la toma de biopsia. (21,26) (Figura 1 y 2)

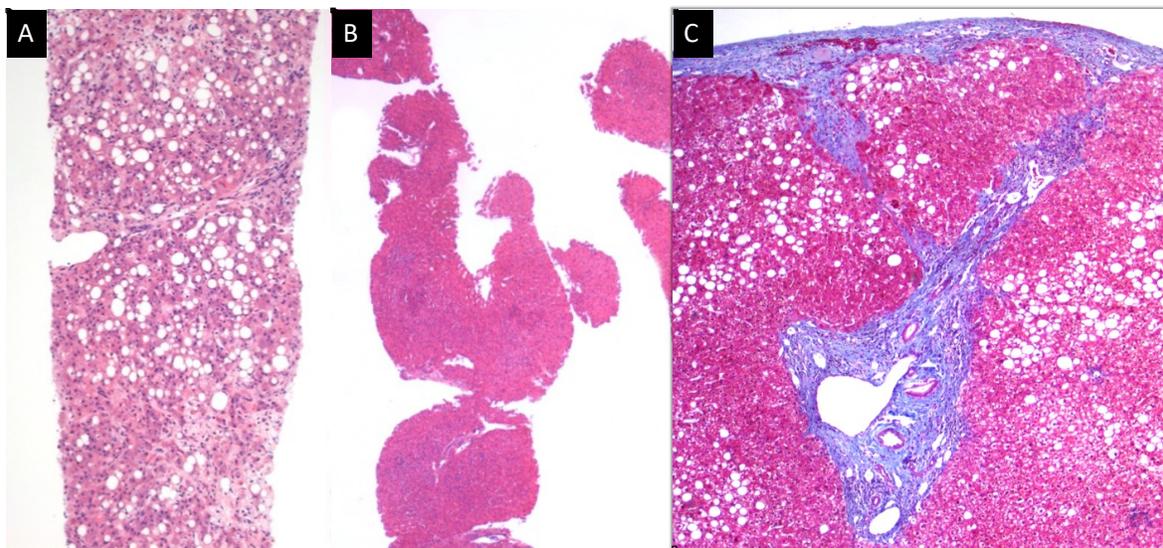


Figura 1. Se observa una biopsia de hígado conservada mayor a 1.6 cm (A) (HE, 10X) Biopsia hepática fragmentada y subóptima. (B) (HE, 4X) Biopsia hepática superficial que muestra la cápsula de Glisson y obliga tener cuidado para la evaluación de fibrosis. (C) (Tricrómico de Masson, 10X)

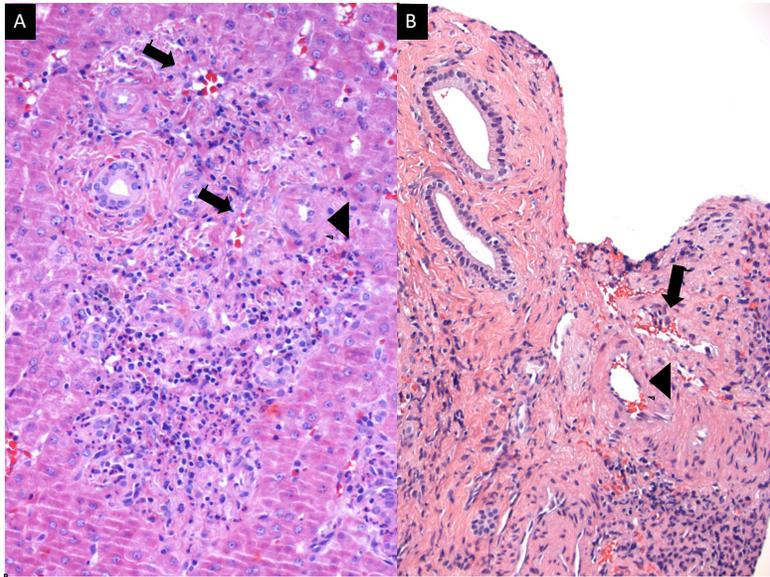


Figura 2. Biopsia de hígado que demuestra un acercamiento a un espacio porta pequeño. Se observan abundantes conductos biliares con una luz redonda y células cúbicas con núcleo redondo. Se observan luces de origen venoso revestidas por epitelio

plano y vistas con mayor facilidad por los eritrocitos en su interior (flechas). También se aprecia la arteria hepática con una pared muscular gruesa y células mioepiteliales en esta (punta de flecha). (A) (HE, 10X) Se observa otro espacio porta de tamaño mediano. La flecha muestra la vena porta y la punta de flecha, la arteria hepática. (B) (HE, 10X)

Esteatosis (Anexo 2)

Es el elemento principal de la enfermedad de hígado graso, corresponde a la acumulación mayor al 5% de lípidos intracitoplasmáticos en forma de vesículas en la biopsia. Esta se puede apreciar de forma macrovesicular o microvesicular. Éste último se comentará en una sección aparte. La forma macrovesicular se divide en dos: la forma de gota gruesa y gota pequeña. En la primera, la vacuola se aprecia como un espacio ópticamente vacío que desplaza el núcleo hacia la periferia. (Figura 3A) Mientras que en la de gota pequeña, se observan los espacios vacíos en el hepatocito sin desplazar el núcleo, y no llenan el hepatocito, a diferencia de la esteatosis microvesicular en donde dan un aspecto espumoso a la célula. (21) En el adulto, la esteatosis macrovesicular se encuentra típicamente en la zona 3 del acino hepático, es decir perivenulares. (25,27) Mientras que en niños se aprecian sobre todo en la zona 1 periportal. (27)

La esteatosis se gradifica en cuatro según la clasificación de CRN, descrita en el 2005. El grado 0 es aquél con < 5% de hepatocitos comprometidos, por lo que no ameritaría el diagnóstico de HGNA. El grado 1 corresponde al 5-33% hepatocitos comprometidos, grado 2 al 33-66% hepatocitos comprometidos y finalmente, grado 3 es mayor al 66%. (17) (Figura 3B)

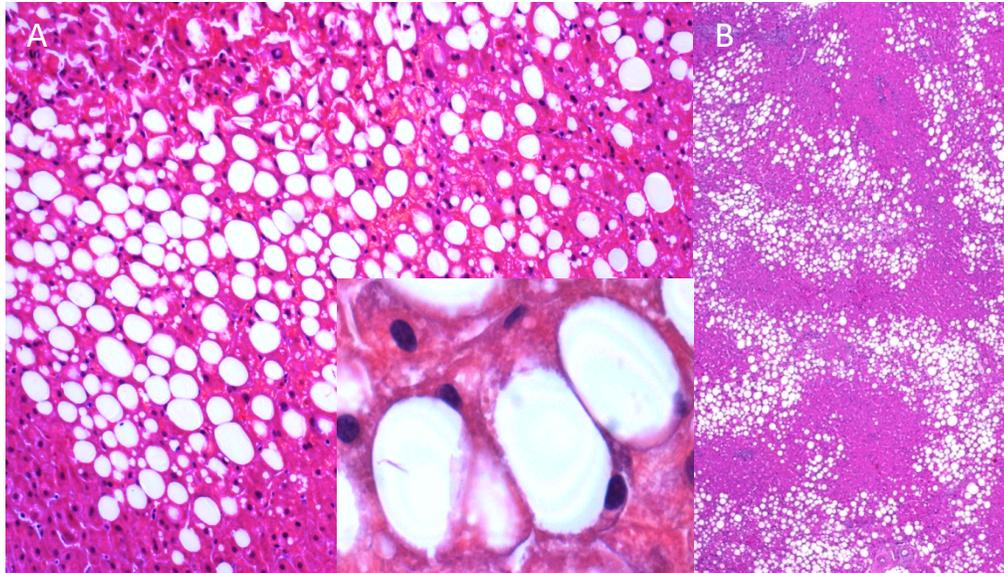


Figura 3. Esteatosis macrovesicular. Se observan vacuolas en el citoplasma de los hepatocitos. (A) (HE, 10X) Interior: el núcleo se observa desplazado hacia la periferia (HE, 100X visto con aceite de inmersión). En esta imagen panorámica se aprecia la gran cantidad de esteatosis correspondiente a un grado 3. (B) (HE, 4X)

Balonización (Anexo 2)

La degeneración balonoide es parte del espectro de lesiones hepatocelulares requeridas para el diagnóstico de EHNA. La esteatosis por sí misma, con o sin inflamación no es suficiente para el diagnóstico de esteatohepatitis. (28,29). La balonización se caracteriza por edema intracelular del hepatocito con rarefacción del citoplasma resultando en células claras con material granular citoplasmático en su interior. (Figura 4) Usualmente son más grandes que los hepatocitos normales. (30) Otras lesiones hepatocelulares diagnósticas de esteatohepatitis incluyen la apoptosis, necrosis y cuerpos acidófilos. Estos criterios se suelen

encontrar en la zona 3 del hígado. También se ha propuesto el uso de reacciones de IHQ utilizando CK8/18 para el reconocimiento histológico facilitado de la degeneración balonoide. (27)

Los estudios de IHQ han demostrado que los hepatocitos balonoides independientemente de su etiología, ya sea EHNA, esteatohepatitis alcohólica, colestásica, deposición de hierro, lesiones proliferativas y neoplasias hepatocelulares, presentan una disminución o pérdida de expresión de CK8/18, mientras que los hepatocitos no balonizados retienen esta expresión. (24, 27) Lesiones como hepatitis aguda, hepatitis neonatal de células gigantes, hepatitis crónica B y autoinmune, si bien también pueden cursar con balonización, los hepatocitos no mostrarán pérdida de CK8/18. (31) Por lo que la pérdida de expresión de CK8/18 membranal y citoplasmática puede usarse como marcador de degeneración balonoide objetivo en EHGNA, ocasionado por alguna de las primeras etiologías expuestas, con la posterior formación de CMD (CK8/18 positivos). En otro estudio se describió que si bien hay pérdida de CK8/18 en la degeneración balonoide, hay otros hepatocitos no balonizados que también muestran pérdida de dicha CK, representando así un espectro morfológico e inmunohistoquímico que no ha sido caracterizado del todo. (24)

La balonización se gradifica en tres categorías: la primera corresponde a balonización nula; el puntaje de 1 corresponde a pocas células balonizadas y el puntaje 2 a muchas células balonizadas. (17)

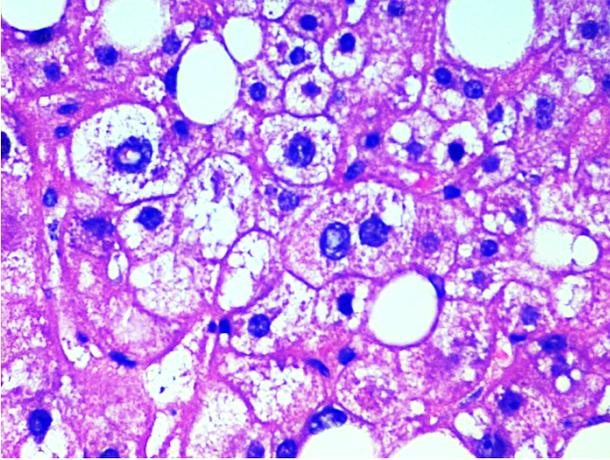


Figura 4. Se observan hepatocitos con cambios de balonización (HE, 40X)

Inflamación lobulillar (Anexo 2)

La inflamación puede ser de tipo linfocitaria o polimorfonuclear (neutrófilos y/o eosinófilos), y suele concentrarse en el parénquima lobulillar. (Figura 5) La activación del sistema inmune suele ser característica de la EHNA, sin embargo no es *sine qua non* de su diagnóstico, puesto que hay casos de inflamación lobulillar pura sin degeneración balonoide (28,32). La agregación en nódulos linfoides, espacios porta o de células plasmáticas debe hacer sospechar en otras entidades como hepatitis autoinmune (25).

Se clasifica según el artículo de la CRN de 0 a 3 grados, en donde 0 equivale a ningún tipo de inflamación. El grado 1 se da a los casos con menos de 2 focos de inflamación por campo óptico x 200, el grado 2, a los casos con 2 a 4 focos por campo óptico x 200, y finalmente, grado 3 a los casos con más de 4 focos de inflamación por campo óptico x 200. (17)

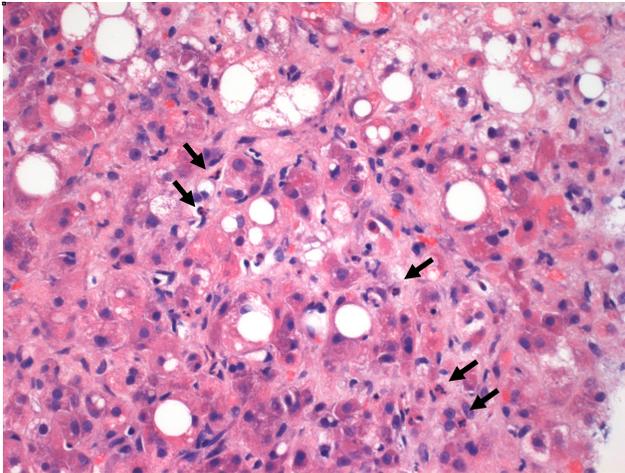


Figura 5. Biopsia de hígado con esteatohepatitis mostrando inflamación de tipo polimorfonuclear (flechas).

Puntaje NAS (Non-alcoholic steatohepatitis Activity Score) (Anexo 2)

El puntaje NAS fue originalmente descrito para establecer la gravedad y evolución de la EHNA, en pacientes adultos y pediátricos. El propósito fue evaluar los cambios histológicos de esteatosis, inflamación lobulillar y balonización para utilizarse sobre todo en intervenciones terapéuticas de ensayos clínicos.

El puntaje del NAS (0-8) correlaciona con el diagnóstico histopatológico, sin bien no lo sustituye. Los casos con puntajes de 0-2, no corresponden a EHNA; puntajes mayores o iguales a 5 correlacionan a EHNA; aquellos casos con valores intermedios no correlacionan bien con algún diagnóstico. Es por esto que el diagnóstico final de EHNA es dada por el patólogo y no por el puntaje NAS.

