



162
11237

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
SECRETARÍA DE SALUD
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ

ESTADO DE QUERÉTARO
SECRETARÍA DE SALUD
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO

**DETECCION DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN LAS
VIAS BILIARES DE LOS NIÑOS CON ATRESIA DE VIAS
BILIARES Y EN EL CUELLO UTERINO DE SUS MADRES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO EN

LA ESPECIALIDAD DE PEDIATRIA MEDICA

PRESENTA

DRA. MA. DEL CARMEN MELO ZURITA

MA. DEL CARMEN MELO ZURITA

2003

ASESOR

DR. PEDRO FRANCISCO VALENCIA MAYORAL

COAUTORES

**DRA. RUTH HERNANDEZ MOTE
DR. GUSTAVO VARELA FASCINETTO**



MEXICO, D.F., A 16 DE SEPTIEMBRE DE 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

INDICE:

Marco teórico	2
Planteamiento del problema	9
Justificación	10
Objetivos	11
Hipótesis	12
Diseño del estudio	12
Material y métodos	13
Resultados	14
Discusión	16
Figuras 1 y 2	18
Figuras 3 y 4	19
Figuras 5 y 6	20
Figuras 7 y 8	21
Figuras 9 y 10	22
Figura 11	23
Anexo 1. Inclusión en parafina	24
Anexo 2. Técnica de hematoxilina-eosina	25
Anexo 3. Hibridación in situ	26
Anexo 4 Reacción en cadena de la polimerasa	27
Bibliografía	30

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DETECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN LAS VIAS BILIARES DE LOS NIÑOS CON ATRESIA DE VIAS BILIARES Y EN EL CUELLO UTERINO DE SUS MADRES

MARCO TEORICO:

La Atresia de Vías Biliares Extrahepáticas (AVBEH) es una lesión destructiva progresiva del árbol biliar que ocurre en el período perinatal y es una de las causas más comunes de colestasis neonatal (1). Se presenta en 1 de cada 10,000 recién nacidos vivos; es, además, la causa más frecuente de trasplante hepático en pediatría (2). En el Hospital Infantil de México se realizó la recopilación de todos los casos de AVBEH en el período de 1979 a 1987 obteniendo 46 casos, 30 mujeres y 16 hombres (3). Se desconoce la incidencia real de este padecimiento en nuestra población. En un estudio realizado en Suecia por Fischler (4), se analizaron los factores que causan colestasis en neonatos y se observó que de 85 pacientes con colestasis, la atresia de vías biliares representó 32% de los casos, seguida de la deficiencia de alfa-1 antitripsina y de la colestasis intrahepática progresiva, que representaron 11% de los casos cada una por separado.

Desde la descripción de éste padecimiento se, han tratado de encontrar las causas que lo expliquen. Al parecer hay varios factores implicados, de los cuales una quinta parte podría ser de origen genético y el resto multifactorial (2,5). Cuando hay implicaciones genéticas, la AVBEH puede asociarse a malformaciones a otros niveles (2).

Becerra y colaboradores (6), comprobaron que los hígados de los niños con AVBEH tienen una activación coordinada de los genes involucrados en la diferenciación leucocitaria; la sobreexpresión de osteopontina e interferon gama, así como la citoquinas Th-1, juegan algún papel en la patogénesis de la enfermedad.

TESTS CON
FALLA DE ORIGEN

Existen varios estudios que apoyan el papel importante que tiene el HLA en la patogenia de la AVBEH. Entre ellos, un estudio realizado en Egipto, en donde se investigó la presencia del HLA en biopsias hepáticas en 18 niños con diagnóstico de AVBEH, y encontraron a los subtipos B8 y DR 3 con mayor frecuencia que en los pacientes sanos (83.3% y 94% en pacientes con AVBEH, comparado con 6.5% y 14.9% en la población general) (7).

Así mismo, en Tokio se comparó la expresión del HLA-DR en los conductos biliares de 13 niños con AVBEH con testigos, y se encontró en el 68% de los casos. Los tipos más comúnmente observados fueron: HLA-A33, B44 y DR 6 (8).

Silveira (9), en Brasil, realizó otro trabajo en el que en 55 niños con AVBEH con y sin malformaciones congénitas asociadas se investigó la presencia del HLA, y se encontró una mayor frecuencia del HLA-B12 (A9-B5, A28-B35) principalmente en pacientes con malformaciones congénitas asociadas.

Sin embargo, en otro estudio se buscó la presencia de varios subtipos del HLA, así como de polimorfismos en algunas citocinas en pacientes con AVBEH, comparados con individuos sanos y no se encontró diferencia entre los dos grupos (10).

Se ha demostrado la presencia de mutaciones en el gen JAG1 (que también se había postulado para el síndrome de Alagille) en 9 pacientes con AVBEH de un grupo de 102 pacientes. Se demostró que estas mutaciones fueron esporádicas en siete (78%) casos y familiares en dos (22%) casos, y que los pacientes que tenían mutaciones requirieron trasplante en menos de cinco años (11).

También se ha descrito la presencia de esta entidad en hermanos, lo que apoya la etiología genética (12-16).

Otros factores han sido implicados en la patogenia de la AVBEH, entre ellos las infecciones virales. Se han propuesto dos vías como medio de transmisión de la infección de la madre al producto: la primera

a través de la placenta (congénita) y la segunda a través del canal de parto al momento del nacimiento (perinatal), aunado a otros factores perinatales como la edad materna avanzada, madres multigestas y productos de bajo peso al nacimiento (17).

Dentro de los virus que se han encontrado asociados se encuentran: el Citomegalovirus (CMV), Reovirus tipo 3 (Reo-3), Rotavirus tipo C y el Virus del Papiloma Humano (VPH).

Lurie (18), en 1987, informó de una serie de cuatro autopsias de pacientes con infección fatal por CMV, en las que encontró en las biopsias hepáticas diferentes grados de hepatitis y en tres de ellas datos de patrón colestásico con fibrosis portal y proliferación de colangioloos; hallazgos que no difieren de los observados en las biopsias de hígado de los pacientes con AVBEH. Así mismo, en 1995, Hart (19), reportó un caso de gemelos con AVBEH en quienes se documentó serológicamente la infección por CMV.

