



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**DETECCIÓN DE RNA DE VIRUS DE HEPATITIS E EN BIOPSIAS CON DIAGNÓSTICO DE
ATRESIA DE VÍAS BILIARES DEL PERIODO 2011 A 2015.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
PATOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA:

ERIKA GUADALUPE CASTAÑEDA ANGELES

TUTOR DE TESIS

**DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO
DOCTOR EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

CIUDAD DE MÉXICO FEBRERO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

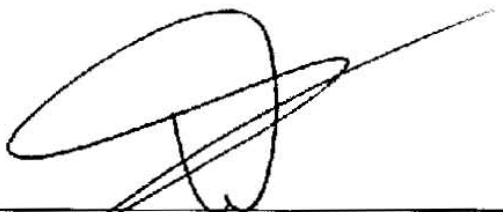
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.



Dr. Francisco Jesús Arenas Huerto
Jefe de Laboratorio de Investigación en Patología Experimental
Hospital Infantil de México Federico Gómez
Director de Tesis



Dra. María Argelia Escobar Sánchez
Jefa del Departamento de Patología Clínica y Experimental
Hospital Infantil de México Federico Gómez
Director Metodológico

DEDICATORIAS

A mi familia, especialmente a mi madre y mi hermana por su infinita paciencia y el apoyo que me han brindado en todo momento para culminar otra de mis grandes metas, por permitirme robarles mucho del tiempo en el que merecía estar con ellas.

Al personal del Laboratorio de Investigación en Patología Experimental especialmente para:

- El Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero por facilitarme el uso de las instalaciones a su cargo para llevar a cabo este trabajo en su laboratorio y por enseñarme una pequeña parte del gran mundo de la investigación.
- La QFB. Adriana Tayde López Santaella por su paciencia en este proceso.
- Al M. en C. Ulises Torres Flores por su apoyo.

A la Dra. Elsa Acosta Jiménez, por escucharme, orientarme y ayudarme a encontrar la fuerza en sus palabras y experiencia para no dejar este camino.

A la Dra. Sara Parraguirre por enseñarme a ser dedicada en mi trabajo.

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES
2. MARCO TEÓRICO
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN
5. JUSTIFICACIÓN
6. OBJETIVOS
7. METODOS
8. PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO
9. DESCRIPCION DE VARIABLES
10. RESULTADOS DEL ESTUDIO
11. DISCUSIÓN
12. CONCLUSIÓN
13. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
15. LIMITACIÓN DEL ESTUDIO
16. ANEXOS

DETECCIÓN DE RNA DE VIRUS DE HEPATITIS E EN BIOPSIAS CON DIAGNÓSTICO DE ATRESIA DE VÍAS BILIARES DEL PERIODO DE 2011 A 2105.

Erika Guadalupe Castañeda Angeles¹, Francisco Jesús Arenas Huertero², María Argelia Escobar Sánchez³.

1. Residente de Patología Pediátrica, Hospital Infantil de México Federico Gómez.
2. Jefe de Laboratorio de Investigación en Patología Experimental, Hospital Infantil de México Federico Gómez.
3. Jefa del Departamento de Patología Clínica y Experimental, Hospital Infantil de México Federico Gómez.

1. ANTECEDENTES

La atresia vías biliares (AVB) es la primer causa de ictericia obstructiva en México. Se trata de una colangiopatía obliterante inflamatoria, progresiva y destructiva del neonato que afecta los conductos intra y extrahepáticos [1]. Clínicamente se presenta con ictericia tardía que inicia durante la segunda semana de vida, con signos de obstrucción biliar como acolia y coluria, así como hepatomegalia. Si no es tratada a tiempo, puede progresar a cirrosis hepática y la muerte del paciente antes de los dos años de vida [1].

La AVB es un padecimiento de baja frecuencia, que se presenta con una incidencia de 1 en 15,000 a 20,000 nacidos vivos con discreta predominancia en el sexo femenino (1.2:1) [1,2]; la enfermedad se ha reportado en todos los grupos raciales. La importancia del diagnóstico oportuno y tratamiento temprano ha llevado al desarrollo de métodos de tamizaje que, sin embargo, no han alcanzado gran cobertura en los sistemas de salud mundial [1]. En México, a partir del año 2015 se incluyó una tabla colorimétrica en la Cartilla Nacional de Salud para comparar el color de las evacuaciones y determinar la atención especializada de estos pacientes, lo que ha reducido el tiempo de referencia para el tratamiento mediante el procedimiento de Kasai. Hasta el momento, el método más efectivo para la detección de la AVB es el ultrasonido materno prenatal.

La enfermedad se clasifica en fetal (sindromática o prenatal) y adquirida (perinatal). La primera representa el 20% de los casos y se asocia con otras malformaciones del desarrollo. Se manifiesta tempranamente y se ha relacionado con alteraciones genéticas en la vía de señalización de Notch, incluyendo las mutaciones en el gen *Jagged 1 (JAG1)* y *CFC1* [2].

La forma adquirida (80%) se subdivide de acuerdo con el nivel más proximal de obstrucción biliar: el tipo 1, cerca de 5% de los casos, presenta persistencia del espacio luminal del conducto biliar común y se asocia frecuentemente con una lesión quística proximal. El tipo 2 se caracteriza por la persistencia de conductos hasta el conducto hepático común y representa el 2% de los casos. Finalmente, el tipo 3 presenta obstrucción a nivel de la porta hepatis. El tipo 3 representa más del 90% de los casos y se caracteriza por la obliteración completa del nivel proximal del tracto biliar extrahepático [1,2].

Histológicamente, la enfermedad se caracteriza por obstrucción biliar con grados variables de fibrosis portal, edema, proliferación ductular y colestasis con presencia de tapones de bilis [1].

En ciertos casos existe evidencia de transformación de células gigantes, lo que dificulta el diagnóstico diferencial con otras entidades de hepatitis neonatal. Además, las biopsias realizadas antes de las seis semanas de edad pueden no presentar los hallazgos histológicos típicos de la enfermedad, por lo que puede ser necesario tomar biopsias seriadas al paciente [1].

Patogénesis

La etiología de la AVB se desconoce. Se considera que la AVB es una enfermedad compleja debido a las interacciones entre factores ambientales y la predisposición genética [3]. Se han propuesto diversas hipótesis para explicar la enfermedad, entre las cuales se incluyen el daño biliar mediado por inflamación crónica o autoinmunidad, las alteraciones en el desarrollo de los conductos biliares y la infección viral [4]. Siendo esta última la que ha recibido mayor atención. Se ha sugerido que la infección viral puede inducir y modular los cambios observados durante el periodo perinatal.

En algunos pacientes con AVB, al menos un tipo viral se ha aislado. La principal hipótesis para la patogénesis de la AVB establece que la lesión a los conductos biliares se inicia por una infección viral seguida de la respuesta autoinmune o inflamatoria exagerada dirigida al epitelio biliar, resultando en el daño progresivo al ducto biliar y su obliteración [4]. Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido una relación causal directa [2].