Inflamación portal (Anexo 2)

El grado de inflamación portal se había considerado como criterio para el diagnóstico de EHNA en 1999 por la investigadora Elizabeth Brunt, sin embargo se desplazó en el 2005 en el sistema de CRN en el estudio de Kleiner. El significado aún no ha sido dilucidado, pues se ha encontrado mucha información no reproducible. Puede ocurrir en diversos grados en la EHNA e incluso, se ha descrito que correlaciona su gravedad con la actividad aumentada de EHNA y

fibrosis. (27,33) Se ha descrito como característica de resolución de hepatitis (21) y como indicador de otra enfermedad hepática concurrente y crónica. (33)

La inflamación portal suele ocurrir como infiltrados linfocíticos periportales. Existen diversos sistemas para gradificar la inflamación portal, el utilizado en nuestro estudio fue el Sistema de puntuación de Brunt para inflamación portal (2007) (Anexo 2). Este separa subjetivamente las etapas de inflamación portal en cuatro grupos: 0, equivale a nula inflamación portal; 1 a inflamación leve; 2 a inflamación moderada y finalmente 3, a inflamación portal grave. (Figura 6)

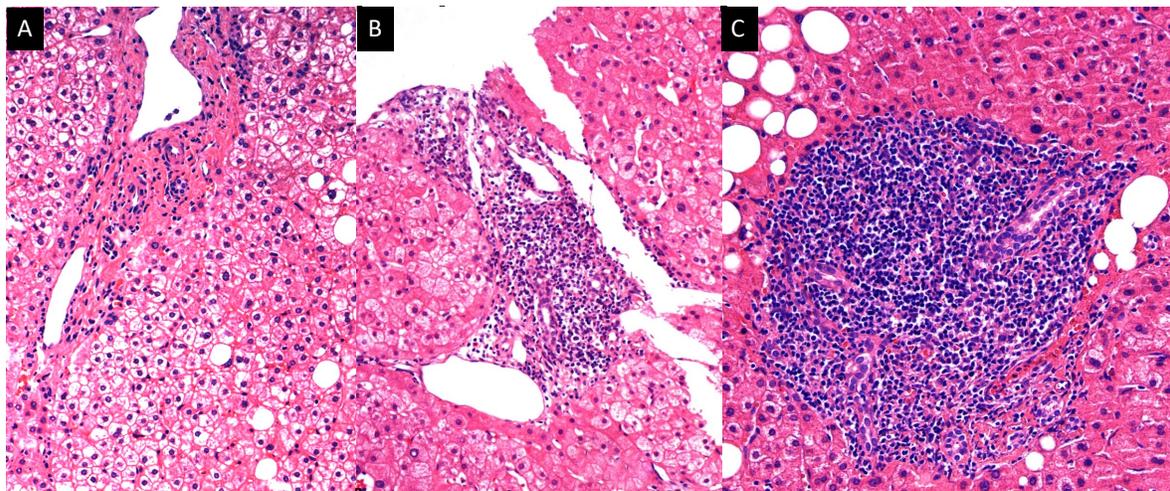


Figura 6. Se observa infiltrado linfocítico en los espacios porta de diversos grados, en la imagen A corresponde a inflamación grado 1, la imagen B a inflamación grado 2 e inflamación grado 3 a la imagen C, donde da aspecto de hepatitis de interfaz. (A-C) (HE, 10X)

Fibrosis (Anexo 2)

La fibrosis avanzada ha sido identificada como la característica histológica más importante asociada con pobres resultados; presagia un mal pronóstico sobre todo en pacientes con EHNA (14). El evento central en la fibrogénesis hepática es la activación de las células estrelladas hepáticas (de Ito) (14). Cuando dichas células están quiescentes, la función principal de estas es el almacenamiento de lípidos,

incluida la vitamina A. Sin embargo, en varias formas de lesión aguda y crónica estas se activan y diferencian en miofibroblastos. Si la lesión persiste, empieza el depósito en la matriz extracelular y cicatrización, especialmente en el espacio de Disse y la zona 3 perivenular. Es así como avanza la enfermedad y se empiezan a formar tabiques fibrosos densos tras el colapso de la red de retículo habitual (Figura 7), y comienza el depósito de colágeno por los nuevos fibroblastos. Finalmente, la enfermedad se extiende tanto que rodean los hepatocitos sobrevivientes y dan a lugar a cicatrices difusas (cirrosis). (32)

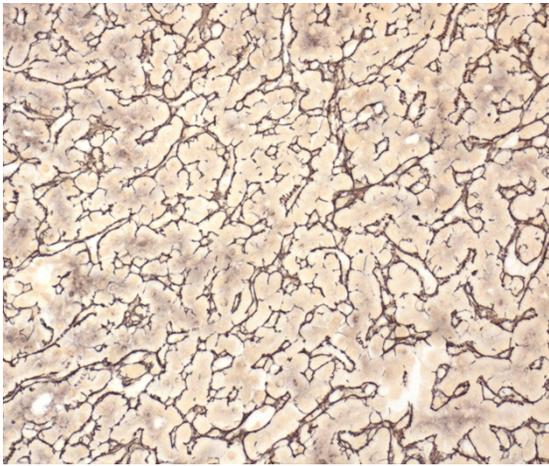


Figura 7. Biopsia hepática sin alteraciones, teñida para fibras reticulares presentes normalmente en los sinusoides separando dos hileras de hepatocitos. (Retículo, 10X)

Existen diversos sistemas de puntuación de la fibrosis, el utilizado en este estudio corresponde al utilizado por Kleiner en el CRN. El grado 1 es sub-dividido en tres partes. El 1A corresponde a fibrosis leve perisinusoidal; 1B es moderado; 1C es solamente fibrosis periportal. El grado 2 corresponde a fibrosis periportal además de perisinusoidal; grado 3 a formación de puentes (porto-portales y porto-centrales) y grado 4, a nódulos cirróticos. (17) (Figura 8)

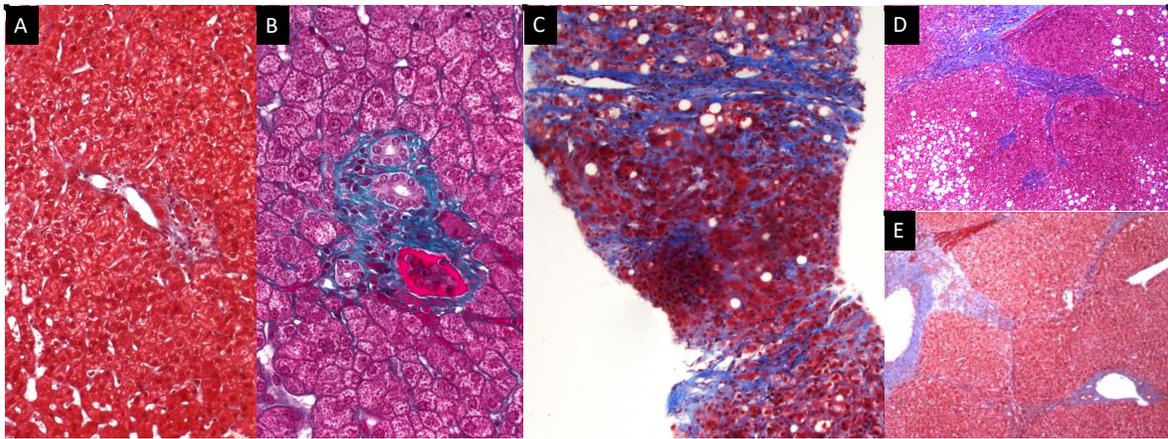


Figura 8. Biopsia hepática sin alteraciones en la deposición de fibras de colágeno, grado 0 (A); con presencia de fibrosis periportal, grado 1C (B); con evidencia de fibrosis perisinusoidal y periportal, grado 2 (C) (A-C, Tinción de Masson, 10X). Biopsia de hígado con formación de septos incompletos, grado 3 (D) y nódulos cirróticos o septos completos en un grado 4 (E) (D-E, Tinción de Masson, 4X).

Vénulas hepáticas terminales

Refiere a la observación subjetiva de las vénulas hepáticas terminales en la zona 3 ya que la deposición de colágeno comienza en dicha zona como fibrosis perivenular y perisinusoidal antes de extenderse a otras partes del lobulillo hepático. (34) La descripción de esta fibrosis perivenular no se incluye en la clasificación de la fibrosis de Kleiner/CRN por lo que se maneja aparte y se reporta subjetivamente por la presencia o ausencia de fibrosis, o ausencia de vénulas identificables en la biopsia. Si la fibrosis es considerable se denomina fleboesclerosis. Esta eventualmente termina por obstruir la vena por completo y puede dar a un área cicatricial conocida como necrosis hialina esclerosante, una lesión veno-oclusiva que se observa principalmente en hepatitis asociada a alcohol. (21,29) (Figura 9)

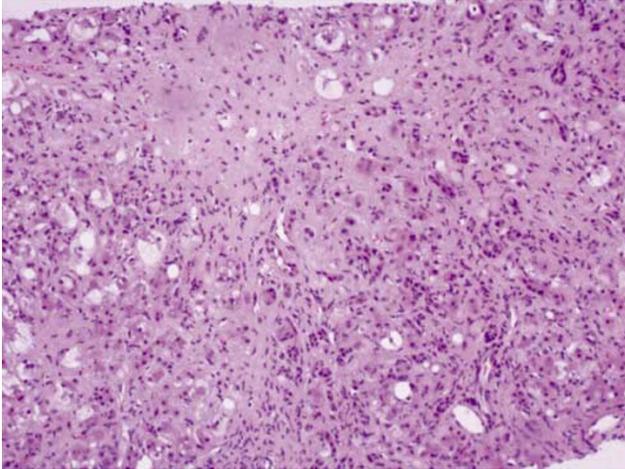


Figura 9. Necrosis hialina esclerosante. La vénula hepática terminal está obliterada (superior-izquierdo). Las tinciones especiales pueden ayudar a observar los remanentes de la pared venular. (HE) Imagen replicada de Elizabeth Brunt. (21)

Actividad de interfase

Esta es definida como infiltrado inflamatorio, típicamente linfoplasmocitario, que sobrepasa la placa limitante (primera hilera de hepatocitos que rodean un espacio porta). (Figura 10) Suele acompañarse de apoptosis, necrosis y destrucción de los mismos hepatocitos circundantes. Estos son hallazgos comúnmente encontrados en hepatitis autoinmune. (35) El reporte de esta característica es simplemente detallada como su presencia o ausencia.

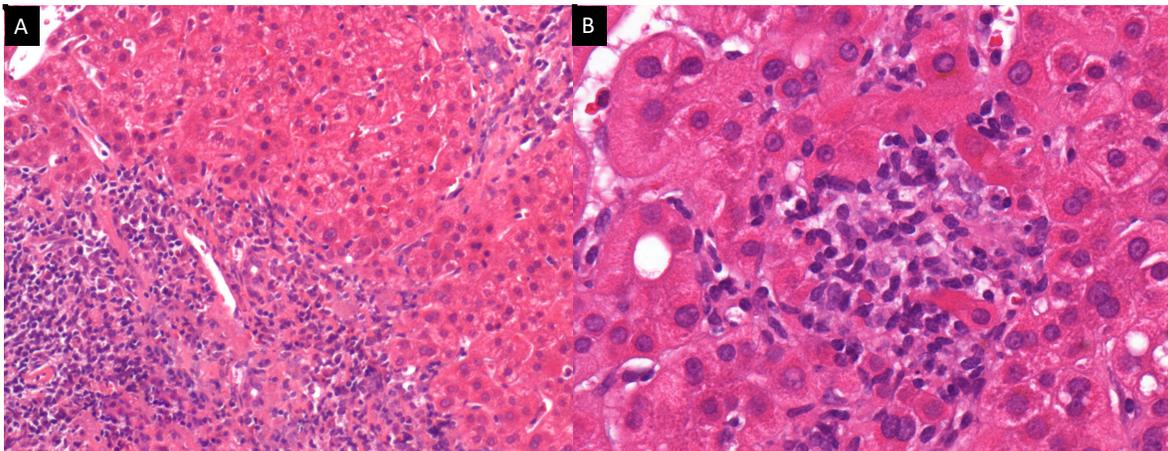


Figura 10. Se observa hepatitis de interfaz con rompimiento de la placa limitante (A) (HE, 10X) y un acercamiento al infiltrado linfoplasmocitario (B) (HE, 40X)

Esteatosis microvesicular

Se refiere a vesículas lipídicas pequeñas dispersas en el citoplasma del hepatocito, sin ocurrir desplazamiento del núcleo hacia la periferia (a diferencia de la esteatosis macrovesicular), sino que el núcleo permanece en su disposición central. (Figura 11) Estas vesículas pueden ser tan diminutas que generan un aspecto espumoso y pueden dificultar su observación en tinciones rutinarias, por lo que a veces se emplea el uso de la tinción especial Rojo Oleoso. (21,36)

La esteatosis microvesicular se asocia a mayor daño hepatocelular, por lo que se encuentra mayoritariamente en EHNA. Suele acompañarse a su vez de megamitocondrias y mayor grado de fibrosis. (25) El hallazgo exclusivo de esteatosis microvesicular es raro y debe sugerir otras etiologías como hepatitis medicamentosa o trastornos del metabolismo de ácidos grasos de cadenas largas. Su reporte es simplemente detallada como su presencia o ausencia.

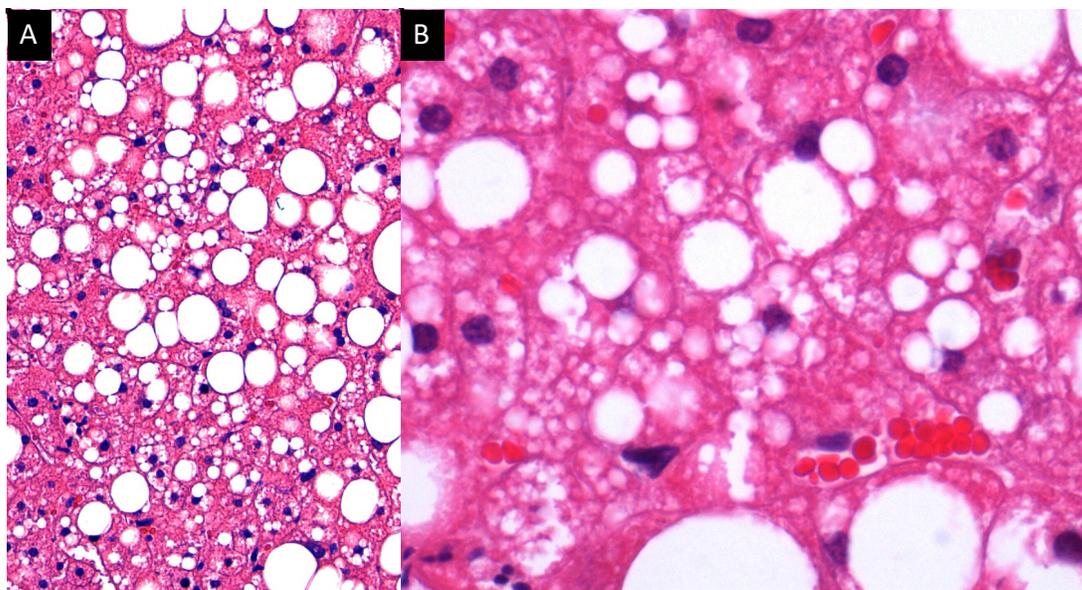


Figura 11. Biopsia hepática demostrando esteatosis macro y microvesicular (A) (HE, 10X), con un acercamiento a un hepatocito con gotas rodeando el núcleo central. (B) (HE, 40X)

Cuerpos de Mallory-Denk

Los CMD son inclusiones intracitoplasmáticas eosinófilas, densas y de aspecto de cuerda retorcida. Suelen encontrarse en hepatocitos balonoides en la zona 3 y áreas de fibrosis perisinusoidal. (Figura 12) Cuando se encuentran, se relacionan a mayor actividad de EHNA (27). Su significado es desconocido, se ha dilucidado que se trata de un mecanismo de protección celular ya que suelen encontrarse neutrófilos en la vecindad. (37)

En cuanto a su fisiopatología, se ha descrito que el estrés oxidativo crónico causa una sobreexpresión de CK8 en relación con CK18 que conlleva a un plegamiento erróneo, reorganización del citoesqueleto y finalmente la pérdida en la estabilidad mecánica del hepatocito que resulta en el agrandamiento y balonización *per se* del citoplasma. Bajo estas mismas condiciones de estrés, otras proteínas adicionales a CK8/18 (como ubiquitina y proteínas de choque térmico como Hsp 70, 90 y 25) se agregan. Dichas agregaciones posteriormente sobrepasan la capacidad de degradación proteica, por lo que es posible observar los CMD, que son positivos a CK8/18 (14).