En el Departamento de Pediatría del Hospital Central de Washington se seleccionaron los pacientes con AVBEH de 1989 a 1993. Se obtuvieron en total 23 pacientes, de los cuales 21 se estudiaron por medio de biopsia hepática y serología para la detección de CMV. Se encontró este germen en 5 (24%) pacientes (20).

En un estudio realizado por Fischler (21) en 1998, se encontró CMV por medio de serología en 38% de los pacientes con AVBEH; por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en las biopsias de hígado y conductos biliares, se tuvieron resultados positivos en nueve pacientes, de los 18 en los que se realizó.

Jevon (22) en 1999 publicó un trabajo retrospectivo de 5 años, en el que en 12 niños con AVBEH buscó la presencia del CMV, sin embargo no encontró hallazgos histopatológicos (inclusiones virales) y no pudo demostrar su presencia por medio de hibridación *in situ* ni PCR.

También se han visto implicados otros virus como el Reovirus tipo 3 (Reo-3). En 1980, Bangaru (23) realizó un estudio en el que se inoculó

TESTES CON
FALLA DE ORIGEN

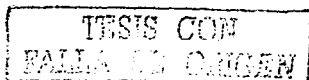
el Reo-3 a ratones transgénicos y con ello se produjeron lesiones obstructivas de las vías biliares similares a las lesiones histológicas encontradas en los hígados de los niños con AVBEH. Además 2 de 12 pacientes tenían anticuerpos antireovirus demostrados, con 7 testigos serológicamente negativos. Se observó que en los ratones la obstrucción no es definitiva; es decir, revirtió cuando se resolvió la infección.

En el 2002, Szaway realizó un estudio (24) en donde se inoculó el Reo-3 tipo Dearing y tipo Abney en ratones, los cuales fueron observados durante 10 días sin encontrar cambios obstructivos o atresias en sus conductos biliares; sin embargo 60% desarrolló colestasis y solo el 15% de ellos se recuperó de la enfermedad. Aunque no se observó atresia como tal, se encontró inflamación y destrucción parcial de los conductos biliares en los ratones inoculados con el Reo-3 tipo Abney únicamente, mientras que los inoculados con el otro tipo no.

Estudios por medio de determinaciones serológicas también demostraron la presencia del Reo-3. Morecki y Glaser en 1982 (25), demostraron por inmunofluorescencia que 17 de 25 pacientes (68%) con AVBEH tenían anticuerpos contra Reo-3, y en 7 pacientes esos títulos fueron 4 veces mayores que en sus madres. Solo 8% de los testigos sanos tuvo anticuerpos contra Reo-3 positivos.

En 1983, en la revista Hepatology (26), se reportó la aparición espontánea de AVBEH en un mono Rhesus en el que se hicieron determinaciones serológicas seriadas del Reo-3 y se encontraron positivas.

En 1984, Glaser y Balistieri (27) se cuestionaron si el Reovirus también estaba presente en los niños con colestasis de otra etiología (p. ej. hepatitis neonatal (HN)); por lo que realizaron una investigación serológica en 167 pacientes con colestasis que incluía 77 testigos, e incluso se tomó una muestra de suero en 40 de las madres de estos pacientes. Se encontró que 21 de 34 (62%) pacientes con AVBEH y 12 de 23 (52%) con hepatitis neonatal fueron positivos para la determinación



de anticuerpos contra reovirus en suero. En las madres de los pacientes con AVBEH se encontró en 16 de 21(76%), en las madres de los niños con HN en 6 de 11(54%). Se propuso que hay una proporción importante de los niños con AVBEH y HN con positividad para reovirus, sin embargo no se puede establecer una relación de causalidad ya que no se sabe si la colestasis por si misma incrementa en estos niños la susceptibilidad para la infección por este virus, o si la colestasis se produce en respuesta a la infección. Se observó que hay una baja incidencia de la infección por reovirus tipo 3 en niños con otro tipo de colestasis.

En 1988, en Colorado, se hicieron determinaciones séricas de anticuerpos por medio de ELISA contra Reo-3 en 23 pacientes con AVBEH, 12 con HN, 30 testigos con otras enfermedades hepáticas y 55 testigos sin hepatopatía. No encontraron diferencias serológicas entre los pacientes con hepatopatía y los testigos en cuanto a la positividad de los anticuerpos y a los títulos de los mismos. Se realizó el método de inmunoperoxidasa en 19 pacientes (18 con AVBEH y 1 con HN) y no se detectaron antígenos de Reo 3, con testigos positivos en una línea celular infectada por el virus. Con dichos resultados no se apoya la asociación (28).

Otro tipo de estudios como inmunohistoquímica, o bien PCR, fueron realizados para la detección del virus. En 1984, Morecki y colaboradores (29) no demostraron la presencia del virus por medio de inmunohistoquímica en los remanentes biliares de un niño con AVBEH; sin embargo, por medio de microscopía electrónica se encontraron partículas similares al reovirus en dichos remanentes.

En la Universidad de Oklahoma, en 1995, Steele (30), por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) reversa para la detección de Reo-3, en 50 pacientes archivados (14 con AVBEH, 20 con HN y 16 testigos) solo en uno se encontró positividad.

Tyler y Sokol en 1998 (31), publicaron un estudio en el que se realizó PCR reversa para la detección de reovirus en 23 pacientes con

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AVBEH, 9 con quiste de colédoco (QC) y 33 pacientes con otras patologías hepatobiliares al momento de la biopsia hepática y 17 autopsias de pacientes con enfermedad hepatobiliar. Encontraron RNA de reovirus en 55% de pacientes con AVBEH, 78% con QC. Con estos resultados se concluyó que la prevalencia del RNA de reovirus fue mayor en los pacientes con QC y AVBEH que en el resto de pacientes.

Se ha observado relación también con otros virus como el rotavirus. El rotavirus del grupo A, se había considerado como enterotrópico estricto y como la causa más importante de diarrea en los niños; sin embargo, se ha visto que tiene la capacidad de diseminarse hacia el hígado produciendo hepatitis en ratones (32).