Se han desarrollado modelos animales que explican la patogenia de la AVB por causa viral. En ratones inoculados con cepas de rotavirus RRV y SA11-FM, se desarrolla ictericia con hallazgos histológicos intrahepáticos similares a los de la atresia biliar [5,6,7]. Estos hallazgos se han reproducido mediante la inoculación de reovirus y citomegalovirus (CMV) [8,9]. Mientras que los estudios que utilizan pruebas serológicas para la detección viral sugieren mayor frecuencia de reovirus en pacientes con atresia biliar [10], otros estudios con detección viral por reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*, por sus siglas en inglés), usando tejido hepático de biopsias, no han confirmado estos resultados [11].

Recientemente se ha observado que la respuesta inmune innata en la AVB es similar a la observada en infecciones virales, con regulación a la alta de las proteínas MxA y receptores tipo Toll (TLRs) 3 y 7 [12,13]. Los virus candidatos que pueden desencadenar el daño a los conductos biliares incluyen el virus del papiloma humano (VPH) [14], virus de Epstein-Barr (VEB) [15], CMV [16,17], rotavirus [18] y reovirus [19].

En un estudio de Rauschenfels y cols (2009), se investigó la presencia de DNA y RNA de distintos virus hepatotrópicos en 74 pacientes al momento del procedimiento de Kasai [13]. Adicionalmente, se buscó la presencia de la proteína Mx, la cual es un marcador de inflamación secundaria a infección viral. Uno o más virus se detectaron en un 30% de los pacientes y la tasa de detección aumentó con la edad, lo que sugiere que la infección viral es un hallazgo secundario en la patogénesis de la AVB. Por otro lado, más del 90% de los pacientes

presentaron elevación de la proteína Mx, lo que sugiere que esta proteína es un indicador confiable de la respuesta inflamatoria sostenida secundaria a una respuesta inmune [13]. De igual forma, se ha sugerido que la infección por CMV probablemente represente una lesión secundaria en el tejido hepático ya susceptible al daño por mecanismos genéticos o de alteración en la regulación inmunológica [1,20].

Virus de la hepatitis E (VHE)

El VHE forma parte de la familia Hepeviridae. Está formado por una partícula icosaédrica sin envoltura de 32 nm, resistente a la inactivación en el tracto gastrointestinal, lo que facilita su transmisión por la vía fecal-oral. El genoma viral está formado por una sola cadena de RNA de ~7.2 kb, con tres regiones codificantes de proteínas o marcos de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés). La interacción de proORF3 con los componentes celulares del huésped favorece la replicación viral, alargando la vida de las células infectadas al atenuar la vía intrínseca de muerte celular y regular a la baja la respuesta inmune innata mediante la reducción en la expresión de proteínas de fase aguda, así como por el aumento en la secreción de α 1-microglobulina [21,22].

El VHE se replica principalmente a nivel hepático. Los antígenos de VHE pueden encontrarse a los 7 días del inicio de la infección, mientras que el 70 a 90% de los hepatocitos presentan el virus durante el pico de su replicación, lo que se asocia con la aparición del VHE en bilis y heces. Los niveles de RNA del VHE son muy elevados desde el comienzo de la infección. El mecanismo patogénico de la enfermedad, de acuerdo con los hallazgos serológicos, de virología e histológicos, sugieren un fondo inmune, no relacionado con el efecto citopático viral [21,22].

La forma más común de presentación es la hepatitis aguda, la cual afecta a individuos de 15 a 40 años de forma autolimitada y sin secuelas, normalmente manifestada de tres a seis semanas posteriores a la adquisición del virus [21]. La infección aguda cursa con formas subclínicas sin ictericia, hasta la hepatitis colestásica severa con ictericia, anorexia, náusea, vómito y fiebre que pueden durar hasta seis semanas. La falla hepática fulminante puede ocurrir en el 1% de los casos, con mayor afección en pacientes con hepatopatía crónica y mujeres embarazadas [21]. Las mujeres embarazadas representan la población con mayor morbimortalidad (15-20%), las cuales desarrollan peor pronóstico obstétrico y fetal.

El VHE es una causa frecuente de hepatitis a nivel mundial [21]. Los hallazgos histológicos corresponden a hepatitis de interfase, caracterizada por inflamación lobular y portal por células plasmáticas, con proliferación ductular, esteatosis y fibrosis en grados variables. Los hepatocitos pueden desarrollar múltiples núcleos y degeneración balonoide. Además, existe daño a los conductos biliares, hiperplasia de las células de Kupffer y colestasis intracelular e intracanalicular. Finalmente, se puede observar necrosis del parénquima hepático.

El VHE es endémico y un problema creciente de salud en países en vías de desarrollo [23]. Los brotes epidémicos se asocian con alta morbimortalidad en mujeres embarazadas (19% vs

2.1% en mujeres no gestantes), así como alto riesgo obstétrico con prematuridad y mortalidad perinatal.

2. MARCO TEÓRICO

Laverdure N y cols (2015), evaluaron la prevalencia del VHE en pacientes pediátricos los cuales recibieron un trasplante hepático previamente. Se incluyeron 96 pacientes, de los cuales el motivo del trasplante fue atresia biliar en 53 (55.2%). Los autores encontraron 8 casos con serología positiva para anti-VHE IgG, de estos, cinco tenían diagnóstico previo de atresia biliar (62.5%). Sin embargo, al evaluar las muestras de suero previo al trasplante, ninguno de los pacientes presentó positividad a VHE. El periodo comprendido entre el trasplante hepático y la seroconversión fue de 10 ± 11.8 años. Se analizaron también las biopsias hepáticas en busca de rechazo al injerto, del que sólo dos pacientes presentaron datos (ninguno con diagnóstico de atresia biliar). Aunque los autores recomiendan la búsqueda dirigida de VHE en pacientes pediátricos sometidos a trasplante hepático, los datos proporcionados en el trabajo sugieren que el VHE no es prevalente en pacientes pediátricos con AVB (24).

Uno de los problemas para la interpretación de estos resultados es la falta de análisis del tejido previo al trasplante mediante una técnica sensible de detección como lo es la PCR. Recientemente se documentó que, en la población pediátrica del Hospital Infantil de México Federico Gómez, la prevalencia de biopsias hepáticas positivas para VHE es alta. Se analizaron biopsias hepáticas de pacientes con diagnóstico de hepatitis crónica de etiología indeterminada, detectando 20 casos, de los cuales el 40% resultó positivo para VHE.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El VHE es altamente prevalente en la población mexicana. La AVB es la primera causa de ictericia obstructiva en México y puede tener etiología viral. Existen pocos estudios que analicen el papel causal o asociado del VHE con el desarrollo de AVB.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la frecuencia de VHE en biopsias de hígado, porta hepatis y vía biliar de pacientes con diagnóstico de atresia de vías biliares?