Fueron inicialmente descritos por el Dr. Frank Burr Mallory. (37) Durante cinco décadas se consideraron patognomónicos de la hepatopatía alcohólica. Posteriormente, el patólogo Helmut Denk demostró que no solamente el alcohol se asociaba a los CMD. Es por eso que estas estructuras llevan el nombre de ambos investigadores.

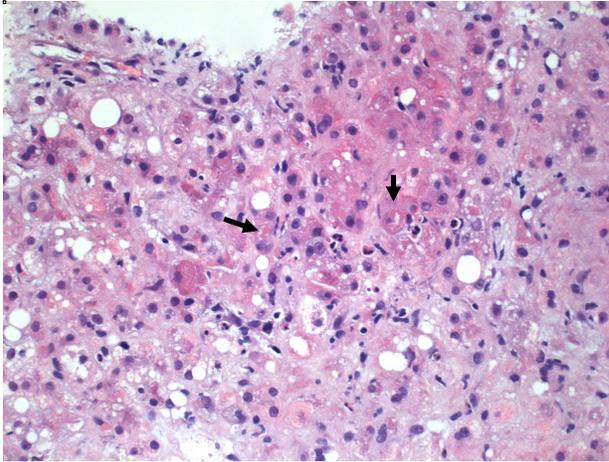


Figura 12. Se observan numerosos cuerpos de Mallory Denk (flechas) en el citoplasma de hepatocitos rodeados por neutrófilos. (HE, 40X)

Reacción ductular / Daño de conductos

El daño a los conductos biliares incluye una variedad de anomalías epiteliales, desde estratificación epitelial, células epiteliales oncocíticas o con vacuolización, apoptosis, necrosis y alteración de la polaridad hasta inflamación, más frecuentemente por linfocitos pero también por polimorfonucleares (en cuyo caso se cambia el término a colangitis). También se puede observar una respuesta granulomatosa, en cuyo caso se le conoce como lesión ductal florida, y estos se aprecian sobre todo en casos con cirrosis biliar primaria. (13,35,38) Estos son reportados por su ausencia o presencia. (Figura 13)

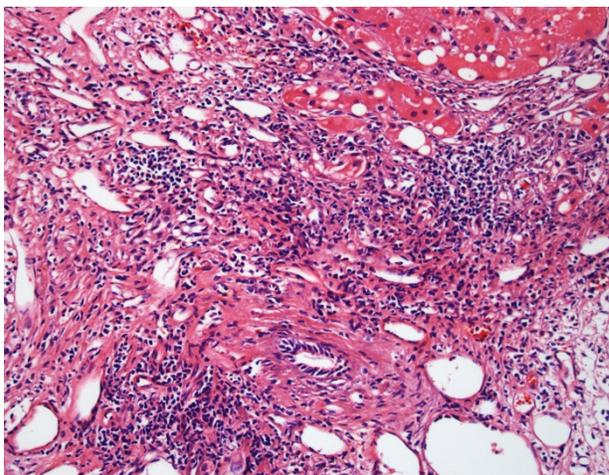


Figura 13. Se observan numerosos conductillos biliares, en un espacio porta mediano, con alteración de su estructura debido a abundantes linfocitos. (HE, 10X)

Proliferación ductular

Este hallazgo hace referencia a estructuras ductulares hiperplásicas que se acompañan de cantidades variables de inflamación y tejido conectivo rodeando los espacios porta. (Figura 14) Se piensa que se originan de las células progenitoras u ovas hepáticas. En la EHNA se relaciona a obstrucción biliar, fibrosis avanzada y cirrosis y de hecho, se ha discutido como una posible vía para la progresión de la fibrosis (27). Es reportado según su ausencia o presencia.

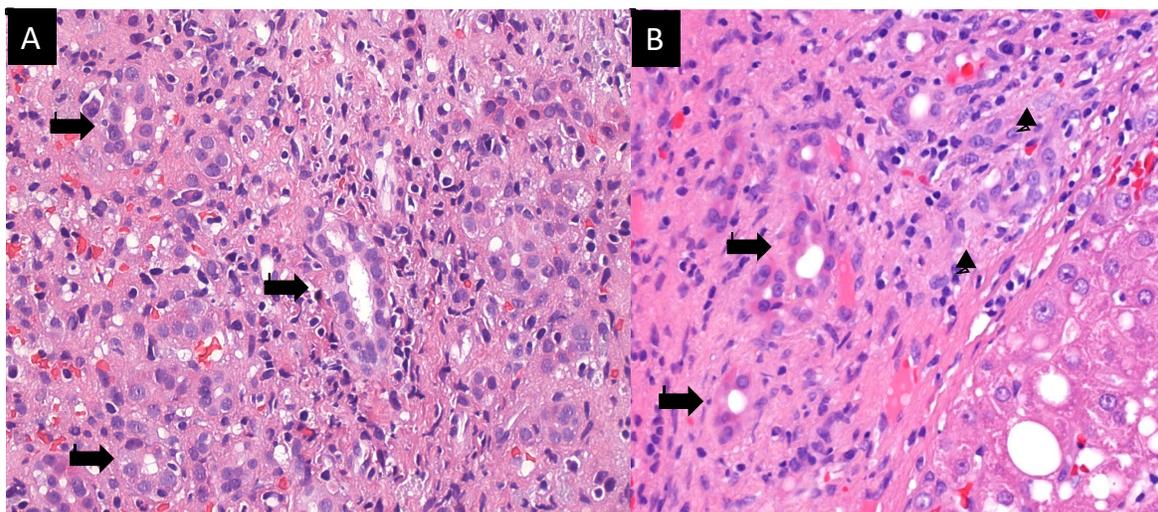


Figura 14. Biopsia hepática con reacción ductular (flechas) abundante. (A) (HE, 10X) Biopsia de hígado con reacción ductular (flechas) y presencia de células ovas (punta de flecha), en el contexto de cirrosis hepática. (B) (HE, 10X)

Colestasis

Esta variable hace referencia al hallazgo de bilis visiblemente como material verde-café, en el citoplasma de hepatocitos o de forma intracanalicular. (Figura 15) Cuando la colestasis se asocia a inflamación, se le conoce como hepatitis colestásica. Se puede encontrar de forma aislada o como parte de una hepatopatía como lesión biliar o medicamentosa, por ejemplo por anabólicos. Dentro de las lesiones biliares asociadas a colestasis se encuentra la colangitis biliar primaria y colangitis esclerosante primaria. (39) La colestasis es reportada por su ausencia o presencia y ubicación.

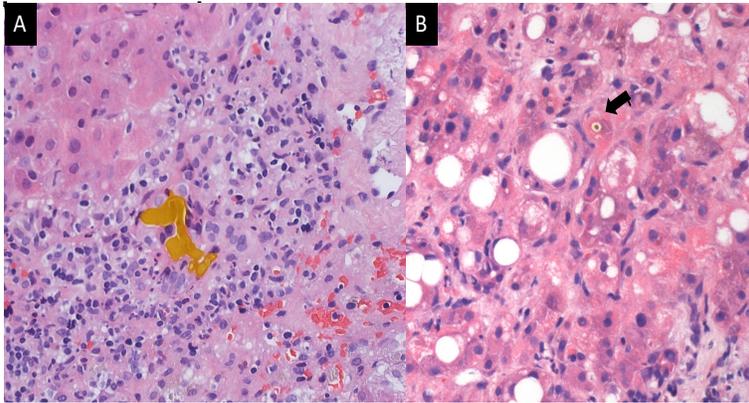


Figura 15. La colestasis puede ser intracanalicular y explícita (A) (HE, 10X) o apenas perceptible, puntiforme, dentro del citoplasma de un hepatocito (B) (HE, 10X).

Cuerpos acidófilos

Los cuerpos acidófilos son parte del espectro de lesión hepatocelular en la esteatohepatitis, junto con la necrosis y degeneración balonoide. (27) Corresponden a hepatocitos muertos individuales, anucleados, eosinófilos y pequeños, redondos que aparecen libres dentro de sinusoides o rodeados por células de Kupffer u otras células inflamatorias. (Figura 16) (13,40) Fueron descritos inicialmente por Councilman en la fiebre amarilla, por lo que cuerpos de Councilman deben abstenerse solo a la descripción de dicha enfermedad. (38) Mientras que los cuerpos apoptóticos corresponden a hepatocitos o células de la vía biliar muertas, se puede usar este término de forma indistinta. (13) En la hepatitis colestásica, así como en hepatitis agudas, suelen encontrarse abundantes cuerpos apoptóticos.

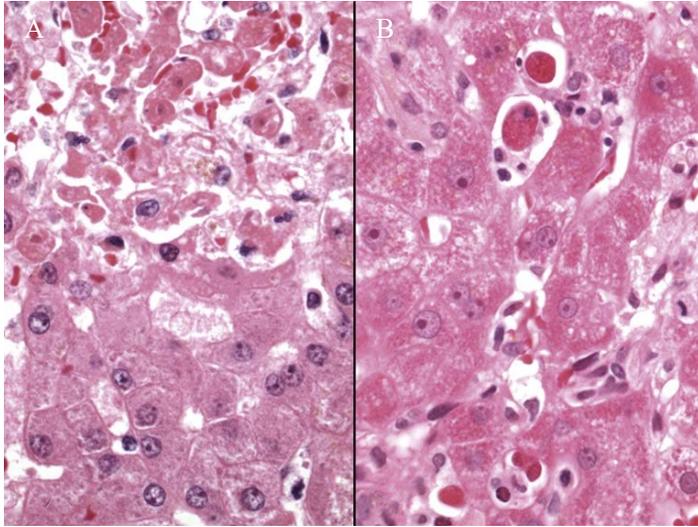


Figura 16. Necrosis coagulativa vs. Apoptosis. Los hepatocitos superiores han sufrido necrosis coagulativa y se delimitan bien de los hepatocitos viables inferiores. Los hepatocitos necróticos demuestran hipereosinofilia, picnosis nuclear y discohesividad (A) (HE).

Múltiples cuerpos apoptóticos de distintos tamaños se observan dentro de los sinusoides. (B) (HE) (38) Imágenes replicadas del libro Scheuer's Liver Biopsy Interpretation.

Núcleos glucogenados

Los núcleos glucogenados se encuentran vacuolados, usualmente agrupados y ubicados en los hepatocitos periportales de la zona 1. (Figura 17) En la EHGNA, especialmente en la EHNA son más comunes, incluso considerados característicos de ésta y de pacientes diabéticos, mientras que en son raros en lesión por alcohol. (27,31) Estos son reportados por su ausencia o presencia en los hepatocitos.

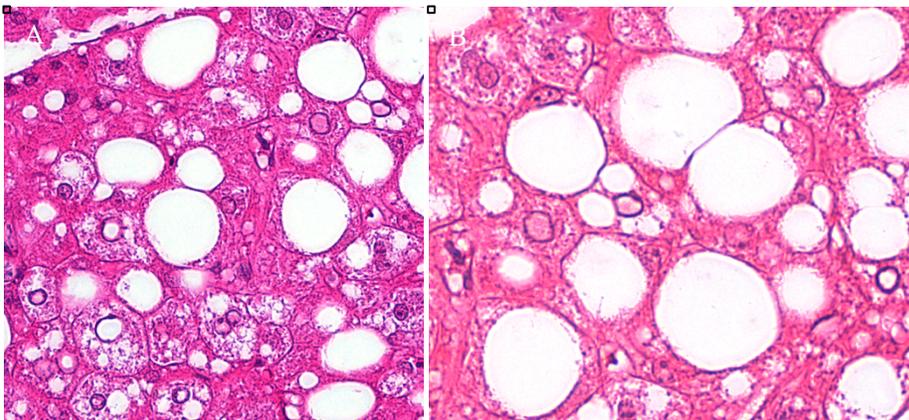


Figura 17. Se observan hepatocitos con núcleos vacuolados en el contexto de dos casos distintos de esteatohepatitis. (A, B) (HE, 10X)

Megamitocondrias

Estas estructuras son intracelulares, eosinofílicas, redondas a cilíndricas observadas en el citoplasma de los hepatocitos. Suelen acompañarse de esteatosis microvesicular. (Figura 18) El significado de éstas en EHGNA es desconocido, sin embargo, en la enfermedad hepática por alcohol, se han asociado a progresión clínica. (27,40) Estas estructuras son reportadas simplemente por su presencia o ausencia.

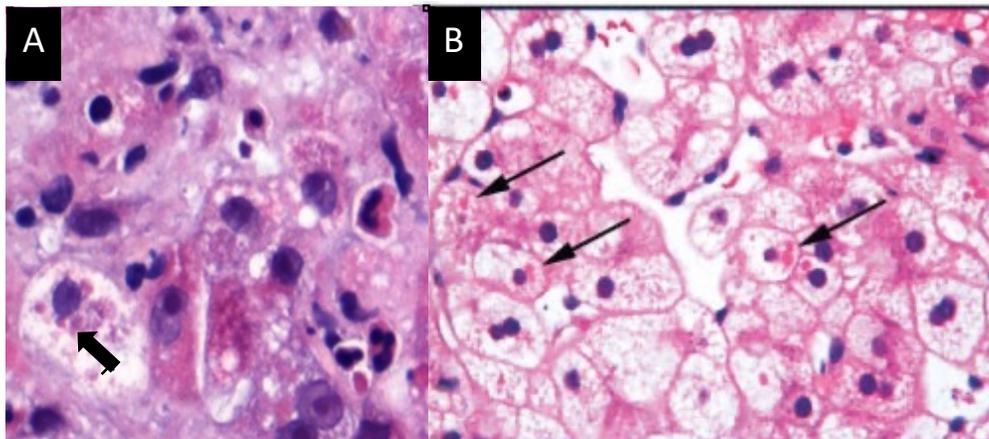


Figura 18. Se observan hepatocitos con megamitocondrias intracitoplasmáticas eosinofílicas (flecha). (A) (HE, 40X) La flechas señalan megamitocondrias en este caso externo del artículo original de la CRN (B) (HE, 40X)

Macrófagos pigmentados

Las células de Kupffer (macrófagos) intrasinusoidales pueden encontrarse de forma pigmentada debido a la presencia de lipofuscina en el hígado en la zona 3 perivenular principalmente. Sobre todo se observan en lesiones con actividad necro-inflamatoria, asociadas a isquemia, hepatitis agudas o crónicas. Los macrófagos se encuentran teñidos de color café-dorado a amarillo en el citoplasma. (Figura 19) El pigmento corresponde a lípidos oxidados dentro de los

lisosomas. No se debe confundir con la hemosiderina que es refráctil, ni con bilirrubina que es verde y se encuentra dentro de los hepatocitos o de forma libre intrasinusoidal. (38) Otro pigmento comúnmente encontrado en el hígado, es el hierro en el contexto de la enfermedad metabólica, hemocromatosis; el pigmento es café granular en el citoplasma de los hepatocitos periportales y tardíamente en las células de Kupffer, donde cursaría frecuentemente con cirrosis. Un elemento de apoyo histopatológico para su diagnóstico es la utilización de la tinción especial, azul de Prussia.