En 1993, se realizó un estudio multicéntrico en el que se describió obstrucción biliar extrahepática en ratones BALB/c inmunocompetentes infectados con rotavirus del grupo A. Se observó que dos ratones inoculados por vía oral tuvieron replicación viral activa en las vías biliares y en el hígado 48 horas después de la inoculación; 7 días después de la inoculación algunos de los ratones mostraron inflamación y edema de los conductos biliares. En la mitad de los ratones sintomáticos hubo una obstrucción total de los conductos biliares; ésta obstrucción fue irreversible en la mitad de los casos. Los hallazgos histopatológicos fueron similares a los encontrados en los pacientes con AVBEH (33).

En 1997, en Hannover, Alemania, se realizó un estudio en ratones BALB/c recién nacidos en los que se inoculó rotavirus; 67% de ellos tuvieron datos de colestasis y retraso en el crecimiento. Ocho se recuperaron espontáneamente. Se realizó microscopía electrónica seriada en 46 ratones y se encontró infiltración celular y edema del epitelio biliar; diez días después había obstrucción completa de las vías biliares, en algunos casos con una dilatación preestenótica. En un caso se observó una dilatación similar al QC a los 19 días de vida (34).

En un estudio retrospectivo en 1996, Riepenhoff-Talty y Gouvea (35), realizaron PCR reversa para la detección de rotavirus tipo C en 32

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

muestras de pacientes (20 con AVBEH y QC así como 12 testigos) 10 (50%) pacientes con AVBEH fueron positivos. Seis de los diez pacientes tuvieron más de una muestra positiva.

Sin embargo en 1997, Bobo y colaboradores (36) realizaron un estudio en el que tomaron 10 pacientes con diagnóstico de atresia de vías biliares y 14 testigos con otras patologías hepatobiliares a los que les realizaron PCR reversa con resultados negativos.

Con todo lo anterior, al haber estudios que apoyan y otros que descartan la presencia de varios virus asociados a AVBEH, utilizando prácticamente la misma metodología, no están claras estas asociaciones.

La primera vez que se reportó asociación del Virus del Papiloma Humano (VPH) con enfermedad hepatobiliar fue en 1996, cuando se detectó por medio de PCR, DNA del VPH en 7/7 casos de pacientes con hepatitis neonatal, a quienes también se les realizó PRC para CMV y fue negativa (37).

Estos hallazgos motivaron la realización de otro estudio por el mismo grupo de investigadores en 1998 (38), en el cual se tomaron 18 pacientes con diagnóstico de AVBEH de los archivos de Patología del Hospital de Niños de La Plata Argentina y 30 pacientes como testigos y se les realizó PCR para VPH *in situ*. Se logró la amplificación del virus en 16 (89%) de los 18 casos. No hubo diferencias histológicas entre los pacientes que fueron positivos y los que no. De los casos positivos, diez (62%) amplificaron VPH tipo 6, cuatro (25%) para el tipo 18, y dos (12.5%) para ambos. Hubo discreta reactividad en el núcleo de algunos hepatocitos en los seis casos en los que se realizó hibridación *in situ*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha postulado que existe una asociación entre el VPH y el desarrollo de neoplasias epiteliales y otros trastornos de la diferenciación celular, así como la producción de lesiones en el epitelio del tubo digestivo y del aparato respiratorio. Tan solo en el cáncer cervicouterino en México está presente con serotipos de alto riesgo hasta en 85% de los casos (39). Probablemente el daño de las vías biliares se produce durante la vida intrauterina por transmisión vertical de la infección, ya que se ha observado que el virus se encuentra en el líquido amniótico; o bien al momento del paso del producto por el canal del parto. Se han realizado estudios que demuestran la presencia del VPH en biopsias de epitelio biliar en niños únicamente por un grupo de investigadores (38); sin embargo, en modelos experimentales en animales gestantes a los que se les ha inoculado por vía intraamniótica el virus, no se ha demostrado daño biliar en los productos (comunicación personal Dr. Valencia/Dra. Hernández). Por lo anterior la asociación entre AVBEH y VPH aun no está del todo esclarecida.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JUSTIFICACIÓN:

La AVBEH es un padecimiento con graves repercusiones clínicas; la asociación con infección por VPH no está clara, si esta lograra demostrarse tomando en cuenta las teorías en cuanto a la vía de transmisión de las infecciones virales de la madre al feto, sería importante establecer programas de detección oportuna y medidas preventivas para evitar la infección.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS:

Demostrar la presencia del VPH en biopsias hepáticas y de conductos biliares en los niños con AVBEH y en el cervix uterino de sus madres.

Establecer si, de estar presente el VPH, es del mismo tipo en el cervix uterino de la madre y en las vías biliares del paciente.

TESIS CON
SELLA DE CUBREN

HIPÓTESIS:

Si el VPH está presente en el epitelio biliar de los niños con AVBEH, el mismo tipo se encontrará en el cervix uterino de sus madres.

DISEÑO DEL ESTUDIO:

Prospectivo, transversal y descriptivo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIAL Y METODOS:

Se tomaron 13 biopsias de conductos biliares e higado en pacientes con diagnóstico de AVBEH del HIM, en periodo comprendido entre agosto de 1999 a julio del 2000, a los que les fue realizada una portoenteroanastomosis tipo Kassai o alguna de sus variantes. Los remanentes de conductos biliares y las biopsias de higado, fueron cortados a la mitad. Una mitad de ellos se congeló a menos 70°C para PCR y al resto se les realizó el procedimiento habitual para inclusión en bloques de parafina y se realizó búsqueda genérica del virus por medio de hibridación *in situ* (sonda amplio espectro Dako Cat Y 1404, sondas tipos 6-11 Dako Cat Y 1411, sondas tipos 16-18 Dako Cat Y 1412, sondas tipos 31-33 Dako Cat Y 1413). Además se tomaron muestras de citología vaginal, previo consentimiento por escrito en 8 de las madres de los pacientes. Una parte de la muestra obtenida se colocó sobre laminillas para tinción con hematoxilina-eosina y la otra se le realizó hibridación *in situ* para VPH. Además se realizó reacción en cadena de la polimerasa para detección del VPH en estas muestras. Como testigos se utilizaron biopsias de papilomas laríngeos secundarios a infección por VPH, obtenidas del archivo del departamento de Patología del HIM.