5. JUSTIFICACIÓN

El uso de tejido humano es fundamental para el avance de la investigación biomédica, la cual permite el mejor entendimiento de una enfermedad y los procesos patológicos subyacentes, y esto, a su vez, facilita la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. La prevalencia del VHE en población mexicana es alta, debido a que el país es una región endémica. La etiología viral de la AVB obliga a descartar la asociación entre VHE y AVB, ya

que, al ser un virus hepatotrópico con alta prevalencia, es posible que la presencia en tejido de pacientes mexicanos con AVB sea alta.

Lo anterior puede proporcionar evidencia para el desarrollo de programas de tamizaje y vigilancia más precisos, así como planear programas de prevención para la población más afectada. Las mujeres embarazadas son la población con mayor morbimortalidad asociada a la infección por HEV, y éstas pueden transmitir el virus al producto de la gestación, lo que puede estar asociado con el desarrollo de AVB.

El mayor entendimiento de las causas que originan la colangiopatía inflamatoria esclerosante característica de la AVB puede llevar al desarrollo de terapias dirigidas para prevenir y proteger al sistema biliar intrahepático del daño mediado por la inflamación y fibrosis.

6. OBEJTIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Determinar la presencia de VHE en biopsias de hígado, porta hepatis y vía biliar de pacientes con diagnóstico de atresia de atresia de vías biliares.

OBJETIVO ESPECÍFICO:

- Determinar la presencia de VHE en biopsias de hígado, porta hepatis y vía biliar de pacientes con diagnóstico de atresia de vías biliares mediante PCR.
- Evaluar la asociación entre la presencia de VHE en biopsias de hígado, porta hepatis y vía biliar con diagnóstico de atresia de vías biliares.

7. MÉTODOS

7.1 Universo de estudio.

Pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez a quienes se les haya realizado biopsia de hígado, porta hepatis y vía biliar por diagnóstico de atresia de vías biliares.

7.2 Tamaño de la muestra.

Muestra a conveniencia, sujeto al número de casos registrados y con material completo con diagnóstico de atresia de vías biliares para estudio molecular.

7.3 Tipo de muestreo: Consecutivo y secuencial.

7.4 Criterios de selección.

7.4.1 Criterios de inclusión.

Pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez a quienes se les haya realizado biopsia de hígado, porta hepatis y vía biliar por diagnóstico de atresia de vías biliares.

7.4.2 Criterios de exclusión.

Pacientes pediátricos a quienes se les haya realizado biopsia de hígado, porta hepatis y vía biliar por otros diagnósticos.

7.4.3 Criterios de eliminación.

No contar con material suficiente y/o adecuado para estudio de biología molecular.

No contar con bloques de parafina en el Departamento de Patología Clínica y Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

7.5 Descripción de procedimientos.

7.5.1 Búsqueda de casos

Se revisaron las libretas de registro correspondientes al archivo de laminillas y bloques de parafina del Departamento de Patología Clínica y Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez, en busca de los casos con diagnóstico de atresia de vías biliares durante el periodo establecido. La búsqueda manual consistió en la selección de aquellos casos en los que los bloques de parafina contaban con material suficiente para estudio de biología molecular.

7.5.2 Extracción total de RNAm

Del material fijado en formalina y embebido en parafina seleccionado se realizaron cortes en microtomo de 10 micras de espesor, para evitar la contaminación entre muestras se limpió el microtomo y cada bloque antes de ser cortado con solución RNaseZAP, para la protección del material genético. El corte de cada bloque se colocó dentro de un tubo nuevo de polipropileno de 1.5 ml. El tejido se hidrató con dos baños de xilol, seguido de dos baños de alcohol etílico absoluto, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el botón a temperatura ambiente por 15 minutos, hasta observar el botón seco. Posteriormente, el botón se hidrató con buffer Tris-HCl más proteinasa K y se incubó toda la noche a 37°C.

Para la extracción de ácidos nucleicos se utilizó el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Se homogenizó y centrifugó a 14000 revoluciones por minuto (rpm). La fase acuosa se transfirió a un tubo que contenía cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó y centrifugó a 14000 rpm. Nuevamente, la fase acuosa se transfirió a un tubo con etanol etílico y acetato de sodio para incubarlo durante una hora a -20°C. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el botón se lavó con etanol al 70%, se vuelve a centrifugar y se elimina el sobrenadante. El botón se seca a temperatura ambiente, se resuspende en 20 µL de agua y se incuba durante una hora a 37°C. Finalmente se cuantificó el RNA presente en la muestra.

En un nanodrop se colocaron 2 µL de cada muestra, se toman las lecturas y se realizaron los siguientes cálculos:

- Concentración de RNA: $50(\text{factor universal}) \times \text{lectura de } A_{260} = \text{nanogramos}/\mu\text{l}$
- Pureza del RNA: $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$

7.5.2 Amplificación del RNA de HEV

Se realizó la amplificación de un fragmento de 250 nucleótidos de un segmento del genoma del VHE cepa México, mediante RT-PCR. La secuencia de los cebadores (primers) es la siguiente:

- HEV F: GAC AGA ATT AAT TTC GTC GGC TGG; Posición: 6265-6288.
- HEV R: CTT GTT CAT GCT GGT TGT CAT AAT; Posición: 6437-6431.

7.5.3 Evaluación del material genético de VHE

La presencia del material genético de VHE se evaluó mediante el análisis por electroforesis en gel de acrilamida al 14% con tinción de plata.

8. PLAN DE ANALISIS ESTADÍSTICO.

Estadística descriptiva: Frecuencia y/o porcentaje según la escala de la variable.

VARIABLES PRINCIPALES.		VARIABLES GENERALES.	
Lugar de procedencia	Nominal (si / no).	Edad (continua).	Continua (en meses).
Paciente trasplantado	Nominal (si / no).	Talla	Continua (en centímetros).
Serología para otros virus (CMV, VEB, VHA, VHB, VHC).	Nominal (si / no).	Peso	Continua (en kilogramos).

9. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

VARIABLES PRINCIPALES.		VARIABLES GENERALES.	
Variable.	Escala (intervalo, ordinal, nominal).	Variable.	Escala (intervalo, ordinal, nominal).
Virus de Hepatitis E.	Nominal (si / no).	Sexo (cualitativa).	Dicotómica (femenino / masculino).

9.1 Descripción de cada variable.

Sexo: El término sexo se deriva de las características biológicamente determinadas, relativamente invariables del hombre y la mujer.

Edad: Periodo de tiempo que ha vivido un individuo desde su nacimiento y se divide en cuatro periodos: infancia, adolescencia, juventud, madurez o senectud.

Talla: Estatura de una persona, medida desde la planta del pie hasta el vértice de la cabeza.

Peso: Designa la medida resultante de la acción que ejerce la gravedad terrestre sobre un cuerpo.