Las células de Kupffer se encuentran más comúnmente en la hepatopatía alcohólica, sin embargo recientemente (41,42) se ha encontrado una relación entre dichos macrófagos con la activación de las células estrelladas de Ito y miofibroblastos, quienes participan en la fibrogénesis hepática. Las células de Kupffer activadas, secretan una gran cantidad de citocinas pro-inflamatorias como TNF-a e IL-6, quienes participan en la progresión de la fibrosis.

Los macrófagos pigmentados son reportados por su escasez o abundancia (17).

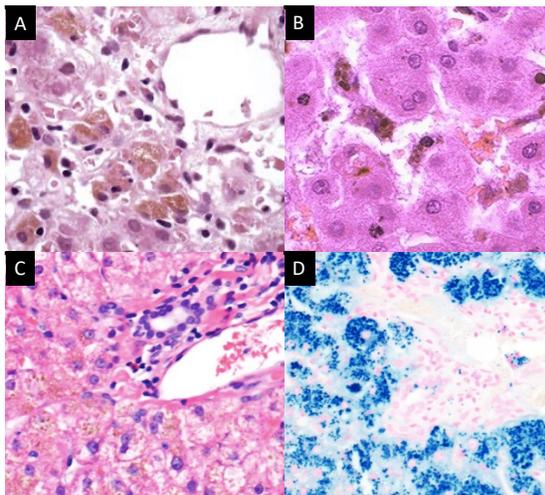


Figura 19. Se observan células de Kupffer con lipofuscina cercanas a la vena centrolobulillar indicativas de actividad necro-inflamatoria reciente. (A, HE) Replicada del libro Scheuer's Liver Biopsy Interpretation. Macrófagos pigmentados por hemosiderina en un sinusoide hepático. Tomado de Webpath (B, HE) Deposición de hierro intracitoplasmático

de hepatocitos periportales, en este caso de hemocromatosis, positivo a la tinción de azul de Prussia. (C, HE); (D, Azul de Prussia) subidos a internet por Kimberley J. Evason, M.D., Ph.D.

Microgranuloma y Lipogranuloma

Se pueden observar estas características en el contexto de una esteatohepatitis. El microgranuloma hace referencia a pequeños agregados de células de Kupffer intrasinusoidales, mientras que el lipogranuloma además contiene vacuolas lipídicas, colágeno e inflamación. (25) (Figura 20) Estos se encuentran sobre todo en el lobulillo hepático y se encuentran más comúnmente en la EHNA que en la hepatopatía alcohólica. (43) Otro tipo de granulomas por ejemplo, los epitelioides, harían dudar del diagnóstico de EHNA y obligan a considerar una etiología infecciosa o los granulomas descritos en la lesión ductal florida que inclinan a pensar en la colangitis biliar primaria.

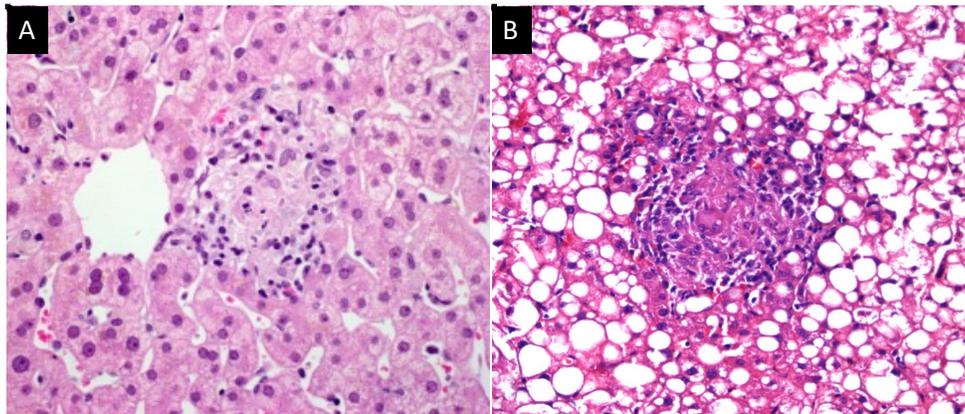


Figura 20. Se observa un microgranuloma adyacente a una vena central. (A, HE). Lipogranuloma (vacuolas, macrófagos, linfocitos y colágeno) observado en el contexto de una esteatohepatitis. Tomado de Lewis J. Histopathology of granulomatous liver disease. (B) (10X, HE)

Hepatocitos en vidrio esmerilado

Los hepatocitos en vidrio esmerilado son aquellos que tienen un citoplasma pálido rosa-homogéneo que recuerda a un vidrio opaco, sobre todo se han descrito en la hepatitis B crónica. Estos cambios pueden involucrar todo el citoplasma o pueden encontrarse en forma de inclusiones redondas. (38) (Figura 21)

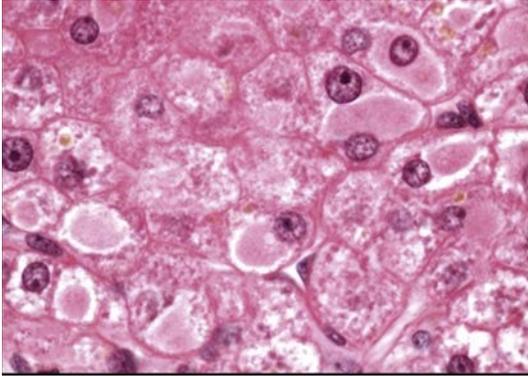


Figura 21. Se observan hepatocitos con vidrio esmerilado en el citoplasma correspondiente a infección por virus de Hepatitis B. (HE) (38) Imágenes replicadas del libro Scheuer's Liver Biopsy Interpretation.

Posteriormente, una vez llenada la base de datos por cada variable, se compararon los reportes antiguos con la lista de verificación propuesta. Como objetivo terciario, se investigaron cada una de estas variables utilizando la clasificación o graduación correspondiente o reportando su presencia/ausencia, se realizó estadística descriptiva a modo de gráficas que se presentan a continuación.

RESULTADOS

Se investigaron todas las variables de la *checklist* en los 53 casos y fueron reportadas y comparadas contra los reportes originales, con un enfoque en si estas variables fueron mencionadas u omitidas. Cuando las variables fueron mencionadas, debe cumplir además con la gradificación apropiada para considerarse como un caso adecuado. Se consideró que el 100% de las variables de los nuevos reportes fueron incluidas en la descripción microscópica o diagnóstico final.

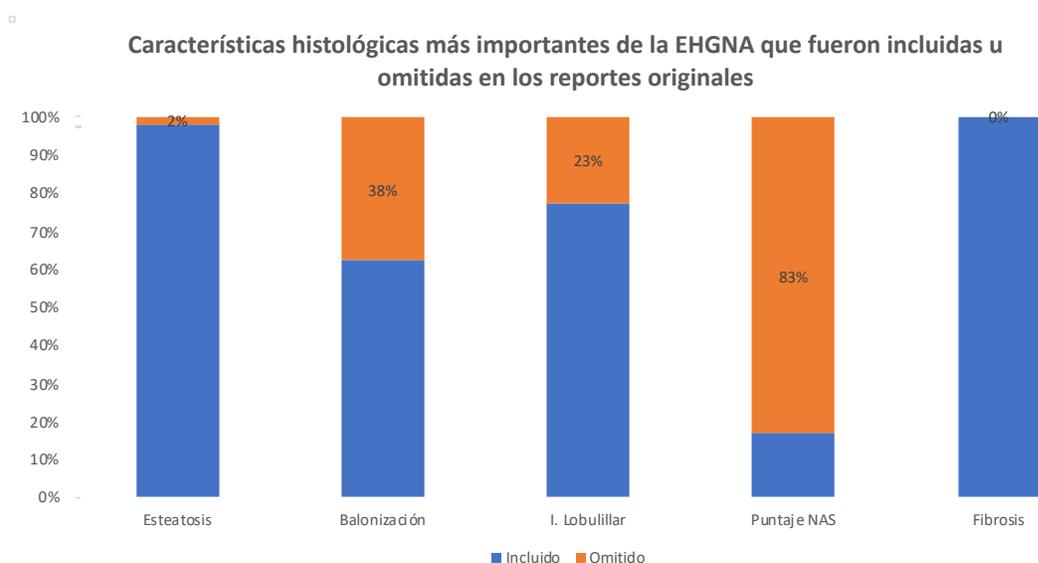


Gráfico 1. Características histológicas más importantes de la EHGNA que fueron incluidas u omitidas en los reportes originales.

En el primer gráfico, se encuentran las variables histológicas más importantes en el contexto de la EHGNA, es decir la esteatosis, degeneración balonoide e inflamación lobulillar. Si bien todos los casos incluyeron la esteatosis como parte del diagnóstico, hubo un 2% que no lo clasificó en grado 1, 2 o 3. En cuanto a la balonización, hasta el 38% no hizo mención de esta en el reporte, mientras que el 23% no hizo mención de la inflamación lobulillar. Estas dos características histológicas son esenciales para distinguir entre HGNA y EHNA. El puntaje NAS fue omitido en un 83% de los casos.

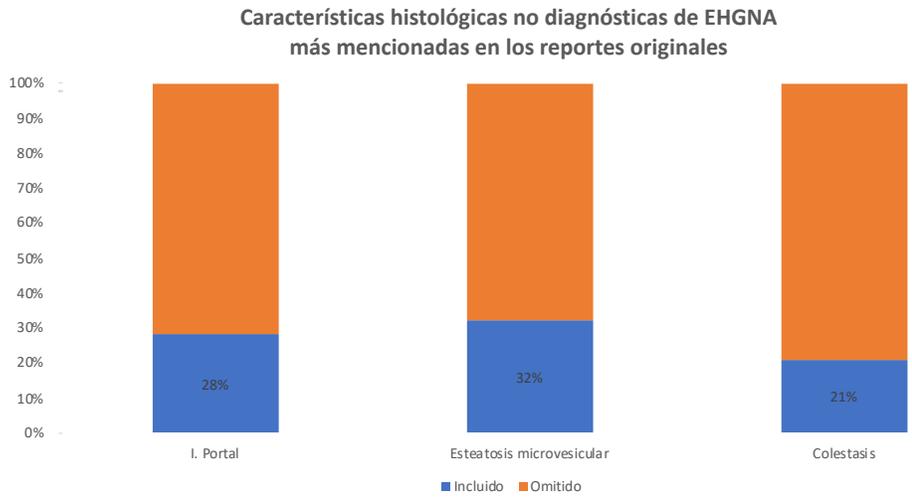


Gráfico 2. Características histológicas no diagnósticas más comúnmente mencionadas en los reportes originales.

En el gráfico 2 se presentan las características histológicas, que después de las más importantes del gráfico 1, fueron incluidas en los reportes originales. Incluyen la inflamación portal, mencionada y gradificada en un 28% de los casos; la esteatosis microvesicular en un 32% de los casos y colestasis en un 21% de los casos.

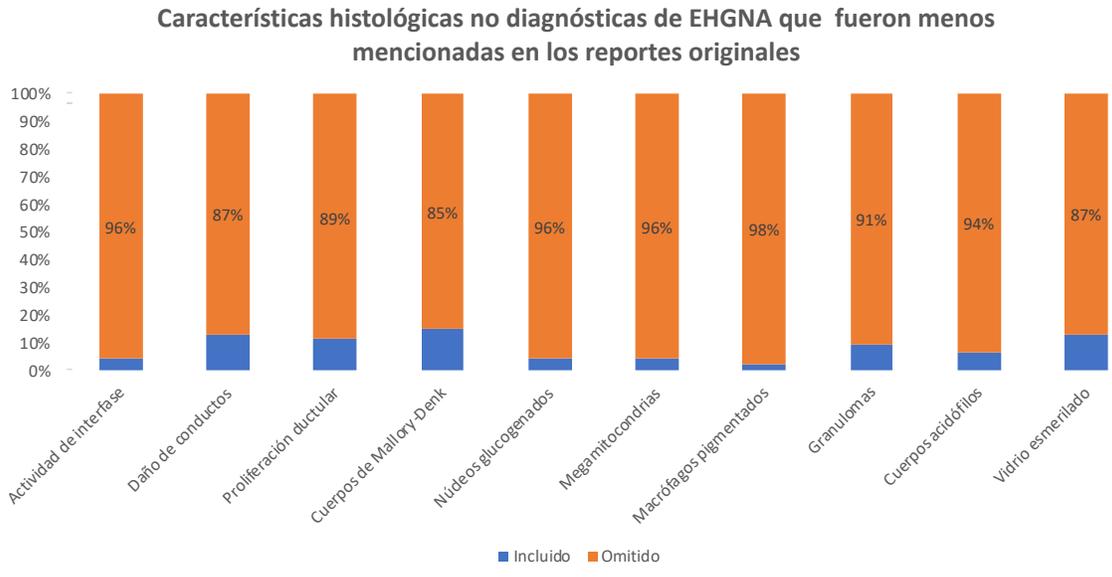


Gráfico 3. Características histológicas no diagnósticas de EHGNA menos mencionadas en el reporte original.

El gráfico 3 muestra las variables histológicas que fueron excluidas en más del 85% en los reportes originales; incluye actividad de interfase, daño de conductos, proliferación ductular, presencia de CMD, núcleos glucogenados, megamitocondrias, macrófagos pigmentados, granulomas, cuerpos acidófilos o hepatocitos con vidrio esmerilado. Si bien los casos pudieran no mostrar los cambios y por esta razón haberse excluido su mención, pudiera también corresponder a que no se buscaron activamente.

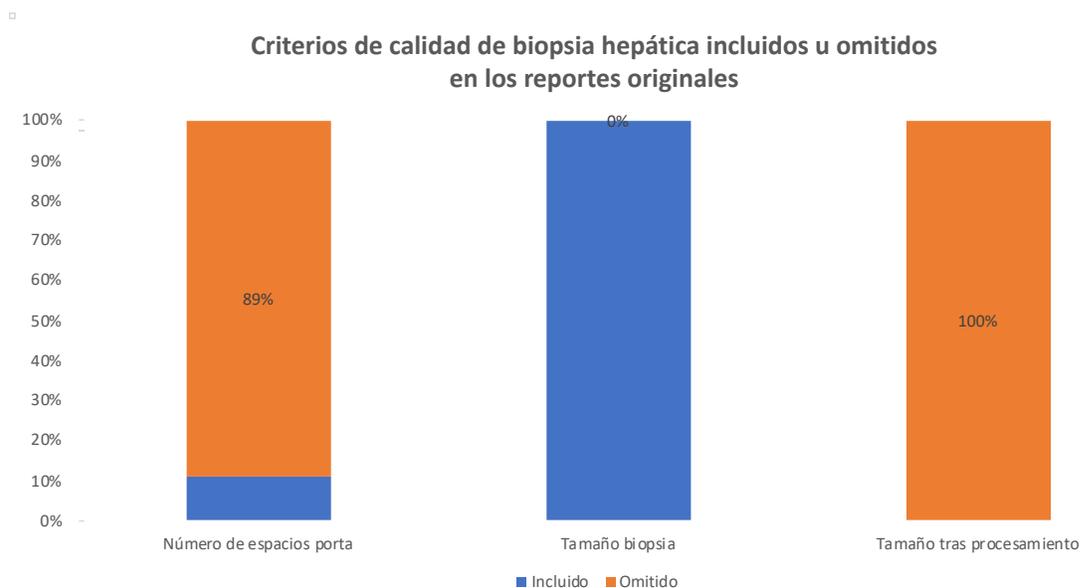


Gráfico 4. Criterios de calidad de biopsia hepática incluidos u omitidos en los reportes originales.