TESIS CON
FALLA DE CUIGEN

RESULTADOS:

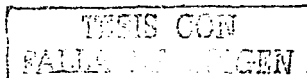
En el periodo de un año en el Hospital Infantil de México se obtuvieron 13 biopsias de remanentes de los conductos biliares así como biopsias hepáticas de niños con AVBEH, quienes fueron candidatos a la realización de una portocenteroanastomosis tipo Kassai o alguna de sus variantes. De los 13 pacientes, 9 (69%) fueron mujeres y 4(31%) hombres: lo que representó una proporción 2:1. Las edades de los pacientes oscilaron entre los 40 y los 90 días con un promedio de 67 días.

Distribución por sexo y edad al momento del diagnóstico

Sexo	Número de pacientes	Edad en días al momento de la cirugía
Femenino	9 (69.2%)	53-90 X = 70.5
Masculino	4 (30.7%)	40-90 X = 61

Los hallazgos histopatológicos no fueron diferentes a los casos de AVBEH previamente descritos: cinco de los trece pacientes tuvieron fibrosis moderada y el resto fibrosis grave; en la totalidad de los casos se encontró tanto proliferación de colangiomas como tapones de bilis; ocho casos tuvieron colapso hepatocelular; once casos tuvieron transformación pseudoacinar y gigantocelular. El diámetro de los conductos fue variable; en cuatro casos midieron menos de 50 μ , en tres casos midieron entre 50 μ y 100 μ , en cinco casos midieron entre 100 μ y 150 μ , y en un solo caso midieron entre 150 μ y 200 μ . (Figs. 1-6).

Se realizó hibridación *in situ* (Fig 7-10), en las biopsias de hígado y conductos biliares de todos los pacientes y los resultados fueron negativos con testigos positivos. Además se realizó PCR, con la cual no se consiguió amplificar el DNA viral en los casos, con testigos positivos adecuados.



Se realizó toma de citología vaginal en 8 de las madres de los pacientes, el resto no autorizó el estudio. En éstas, no se encontraron datos citológicos compatibles con infección por virus del papiloma humano, únicamente en un caso se observó metaplasia escamosa (hallazgo inespecífico). La hibridación *in situ* (Fig. 11) y la PCR fueron negativas en estas muestras.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN:

En éste estudio no se pudo demostrar la presencia del virus del papiloma humano, a diferencia de lo reportado previamente por un grupo de investigadores (38). Se utilizaron prácticamente las mismas técnicas de biología molecular para la detección y amplificación del virus.

Posterior a la realización de nuestro trabajo, en Texas, se publicó un estudio en el 2000 (40), cuyo propósito era confirmar los reportes de la asociación entre VPH y AVBEH o HN; sin embargo, en un total de 19 pacientes no se pudo amplificar el virus. También realizaron PCR para Citomegalovirus (CMV), virus del Epstein Barr (VEB), herpesvirus tipo 6 (HV6) y parvovirus B19 (PVB19). Dos casos de HN y un caso de AVBEH fueron positivos para CMV, en 2 pacientes de HN, 2 pacientes con AVBEH y 2 controles se detectó HV6, lo cual no apoya una explicación o asociación causal.

Las posibles razones de la obtención de nuestros resultados pueden ser: 1) la existencia de un factor ambiental en la región de La Plata (en donde fue realizado el estudio previo) o una mayor incidencia de infección por VPH en las madres de esos pacientes, que favorezca la infección por VPH en recién nacidos, 2) los especímenes de los remanentes de conductos biliares no fueron significativos (exceso de fibrosis y pocas células epiteliales), 3) las copias del virus no fueron suficientes (aunque la PCR detecta una sola copia, en ocasiones hay falsos negativos), 4) que haya serotipos aun no identificados que no son detectados por los iniciadores comerciales.

Si bien es cierto que en nuestro país no hay datos de la prevalencia de infección por VPH, el porcentaje de asociación de serotipos de VPH de alto riesgo con cáncer cervicouterino es hasta de 85% (39), y podemos considerarlo como un dato indirecto de la frecuencia de esta infección en nuestro medio. En las citologías vaginales de las madres no se hallaron cambios histológicos sugestivos de infección por VPH y con las pruebas moleculares tampoco.

TEXAS CON
FALLA DE REGISTRO

En nuestro grupo de estudio, la proporción por género fue similar a lo informado en la literatura.

Es posible que individuos genéticamente predispuestos tuvieran mayor susceptibilidad para la infección por VPH y otros virus, pero desconocemos si los agentes virales causan directamente la infección o que, paradójicamente, se reproducen adecuadamente en ambientes colestásicos.

Aparentemente hay mayor riesgo de AVBEH en productos de madres de edad avanzada, multiparas y en productos de bajo peso al nacimiento (17). Aunado a ello, hay, además, factores de riesgo de tipo genético [HLA B8 y DR3 (7), A33, B44 y DR6 (8) y B12 haplotipos A9B5 y A28B35 (9) y mutaciones en el gen JAG1(11)], los cuales podrían estar interviniendo conjuntamente en la patogenia de esta enfermedad.

La interacción entre este tipo de factores genéticos y los agentes virales no está descrita; sin embargo, una alteración genética podría incrementar la susceptibilidad de un organismo a la infección viral, y con ello a la aparición de la secuencia de eventos inflamatorios que dan como resultado la AVBEH.

TIENE CON
FALSA EL ORIGEN

FIGURAS.