Virus de Hepatitis E: Virus de la familia Hepeviridae, formado por una partícula icosaédrica sin envoltura de 32 nm, resistente a la inactivación en el tracto gastrointestinal, lo que facilita su transmisión por la vía fecal-oral. El genoma viral está formado por una sola cadena de RNA de ~7.2 kb, con tres regiones codificantes de proteínas o marcos de lectura abierta. Se replica principalmente a nivel hepático. Los antígenos del virus pueden encontrarse a los 7 días del inicio de la infección, mientras que el 70 a 90% de los hepatocitos presentan el virus durante el pico de su replicación, lo que se asocia con la aparición del HEV en bilis y heces. Los niveles de RNA del HEV son muy elevados desde el comienzo de la infección. La forma más común de presentación es la hepatitis aguda.

Lugar de procedencia: Es el origen de algo o el principio de donde nace o deriva, en este caso una persona.

Paciente trasplantado: individuo al que se le ha sustituido un órgano enfermo por otro que funcione adecuadamente proveniente de un donante cadavérico. El órgano trasplantado reemplaza y asume la función del órgano dañado del receptor, salvándole la vida o mejorando la calidad de ella.

Serología para virus: La serología es el estudio que permite comprobar la presencia de anticuerpos en la sangre. Este se basa en un examen serológico que tiene como fin el conocer la exposición o presencia previa de un microorganismo patógeno en particular y a partir de ella la capacidad de respuesta del individuo a tal infección. para realizar esta prueba se toma una muestra de sangre en volumen apropiado y según la técnica que se emplee se puede usar la sangre total o tomar solo el suero, el cual se obtiene después de centrifugar la sangre previamente coagulada.

10. RESULTADOS

Se revisaron las libretas de registros de piezas quirúrgicas del Departamento de Patología Clínica y Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez, y se seleccionaron los casos que contaban con diagnóstico de atresia de vías biliares del periodo comprendido entre enero de 2011 a diciembre de 2015.

Se seleccionaron 56 casos, los cuales cumplieron con los criterios de inclusión, de estos, 37 casos (66.07%) corresponden al sexo femenino y 19 (33.92%) al sexo masculino **[Gráfico 1]**,

además de abarcar grupos de edad que van desde el mes 1 de vida hasta los 75 meses de vida, encontrándose una frecuencia de 60.71% (34 casos) en los primeros cinco meses de vida **[Tabla 1]**. De dichos casos se obtuvieron 78 muestras, entre ellas 48 biopsias hígado (61.54%), 17 biopsias de porta hepatitis (21.79%) y 11 biopsias de vía biliar (14.10%), se excluyeron 2 casos (2.56%) del análisis por no contar con tejido suficiente para la prueba de biología molecular **[Gráfico 2 y Tabla 2]**.

En cuanto a los datos clínicos que se pudieron recopilar, se obtuvieron 24 (42.8%) expedientes del archivo clínico, encontrando que la mayoría de los pacientes provienen del Estado de México (33.33%), seguido de Querétaro (12.5 %) **[Gráfico 3 y Tabla 3]**. Además de que 10 pacientes (41.66%) contaban con bajo peso, 1 (4.167%) con talla baja, 4 pacientes (16.66%) con talla y peso bajo y 9 pacientes (37.5 %) con adecuado peso y talla **[Gráfico 4]**. Se identificó que solo 3 pacientes contaban con trasplante hepático, de los cuales 1 de estos resultó positivo para infección de HEV en tejido hepático y de porta hepatitis analizado.

Con el estudio de biología molecular realizado (PCR), se detectaron 27 casos positivos para HEV y 51 casos negativos para HEV **[Gráfico 5 y Figura 1]**. D e los 27 casos positivos, 17 (62.96%) corresponden a biopsias de hígado, 7 (25.92%) biopsias de porta hepatitis y 3 (11.11%) a biopsias de vía biliar **[Tabla 4]** con una $p > 0.05$. Con estos casos positivos se identificó que solo dos casos contaban con serología positiva para otros virus los cuales son CMV y virus herpes coste tipo 1 y 2 (VHZ 1 y 2), el resto no contaba con serología y en otros casos el expediente no se encontró en archivo clínico **[Gráfico 6]**.

11. DISCUSIÓN

La atresia vías biliares es la primera causa de ictericia obstructiva en México; es una enfermedad congénita que se caracteriza por un grado variable de obliteración de los conductos biliares intrahepáticos y extrahepáticos. Como bien se reporta en la literatura, este padecimiento es más frecuente en el sexo femenino [1,2], al igual que lo encontrado en nuestra investigación, además de que los grupos de edad en los que se atendió por primera vez en esta Instituto dicho padecimiento comprendió entre el primer mes de vida y el quinto de vida, con una frecuencia de 60.71%.

Si esta enfermedad no es tratada a tiempo, puede progresar a cirrosis hepática y la muerte del paciente, antes de los dos años de vida en caso de no realizarse un trasplante hepático [1]. Utterson y colegas encontraron que un 40% de los casos con atresia de vías biliares enlistados para trasplante murieron dentro de los 3 meses posteriores de estar en lista de espera [2]. Se debe de tener en cuenta que la escasez de donantes es una preocupación importante para estos pacientes como es el caso de nuestra sociedad, ya que aún falta mucho para que la cultura de donación de órganos sea más aceptada. El tratamiento de esta entidad es la cirugía (procedimiento de Kasai), la cual se debe realizar antes de los 90 días de vida. La importancia del diagnóstico oportuno y tratamiento temprano ha llevado al desarrollo de métodos de tamizaje que, sin embargo, no han alcanzado gran cobertura en los sistemas de salud mundial [1].

Clínicamente se presenta con ictericia tardía que inicia durante la segunda semana de vida, con signos de obstrucción biliar como acolia y coluria, así como hepatomegalia. Histológicamente, la enfermedad se caracteriza por obstrucción biliar con grados variables de fibrosis portal, edema, proliferación ductular y colestasis con presencia de tapones de bilis [1]. Además, las biopsias realizadas antes de las seis semanas de edad puede que no presenten los hallazgos histológicos típicos de la enfermedad, por lo que puede ser necesario tomar biopsias seriadas al paciente [1].

La etiología de la atresia de vías biliares es multifactorial, va desde causas genéticas, hasta las asociadas a virus. En el caso de las asociadas a virus, se han explicado que los mecanismos patológicos son ocasionados por la destrucción de conductos biliares ya formados debido a los efectos destructivos de un virus hepatotrópico o secundarios a una reacción inmune desencadenada por la exposición viral [4].

En nuestro caso, los resultados positivos con la asociación entre VHE y atresia de vías biliares, nos abre un panorama hacia esta posible etiología. Se debe tener en cuenta que el VHE es altamente prevalente en la población mexicana, por ser un país en vías de desarrollo [23]. Las mujeres embarazadas son la población con mayor morbimortalidad asociada a la infección de VHE y estas pueden transmitir el virus al producto de la gestación, lo que puede estar asociado con el desarrollo de la enfermedad [21].