El gráfico 4 muestra los criterios de calidad de biopsia hepática, número de espacios porta y el tamaño de la biopsia cuando se recibe en el laboratorio y tras el procesamiento histológico. El número de espacios porta fue omitido en un 89% de los casos, mientras que si bien el tamaño de la biopsia fue reportado en todos los casos, su tamaño tras el procesamiento fue omitido en todos los casos.

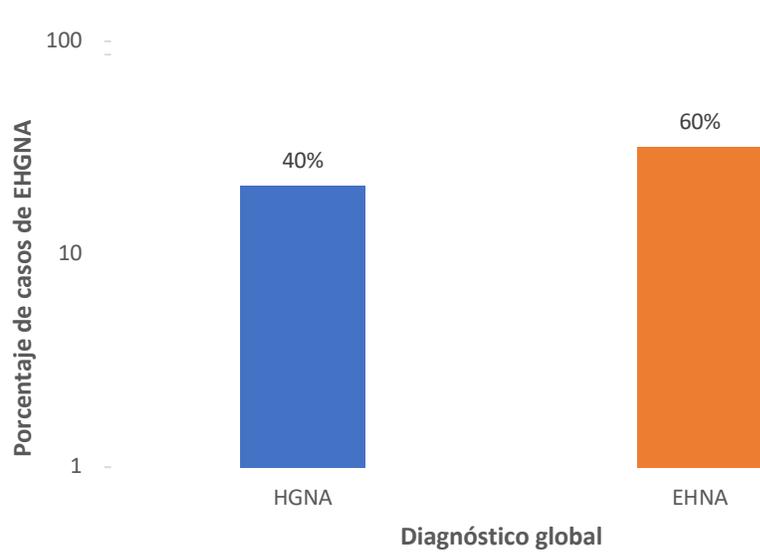


Gráfico 5. Muestra el porcentaje de casos con HGNA y EHNA de un total de 53 casos examinados.

De las 53 biopsias hepáticas con EHGNA recopiladas se encontró que el 60% correspondían a EHNA (n= 32) y 40% a HGNA (n=21) (Gráfico 5).

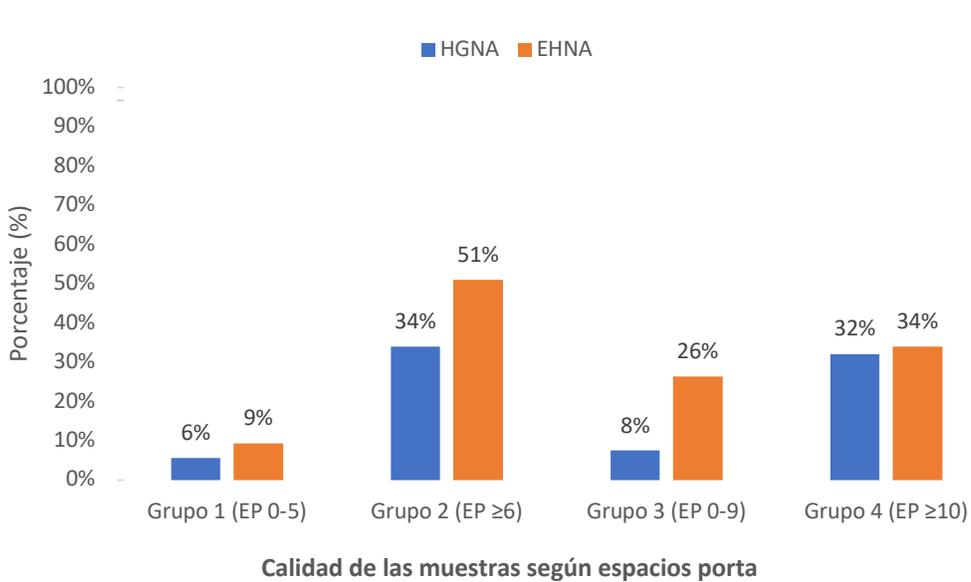


Gráfico 6. Comparación de los cuatro grupos que muestran la calidad de la biopsia hepática según el número de espacios porta.

Según los criterios para garantizar calidad en una biopsia hepática, el número de espacios porta deben ser mayores a 6-8, mientras que otros autores sugieren mayor o igual a 10. En nuestro estudio, se separaron las muestras en cuatro grupos. Los primeros dos para evaluar el criterio de 6 a 8 espacios porta, y los grupos 3 y 4 para evaluar el criterio de 10 espacios porta. Se encontró que utilizando el primer criterio, en el grupo 1 con 0-5 espacios porta contabilizados en la biopsia, excluiría hasta el 15% de las biopsias enviadas por EHGNA (Gráfico 6); de estas, el 6% fueron diagnosticadas como HGNA y 9% como EHNA. En el grupo 2, están aquellas biopsias con mayor o igual a 6 espacios porta (óptimas para su diagnóstico), estas comprenden el 85% de las biopsias hepáticas, el 34% corresponde a HGNA y el 51% a EHNA. El grupo 3 contiene las biopsias con menos de 10 espacios porta, el otro criterio de calidad sugerido que las haría insuficientes. Hasta el 34% de las biopsias no serían apropiadas para diagnosticarse, el 8% fue diagnosticado como HGNA y el 26% como EHNA. Finalmente, en el grupo 4 se encuentran aquellas biopsias con espacios porta mayor o igual a 10; corresponden a 66% de las biopsias; 32% de HGNA y 34% de EHNA.

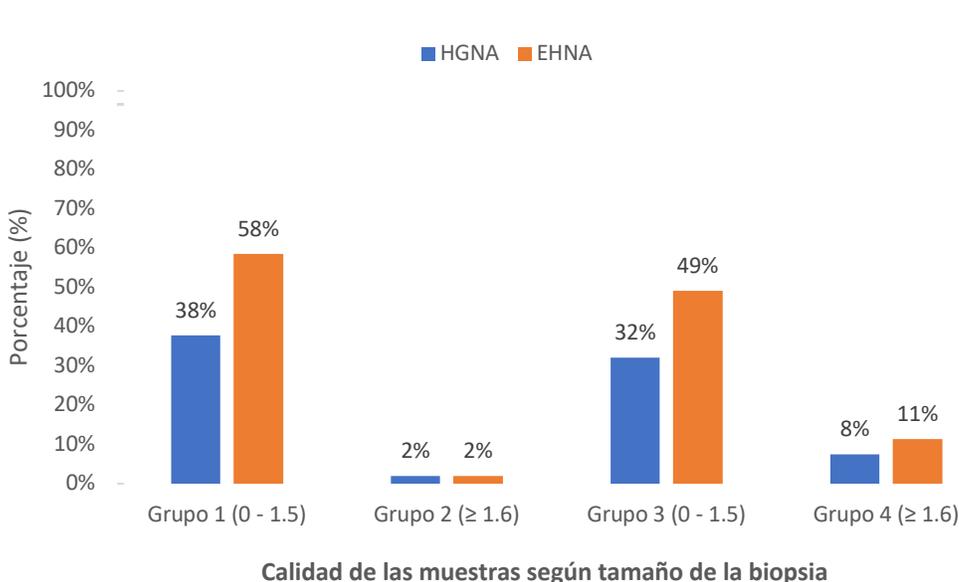


Gráfico 7. Comparación de los cuatro grupos que muestran la calidad de la biopsia hepática según el tamaño de la biopsia, antes y después del procesamiento.

El segundo criterio de calidad en biopsias hepáticas que ha sido reportado es la longitud de la biopsia medida en centímetros, la cuál debe medir mayor o igual a 1.6 cm. Se encontraron los siguientes resultados (Gráfico 7). En el grupo 1, se tienen las biopsias menores a dicha medida, las cuales conformaron hasta el 96% de las biopsias de EHGNA, el 38% de estas fueron diagnosticadas como HGNA y el 58% como EHNA. El grupo 2 muestra aquellas que fueron mayor o igual a 1.6 cm, mostrando que solo el restante 4% cumple con los criterios de calidad establecidos. El grupo 3 muestra las mismas biopsias pero ahora, posteriores al procesamiento histológico como forma de estudiar si se está perdiendo tejido valioso en este proceso o si el tejido es escaso desde el momento de obtención instrumental de la biopsia. Se observa que todavía hasta el 81% de las biopsias son insuficientes para su diagnóstico y el 19% restante (grupo 4) sí cumplía con criterios de calidad.

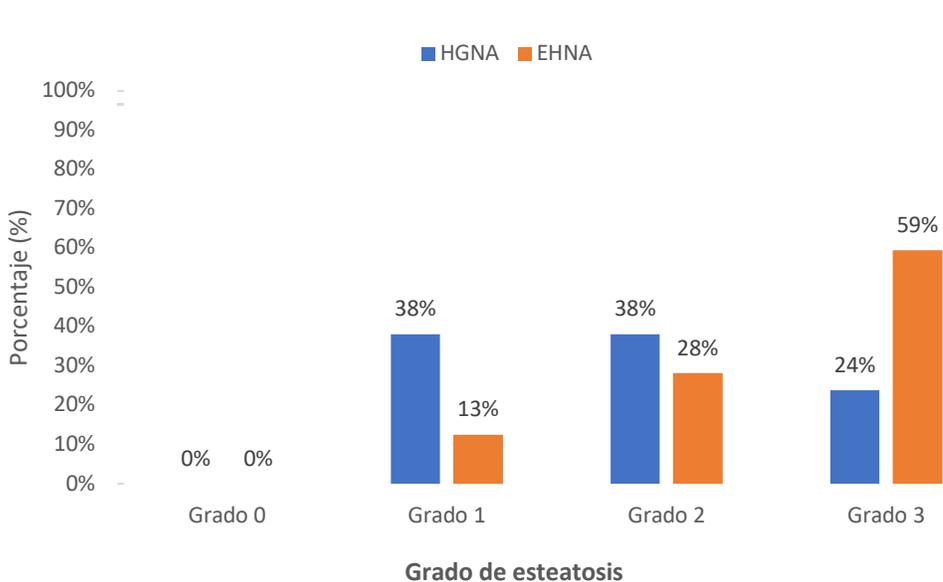


Gráfico 8. Comparación entre biopsias con por EHGNA por grado de esteatosis.

En cuanto a la esteatosis, las biopsias diagnosticadas como EHNA corresponden mayoritariamente a grado 3, mientras que aquellas clasificadas como HGNA

corresponden más a grado 1 y grado 2. No hay casos clasificados como grado 0 ya que implicaría que no hay EHNA.

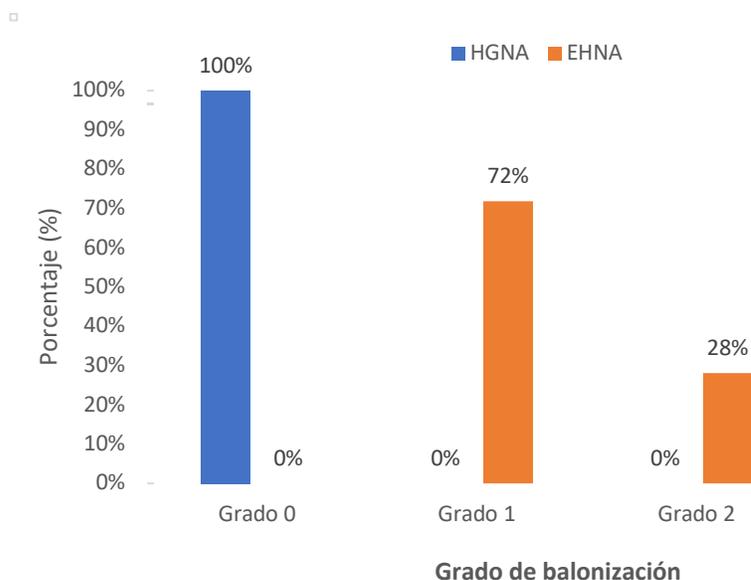


Gráfico 9. Comparación entre biopsias de EHGNA por grado de balonización (0-2).

Según el grado de balonización, las biopsias diagnosticadas como grado 0 corresponden en su totalidad a HGNA debido a que ninguna presenta daño hepatocelular, pilar diagnóstico de la EHNA. La mayoría (72%) de las biopsias con EHNA corresponden a grado 1, demostrando pocas células balonizadas, y el 28% corresponde a grado 2, esto equivale a muchas células balonizadas.

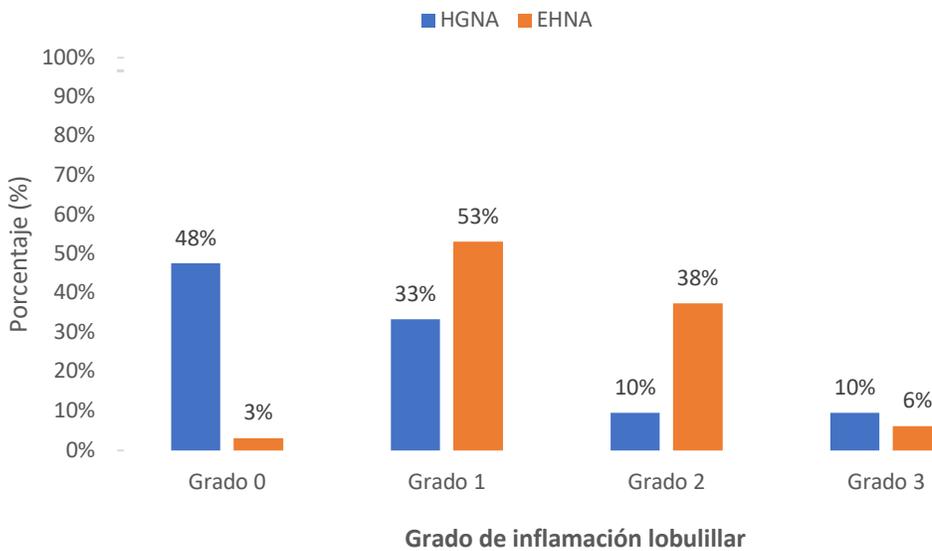


Gráfico 10. Comparación entre biopsias de EHGNA por grado de inflamación lobulillar (0-3).

Las biopsias diagnosticadas como EHNA suelen tener algún grado de inflamación lobulillar (53% grado 1, 38% grado 2 y 6% grado 3) en comparación con las biopsias con HGNA que suelen ser grado 0 (48%). Esto se explica por la propia naturaleza de la afección en donde la degeneración balonoide y la inflamación lobulillar suelen ir de la mano con mayor actividad de la enfermedad hepática.