Figura 1. Microfotografía en la que se observa un espacio porta expandido por proliferación de colangiocitos, fibrosis e inflamación. El parénquima muestra abundante cantidad de colágeno y sustitución celular por puentes de fibrosis. (Mason $\times 100$)

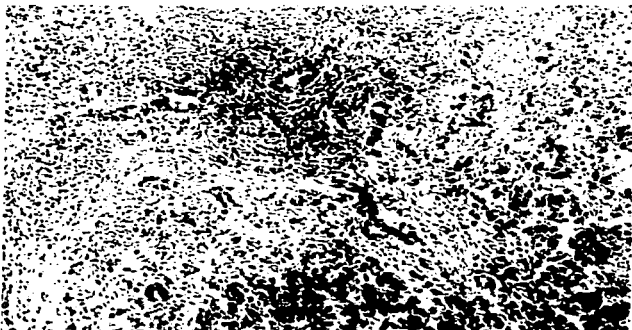
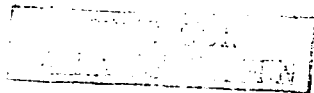


Figura 2. Microfotografía de un espacio porta con gran cantidad de células inflamatorias que afectan y rodean a colangiocitos. (Mason $\times 100$)



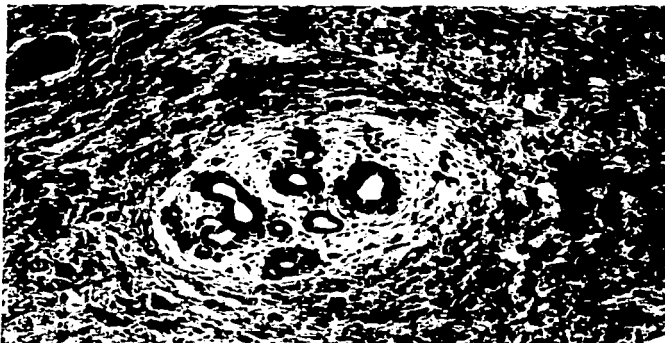


Figura 3. Microfotografía de conductos de la *porta hepatis*; éstos tienen un diámetro menor a 100μ y están rodeados de fibrosis e inflamación. (HE \times 100)

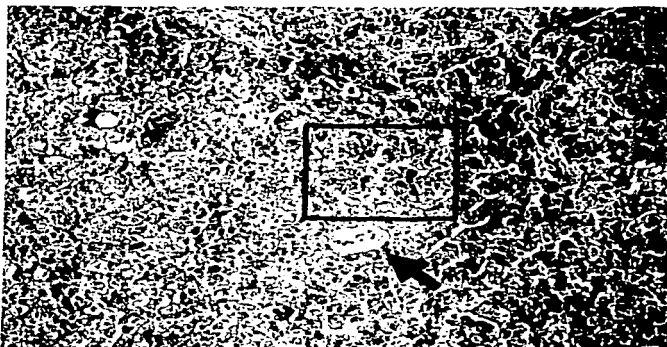


Figura 4. Microfotografía de biopsia hepática que muestra transformación pseudoacinar de los cordones de los hepatocitos, con tapones de bilis en los canaliculos (recuadro), y transformación gigantocelular en algunos hepatocitos (flecha). (HE \times 100)

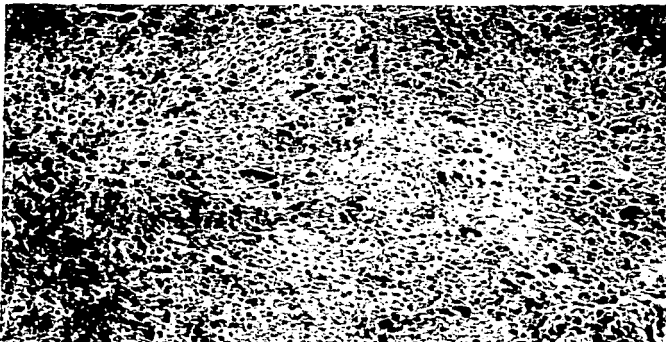


Figura 5. Proliferación de colangiolas en un espacio porta; varios de ellos contienen tapones de bilis en su interior. (HE \times 100)

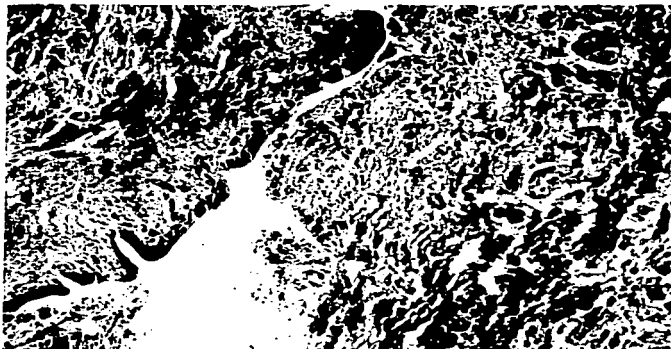
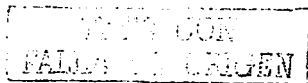


Figura 6. Remanente del colédoco con epitelio biliar parcialmente conservado; alrededor de él se aprecia fibrosis e infiltrado inflamatorio mononuclear. (HE \times 100)



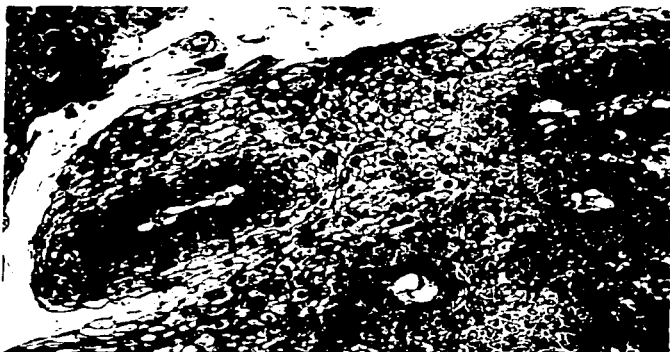


Figura 7. Microfotografía que muestra hibridación *in situ* para VPH en epitelio laríngeo. Los núcleos azules son positivos para éste virus. (Hibridación *in situ* \times 200)

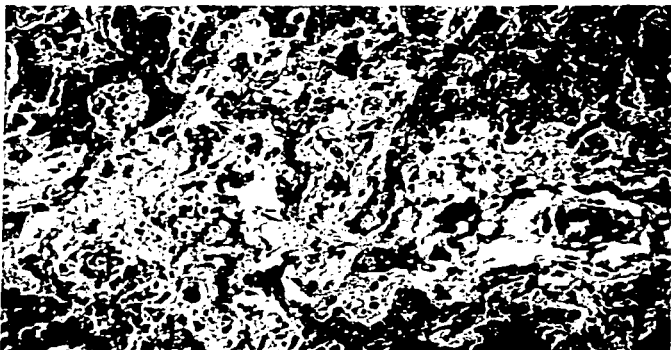


Figura 8. Microfotografía de biopsia hepática que muestra colangiolo negativos para VPH. (Hibridación *in situ* \times 100)