Hay pocos artículos que mencionan un posible enlace viral para las atresias de vías biliares. Los estudios de biología molecular (PCR) como el realizado en este estudio con muestras de tejidos seleccionadas y calificadas confirman su presencia. Existen otras técnicas de biología molecular como lo son la secuenciación, la cual nos ayudaría a ampliar el diagnóstico sobre dichas muestras. Así como la recomendación de recolectar tejido en fresco al momento de realizar la cirugía, recolectando tejido de hígado, porta hepatis y vía biliar, ya que en nuestro estudio se ocupó material previamente fijado con formaldehído al 10% y embebido en parafina.

El uso de tejido humano es fundamental para el avance de la investigación biomédica, la cual permite el mejor entendimiento de una enfermedad y los procesos patológicos subyacentes, y esto, a su vez, facilita la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. La prevalencia del VHE en población mexicana es alta, debido a que el país es una región endémica. La etiología viral de la atresia de vías biliares obliga a descartar la asociación con VHE, ya que, al ser un virus hepatotrópico con alta prevalencia, es posible que la presencia en tejido de pacientes mexicanos sea alta.

Lo anterior puede proporcionar evidencia para el desarrollo de programas de tamizaje y vigilancia más precisos, así como planear programas de prevención para la población más afectada como lo son las mujeres embarazadas y el desarrollo de terapias dirigidas a prevenir y proteger al sistema biliar intrahepático del daño mediado por la inflamación y fibrosis.

12. CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos del presente estudio, se puede evidenciar que existe la presencia del HEV en casi el 50% de los casos.

El sitio más prevalente de HEV fue el hígado, seguido de porta hepatis.

13. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

- 1) Revisión bibliográfica: Cuatro meses.
- 2) Elaboración del protocolo: Tres meses.
- 3) Obtención de la información: Dos meses.
- 4) Procesamiento y análisis de datos: Dos meses.
- 5) Elaboración del informe técnico final: Un mes.
- 6) Divulgación de los resultados: Mínimo 3 meses.

Fecha de inicio del protocolo: agosto de 2018.

Fecha de terminación: mayo de 2019.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hartley JL, Davenport M, Kelly DA. Biliary atresia. *Lancet* (London, England). 2009 Nov 14;374(9702):1704-13. PubMed PMID: 19914515. Epub 2009/11/17. eng.
2. Sanchez-Valle A, Kassira N, Varela VC, Radu SC, Paidas C, Kirby RS. Biliary Atresia: Epidemiology, Genetics, Clinical Update, and Public Health Perspective. *Advances in pediatrics*. 2017 Aug;64(1):285-305. PubMed PMID: 28688594. Epub 2017/07/10. eng.
3. Ningappa M, Min J, Higgs BW, Ashokkumar C, Ranganathan S, Sindhi R. Genome-wide association studies in biliary atresia. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine*. 2015 Sep-Oct;7(5):267-73. PubMed PMID: 25963027. Epub 2015/05/13. eng.
4. Feldman AG, Mack CL. Biliary atresia: cellular dynamics and immune dysregulation. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2012 2012/08/01;21(3):192-200.
5. Riepenhoff-Talty M, Schaekel K, Clark HF, Mueller W, Uhnoo I, Rossi T, et al. Group A rotaviruses produce extrahepatic biliary obstruction in orally inoculated newborn mice. *Pediatric research*. 1993 Apr;33(4 Pt 1):394-9. PubMed PMID: 8386833. Epub 1993/04/01. eng.
6. Allen SR, Jafri M, Donnelly B, McNeal M, Witte D, Bezerra J, et al. Effect of rotavirus strain on the murine model of biliary atresia. *Journal of virology*. 2007 Feb;81(4):1671-9. PubMed PMID: 17121809. Pubmed Central PMCID: PMC1797562. Epub 2006/11/24. eng.
7. Oetzmann von Sochaczewski C, Pintelon I, Brouns I, Dreier A, Klemann C, Timmermans JP, et al. Rotavirus particles in the extrahepatic bile duct in experimental biliary atresia. *Journal of pediatric surgery*. 2014 Apr;49(4):520-4. PubMed PMID: 24726104. Epub 2014/04/15. eng.
8. Szavay PO, Leonhardt J, Czech-Schmidt G, Petersen C. The role of reovirus type 3 infection in an established murine model for biliary atresia. *European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery [et al]* =

Zeitschrift fur Kinderchirurgie. 2002 Aug;12(4):248-50. PubMed PMID: 12369002. Epub 2002/10/09. eng.

9. Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Huang SF. Cytomegalovirus infection and proinflammatory cytokine activation modulate the surface immune determinant expression and immunogenicity of cultured murine extrahepatic bile duct epithelial cells. *Clinical and experimental immunology*. 2001 Oct;126(1):84-91. PubMed PMID: 11678903. Pubmed Central PMCID: PMC1906176. Epub 2001/10/27. eng.

10. Morecki R, Glaser JH, Cho S, Balistreri WF, Horwitz MS. Biliary atresia and reovirus type 3 infection. *The New England journal of medicine*. 1982 Aug 19;307(8):481-4. PubMed PMID: 6285193. Epub 1982/08/19. eng.

11. Saito T, Shinozaki K, Matsunaga T, Ogawa T, Etoh T, Muramatsu T, et al. Lack of evidence for reovirus infection in tissues from patients with biliary atresia and congenital dilatation of the bile duct. *Journal of hepatology*. 2004 Feb;40(2):203-11. PubMed PMID: 14739089. Epub 2004/01/24. eng.

12. Huang YH, Chou MH, Du YY, Huang CC, Wu CL, Chen CL, et al. Expression of toll-like receptors and type 1 interferon specific protein MxA in biliary atresia. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2007 Jan;87(1):66-74. PubMed PMID: 17075576. Epub 2006/11/01. eng.

13. Rauschenfels S, Krassmann M, Al-Masri AN, Verhagen W, Leonhardt J, Kuebler JF, et al. Incidence of hepatotropic viruses in biliary atresia. *European Journal of Pediatrics*. 2009 2009/04/01;168(4):469-76.

14. Drut R, Drut RM, Gomez MA, Cueto Rua E, Lojo MM. Presence of human papillomavirus in extrahepatic biliary atresia. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1998 Nov;27(5):530-5. PubMed PMID: 9822318. Epub 1998/11/20. eng.

15. Mahjoub F, Shahsiah R, Ardalan FA, Iravanloo G, Sani MN, Zarei A, et al. Detection of Epstein Barr virus by chromogenic in situ hybridization in cases of extra-hepatic biliary atresia. *Diagnostic pathology*. 2008 Apr 28;3:19. PubMed PMID: 18442403. Pubmed Central PMCID: PMC2424033. Epub 2008/04/30. eng.

16. Domiati-Saad R, Dawson DB, Margraf LR, Finegold MJ, Weinberg AG, Rogers BB. Cytomegalovirus and human herpesvirus 6, but not human papillomavirus, are present in neonatal giant cell hepatitis and extrahepatic biliary atresia. *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*. 2000 Jul-Aug;3(4):367-73. PubMed PMID: 10890252. Epub 2000/07/13. eng.