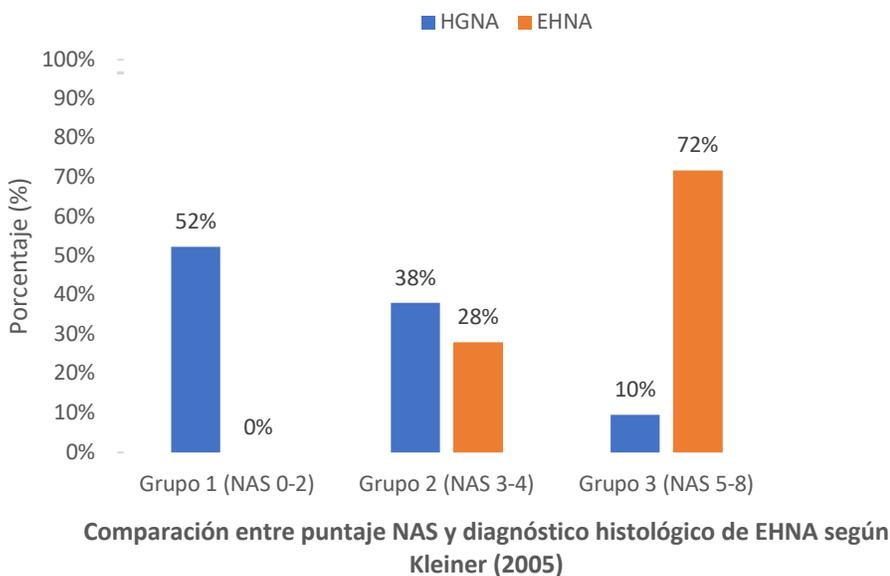


Gráfico 11. Comparación entre puntaje NAS y diagnóstico histológico de EHNA según grupos de Kleiner.

En el artículo original descrito por Kleiner en 2005, divide el estudio en tres grupos dependiendo del puntaje NAS para observar la correlación entre el puntaje obtenido y el diagnóstico histológico global emitido por el patólogo, en donde el grupo 1 (NAS 0-2) corresponde a “no esteatohepatitis”; el grupo 2 (NAS 3-4) a “esteatohepatitis indeterminada” y el grupo 3 (NAS 5-8) a “esteatohepatitis probable o definitiva”. En este estudio de 53 casos se observó que las proporciones descritas por Kleiner son subóptimas por lo que se modificaron estos grupos a grupo 1 (NAS 0-3); grupo 2 (4); y grupo 3 (NAS 5-8) resultando una mejor estratificación de la población (Gráfico 12). Es por el grupo 2 (indeterminado) que el puntaje NAS no se puede utilizar para establecer un diagnóstico histopatológico sino debe limitarse para medir la actividad de la enfermedad. El diagnóstico se realiza ultimadamente por la decisión juiciosa del patólogo.

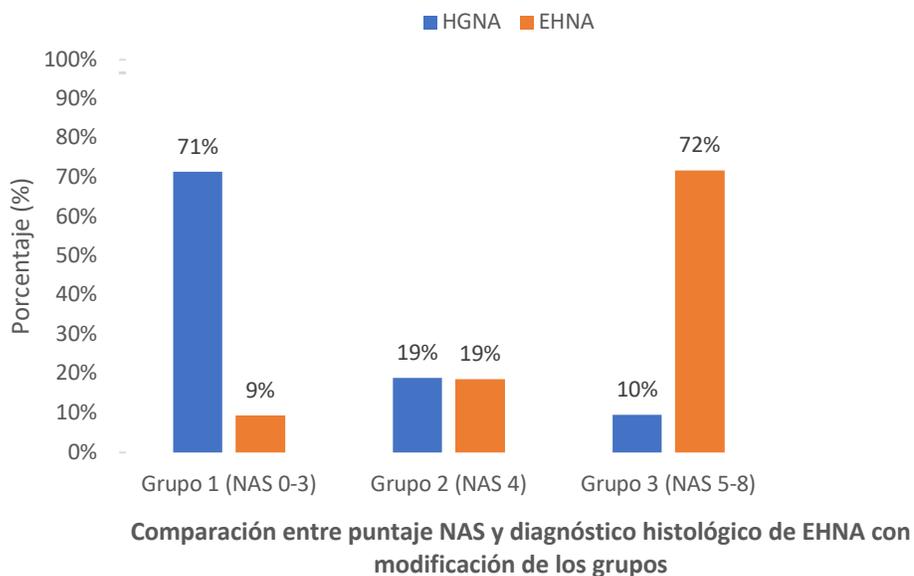


Gráfico 12. Comparación entre puntaje NAS y diagnóstico histológico de EHNA según el estudio presente.

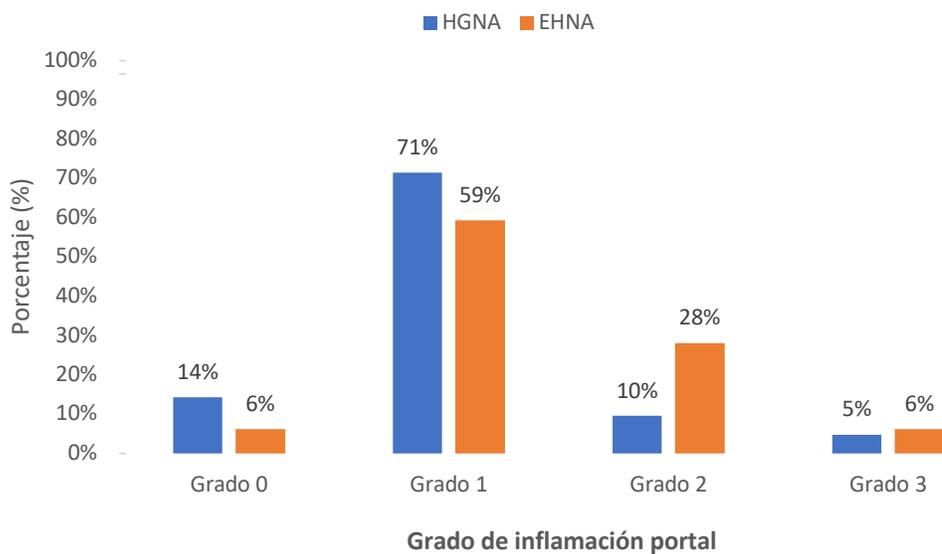


Gráfico 13. Comparación entre el grado de inflamación portal de biopsias con EHGNA.

No existe gran diferencia en el grado de inflamación portal entre las biopsias con HGNA y EHNA. La mayoría de las biopsias por EHGNA se encuentran en un grado 1 de inflamación portal (leve).

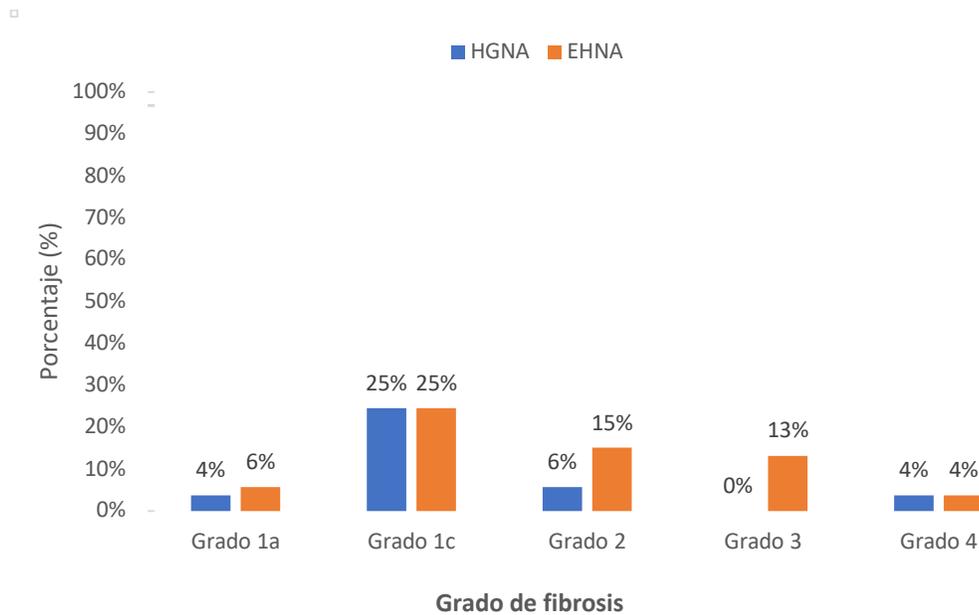


Gráfico 14. Comparación entre el grado de fibrosis en biopsias de EHGNA.

La mayoría de las biopsias por EHGNA se encuentran en fases iniciales de fibrosis (grado 1), sin embargo, los grados 2 y 3 se encuentran en mayor proporción en aquellas con EHNA. Si bien, la fibrosis grado 1 se subdivide en 1A (perisinusoidal leve), 1B (perisinusoidal moderado) y 1C (periportal) no se encontraron diferencias significativas entre HGNA y EHNA para este grado y no se encontraron biopsias con Grado 1b. En cuanto al grado 4, debe tenerse en mente que se piensa que la mayoría de las cirrosis criptogénicas son ocasionadas por EHNA. En la cirrosis criptogénica los hallazgos histopatológicos suelen ser insuficientes para la correcta categorización de la EHGNA. (32)

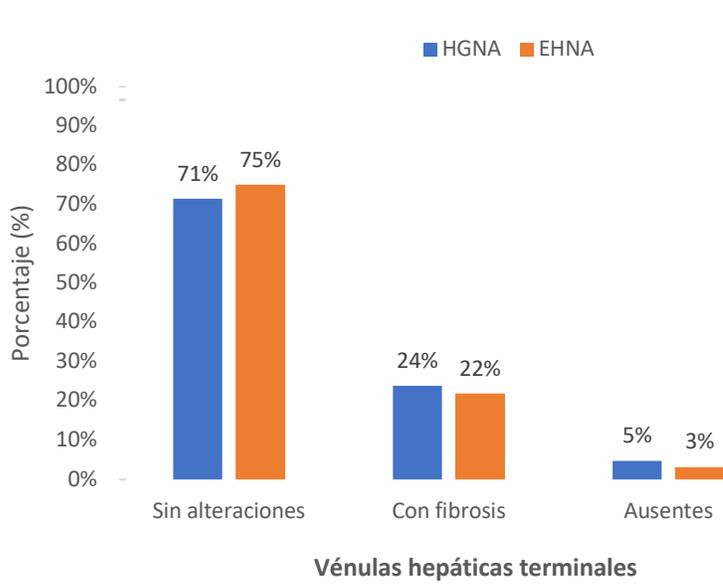


Gráfico 15. Comparación de los hallazgos histológicos encontrados en las vénulas hepáticas terminales en biopsias de EHGNA.

Más del 70% de las biopsias con EHGNA no presentan alteraciones en las vénulas hepáticas, el 24% de las biopsias con HGNA y el 22% con EHNA presentan fibrosis, por lo que no es una variable que distinga entre HGNA y EHNA.

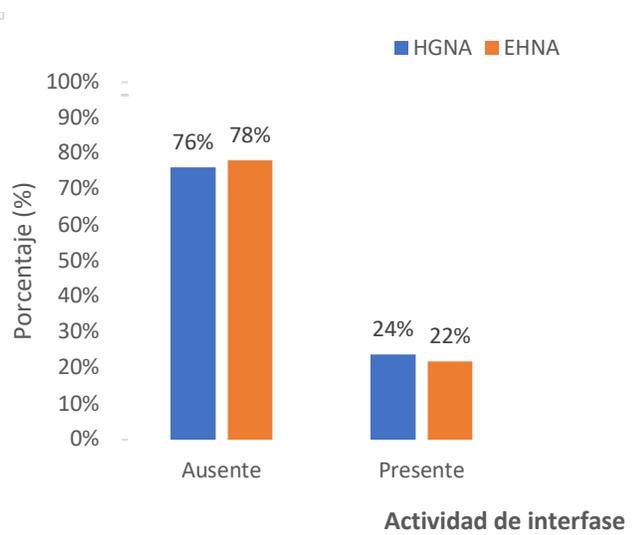


Gráfico 16. Comparación de la actividad de interfase encontrada en biopsias de EHGNA.

La actividad de interfase se encuentra presente en el 24% de las biopsias con HGNA y 22% con EHNA, demostrando no ser una variable de utilidad para distinguir entre ambas enfermedades. Más del 75% de las biopsias con EHGNA no presentan actividad de interfase.

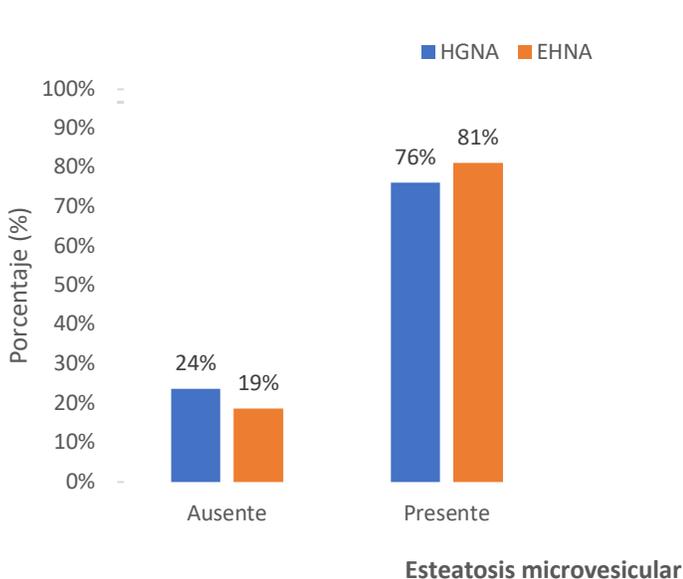


Gráfico 17. Comparación de esteatosis microvesicular encontrada en biopsias de EHGNA.

La esteatosis microvesicular no se considera dentro del rubro de esteatosis en la descripción original de Kleiner en 2005, por lo que en este estudio se menciona como variable independiente al puntaje NAS. Se encuentra presente en el 76% de las biopsias con HGNA y 81% con EHNA, demostrando no ser una variable de utilidad para distinguir entre ambas enfermedades.

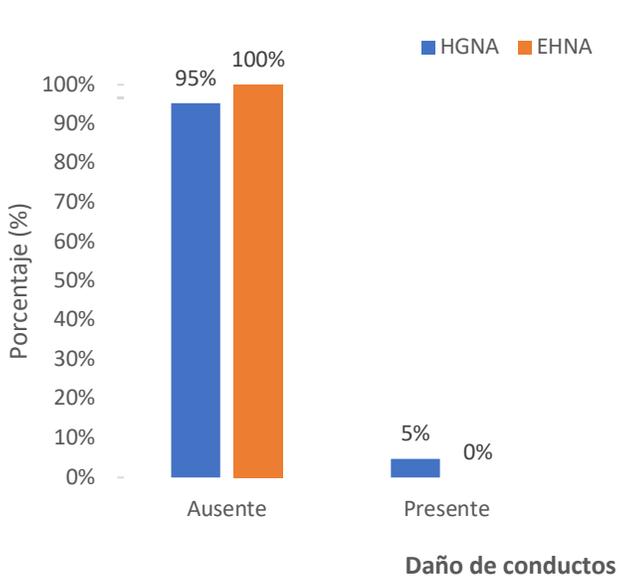


Gráfico 18. Comparación de daño de conductos encontrada en biopsias de EHGNA.

Más del 95% de las biopsias con EHGNA no presentan daño de conductos, por lo que no es una variable que distinga entre HGNA y EHNA.