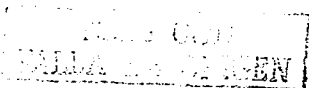




Figura 9. Microfotografía que muestra los conductos de la *porta hepatis* negativos para VPH. (Hibridación *in situ* $\times 100$)

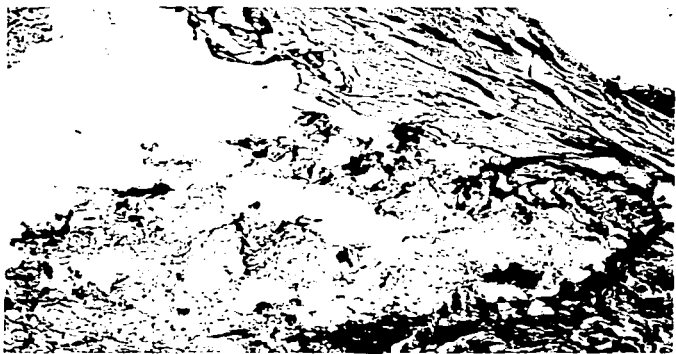


Figura 10. Microfotografía de un corte de colédoco negativo para VPH. (Hibridación *in situ* $\times 100$)

LIBRE CON
SERVICIO DE
LABORATORIO DE
32

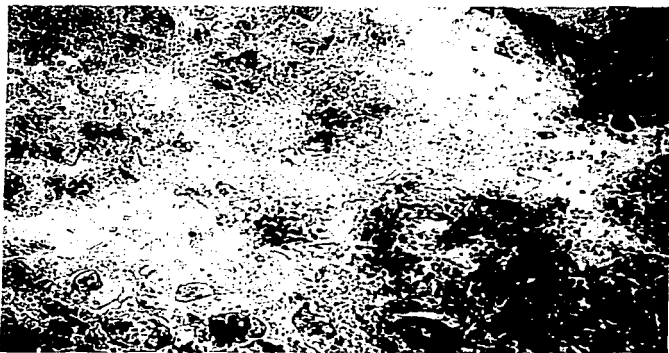


Figura 11. Numerosas células de epitelio plano cervical negativas para VPH. (Hibridación *in situ* $\times 100$)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo I. METODO PARA INCLUSIÓN EN PARAFINA

Se fijaron en formol al 10% amortiguado a pH 7 durante 24 horas, posteriormente se lavaron en agua destilada y se deshidrataron mediante el uso de alcoholes graduales en cada uno de los cuales permanecieron durante 20 minutos, los porcentajes de los alcoholes fueron al 70%, 90% y al 100%. Se aclararon con xilol durante 30 minutos y se colocaron en parafina a 60°C durante 30 minutos, finalmente se incluyeron en bloques de parafina (41).

Se realizaron cortes a 4 micras en un microtomo marca Leica, para las técnicas de Hematoxilina-eosina e Hibridación *in situ*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo 2. TÉCNICA DE LA TINCION DE HEMATOXILINA-EOSINA:

Después de la obtención de los cortes, estos fueron desparafinados en una estufa a 60°C durante media hora y colocados en xilol durante 15 minutos y se hidrataron mediante el uso de alcoholes graduales a 100%, 95% y 80% y en agua destilada durante 1 minuto en cada uno y se tiñeron posteriormente en una solución de Hematoxilina de Harris durante 5 minutos, se lavaron en agua corriente y se colocaron en una solución de eosina floxina durante 5 minutos y se deshidrataron mediante el uso de alcoholes graduales al 95% y 100% durante 1 minuto en cada uno de ellos y finalmente en xilol durante 1 minuto. Se montaron mediante el uso de entellan (Baker), los resultados fueron analizados por un Patólogo (41).

Tabla 1

SOLUCION MATRIZ DE EOSINA	
Eosina Y hidrosoluble	1.0g
Agua destilada	100.0ml
SOLUCION MATRIZ DE FLOXINA	
Floxina B	1.0g
Agua destilada	100.0ml
SOLUCION DIARIA DE EOSINA-FLOXINA Combine en un cilindro de 1000ml	
Solución matriz de eosina	100.0ml
Solución matriz de floxina	10.0ml
Etanol al 95%	780.0ml
Acido acético, glacial	4.0ml

TISSE CON
TALLA DE CAJON

Anexo 3. TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN *IN SITU*:

Se utilizaron cortes a 4 micras los cuales fueron colocados sobre laminillas cargadas eléctricamente (Fisher Biotech). Los cortes fueron colocados en una estufa a 60°C durante 30 minutos posteriormente se desparafinaron mediante el uso de xilol por 15 minutos y se deshidrataron mediante el uso de alcoholes graduales de 100%, 90%, 70% y agua destilada, durante un minuto en cada uno de ellos y se dejaron secar al aire y se les hizo una digestión enzimática con pepsina al 1.25% (SIGMA) durante 5 minutos. Se lavaron y se deshidrataron mediante el uso de alcoholes graduales al 70% al 90% y al 100% durante 1 minuto en cada uno de ellos y se dejaron secar al aire. Para la hibridación a los cortes se les colocó 20 μ L de los cuatro tipos de sondas (una sonda por laminilla) Una de las sondas era de amplio espectro (Dako Cat. Y1404) y las restantes eran de los tipos 6-11 (Dako Y 1411), 16-18 (Dako Cat. Y1412) y 31-33 (Dako Cat. Y1413). Los tejidos y la mezcla de reacción fueron calentados a 95°C durante 10 minutos en una placa de calor (Thermolyne). Al final del tiempo de incubación se colocaron a 37°C en una cámara húmeda donde permanecieron durante toda la noche. Se lavaron durante 5 minutos en TBS (Dako Cat. S3001) posteriormente se hicieron lavados astringentes con la solución de astringencia (Dako Cat. S3500) a 47°C durante 30 minutos. Se lavaron con TBS y se les agregó una solución de estreptavidina peroxidasa (Dako K1016) en la que permanecieron 30 minutos. Se lavaron y se reveló con una solución de BCIPNBT (Dako K0598). Se lavaron nuevamente y se dejaron secar al aire y finalmente se montaron con entellan para su observación por un Patólogo (42).