17. Fischler B, Ehrnst A, Forsgren M, Orvell C, Nemeth A. The viral association of neonatal cholestasis in Sweden: a possible link between cytomegalovirus infection and extrahepatic biliary atresia. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1998 Jul;27(1):57-64. PubMed PMID: 9669727. Epub 1998/07/21. eng.

18. Riepenhoff-Talty M, Gouvea V, Evans MJ, Svensson L, Hoffenberg E, Sokol RJ, et al. Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. *The Journal of infectious diseases*. 1996 Jul;174(1):8-15. PubMed PMID: 8656017. Epub 1996/07/01. eng.

19. Tyler KL, Sokol RJ, Oberhaus SM, Le M, Karrer FM, Narkewicz MR, et al. Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1998 Jun;27(6):1475-82. PubMed PMID: 9620316. Epub 1998/06/10. eng.

20. Shen C, Zheng S, Wang W, Xiao XM. Relationship between prognosis of biliary atresia and infection of cytomegalovirus. *World journal of pediatrics : WJP*. 2008 May;4(2):123-6. PubMed PMID: 18661768. Epub 2008/07/30. eng.

21. Rodriguez-Frias F, Jardi R, Buti M. [Hepatitis E: molecular virology, epidemiology and pathogenesis]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2012 Dec;30(10):624-34. PubMed PMID: 22386306. Epub 2012/03/06. Hepatitis E: virología molecular, epidemiología y patogenesis. spa.

22. Kumar S, Subhadra S, Singh B, Panda BK. Hepatitis E virus: the current scenario. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2013 Apr;17(4):e228-33. PubMed PMID: 23313154. Epub 2013/01/15. eng.

23. Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *The Lancet Infectious diseases*. 2008 Nov;8(11):698-709. PubMed PMID: 18992406. Epub 2008/11/11. eng.

24. Laverdure N, Scholtes-Brunel C, Rivet C, Heissat S, Restier L, Bacchetta J, et al. Paediatric liver transplanted patients and prevalence of hepatitis E virus. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2015 Aug;69:22-6. PubMed PMID: 26209371. Epub 2015/07/26. eng.

15. LIMITACIÓN DEL ESTUDIO.

- No contar con los bloques de parafina de los casos seleccionados de casos con diagnóstico de atresia de vías biliares.

- No contar con suficiente tejido preservado en condiciones ideales.

- No contar con material suficiente y/o adecuado para estudios de biología molecular.

- No contar con bloques de parafina en el departamento Patología Clínica y Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

- No contar con los suficientes recursos para realizar las pruebas moleculares.

16. Anexos

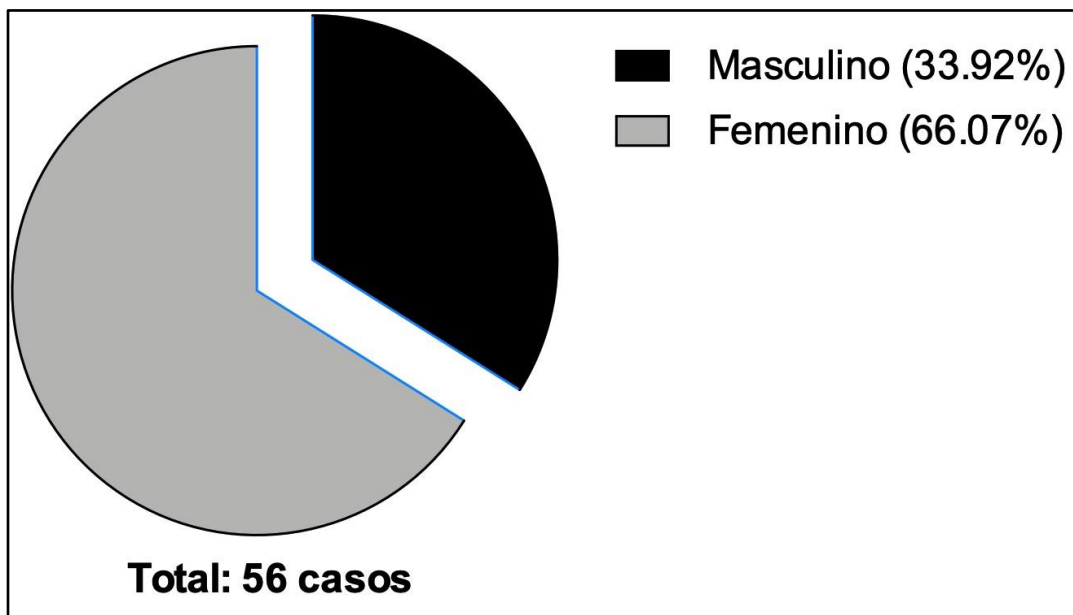


Gráfico 1. Porcentaje de casos por género.

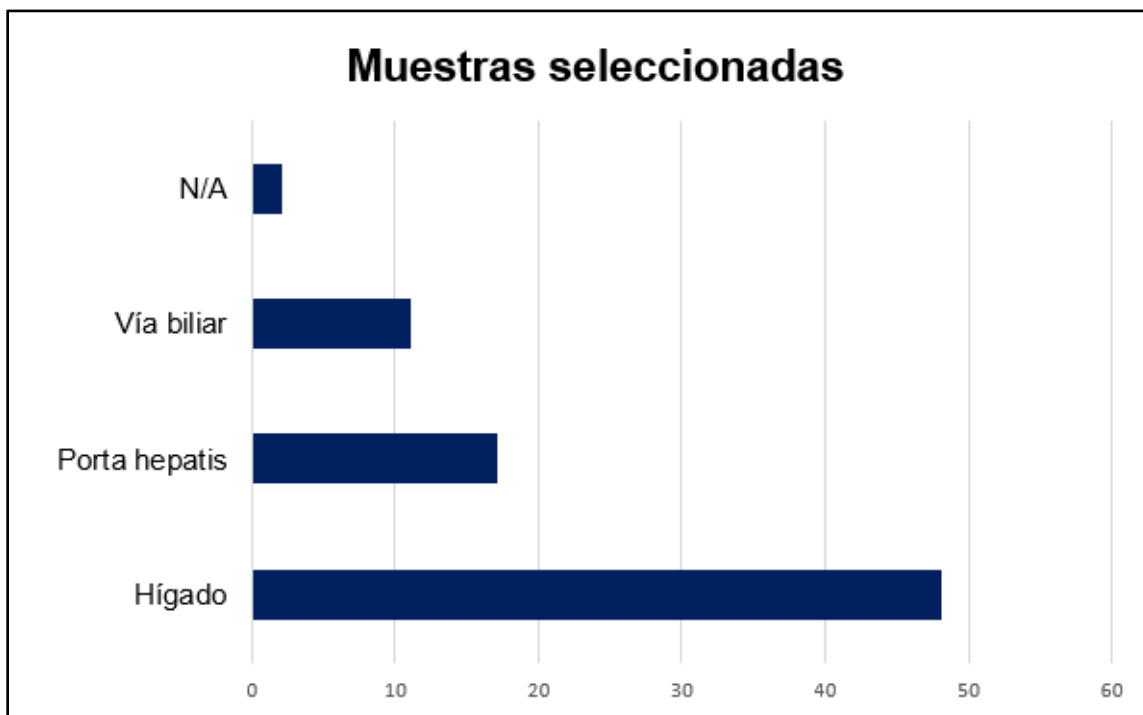


Gráfico 2. Tejido de muestras seleccionadas de los 78 casos.

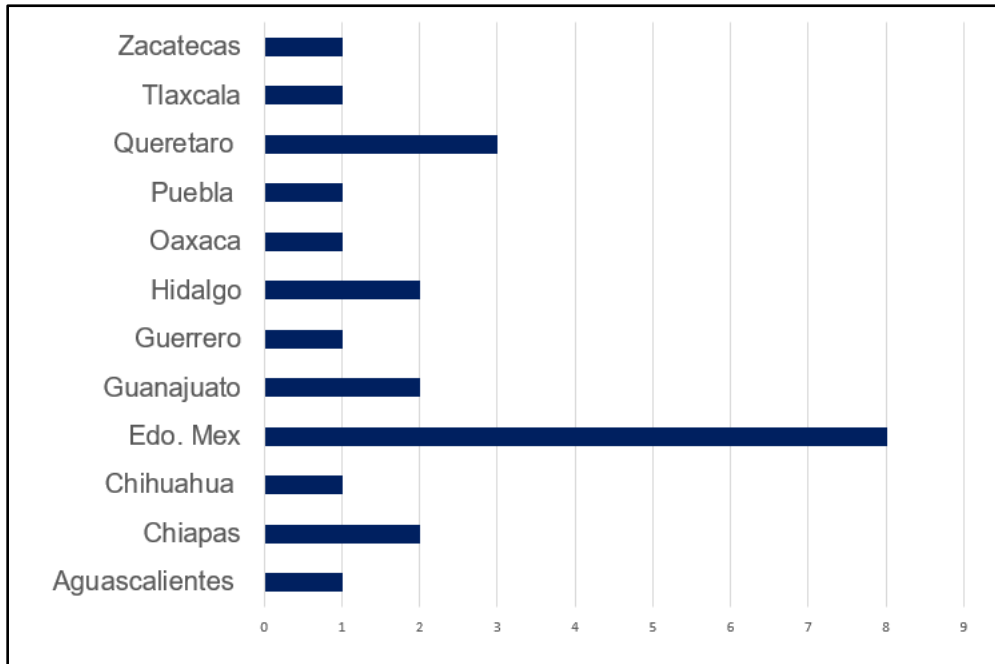


Gráfico 3. Lugar de procedencia de pacientes con atresia de vías biliares.

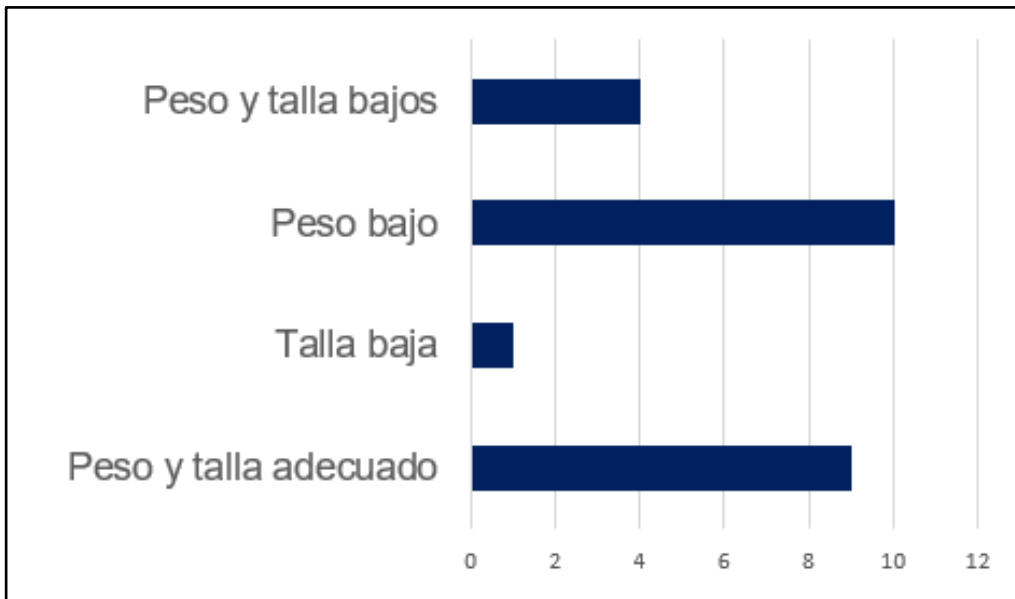


Gráfico 4. Peso y talla de pacientes con atresia de vías biliares.

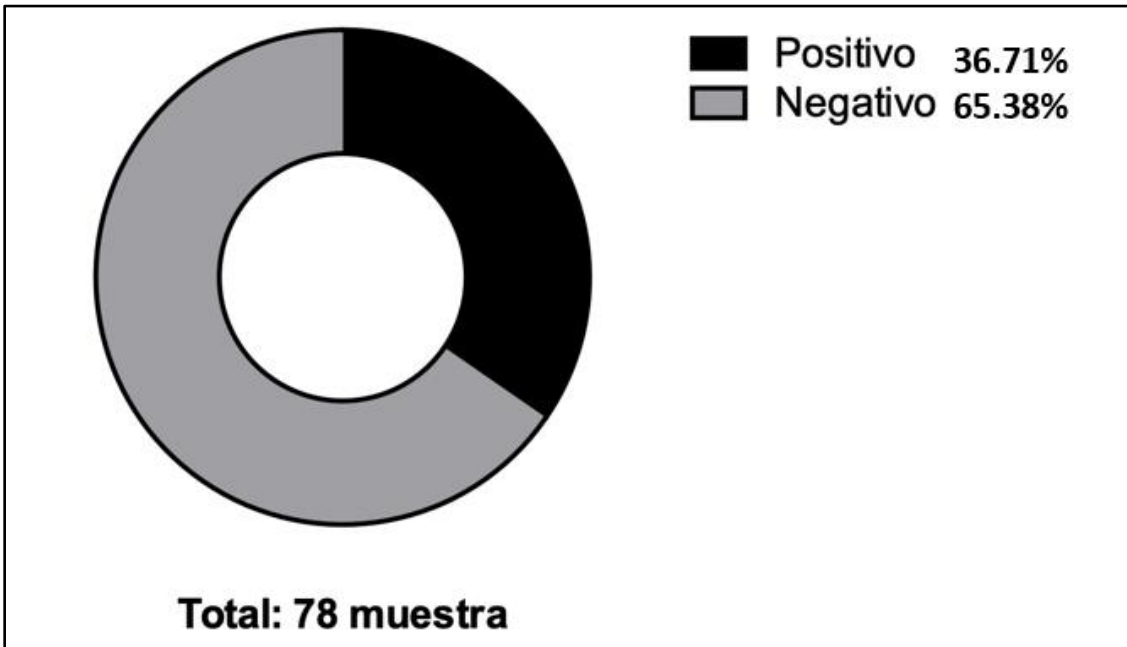


Gráfico 5. Porcentaje de casos positivos y negativos para HEV.

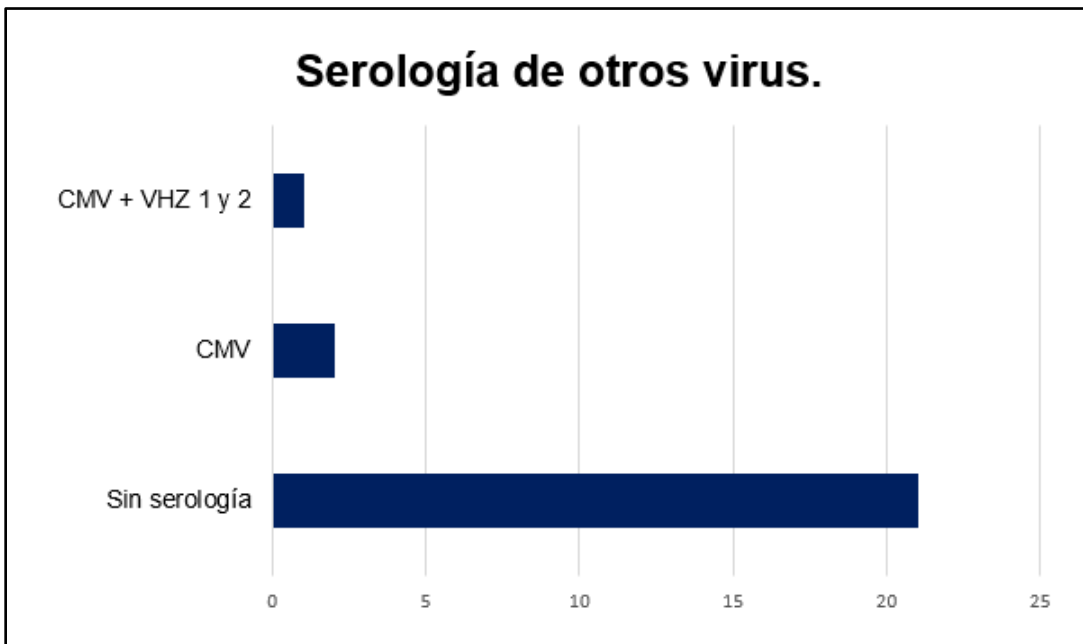


Gráfico 6. Número de casos con serología positiva para otros virus.

Tabla 1. Frecuencia de casos por grupo de edad.

Edad meses	Número de casos	Frecuencia relativa
1 a 5	34	60.71%
6 a 10	9	16.07%
11 a 15	4	7.14%
16 a 20	0	0.00%
21 a 25	5	8.93%
26 a 30	0	0.00%
31 a 35	0	0.00%
36 a 40	0	0.00%
41 a 45	2	3.57%
46 a 50	0	0.00%
51 a 55	0	0.00%
56 a 60	1	1.79%
61 a 65	0	0.00%
66 a 70	0	0.00%
71 a 75	1	1.79%
total	56	100.00%

Tabla 2. Porcentaje de muestras seleccionadas.

Hígado	48	61.54%
Porta hepatis	17	21.79%
Vía biliar	11	14.10%
N/A	2	2.56%
Total	78	100.00%

Tabla 3. Porcentaje de lugar de procedencia de los pacientes con atresia de vías biliares.

Aguascalientes	1	4.17%
Chiapas	2	8.33%
Chihuahua	1	4.17%
Edo. Mex	8	33.33%
Guanajuato	2	8.33%
Guerrero	1	4.17%
Hidalgo	2	8.33%
Oaxaca	1	4.17%
Puebla	1	4.17%
Querétaro	3	12.50%
Tlaxcala	1	4.17%
Zacatecas	1	4.17%
Total	24	1

Tabla 4. Porcentaje del lugar de procedencia de los pacientes con atresia de vías biliares.

TEJIDOS ANALIZADOS	No. DE MUESTRAS POSITIVAS PARA HEV	No. DE MUESTRAS NEGATIVAS PARA HEV
Hígado (48)	17	31
Porta hepatis (17)	7	10
Vía biliar (11)	3	8

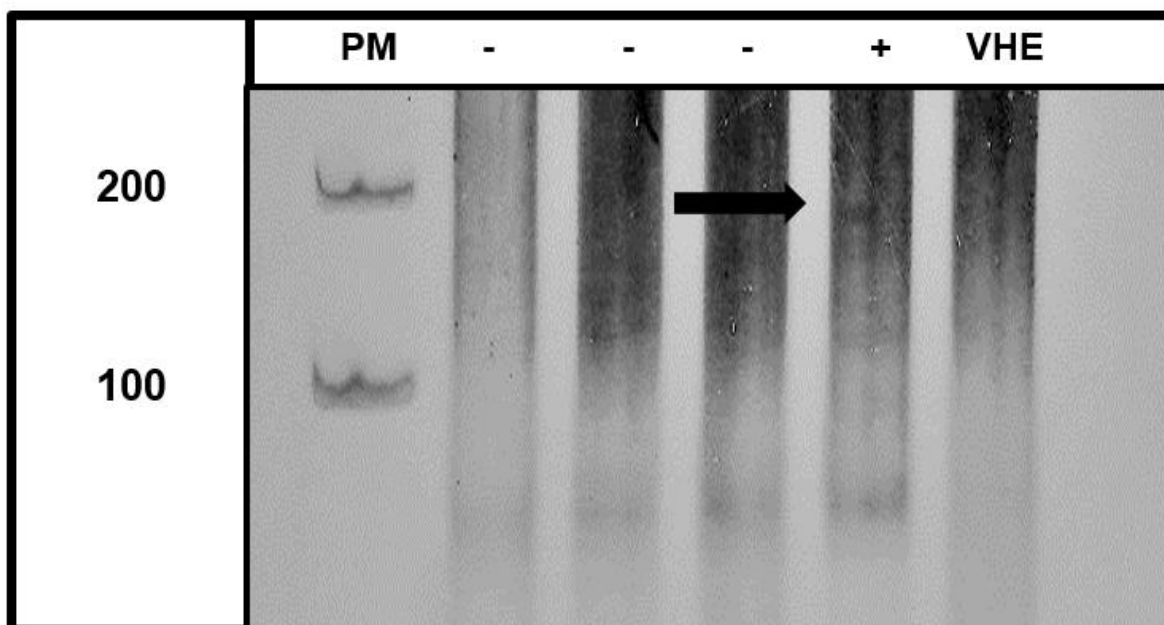


Figura 1. Productos separados de geles de acrilamida al 14%. Tinción con plata.