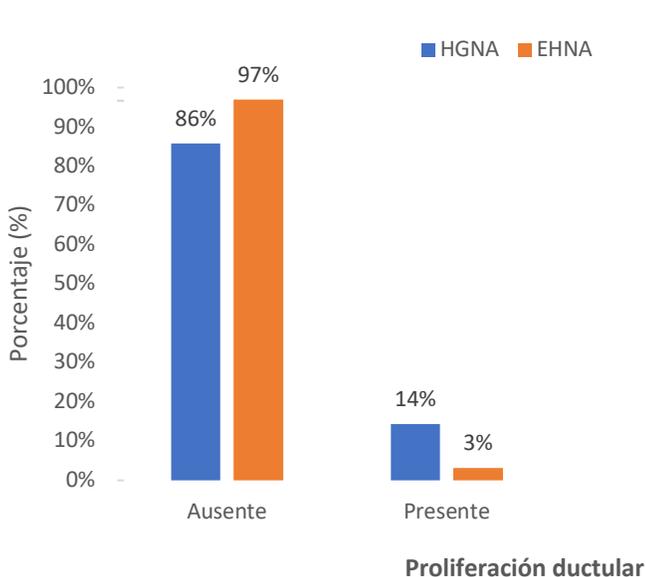


Gráfico 19. Comparación de proliferación ductular encontrada en biopsias de EHGNA.

Más del 85% de las biopsias con EHGNA no presentan proliferación ductular, por lo que no es una variable que distinga entre HGNA y EHNA.

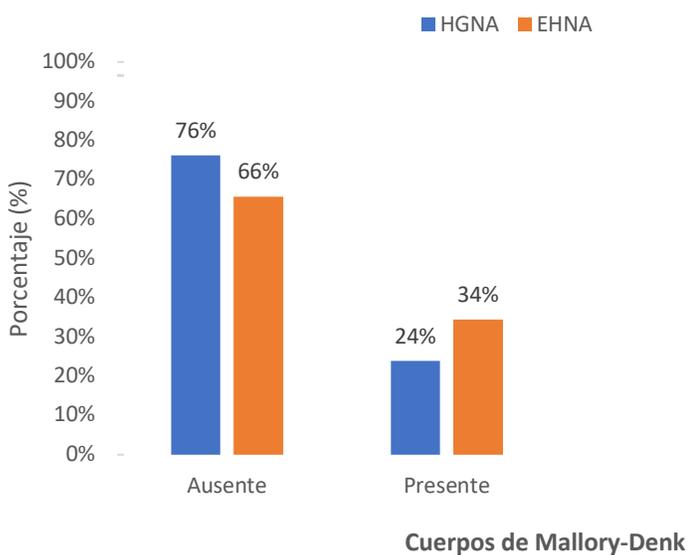


Gráfico 20. Comparación de cuerpos de Mallory-Denk encontrados en biopsias de EHGNA.

Los CMD se encuentran en hasta el 24% de las biopsias con HGNA y 34% de las biopsias con EHNA. Sin embargo, la mayoría de las biopsias por EHGNA no presentan cuerpos de Mallory-Denk en nuestro estudio, por lo que no es una variable que distinga entre HGNA y EHNA, siendo que ha sido principalmente descrita en las biopsias por EHNA.

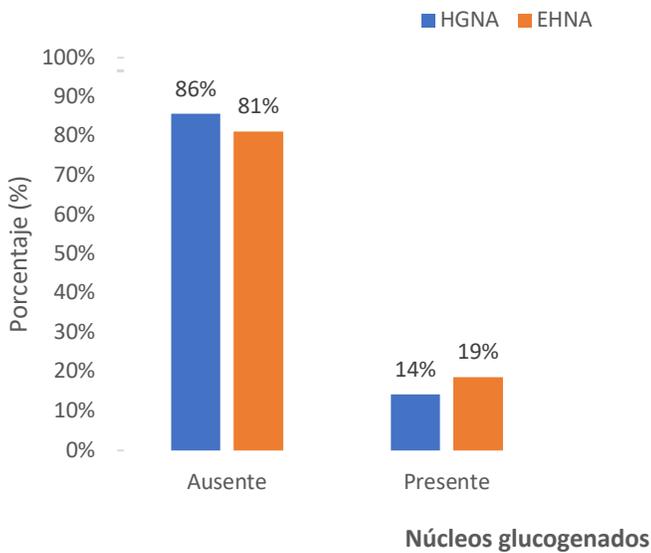


Gráfico 21. Comparación de núcleos glucogenados encontrados en biopsias de EHGNA.

Más del 80% de las biopsias con EHGNA no presentan núcleos glucogenados, por lo que no es una variable que distinga entre HGNA y EHNA.

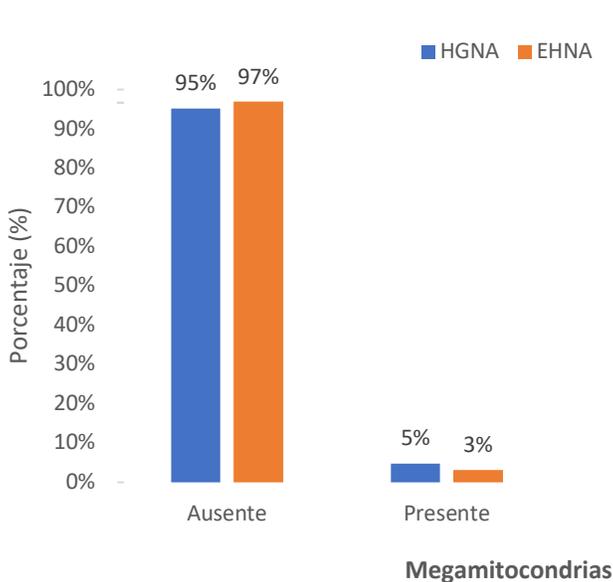


Gráfico 22. Comparación de megamitocondrias encontradas en biopsias de EHGNA.

Más del 95% de las biopsias con EHGNA no presentan megamitocondrias, por lo que no es una variable que distinga entre HGNA y EHNA.

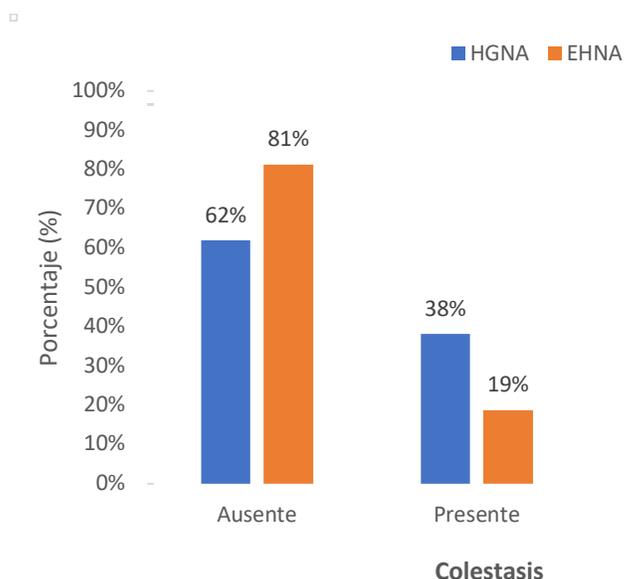


Gráfico 23. Comparación de la colestasis en biopsias de HGNA y EHNA.

Más de la mitad de las biopsias con EHGNA no presenta colestasis; el 38% de las biopsias con HGNA y el 19% con EHNA presentan colestasis, por lo que no es una variable con distinga entre HGNA y EHNA.

Se encontró un (1) microgranuloma en una sola biopsia correspondiente a EHNA. Por el resto de las variables presentes en la lista de verificación, no se encontraron macrófagos pigmentados, lipogranulomas, cuerpos acidófilos ni hepatocitos en vidrio esmerilado en las biopsias examinadas.

Adicionalmente, se realizó inmunohistoquímica a cuatro casos que representaran el espectro de EHGNA con el fin de estudiar la expresión de CK8/18. Este anticuerpo es positivo de forma membranal en hepatocitos normales y negativo en

hepatocitos balonizados. Asimismo, es positivo en los cuerpos de Mallory Denk intracitoplasmáticos.

En el primer caso (Q15-5103) había un ligero abombamiento de los citoplasmas de los hepatocitos sin rarefacción del éste, y contaba con inflamación lobulillar grado 2, el cual suele ser indicativo de EHNA. Sin embargo, el diagnóstico original y del estudio presente fue de HGNA. La CK8/18 fue positiva por lo que el diagnóstico permaneció igual. (Figura 22-A) En el segundo caso (Q18-5539), se observaron focos de hepatocitos con citoplasma rarefacto y abombamiento sutil del borde citoplasmático acompañado de grado 2 de inflamación lobulillar. Este caso fue diagnosticado en ambas instancias como HGNA. La IHQ demostró pérdida de la expresión de CK8/18, lo cual modificaría el diagnóstico original hacia EHNA. (Figura 22-B) El tercer caso (Q18-8023) igualmente que en los casos previos, fue diagnosticado como HGNA (en ambas instancias) con un grado 0 de balonización y grado 2 de inflamación lobulillar. Este caso es interesante porque aunque en la tinción de HE no se observa degeneración balonoide ni CMD, se observaron zonas con pérdida membranar de CK8/18 y positividad intracitoplasmática correspondiente a CMD. Por lo que en este caso el diagnóstico sí cambió al realizar tinciones de IHQ. (Figura 22-C) Finalmente, en el último caso (Q21-1290), también se encontró pérdida de CK8/18 en un caso diagnosticado como HGNA en ambas instancias (Figura 22-D).

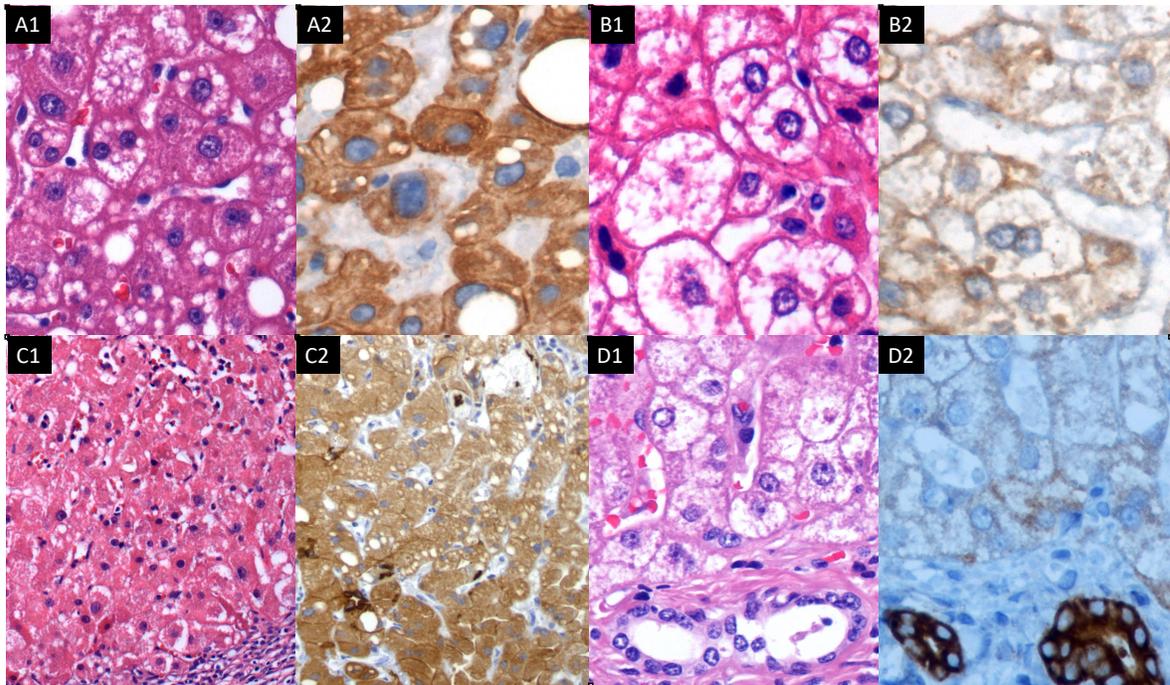


Figura 22. Hepatocitos prácticamente normales con positividad membranal para CK8/18. (A1, HE, 40X)(A2, CK8/18, 40X) Degeneración balonoide y pérdida de la expresión de CK8/18. (B1, HE, 40X)(B2, CK8/18, 40X) Lobulillo hepático con infiltrado linfocitario, sin aparente balonización pero con pérdida de CK8/18 y expresión en los CMD. (C1, HE, 10X)(C2, CK8/18, 10X) Degeneración balonoide con pérdida de expresión de CK8/18 y control interno positivo (conductillos biliares). (D1, HE, 40X)(D2, CK8/18, 40X).

En este breve estudio de cuatro casos, se ejemplifica el potencial que hay en el empleo de inmunohistoquímica para el entendimiento y correcto diagnóstico de las biopsias por EHGNA. Se debe realizar más investigación sobre la expresión de CK8/18 en estas biopsias para recomendar o no el uso rutinario de estas tinciones.

DISCUSIÓN

Actualmente, la mayoría de los reportes que existen en la patología quirúrgica corresponden al reporte de neoplasias. No se utilizan rutinariamente reportes para lesiones no neoplásicas. Quienes más realizan informes reproducibles en este campo, son los patólogos expertos en hígado. Es importante el uso de *checklists* pues apoyan al diagnóstico, son descriptivos al incluir diversas lesiones histológicas de interés y garantiza que no se omita información potencialmente útil o pronóstica y a no pasar por alto ninguna lesión de relevancia, funcionan como herramientas educativas para la formación de residentes, como método ahorrador de tiempo para la redacción de informes histológicos, y contienen los requerimientos mínimos y recomendaciones que reflejan la opinión de expertos.

Además, funcionan como medida de calidad que asegura la consistencia, uniformidad y completitud de un diagnóstico. Aquellos reportes que son a texto libre son propensos a omisión de información e inconsistencias en el formato.

Asimismo, debe incluirse criterios de calidad que permiten al patólogo y médico tratante tener una mejor comunicación e inclusive puede fomentar el involucramiento del papel del patólogo en equipos multidisciplinarios para el manejo de pacientes en ciertas enfermedades. En el caso específico de un paciente, el uso de listas de verificación y el empleo de un mismo sistema de evaluación de fibrosis y/o actividad y de criterios de calidad (ambos previamente establecidos por el laboratorio) permitiría observar puntualmente el avance de alguna lesión en diferentes puntos de tiempo, lo cual también facilitaría la comprensión del informe microscópico.

Es así como las listas de verificación tienen implicaciones en la selección de terapia de pacientes, en el establecimiento de pronóstico y evaluación de resultados tras un tratamiento específico. Adicionalmente, reducen la variabilidad intra e inter-observador y mejoran la comunicación entre patólogos.

En este estudio, se observaron inconsistencias en el reporte de biopsias por EHGNA, omitiendo información relevante como criterios de calidad de biopsia y la inclusión de importantes elementos histológicos como la gradificación de la balonización, la cual fue omitida en el 38% de las biopsias, inflamación lobulillar en el 23% y esteatosis en el 2%.

Finalmente, resultan ser un valor agregado que facilitaría la captación de datos, interoperabilidad e intercambio de información en el tema de academia para estudios de investigación al armonizar la información en protocolos reproducibles y equiparables a nivel global. Es necesario recordar que no debe obviarse el diagnóstico final histopatológico, el cual debe ser integral, breve y claro, ya que una de las limitantes del empleo de dichas listas es que puede nublar el juicio del patólogo al ver la lista como algo que debe llenarse y no como un apoyo diagnóstico. La lista debe manejarse como incentivo al aprendizaje, a la revisión constante de literatura, como herramienta que puede y debe modificarse y adaptarse a las necesidades específicas de cada población y que debe fungir como motivante para la mejoría activa del informe de biopsias hepáticas no neoplásicas.