TESIS CON
PAULA DE ORIGEN

Anexo 4. TÉCNICA DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA:

a. Extracción del DNA:

Se usaron fragmentos de tejidos de 100mg aproximadamente, se colocaron en amortiguador TE (Tris 10mM:EDTA 1mM:10mM) con SDS al 0.5% en la que se mantuvieron en agitación a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se les agregó proteinasa K (SIGMA P-2308) hasta alcanzar una concentración de 0.05% en la que se mantuvieron de 2 a 3 horas a 50°C. Cuando la digestión se completó se inactivó la proteinasa K a 95°C durante 5 minutos y se les agregó un volumen igual de Fenol y se mezcló suavemente, se centrifugo durante 5 minutos a 14,000 rpm, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se le agregó un volumen igual de Fenol: cloroformo-isoamilalcohol (24:1) y se mezcló suavemente, se centrifugo nuevamente durante 5 minutos a 14000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio en el que se le agregó una solución de cloroformo-isoamilalcohol (24:1) y se mezcló suavemente.

Nuevamente se centrifugo durante 5 minutos a 14000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio donde se le agregó un décimo del volumen de NaOAc 3M y se mezcló suavemente. Se agregaron 3 volúmenes de etanol absoluto a -20°C y se mezcló por inmersión durante varios minutos. Las muestras se colocaron a -20°C durante 2 a 3 horas y se centrifugo a 4°C a 14000 rpm por 30 minutos. Se decantó el etanol y el precipitado se lavó con 1ml de etanol al 70% a -20°C y se centrifugo durante 5 minutos a 14000 rpm el etanol se decantó y el precipitado se dejó secar al aire y se resuspendió en amortiguador TE durante toda la noche a 37°C.

La concentración del DNA obtenido fue cuantificada por espectrofotometría con luz UV para lo cual se colectó una muestra y se diluyó 1:50 hasta obtener un volumen de 100 microlitros el cual fue colocado en una celda y se leyó a 260 y 280nm. La concentración fue obtenida mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$[DNA]_{\text{final}} = (F)(\Delta 260)(Dil)$$

de donde:

F= 50 correspondiente a 50microg de DNA por cada valor de absorbencia a 260nm

$\Delta 260$ = Valor de absorbencia obtenido a 260nm

Dil= Factor de dilución de la muestra leída.

Y también se obtuvo la concentración final de proteínas mediante la siguiente fórmula:

$$[Proteinas]_{\text{final}} = (F)(\Delta 260)(Dil)$$

En donde

F= Factor 1,200 que corresponde a 1mg de proteína por cada 0.8 DO

$\Delta 260$ = Valor de absorbencia obtenido a 260nm.

Dil.= Factor de dilución de la muestra leída (42).

b. Reacción en cadena de la polimerasa:

En un tubo de microcentrifuga nuevo y estéril se colocó la siguiente mezcla de reacción

Tabla 2 Reactivos y concentración para realizar PCR

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN UTILIZADA
Enzima Taq Polimerasa	1-2.5 U/ μ L
DNTP's	200 μ M
MgCl ₂	1.5mM
Iniciadores	3 μ M
DNA genómico	500ng
Amortiguador	5 μ L

La mezcla de reacción se cubrió con 20 μ L de aceite mineral para evitar la evaporación y se colocó en un termociclador en el que se le aplicaron 20 ciclos de amplificación. Cada ciclo constaba de un paso de

desnaturalización a 95°C por un minuto, seguido de un paso de alineación de los iniciadores a 50°C por 2 minutos y un paso de elongación de cadenas a 72°C por 1.5 minutos. Se añadieron 25picomolas de los iniciadores GP5 y GP6 así como la Taq polimerasa. Se llevaron a cabo 35 nuevos ciclos y las muestras se incubaron por 5 minutos a 72°C. Los productos se colocaron sobre gel de agarosa con bromuro de etidio al 2% para la electroforesis (42).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

TESIS CON
FALLA EN EL ORIGEN

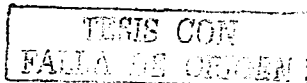
BIBLIOGRAFIA:

1. Sokol RJ, Mack C. Etiopathogenesis of biliary atresia. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 517-524.
2. Bates MD, Bucuvalas JC, Alonso MH, Ryckman FC. Biliary atresia: pathogenesis and treatment. *Semin Liver Dis* 1998;18: 281-293.
3. Moguel G, Valencia P. Tesis: Atresia de Vías Biliares. Revisiónclínico patológica. 1979-1984. México 1985, Biblioteca Hospital Infantil de México.
4. Fischler B, Papadogiannakis N, Nemeth A. Aetiological factors in neonatal colestasis. *Acta Paediatr* 2001; 90: 88-92.
5. Danks DM, Campbell PE, Jack I, Togers J y cols. Studies of aetiology of neonatal hepatitis and biliary atresia. *Arch Dis Child* 1997; 52: 360-367.
6. Becerra JA, Tiao G, Ryckman FC, Alonso M y cols. Genetic induction of proinflammatory immunity in children with biliary atresia. *Lancet* 2002; 36: 1653-1659.
7. A-Kader HH, EL Ayyouti M, Haman S, Abdalla A y cols. HLA in Egyptian children with Biliary Atresia. *J Pediatr* 2002;121:432-433.
8. Nakada M, Nakada K, Kawaguchi F, Wakisaka M. Immunologic reaction and genetic factors in biliary atresia. *Tohoku J Exp Med* 1997; 181: 41-47.
9. Silveira TR, Salzano PM, Donaldson PT, Mieli-Vergagni G y cols. Association between HLA and extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 16: 111-112.
10. Donaldson PT, Clare M, Constantini PK, Hadzic N, Vergani G y cols. HLA and cytokine gene polymorphisms in biliary atresia. *Liver* 2002; 22: 213-219.
11. Kohsaka T, Yuan ZR, Guos X, Tagawa R. The significance of human jagged 1 mutations detected in severe cases of extrahepatic biliary atresia. *Hepatology* 2002; 36: 904-912.
12. Cunningham ML, Sybert L. Idiopathic Extrahepatic Biliary Atresia: recurrence in sibs in two families. *Am J Med Genet.* 1988; 31: 421-426.