Hablando específicamente de la EHGNA, actualmente existen diversos sistemas de clasificación de actividad y fibrosis, por ejemplo, el de Kleiner (utilizado en este estudio), Brunt, METAVIR, Batts-Ludwig, entre otros. Es necesario apegarse a un solo sistema de clasificación y puntuación de la fibrosis para tener un lenguaje universal en el área de trabajo y poder medir los elementos histológicos de forma más objetiva.

Además de tener diversos sistemas de reporte de elementos microscópicos, se complica aún más la estandarización de la información desde el momento en que no se tiene una definición universalmente aceptada en el tema de EHGNA; la degeneración balonoide no ha sido bien caracterizada a pesar de ser un pilar diagnóstico de la EHNA. Fukusato inclusive propuso en el 2005 que se definiera

de manera más objetiva la balonización para reducir la variabilidad en el diagnóstico de EHNA. (44) En un estudio que evaluaba la reproducibilidad entre patólogos se encontró que en general, la extensión de esteatosis y fibrosis tuvo una buena concordancia, no así en la estimación de inflamación lobulillar y degeneración balonoide (44). De hecho, la concordancia para identificación de esteatosis entre patólogos expertos fue del 79%, la balonización fue del 44% y la inflamación lobulillar, del 55%. Si se considera además el error de muestreo, se dificulta aún más la integración de información a partir de una biopsia. Una biopsia de hígado representa la cincuentamilésima parte de todo el órgano. (11) Algunas enfermedades del hígado son difusas y afectan el parénquima hepático por igual donde no hay error de muestreo, como en el caso de las hepatitis virales agudas. Sin embargo, no es el caso para la hepatopatía crónica ni para la evaluación completa de EHGNA. En un estudio de EHGNA, se describe la variabilidad propia del error del muestreo, y se concluye que tomar muestras de dos lóbulos hepáticos aumenta la identificación de la degeneración balonoide, en comparación con biopsia de un solo lado. (26) Por esto nacieron criterios de calidad de biopsia, en términos de número de espacios porta y longitud en centímetros del tamaño de la biopsia. Se recomienda que en el mismo reporte de patología se describa la calidad de la biopsia, detallando un comentario sobre la limitación de la biopsia debido al número de espacios porta, su tamaño, fragmentación o la medición de la extensión de la fibrosis limitada por la localización subcapsular de la toma de biopsia, la cual sobreestimaría la medición de la fibrosis. (26)

En el presente estudio, se encontró que entre el 15 al 34% de las biopsias, según el número de espacios porta, las haría insuficientes para su correcta interpretación. Mientras que, según la longitud en centímetros, tan solo el 4% resultó mayor a 1.6 cm. Sin embargo, debe considerarse que la longitud de la muestra es precisamente de ese largo para tratar de abarcar la mayor cantidad de espacios porta, y como vemos en nuestros casos, aunque no se haya alcanzado la medición deseada, la gran mayoría de los casos sí cumplía con el número de espacios porta óptimos. Es

por esto que incluir el número de espacios porta y medición de la biopsia (antes y después del procesamiento) precisa ser incluido en el reporte histológico como parte de la lista de verificación. Además, para que el médico tratante tenga conocimiento de que su biopsia pudiera no ser representativa de la enfermedad hepática global. Cada laboratorio debe seleccionar los criterios de calidad por los cuales se regirá para apoyar la estandarización del reporte microscópico.

CONCLUSIONES

1.- Se propone una *checklist* detallada para la estandarización del reporte histopatológico de las biopsias hepáticas no neoplásicas en el laboratorio de Anatomía Patológica de la Fundación Clínica de Médica Sur.

2.- Se encontraron áreas de oportunidad en el reporte de biopsias hepáticas por EHGNA en el laboratorio de Anatomía Patológica de la Fundación Clínica de Médica Sur, entre los años 2014 a 2021, como la inclusión de criterios de calidad de biopsia hepática y de los pilares histológicos que componen la EHGNA.

3.- Las biopsias hepáticas por EHGNA recopiladas en el laboratorio de Anatomía Patológica de la Fundación Clínica de Médica Sur, entre los años 2014 a 2021 corresponden en su mayoría (60%) a EHNA.

4.- Del 15 al 34% de las biopsias obtenidas en el laboratorio de Anatomía Patológica de la Fundación Clínica de Médica Sur, entre los años 2014 a 2021 no cumplen con los criterios de calidad por número de espacios porta, por lo que la biopsia pudiera no ser representativa de la enfermedad hepática global.

5.- No se encontraron variables histológicas diferentes a la balonización o inflamación lobulillar, que apoyen la distinción entre HGNA y EHNA, como ha sido previamente reportado en la literatura.

6.- Según el puntaje NAS en nuestro estudio, se estratifican de mejor manera los casos de EHGNA si se modifican los puntajes; el grupo “no esteatohepatitis” incluye en puntaje de NAS 0-3, el grupo “esteatohepatitis indeterminada” al puntaje de NAS 4, y el grupo “esteatohepatitis probable o definitiva” al puntaje NAS 5-8. Si bien no debe utilizarse para hacer diagnóstico, se puede utilizar para correlacionar.

Como futuras investigaciones, se destaca la importancia de continuar estudiando la expresión de CK8/18 para auxiliar en el diagnóstico de EHNA. También, sería interesante repetir este estudio utilizando biopsias de calidad del 100%, ya sea por número de espacios porta o longitud, para comparar qué tanto se ve afectada la estimación de la degeneración balonoide, esteatosis e inflamación lobulillar. Finalmente, sería interesante estudiar asimismo la correlación entre el diagnóstico original, con el diagnóstico actual con uno tercero, visto por un hepatopatólogo con el fin de estudiar los grados de variabilidad interobservador.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Amin. Utility and applications of synoptic reporting in pathology. *Open Access Bioinforma.* agosto de 2010;105.
2. Wagner LR, College of American Pathologists, editores. *In pursuit of excellence: the College of American Pathologists, 1946-1996.* Northfield, IL: College of American Pathologists; 1997. 188 p.
3. Fitzgibbons PL, Dillon DA, Alsabeh R, Berman MA, Hayes DF, Hicks DG, et al. Template for Reporting Results of Biomarker Testing of Specimens From Patients With Carcinoma of the Breast. *Arch Pathol Lab Med.* mayo de 2014;138(5):595-601.
4. Checklists, Protocols, and the “Gold Standard” Approach | *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* [Internet]. [citado 2 de octubre de 2021]. Disponible en: <https://meridian.allenpress.com/aplm/article/138/2/159/186547/Checklists-Protocols-and-the-Gold-Standard>
5. College of American Pathologists. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Hepatocellular Carcinoma. 4.2.0.0; 2021.
6. Washington MK, Berlin J, Branton PA, Burgart LJ, Carter DK, Compton CC, et al. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Carcinoma of the Intrahepatic Bile Ducts. *Arch Pathol Lab Med.* 1 de abril de 2010;134(4):e14-8.
7. Washington MK, Berlin J, Branton PA, Burgart LJ, Carter DK, Compton CC, et al. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Carcinoma of the Distal Extrahepatic Bile Ducts. *Arch Pathol Lab Med.* 1 de abril de 2010;134(4):e8-13.
8. Foschini MP, Dina RE, Eusebi V, Sarti F, Giuliani-Picari G, Dal Monte P-R. Standardized reporting of histological diagnoses for non-neoplastic liver conditions in needle biopsies. *Virchows Arch.* julio de 1995;426(6):593-6.
9. Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging the Histological Lesions. 1999;94(9):8.
10. Renshaw AA, Mena-Allauca M, Gould EW, Sirintrapun SJ. Synoptic Reporting: Evidence-Based Review and Future Directions. *JCO Clin Cancer Inform.* 7 de marzo de 2018;2:CCI.17.00088.
11. Lefkowitz JH. General Principles of Biopsy Assessment. En: *Scheuer’s Liver Biopsy Interpretation* [Internet]. Elsevier; 2021 [citado 14 de julio de 2021]. p. 1-12. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702075841000012>
12. Bedossa P. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2014;60(2):565-75.
13. Torbenson MS. *Biopsy Interpretation of the Liver.* Wolters Kluwer. 2015. (Biopsy Interpretation Series).
14. Brunt EM, Wong VW-S, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primer.* 17 de diciembre de 2015;1(1):15080.
15. Royal College of Pathology Australasia. *Colorectal Cancer Structured*

Reporting Protocol. 4th Edition; 2020.

16. Torous VF, Simpson RW, Balani JP, Baras AS, Berman MA, Birdsong GG, et al. College of American Pathologists Cancer Protocols: From Optimizing Cancer Patient Care to Facilitating Interoperable Reporting and Downstream Data Use. *JCO Clin Cancer Inform.* enero de 2021;(5):47-55.
17. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* junio de 2005;41(6):1313-21.
18. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* diciembre de 2008;40(12):1461-5.
19. Méndez-Sánchez N, Aguilar-Ramírez JR, Reyes A, Dehesa M, Juárez A, Castañeda B, et al. Etiology of liver cirrhosis in Mexico. *Ann Hepatol.* marzo de 2004;3(1):30-3.
20. Méndez-Sánchez N. Obesidad y esteatohepatitis no alcohólica. 2004;140(2):6.
21. Brunt EM. Pathology of fatty liver disease. *Mod Pathol.* febrero de 2007;20(S1):S40-8.
22. Prophet EB, Mills B. Coloración Tricrómica de Masson. En: *Métodos histotecnológicos de la AFIP.*
23. BioSb. Cytokeratin 8 / 18.
24. Lackner C. Hepatocellular ballooning in nonalcoholic steatohepatitis: the pathologist's perspective. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* abril de 2011;5(2):223-31.
25. Arab JP, Schalper KurtA. Clasificación histológica para hígado graso no alcohólico: NAFLD activity score (NAS). *Clasif En Gastroenterol.* 2014;25(3):308-13.
26. Iezzoni JC, Yerian LM. *Medical Liver Biopsy Interpretation: A practical guide for accurate diagnosis and informative reporting.* :113.
27. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathology and Pathogenesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* enero de 2010;5(1):145-71.
28. Castillo-Barradas M, Bornstein-Quevedo L. Enfermedad por hígado graso no alcohólico. En: *Primera edición. México: Corinter; 2018.*
29. del Pilar R. Pathological aspects of fatty liver disease. *Asoc Colomb Gastroenterol Endosc Dig Coloproctol Hepatol.* 21 de febrero de 2014;72-8.
30. Bedossa P. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* enero de 2017;37:85-9.
31. Lackner C, Gogg-Kamerer M, Zatloukal K, Stumptner C, Brunt EM, Denk H. Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: The value of keratin immunohistochemistry for diagnosis. *J Hepatol.* mayo de 2008;48(5):821-8.
32. Kumar, Abbas. Robbins y Cotran. *Patología Estructural y Funcional.* En: *Hígado y vesícula biliar. Décima. p. 824-47. (Elsevier).*
33. Rakha EA, Adamson L, Bell E, Neal K, Ryder SD, Kaye PV, et al. Portal inflammation is associated with advanced histological changes in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *J Clin Pathol.* 1 de septiembre de 2010;63(9):790-5.

34. Baffy G. Origins of Portal Hypertension in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci*. marzo de 2018;63(3):563-76.
35. Odze RD, Goldblum JR. Odze and Goldblum surgical pathology of the GI tract, liver, biliary tract, and pancreas [Internet]. 2015 [citado 21 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.clinicalkey.com/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-C20110697145>
36. Tandra S, Yeh MM, Brunt EM, Vuppalanchi R, Cummings OW, Ünalp-Arida A, et al. Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. septiembre de 2011;55(3):654-9.
37. García JA. El centenario de la descripción de los cuerpos de Mallory. :6.
38. Lefkowitz JH. Assessment and Differential Diagnosis of Pathological Features. En: *Scheuer's Liver Biopsy Interpretation* [Internet]. Elsevier; 2021 [citado 14 de julio de 2021]. p. 34-57. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702075841000048>
39. Pathology Outlines - Cholestasis [Internet]. [citado 21 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/livercholestasis.html>
40. Cabezas J, Mayorga M, Crespo J. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Pathological View. En: Tagaya N, editor. *Liver Biopsy - Indications, Procedures, Results* [Internet]. InTech; 2012 [citado 13 de julio de 2021]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/liver-biopsy-indications-procedures-results/nonalcoholic-fatty-liver-disease-a-pathological-view>
41. Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol WJG*. 14 de diciembre de 2006;12(46):7413-20.
42. Kupffer Cells in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Friend or Foe? [Internet]. [citado 22 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7378652/>
43. Takahashi Y, Fukusato T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol WJG*. 14 de noviembre de 2014;20(42):15539-48.
44. Fukusato T, Fukushima J, Shiga J, Takahashi Y, Nakano T, Maeyama S, et al. Interobserver variation in the histopathological assessment of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res*. octubre de 2005;33(2):122-7.

ANEXO 1

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA DE BIOPSIAS HEPÁTICAS

• Tamaño de la biopsia	
• Número de espacios porta.	
• Fibrosis: grado 1-4	Clasificación de CRN/Kleiner
• Esteatosis macrovesicular	Clasificación de CRN/ Kleiner
• Degeneración balonoide	Clasificación de CRN/ Kleiner
• Inflamación lobulillar	Clasificación de CRN/ Kleiner
• Inflamación portal	Clasificación de Brunt
• Esteatosis microvesicular:	Ausente / Presente
• Daño de conductos:	Ausente / Presente
• Proliferación ductular:	Ausente / Presente
• Cuerpos de Mallory-Denk:	Ausente / Presente
• Cuerpos acidófilos:	Ausente/ Presente
• Núcleos glucogenados:	Ausente / Presente
• Megamitocondrias:	Ausente / Presente
• Macrófagos pigmentados:	Ausente / Presente
• Lipogranulomas:	Ausente / Presente
• Microgranulomas:	Ausente / Presente
• Cuerpos acidófilos:	Ausente / Presente
• Colestasis:	Ausente / Presente
• Vénulas hepáticas terminales:	Ausente / Presente
• Hepatocitos vidrio esmerilado:	Ausente / Presente

Adaptado de Kleiner y Torbenson.

ANEXO 2

Tabla 1. Clasificación histológica de actividad de hígado graso no alcohólico (adaptado de Kleiner/CRN et al. 2005)

NAFLD Activity Score (NAS) (0-8)
Suma de los puntajes de esteatosis, inflamación lobular y balonización hepatocelular
Esteatosis (0-3)
0 = < 5% hepatocitos comprometidos 1 = 5-33% hepatocitos comprometidos 2 = 33-66% hepatocitos comprometidos 3 = > 66% hepatocitos comprometidos
Inflamación lobulillar (0-3)
0 = ninguna 1 = < 2 focos por campo óptico x200 2 = 2-4 focos por campo óptico x200 3 = > 4 focos por campo óptico x200
Balonización de hepatocitos (0-2)
0 = ninguno 1 = pocas células balonizadas 2 = muchas células/balonización prominente
Puntuación de fibrosis
1 Perisinusoidal o periportal 1A Leve fibrosis perisinusoidal en zona 3 1B Moderada fibrosis perisinusoidal en la zona 3 1C Sólo fibrosis portal/periportal
2 Fibrosis perisinusoidal en la zona 3, con fibrosis portal/periportal 3 Puentes de fibrosis 4 Cirrosis

ETAPA	GRADO DE INFLAMACIÓN PORTAL
0	Nula
1	Leve
2	Moderada
3	Grave

Sistema de puntuación de Brunt para inflamación portal. 2007