13. Smith BM, Laberge JM, Schreiber R, Weber AM, Blanchard H. Familiar Biliary Atresia in three sibilings including twins. J Pediatr Surg 1991; 26: 1331-1333.
14. Blanchard H. Familial biliary atresia in three sibilings including twins. J Pediatr Surg. 1991; 26: 1331-1333.
15. Isoyama K, Yamada K, Ishikawaki L, Sanada Y. Coincidental cases of primary sclerosing cholangitis and biliary atresia in sibilings? Acta Paediatr 1995; 84: 1444-1446.
16. Ando K, Miyano T, Fujimoto T, Ohya T. Sibling occurrence of Biliary Atresia and Biliary Dilatation. J Pediatr Surg 1996; 31: 1302-1304.
17. Fischler B, Hagiund B, Hiern A. A population-based stugy on the incidence and possible pre-and perinatal etiologic risk factors of biliary atresia. J Pediatr 2002; 141: 217-222.
18. Lurie M, Elmalach I, Schuger L, Weintraub Z. Liver findings in infantile Cytomegalovirus infection: similarity to extrehepatic biliary obstruction. Histopathology 1987; 11: 1171-1180.
19. Hart MH, Kaufman SS, Vanderhoof JA, Erdman S, Linder J. Neonatal hepatitis and extrahepatic Biliary atresia associated with Citomegalovirus infection in twins. Am J Dis Child 1991; 145: 302-305.
20. Tarr PT, Haas JE, Christie DL. Biliary atresia, Cytomegalovirus and age at referral. Pediatrics 1996; 97:828-831
21. Fishler B, Ehrnst A, Forsgren M, Orvello L y cols. The viral association of neonatal cholestasis in Sweden: a possible link between CMV infection y EBA. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1998; 27: 57-64.
22. Jevon GP, Dimmick JE. Biliary atresia and citomegalovirus infection : a DNA study. Pediatr Dev Pathol 1999; 2:11-14.
23. Bangaru B, Morecki R, Glaser JH, Gartner LM y cols. Comparative studies of biliary atresia in the human newborn and reovirus-induced cholangitis in weanling mice. Lab Invest 1980; 43: 456-462.

TEXAS COM
FAMILIA DE ORIGEN

24. Szaway PO, Leonhardt J, Czeche-Smith G, Petersen A. The role of reovirus type 3 infection in an established murine model for BA. *Eur J Pediatr Surg* 2002; 12: 248-250.
25. Morecki R, Glaser JH, Balistieri WF, Horwitz M y cols. Biliary atresia and reovirus type 3 infection. *N Engl J Med* 1982; 307: 481-484.
26. Rosenberg DP, Morecki R, Lollini CO, Glaser J y cols. Extrahepatic biliary atresia in a rhesus monkey (macaca mulatta). *Hepatology* 1983; 3: 577-580.
27. Glaser JH, Balistieri WF, Morecki R. Role of reovirus type 3 in persistent infantile cholestasis. *J Pediatr* 1984; 4: 1137-1142.
28. Brown WR, Sokol RJ, Levin MJ, Silverman A y cols. *J Pediatr* 1988; 113: 670-676.
29. Morecki R, Glaser JH, Hohnson AB, Kress Y. Detection of reovirus type 3 in the porta hepatis of an infant with extrahepatic biliary atresia: ultrastructural and immunocytochemical study. *Hepatology* 1984; 4: 1137-1142.
30. Steele MI, Marshall CM, Lloyd RE, Randolph VE. Reovirus 3 not detected by reverse transcriptase mediated polymerase chain reaction analysis of preserved tissue from infants with cholestatic liver disease. *Hepatology* 1995; 21: 697-702.
31. Tyler KL, Sokol RJ, Oberhaus SM, Lee M, y cols. Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with EHBA. *Hepatology* 1998; 27: 1475-1482.
32. Uhoo I, Riepenhoff-Talty M, Dharakul T, Chegas P. Extramucosal spread and deficient and normal development of hepatitis in immunodeficient and normal mice infected with rhesus rotavirus. *J Virol* 1990; 64: 361-368.
33. Riepenhoff-Talty M, Schaekel K, Clark HF, Müller W, Uhoo I y cols. Group A rotaviruses produce extrahepatic biliary obstruction in orally inoculated newborn mice. *Pediatr Res* 1993; 33: 394-399.



34. Petersen G, Biermanns D, Kusike M, Schakel K. New aspects in a murine model for EHBA. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 1190-1195.
35. Riepenhoff-Talty, Gouvea V, Evans MJ, Svenson L. Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. *J Infect Dis* 1996; 174: 8-15.
36. Bobo L, Oreh C, Chiu D, Machado A, y cols. Lack of evidence for rotavirus by polimerasa chain reaction/enzyme immunoassay of hepatobiliary samples from children with biliary atresia. *Pediatr Res* 1997; 41: 229-234.
37. Drut R, Gomez MA, Drut RM, Lojo MM. Human papillomavirus (HPV) associated neonatal giant cell hepatitis (NGCH) *Pediatr Pathol Lab Med* 1996; 16: 403-412.
38. Drut R, Drut RM, Gomez MP, Cueto RE y cols. Presence of human papillomavirus in extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 27: 530-535.
39. Hernández DM, García A, González VL. High-risk HPV and cervical intraepithelial neoplasia in women at 2 hospitals in México city. *Rev Invest Clin* 2002; 54: 299-306.
40. Domiati-Saad R, Dawson DB, Margraf LR, Finegold MJ y cols. Cytomegalovirus and human herpesvirus 6 but not human papillomavirus are present in neonatal giant cell hepatitis and extrahepatic biliary atresia. *Pediatr Dev Pathol* 2000; 3: 367-373.
41. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Técnica de inclusion en parafina y hematoxilina y eosina en Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de Norteamérica (AFIP), Washington 1995: 55-57.
42. Ulrika VM. *In situ* hybridization and polimerase chain reaction en *Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology*. Ed: Armed Forces Institute of Pathology (AFIP). Washington 1994: 41-52;77-105.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN