



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

Identificación de marcadores
biológicos asociados a infección por
virus de la hepatitis E en casos con
hepatitis crónica de etiología
indeterminada

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:

PATOLOGÍA PEDIÁTRICA

P R E S E N T A:

Dra. Zindy Jair Durán Reyes

TUTOR:

Dr. Francisco Jesús Arenas



CIUDAD DE MÉXICO

FEBRERO 2022



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

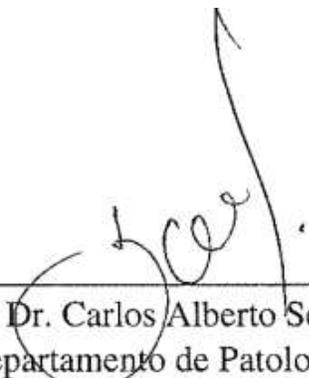
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

HOJJA DE FIRMAS



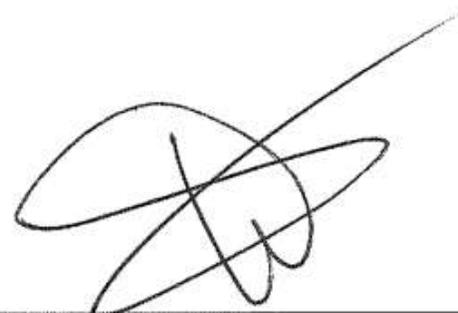
Dr. Francisco Jesús Arenas Huerto
Jefe del Laboratorio de Investigación en Patología Experimental
Hospital Infantil de México Federico Gómez
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel II



Dr. Carlos Alberto Serrano Bello

Adscrito al Departamento de Patología Clínica y Experimental

Hospital Infantil de México Federico Gómez



Dra. María Argelia Escobar Sánchez

Jefa del Departamento de Patología Clínica y Experimental

Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dedicatoria

En primer lugar, a Dios porque permitirme concluir mis metas y darme la fuerza espiritual que necesito en cada paso.

Al Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero por su apoyo, guía y enseñanza en cada paso que di para la realización de éste y otros proyectos.

A la Dra. Argelia Escobar y al Dr. Carlos Serrano por el apoyo que me dan día con día y por compartir su conocimiento.

A mis Padres, Alejandra y Alfonso y a mi hermana Rubí, porque gracias a ellos y por su apoyo en cada paso, he logrado todo lo que me he propuesto.

A Aide por ser mi compañera incondicional de vida.

A mis compañeros Rafa, Alan, Abraham y Pedro, por siempre sacarme una sonrisa en el servicio, aún en los momentos más estresantes.

Contenido

1. Antecedentes.....	7
2. Marco teórico.....	8
Biología y virología molecular del virus de la hepatitis E.....	8
Variabilidad genética e implicación clínica del VHE.....	10
Vías de transmisión y periodo de incubación del virus de la hepatitis E.....	11
Epidemiología de la infección por VHE.....	12
Características histopatológicas de la hepatitis E.....	13
Infección crónica por VHE.....	15
Hepatitis crónica de etiología indeterminada y virus de la hepatitis E en pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez.....	16
3. Planteamiento del problema.....	17
4. Pregunta de investigación.....	17
5. Justificación.....	17
6. Hipótesis.....	18
7. Objetivos.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos.....	19
8. Metodología.....	19
Diseño del estudio.....	19
Población del estudio.....	19
Criterios de inclusión.....	20
Criterios de exclusión.....	20
Muestreo y tamaño de muestra.....	20
Materiales.....	20
Métodos.....	21
Realización de base de datos.....	21
Realización de reacciones de inmunohistoquímica.....	21
Realización de RT-PCR para VHE.....	23
9. Plan de análisis estadístico.....	25
10. Definición de las variables.....	25

11.	Consideraciones éticas	30
12.	Resultados.....	31
13.	Discusión	43
14.	Conclusiones.....	45
15.	Cronograma de actividades.....	46
16.	Bibliografía.....	47
17.	Limitaciones del estudio	49
18.	Anexos	50

1. Antecedentes

En 1955 y 1956 se originó un brote de hepatitis aguda en Nueva Delhi, India, en el cual las características clínicas y demográficas, aunque similares a las observadas en hepatitis A, no fueron suficientes para poder diagnosticarla. Posteriormente, se realizaron estudios presentando negatividad para el virus de la hepatitis A. Con estos datos se concluyó la presencia de un nuevo agente etiológico como causante de la epidemia. En 1983, se realizaron estudios de las muestras del brote de 1955, y se denominó virus de la hepatitis E (VHE) siendo la E por entérica y epidémica. En 1991 se logró realizar la secuenciación genómica del VHE.¹

Actualmente, la hepatitis E es un problema de salud pública principalmente en países en vías de desarrollo, y una enfermedad emergente en países industrializados de Europa y en Estados Unidos. Los brotes endémicos y esporádicos se han dado en países tropicales y subtropicales (India, Uganda, Sudán y México), y han afectado a miles de personas de los más de dos billones que viven en zonas endémicas, siendo la vía fecal-oral por contaminación de suministros de agua y malas condiciones de saneamiento. En países industrializados, los casos han sido menores y se han asociado a viajeros procedentes de zonas endémicas, sin embargo, actualmente se ha hablado de casos autóctonos, los cuales ha presentado aumento en su incidencia.^{1,2}

La mayoría de las infecciones de VHE son asintomáticas y el cuadro sintomático incluye hepatitis aguda, falla hepática fulminante y síntomas extrahepáticos muy similares a los ocasionados por virus de las hepatitis A, B, C y D, por lo que es prácticamente indistinguible de los demás.^{3,4} En mujeres embarazadas se ha observado como cuadro clínico, principalmente hepatitis aguda con falla hepática fulminante, la severidad de la infección en estas pacientes se ha asociado al balance hormonal y al complejo inmunológico durante este estadio. Se han descrito de igual manera, la replicación viral en la placenta humana, teniendo como consecuencias pérdida del producto o transmisión vertical madre-hijo. La tasa de mortalidad es

mayor a la observada en la hepatitis A, y en países como Japón se ha observado pacientes infectados por transfusión sanguínea o ingestión de alimentos crudos.⁵

Recientemente, se han diagnosticado casos de hepatitis E crónica, los cuales se definen como la persistencia del RNA-VHE, o IgM anti-VHE más de seis meses posterior a la elevación de los niveles de alanino aminotransferasa (ALT).¹⁶ La infección crónica se ha reportado principalmente en individuos inmunocomprometidos, receptores de trasplante de órganos, pacientes en tratamiento con quimioterapia, y pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH). En estos pacientes, se ha descrito el desarrollo de fibrosis y/o cirrosis hepática.¹⁵ Estos datos abren una línea de estudio de gran interés, principalmente en los casos reportados de hepatitis crónica en pacientes sanos e inmunocompetentes. Planteando la cuestión de sobre el porcentaje real de paciente con hepatitis crónica secundaria al virus de la hepatitis E.

2. Marco teórico

Biología y virología molecular del virus de la hepatitis E

El VHE es un virus RNA pequeño, sin envoltura que mide 32-34 nm de diámetro, perteneciente al género *Orthohepevirus* de la familia *Hepeviridae*; el genoma viral está formado por una sola cadena de RNA de sentido positivo, de 7.2Kb y presenta cuatro regiones codificantes de proteínas o marcos de lectura abierta (ORF): ORF1,

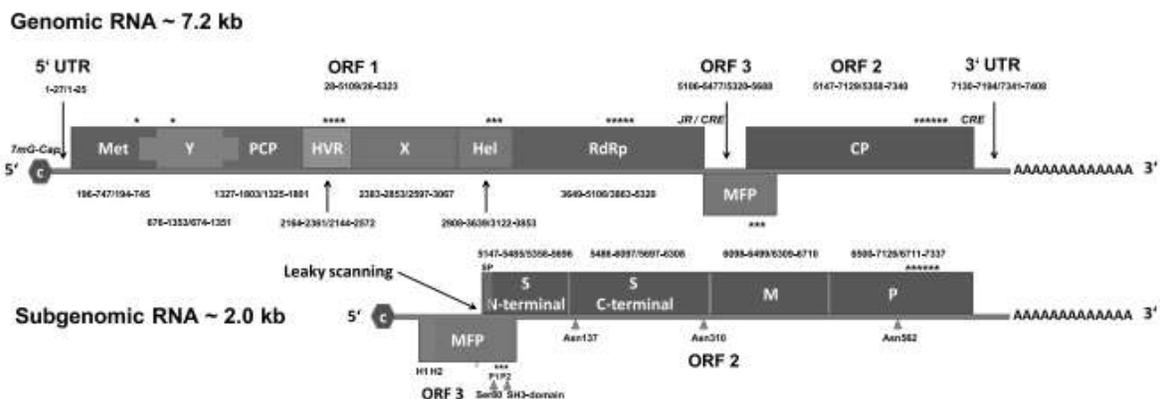


Ilustración 1. Descripción esquemática del genoma del virus de la hepatitis E y sus proteínas virales. Hoang van Tong et al. / Hepatitis E Virus Mutations: Functional and Clinical Relevance (2016)

ORF2, ORF3 y ORF4, flanqueadas en los extremos 5' y 3', por dos regiones no traducidas (NTR). ORF1 se encarga de codificar poliproteínas no estructurales y enzimas que incluyen una gran lipoproteína de 1 693 aminoácidos, proONF1 que presenta varias funciones responsables de la replicación viral como la metiltransferasa (MeT), la helicasa de RNA (Hel), RNA-polimerasa dependiente de RNA (RdRp), y la cisteín-proteasa análoga a la papaína (Cys-Prot). De estas, la MeT es esencial para la infectividad y replicación de VHE. La ORF2 codifica una proteína de 600 aminoácidos, porORF2, que es una proteína de la cápside viral. Dicha proteína contiene tres dominios lineales: dominio S que forma la cápside, y los dominios M y P que se relacionan con la interacción del virus-célula huésped. El dominio P es el blanco de las vacunas en desarrollo, debido a que queda en el exterior de la cápside viral. ORF3, sobrepuesta con ORF2, codifica una fosfoproteína, proORF3, de 114 aminoácidos, esta proteína es prescindible para la replicación *in vitro*, ya que puede modular la señalización celular. ORF4 se ha descrito recientemente y codifica para una proteína de 158 aminoácidos en asociación con ORF1. Esta proteína está involucrada en la replicación de VHE-1, al interactuar con múltiples proteínas virales (Helicasa, RdRp) y factores del

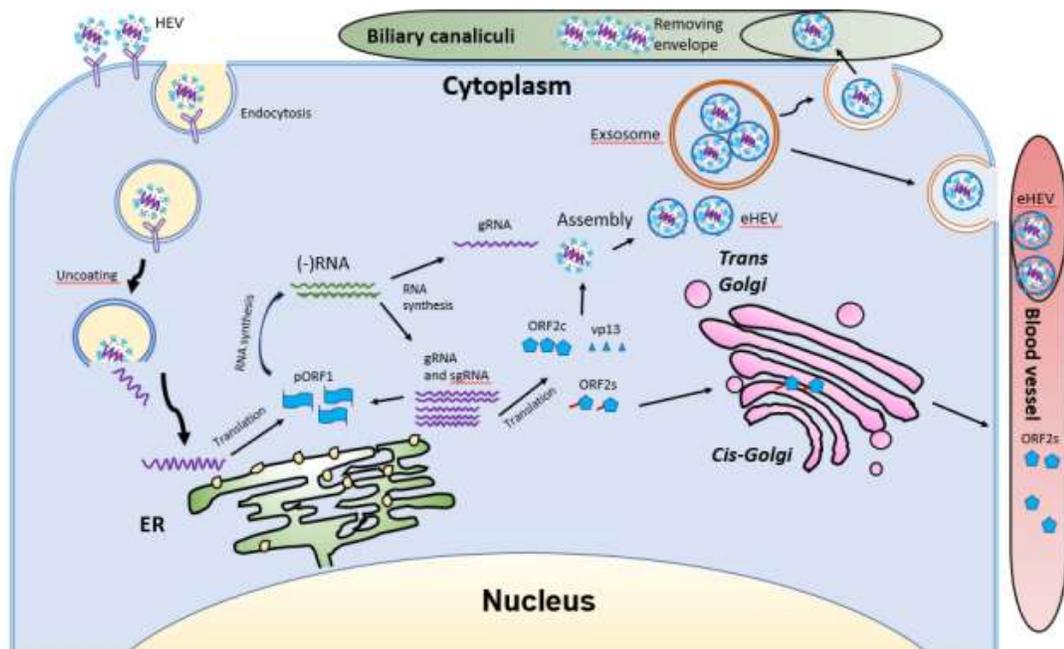


Ilustración 2. Descripción del ciclo del virus de la hepatitis E ²¹

hospedero como la isoforma 1 del factor 1 eucariótico de elongación (eEF1 α 1) y la β tubulina.⁵⁻⁸

A pesar de que el ciclo replicativo del VHE, es similar al ciclo de otros tipos virales, todavía se requieren estudios detallados de este proceso. El VHE se adhiere a la célula por medio de la interacción con ORF2, el cual se une a los receptores como el heparán sulfato y la proteína de shock térmico 70 (HS70) y penetra la célula por medio de actinas dependientes de endocitosis. Posteriormente, el virión libera su RNA viral en el citoplasma, el virus utiliza la maquinaria del hospedero para traducir proteínas ORF1 que incluyen enzimas virales. El genoma viral se replica por la participación de helicasa RNA viral y RdRp, al igual que ORF2 y ORF3. El complejo de replicación ocurre en los compartimientos retículo endoplásmico-Golgi. El ensamblaje del RNA y ORF2, forman las partículas de progenie viral, las cuales son liberadas desde las células del hospedero a través de los complejos de clasificación endosomal requerida para la maquinaria de transporte (ESCRT).⁵

La proteína GRP78, también conocida como BiP (binding immunoglobulin protein) es una chaperona molecular que se encuentra en el retículo endoplásmico. Sin embargo, la presencia de GRP78/BiP en la superficie celular se ha visto implicada en la unión y entrada del virus. GRP78/BiP se une a p239 VLPs tanto en modelos celulares como en co-inmunoprecipitados.¹⁷⁻²⁰

Variabilidad genética e implicación clínica del VHE

Basándose en la filogenia y el genoma viral completo, se han identificado siete genotipos del VHE pertenecientes a la familia de *Orthohepevirus A*. Cuatro genotipos, VHE-1 a VHE-4, han sido bien reconocidos como patógenos humanos mientras que el VHE-5 y VHE-6 solo se han identificado como causa de infección en animales. El VHE-7 se ha relacionado actualmente y en pocos casos a hepatitis crónica en humanos con trasplante hepático.^{8,9}

Los genotipos de VHE tienen diferentes reservorios, distinta distribución y patrones de transmisión. El VHE-1 está restringido únicamente a humanos y se ha aislado en brotes epidémicos y casos esporádicos de Asia. El VHE-2 también restringido únicamente en humanos e incluye una cepa única aislada en África Central y México, el VHE-3 se ha aislado en humanos y porcinos y tiene una distribución global con un ligero predominio en países industrializados de Europa y Norte América. El VHE-4 también se ha encontrado en humanos y porcinos, en localizaciones principalmente de Asia y Europa, y el VHE-7 se ha reportado en humanos y camélidos principalmente en Medio oeste. Con estos datos queda establecido que el medio de transmisión de VHE-1 y VHE-2 es por vía fecal-oral por la contaminación de alimentos y agua, y los VHE-3, VHE-4 y VHE-7 se han asociados a transmisión zoonótica.

Se ha encontrado relación entre el curso clínico en las infecciones sintomáticas y el genotipo de VHE. La hepatitis aguda severa se ha asociado más frecuentemente a VHE-1 y VHE-2; sin embargo, no se ha relacionado a hepatitis crónica a diferencias del VHE-3, VHE-4 y VHE-7 no solo ocasiona hepatitis aguda, sino que están ampliamente relacionadas a hepatitis crónica principalmente en paciente inmunocomprometidos. El VHE-1 se asocia a falla hepática fulminante en mujeres embarazadas, el VHE-4 se relaciona a peores resultados que infecciones por VHE-3.¹

Vías de transmisión y periodo de incubación del virus de la hepatitis E

En humanos se observado un periodo de incubación de 4-5 semanas que puede variar desde 2 hasta 10 semanas. Se han descrito cinco vías de transmisión de VHE: 1) fecal-oral, 2) ingesta de alimentos contaminados, 3) transfusión de productos contaminados, 4) transmisión vertical (madre-hijo) y 5) por contacto directo con sujetos infectados.¹

Epidemiología de la infección por VHE

Se ha observado que la infección por VHE es probablemente la causa más frecuente de hepatitis aguda a nivel mundial y se estima que un tercio de la población mundial ha estado infectada por este agente viral. El VHE se ha determinado como la causa principal de la hepatitis aguda en adultos en Centroamérica y en el Sudeste asiático, y la segunda causa de hepatitis aguda, después de la hepatitis B en Oriente medio y en África del Norte. Sin embargo, en países desarrollados, la principal causa de **hepatitis** aguda sigue siendo el virus de hepatitis A (VHA). En contraste con la incidencia geográfica, la prevalencia geográfica de anticuerpos anti-VHE es mundial, con prevalencia mayor en países desarrollados de hasta 70% en algunos países, dejando muy por debajo la de anti-VHA. El verdadero número de las infecciones por VHE es controversial, por lo que se ha propuesto que el número de infecciones asintomáticas es el doble de las infecciones sintomáticas.¹⁰

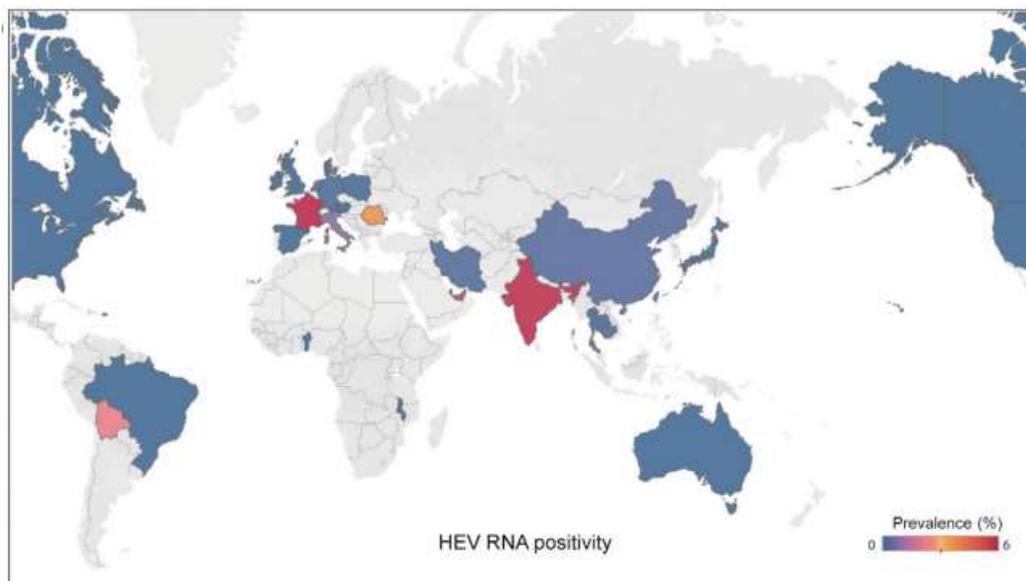


Ilustración 3. Distribución mundial de la hepatitis E con RNA viral positivo²²

En México, la mayoría de los casos reportados de hepatitis viral consisten en hepatitis A, B y C, de cualquier manera, existen miles de casos reportados anualmente con etiología indeterminada. Panduro et al. reporto en un estudio que

8982 casos no se identificó agente etiológico en un periodo de un año. Algunos estudios han establecido una prevalencia de 1.2 a 15% en el país. La mayoría de los estudios se realizaron en la población adulta. López-Santaella et al. publicaron en el año 2019, un estudio de la prevalencia de VHE en pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez, utilizando ELISA y RT-PCR encontrando la seroprevalencia del 3%, resultado que se relaciona a otros estudios en población pediátrica, y de 54.5% por RT-PCR. Además, de un par de casos que correspondieron a la variante que infecta cerdos, por lo que se describe por primera vez casos de zoonosis. ⁽²⁾

En una revisión sistemática global realizada en el año 2014 por Verghese y Robinson¹³ se pudo evidenciar el incremento de la infección por VHE; entre los países estudiados se encuentra México reportando en 2 años un total de 1848 niños entre 1 y 19 años de edad de los cuales el 1.1% se encontraban entre 1 y 4 años, el 4.4% entre 5 a 14 años y el 9.6 % de 15 a 19 años. Siendo el grupo de adolescente el que más prevalencia tiene de estos casos.

Características histopatológicas de la hepatitis E

En años recientes, se ha intentado determinar principalmente en estudios retrospectivos las características histopatológicas de la hepatitis E. Hasta el momento, únicamente se han observado y registrado cambios relacionados a falla hepática fulminante, un curso clínico visto frecuente en mujeres embarazadas. Los cambios observados pueden causar hepatitis de interfase caracterizado por inflamación lobulillar y portal, principalmente por células plasmáticas, proliferación ductular, esteatosis graduada, fibrosis y cirrosis. A nivel de los hepatocitos, se puede observar degeneración globoide, multinucleación, daño de los conductos biliares, prominencia de las células de Kupffer y colestasis intracelular e intracanalicular. Estos datos no son patognomónicos, pero podrían orientar a la búsqueda etiológica de VHE.¹¹

Vergheze y Robinson¹³ en su revisión sistemática demostraron que el mayor porcentaje de los niños que presentaron infección por VHE tuvieron hallazgos histopatológicos de necrosis hepática masiva (44 casos) de los cuales 19 niños fallecieron por el daño extenso.

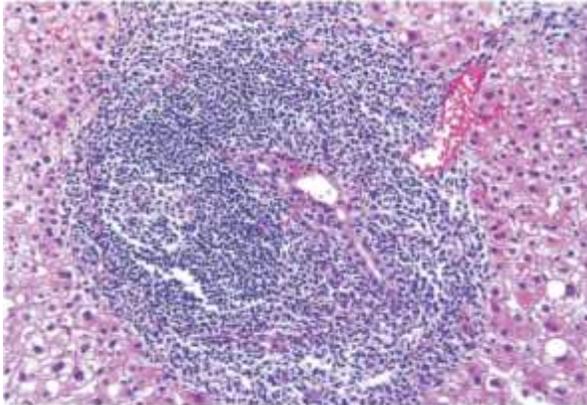


Ilustración 4. Infiltrado inflamatorio de predominio linfocítico en un espacio portal, es una de las características histopatológicas de la hepatitis crónica

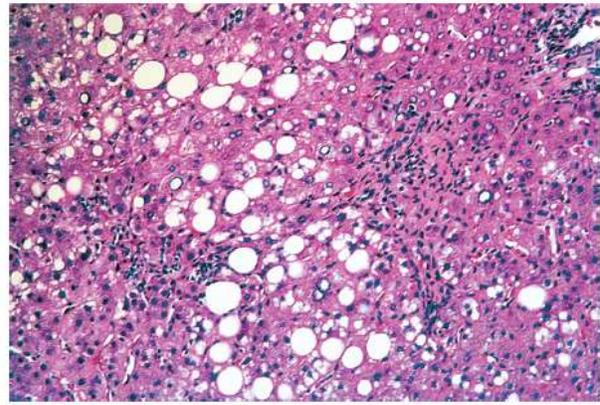


Ilustración 5. Daño hepatocelular extenso en una hepatitis crónica, se observa necrosis en sacabocado, degeneración globoide e infiltrado inflamatorio de predominio linfoplasmocitario.

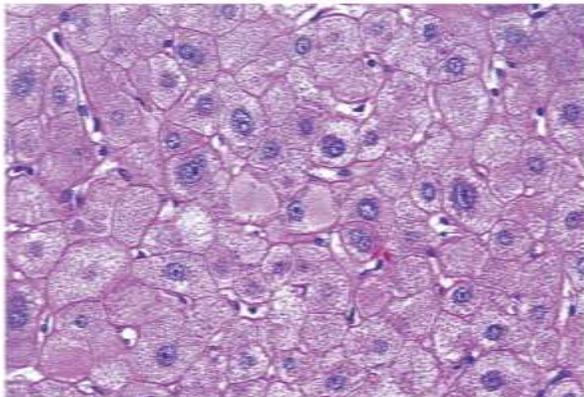


Ilustración 6.. Hepatocitos con degeneración globoide, Ilustración 7. Hepatocito con cambios apoptoticos en el el citoplasma esta expandido y con característica de contexto de una hepatitis crónica.

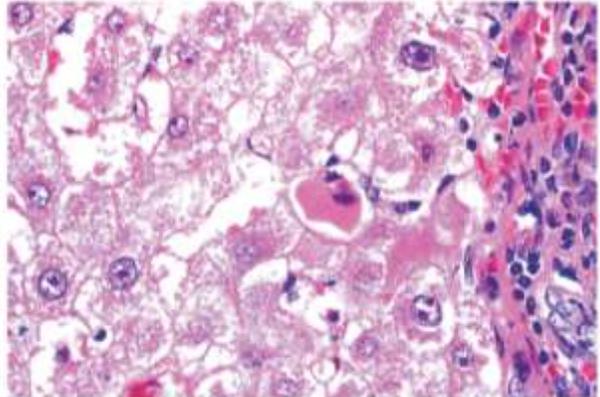


Ilustración 7. Hepatocito con cambios apoptoticos en el el citoplasma esta expandido y con característica de contexto de una hepatitis crónica.

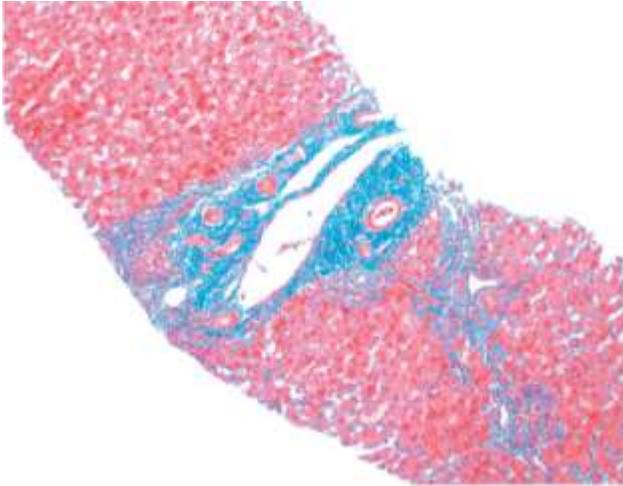


Ilustración 8. Vista en panorámica de una fibrosis estadio 2 en donde se puede observar la fibrosis (azul) portal y periportal. tinción de tricrómico de Masson.

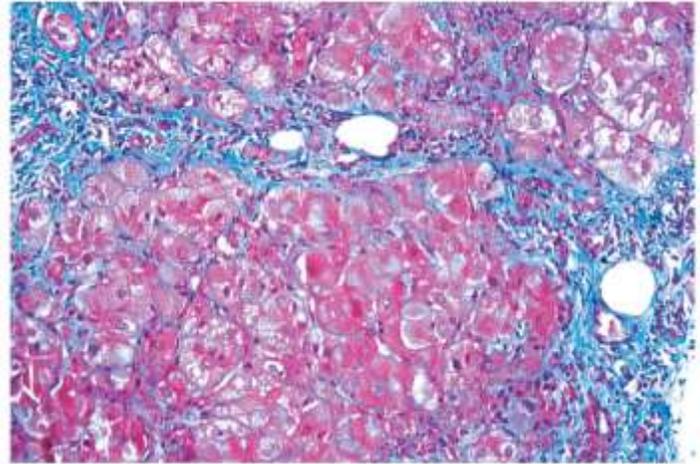


Ilustración 9. Vista a 40x de una fibrosis estado 3 con tricrómico de Masson (azul).

Infección crónica por VHE

Recientemente se han reportado pequeñas series de casos pediátricos en el año 2012^{14,15} sobre casos persistentes de infección por VHE con elevación prolongada de las aminotransferasas y viremia crónica principalmente en niño inmunocomprometidos, en especial los que han recibido recientemente un trasplante de órgano sólido, así como infección por VIH y neoplasias hematológicas. Estos pacientes desarrollaron una hepatitis crónica y continuaron excretando el virus por vía fecal incluso 24 meses posteriores al diagnóstico. En estos pacientes se desconoce si la infección fue adquirida por el donador o por exposición posterior al trasplante y los tratamientos anti rechazo.

En una de las series de casos¹⁵ se reportó que 14 niños presentaron cirrosis hepática 10 años posteriores al trasplante, aunque en solo uno de ellos se pudo encontrar RNA de VHE.

Otra serie de casos pediátricos¹⁶ estudió casos de paciente con trasplante de médula ósea por neoplasias hematológicas. Estos pacientes desarrollaron cirrosis hepática con hipertensión portal. El genotipo de VHE encontrado en estos pacientes fue el tipo 3, sin embargo, ninguno de estos pacientes había viajado a una zona

endémica y se concluyó que estos pacientes adquirieron la infección a través de agua y comida contaminada.

Hepatitis crónica de etiología indeterminada y virus de la hepatitis E en pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez

Los datos obtenidos en estudios previos sobre la incidencia y prevalencia de la infección causada por VHE, concluyen que un tercio de la población ha sido infectada pero la presentación es subclínica con una respuesta inmune limitada. Sin embargo, un número de casos puede evolucionar a una hepatopatía crónica o una respuesta clínica fulminante, por lo tanto, es importante la búsqueda intencionada de este agente etiológico en las biopsias hepáticas con diagnóstico de hepatitis crónica de etiología indeterminada, con el propósito de dar un seguimiento y vigilancia de dichos pacientes. En el año 2017, se realizó un estudio en el Hospital Infantil de México, donde se determinó que el 14% de todas las biopsias de hígado corresponde a diagnósticos de hepatitis crónica de etiología indeterminada. En el estudio se analizaron biopsias con dicho diagnóstico en las cuales se descartó la presencia de VHA, VHB, VHC y VHD. Al realizar la detección del RNA de VHE se concluyó que el 40% de los casos analizados fueron positivos para dicho agente, con una mayor incidencia en el sexo femenino.¹²

3. Planteamiento del problema

Las enfermedades hepáticas son un grupo de padecimientos que causan daño agudo y crónico a los individuos, llegando incluso a falla del órgano que podría llegar a un desenlace tortuoso. Un gran número de microorganismos son afines o pueden infectar y afectar al hígado, los más frecuentes son los virus de la hepatitis, principalmente el B y el C.¹⁻² Actualmente, existe extenso conocimiento de estos agentes, y el daño que provocan al tejido hepático, sin embargo, numerosos reportes afirman que la infección causada por VHE se encuentra en aumento. A pesar de lo anterior al momento del abordaje del paciente, se tiene que buscar como causa etiológica otros agentes y microorganismos, dejando relegada la búsqueda para VHE. En los padecimientos crónicos como la hepatitis crónica, está indicada la toma de biopsias hepáticas para valorar la extensión del daño y la respuesta al tratamiento para estos pacientes, que realizar una búsqueda para VHE empleando técnicas empleada rutinariamente en los laboratorios de Patología, como las reacciones de inmunohistoquímica: sería un gran paso para poder identificar el agente etiológico de los pacientes que hasta el momento de la biopsia, no cuenten con una causa de la lesión hepática.

4. Pregunta de investigación

¿Cuál será la marcación por inmunohistoquímica para proteínas BiP y eEF1 α 1 en los casos de hepatitis crónica de etiología indeterminada con RT-PCR positiva para Virus de la Hepatitis E?

5. Justificación

Las biopsias hepáticas con diagnóstico de hepatitis crónica de etiología indeterminada, son aquellas en las cuales no se ha encontrado asociación con infección por los virus de hepatitis A, B, C y D o algún otro agente viral. Estos casos

representan hasta el 14%, del total de estos casos, y son frecuentemente relacionados cambios histopatológicos extensos. Actualmente, se han documentado marcadores biológicos relacionados a la presencia y replicación vírica del VHE en las células del hospedero: como la proteína BiP (marcador de estrés de retículo endoplásmico: respuesta que promueve la replicación del VHE) (referencia), eEF1 α 1 (factor de elongación eucarionte, se asocia a replicación del VHE) (referencia) y TBK1 (TANK-binding kinase, inhibidor de la activación de interferón como respuesta a la infección por el VHE) (referencia), los cuales pueden determinarse por estudios de inmunohistoquímica en el tejido de las biopsias de los pacientes afectados. Al realizar el estudio de estos marcadores en biopsias con diagnóstico de hepatitis crónica de etiología indeterminada, se podrá determinar si la presencia de VHE en estas biopsias está relacionada a eventos de replicación viral (eEF1 α 1) y a ensamble viral (BiP)

6. Hipótesis

Los casos positivos al VHE por RT-PCR en biopsias con diagnóstico histopatológico de hepatitis crónica de etiología indeterminada presentarán una marcación positiva en reacciones de inmunohistoquímica para los marcadores biológicos BiP y eEf1 α 1.

7. Objetivos

Objetivo general

Identificar los marcadores biológicos descritos en modelos de infección *in vitro* por VHE en casos con diagnóstico histopatológico de hepatitis crónica de etiología indeterminada, del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Objetivos específicos

1. Determinar la positividad y negatividad para BiP e eEF1 α 1 en casos de hepatitis crónica de etiología indeterminada que cuenten previamente con una prueba molecular para VHE.
2. Determinar la presencia de VHE por medio de RT-PCR, en los casos con diagnóstico de hepatitis crónica de etiología indeterminada que no cuenten con ella.
3. Correlacionar la frecuencia de hepatitis crónica de acuerdo a sexo y grupo etario.
4. Correlacionar la frecuencia de hepatitis crónica asociada a VHE por sexo y grupo etario.
5. Determinar el grado de fibrosis hepática asociado a la hepatitis crónica.

8. Metodología

Diseño del estudio

Se realizará un estudio transversal, descriptivo y observacional.

Población del estudio

Paciente que cuenten con diagnóstico histopatológico de hepatitis crónica de etiología indeterminada realizado en el servicio de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez del año 2004 a 2019.

Criterios de inclusión

- Biopsias de pacientes con diagnóstico histopatológico de Hepatitis crónica con o sin fibrosis realizado en el servicio de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez

Criterios de exclusión

- Biopsias de pacientes que no cuenten material suficiente en el bloque de parafina para la realización de marcadores de inmunohistoquímica.
- Biopsias de pacientes con diagnóstico de hepatitis crónica que tengan diagnóstico clínico de enfermedades que causen daño hepático crónico como hepatitis autoinmune, hepatitis crónica por Virus de la Hepatitis C, Hepatitis crónica por virus de la Hepatitis B, Hepatitis crónica asociada a Virus de Epstein Barr, Cirrosis hepática congénita, etc.

Muestreo y tamaño de muestra

El tipo de muestreo será no probabilístico, por conveniencia. Acorde al número de casos encontrados en el archivo del Servicio de Patología.

Materiales

Los materiales necesarios para realizar este protocolo serán los siguientes:

1. Personal:
 - a. Alumno: Dra. Zindy Jair Durán Reyes
 - b. Tutor principal: Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero
 - c. Tutor metodológico: Dr., Carlos Alberto Serrano Bello
 - d. Segundo tutor: Dra. María Argelia Escobar Sánchez
 - e. Técnico en inmunohistoquímica para realización de las reacciones
 - f. Técnico de histología para los cortes histológicos

g. QFB Tayde López Santaella para realización de RT-PCR

2. Materiales:

- a. Libreta de archivos del servicio de Patología
- b. Bloques de parafina y laminillas que incluyen tinciones de hematoxilina y eosina, ácido periódico de Schiff, ácido periódico de Schiff con diastasa, retículo, orceína, Masson y Perls.
- c. Reacciones de inmunohistoquímica para BiP y eEF1 α 1
- d. Computadora portátil
- e. Material para RT-PCR del servicio del Departamento de Investigación en Patología Experimental.

Métodos

Realización de base de datos

Se realizará la base de datos con los casos obtenidos de la tesis del año 2017 titulada “Detección de RNA de VHE en pacientes con Hepatitis crónica de etiología indeterminada del Hospital Infantil de México Federico Gómez del año 2004 al 2014” que todavía cuenta con materiales óptimos para la obtención y realización de los estudios de inmunohistoquímica y RT-PCR. Se complementarán estos casos con la búsqueda de nuevos casos hasta el año 2019 de los cuales se cuenta con material en el Servicio de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Se obtendrán otros datos como sexo y edad.

Realización de reacciones de inmunohistoquímica

Se realizará la valoración de las laminillas y los bloques de parafina para determinar si poseen la cantidad óptima de tejido para realizar las reacciones e inmunohistoquímica. Al seleccionar estos casos se procederá a la realización de las reacciones de inmunohistoquímica de los siguientes marcadores biológicos:

- **Isoforma 1 del factor 1 eucariótico de elongación (eEF1 α 1)**: proteína que interactúa con ORF4 del virus de la hepatitis E provocando la estimulación de la actividad viral de la RNA polimerasa dependiente de RNA con consecuente estrés del retículo endoplásmico y replicación viral.
- **BiP**: proteína relacionada en la interacción de las proteínas de cápside y factores del hospedero para la unión viral.

Se realizará el procedimiento de la siguiente manera:

1. Se realizaron cortes de 3-4 μ m y se desparafinaron en 3 baños de xilol por 5 minutos cada uno. Posteriormente se hidrataron con 2 baños de alcohol al 100% y 2 baños de alcohol al 95%, cada baño de 3 minutos y por último un baño de agua corriente por 30 segundos.
2. Seguido se realizó lavado con agua destilada y la recuperación antigénica en baño termorregulado, la solución recuperadora se diluyó 1:10, se dejó incubar por 40 minutos a 90-95°C, luego se dejó enfriar por 20 minutos a temperatura ambiente.
3. Se lavó con agua destilada por 1 minuto y se marcó la zona de tejido a estudio con lápiz hidrófobo y se mantuvieron los cortes con buffer de lavado
4. Se realizó el bloqueo con albúmina al 3% por 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Posteriormente se realizaron 5 lavados de 2 minutos cada uno con buffer de lavado. Seguido se realizó la incubación del anticuerpo primario por 60 minutos a temperatura ambiente
6. Se realizó 5 lavados de 2 minutos cada uno con buffer de lavado y se incubó con el anticuerpo secundario (diluido 2:1 en buffer) por 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Posteriormente, se realizó 5 lavados a 2 minutos cada uno con buffer de lavado.
8. Se dejó en incubación por 30 minutos a temperatura ambiente y otros 5 lavados de 2 minutos cada uno con buffer de lavado

9. Se reveló con 2 gotas de cromógeno de 1.5 ml de buffer y lavar con abundante agua. El contraste se realizó con Hematoxilina por 3 minutos.

Realización de RT-PCR para VHE

Se realizará la extracción de RNAm total se realizará en tejido fijado en formol e incluido en parafina de la siguiente manera:

1. Se colocará una cuchilla nueva para el microtomo la cual será limpia entre cada corte para eliminar ribonucleasas presentes.
2. Se eliminará el exceso de parafina del bloque con una hoja de bisturí nuevo para su mejor manejo.
3. Se realizarán cortes a 10 micras de grosor, los primeros 2 cortes serán eliminados y posteriormente se tomarán los 3 cortes siguientes de cada bloque y serán almacenados inmediatamente en un microtubo para evitar la degradación del RNA por el aire y/o humedad.
4. Los bloques procesados serán almacenados de manera adecuada y se colocará una capa fina de parafina para el cuidado del material restante.
5. Para la eliminación de la parafina de los cortes obtenidos se agregará 1 ml de xilol y se incubará 2 veces por 3 minutos a 42°C con agitación con centrifugación por 1 minuto en cada ocasión.
6. Posteriormente se realizará lavado con 1 ml de Et-OH absoluto por 3 minutos a temperatura ambiente y agitación con centrifugación a máxima velocidad en cada ocasión.
7. Se dejará evaporar el OH durante 5 minutos a temperatura ambiente y hasta que el tejido estuviera totalmente seco.
8. Para la digestión de los tejidos se agregará 350µl de buffer de digestión y se incubará a 42°C hasta que se desintegre el tejido.
9. Para la extracción del RNA se agregaron 600µ de Trizol con posterior agitación de la solución e incubación a 5 minutos a temperatura ambiente.
10. Luego se agregaron 200µ de cloroformo y se agitará nuevamente de manera vigorosa por 20 segundos para posteriormente incubarlo a 5

minutos a temperatura ambiente y centrifugación a alta velocidad por 5 minutos más.

11. El contenido acuoso se pasará a un nuevo tubo y se medirá el volumen extraído.
12. Se agregará 2 µl de glucógeno dentro de la muestra y un volumen de isopropanol. Se mezclará por inversión lentamente y se incubará toda la noche a -20°C.
13. Al día siguiente se centrifugará a máxima velocidad a 4°C por 20 minutos y se decantará la pastilla de RNA al fondo y se lavará con Et-OH al 75%.
14. Se centrifugará por última vez a máxima velocidad a 4°C por 10 minutos para eliminar el Et-OH y se dejará secar la pastilla a temperatura ambiente libre de ribonucleasas y se suspenderá en agua DEPC. El volumen del agua dependerá del tamaño de la pastilla obtenida en el proceso.
15. La pastilla de RNA obtenida se suspenderá en 30µl de agua tratada con DEPC y se colocará en cada muestra de 3 µl de buffer de DNasa 10X + 1µl de DNasa. Se incubará la solución a 15 minutos a 37°C y después de agregará 0.1 volúmenes de reactivo inactivador de la NDasa. Se incubará a 5 minutos con agitación a mitad de tiempo.
16. Se centrifuga por 1 minutos a máxima velocidad para que el reactivo inactivador de DNasa se quede en el fondo y se obtiene el sobrenadante en un nuevo microtubo para su almacenamiento a -20°C.

Para comprobar la integridad del RNAm se realizó una amplificación de un fragmento del gen GAPDH por RT-PCR de punto final.

Posteriormente para la realización del estudio de cada caso se realizó una amplificación de un fragmento de 250 nucleótidos de un segmento del genoma de VHE de la cepa México. Se utilizó la siguiente secuencia de iniciadores:

VHE F: *GAC AGA ATT AAT TTC GTC GGC TGG* Posición: 6265-6288

VHE R: *CTT GTT CAT GCT GGT TGT CAT AAT* Posición: 6437-6461

Se seleccionaron estos iniciadores ya que fueron usados previamente en el Laboratorio de Investigación en Patología Experimental para la detección de VHE en suero de pacientes de diversos servicios de nuestra institución. Estudio ya publicado en el año 2017. ¹²

Para verificar la presencia de VHE se realiza un análisis en electroforesis de acrilamida al 12% y tinción de plata. La determinar la presencia del VHE en el material de cada biopsia se debe de obtener el amplificado correspondiente.

Con los datos previos, se realizará una prueba de X^2 para evaluar las diferencias en la positividad a los marcadores biológicos, entre las muestras positivas y negativas al VHE. Se considerarán significativas cuando el valor de p sea < 0.05 .

9. Plan de análisis estadístico

Se busca un plan de análisis estadístico cualitativo. Una vez obtenidos los datos de la inmunomarcación de los marcadores biológicos establecidos asociados a la infección por virus de la hepatitis E (BiP y eE1 α 1) se realizará la comparación individualmente de los casos positivos y negativos con respecto a su positividad o negatividad a RNA de VHE en la genotipificación del virus en el estudio de tesis previa ⁽¹²⁾ y de los casos nuevos a los que se les realizará la tipificación. Se realizará estadística descriptiva para relación entre variables por medio de Chi cuadrada.

10. Definición de las variables

a) Variable independiente

Infección por virus de la hepatitis E

- Definición: La presencia de RNA viral en los hepatocitos, demostrada por genotipificación con RT-PCR.
- Definición conceptual:

- Positiva: presencia del RNA viral por medio de RT-PCR
- Negativa: ausencia del RNA viral por medio de RT-PCR

Tipo de variable: Cualitativa dicotómica

- Escala de medición:
 - Positiva
 - Negativa

b) Variables dependientes:

eEF1 α 1

- Definición: Isoforma 1 del factor 1 eucariótico de elongación, proteína que interactúa con ORF4 del virus de la hepatitis E provocando la estimulación de la actividad viral de la RNA polimerasa dependiente de RNA con consecuente estrés del retículo endoplásmico y replicación viral.
- Definición operacional:
 - Positiva: marcación de color ocre intensa en el citoplasma de los hepatocitos infectados por VHE
 - Negativa: sin marcación en el núcleo de los hepatocitos
- Tipo de variable: Cualitativa dicotómica
- Escala de medición:
 - Positiva
 - Negativa

BiP

- Definición: proteína relacionada en la interacción de las proteínas de cápside y factores del hospedero para la unión viral.
- Definición conceptual:
 - o Positiva: marcación de color ocre intensa en el citoplasma de los hepatocitos infectados por VHE
 - o Negativa: sin marcación en el núcleo de los hepatocitos
- Tipo de variable: Cualitativa dicotómica
- Escala de medición:
 - o Positiva
 - o Negativa

Hepatitis crónica

- Definición: inflamación del hígado que se prolonga durante un periodo de tiempo de por lo menos 6 meses y que presenta los hallazgos histológicos de procesos necro-inflamatorios, infiltrado inflamatorio mononuclear con o sin fibrosis.
- Tipo de variable: Cualitativa, nominal, dicotómica.
- Escala de medición:
 - o Presente
 - o Ausente

Actividad

- Definición conceptual: Presencia de infiltrado de células polimorfonucleares asociadas a un proceso crónico en el espacio porta y/o el lobulillo.

- Definición conceptual: Se evaluará con la Escala de Batt y Ludwig (ver anexo):
 - o Sin actividad: Sin necrosis ni inflamación
 - o Mínima/leve: daño hepatocelular leve con necrosis en sacabocado que involucra algunos espacios porta.
 - o Moderada: Daño hepatocelular moderado con necrosis en sacabocado de todos los espacios porta
 - o Severo: Daño hepatocelular extenso con formación de puentes necro-inflamatorios.

- Tipo de variable. Cualitativa ordinal

- Escala de medición:
 - o Sin actividad
 - o Mínima/Leve
 - o Moderada
 - o Severa

Fibrosis hepática

- Definición conceptual: acumulación de tejido conectivo en el parénquima hepático con formación de puentes de espacio porta a espacio porta o de espacio porta a vena central.

- Definición operacional: Escala de METAVIR para fibrosis hepática (ver anexo):
 - o Estadio 0: ausencia de fibrosis
 - o Estadio 1: fibrosis leve (fibrosis portal)
 - o Estadio 2: fibrosis moderada (fibrosis peri portal)
 - o Estadio 3: fibrosis avanzada (puentes de fibrosis entre espacios porta)
 - o Estadio 4: Cirrosis (puentes gruesos de fibrosis de espacio porta a venas centrolobulillar)

- Tipo de variable: Cualitativa ordinal

- Escala de medición:

- Estadio 0
- Estadio 1
- Estadio 2
- Estadio 3
- Estadio 4

c) Variables universales

Edad

- Definición conceptual: tiempo transcurrido en años y meses desde el nacimiento hasta la fecha de realización de la biopsia hepática.

- Definición operacional:

- Recién nacido: primeros 28 días de vida extrauterina
- Lactante: desde los 28 días de vida extrauterina hasta 1 año y 11 meses
- Preescolar: de los 2 años hasta los 4 años
- Escolar: de los 5 años hasta los 9 años
- Adolescente: de los 10 años hasta los 19 años

- Tipo de variable: Cuantitativa ordinal

- Escala de medición:

- Recién nacido
- Lactante
- Preescolar
- Escolar
- Adolescente

Sexo

- Definición conceptual: condición dada por la presencia de genitales femenino y masculino, datos obtenidos del expediente clínico.

- Definición operacional:
 - Femenino: Género gramatical, propio de la mujer
 - Masculino: Género gramatical, propio del hombre

- Tipo de variable: Cualitativa, nominal, dicotómica

- Escala de medición:
 - Femenino
 - Masculino

11. Consideraciones éticas

Con base en el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud en el Título Segundo, Capítulo I, Artículo 17, este proyecto se clasifica con una investigación sin riesgo debido a que no implica intervención directa con los pacientes.

Como parte de las consideraciones ética en investigación se salvaguardará la confidencialidad de los datos personales extraídos de los reportes de histopatología y tanto el protocolo de investigación como los resultados obtenidos en el estudio estarán abiertos al acceso público.

12. Resultados

Se realizó la valoración de los casos con hepatitis crónica de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión logrando reunir un total de 26 casos con los siguientes datos obtenidos de la información clínica proporcionada al momento de la biopsia:

TABLA 1. BASE DE DATOS DE CASOS ESTUDIADOS

No.	Biopsia	Sexo	Edad	Diagnóstico	Fibrosis	Genotipificación VHE
1	Q04-2373	F	9 a	Hepatitis crónica sin actividad	Estadio 3	Positivo
2	Q05-436-1	M	1 a	Hepatitis crónica sin actividad	Estadio 0	Positivo
3	Q05-436-2	M	1 a	Hepatitis crónica sin actividad	Estadio 0	Positivo
4	Q05-1603	F	8 a	Hepatitis crónica sin actividad	Estadio 0	Negativo
5	Q08-160-2	M	13 a	Hepatitis crónica con actividad extensa	Estadio 2	Sin resultado
6	Q08-523-1	M	10 m	Hepatitis crónicas sin actividad	Estadio 0	Positivo
7	Q08-1476	F	1 a	Hepatitis crónica con actividad leve	Estadio 0	Sin resultado
8	Q08-2207	M	17 a	Hepatitis crónica con actividad moderada	Estadio III	Positivo
9	Q09-247	M	17 a 9 m	Hepatitis crónica con actividad moderada	Estadio 2	Sin resultado
10	Q09-986-2	F	10 a	Hepatitis crónica granulomatosa con actividad leve	Estadio I	Sin resultado

11	Q09-1378-2	M	4 a 8 m	Hepatitis crónica con actividad moderada	Estadio 2	Sin resultado
12	Q09-2083-1	F	14 a	Hepatitis crónica con actividad mínima	Estadio 1	Sin resultado
13	Q09-2088-2	M	17 a	Hepatitis crónica con sin actividad	Estadio 0	Sin resultado
14	Q10-1875	F	11 a	Hepatitis crónica con actividad mínima	Estadio 0	Sin resultado
15	Q11-70-1	M	7 a 6 m	Hepatitis crónica con actividad mínima	Estadio 0	Sin resultado
16	Q11-70-2	M	7 a 6 m	Hepatitis crónica con actividad mínima	Estadio 0	Sin resultado
17	Q13-1290	M	17 a	Hepatitis crónica con actividad mínima	Estadio 0	Sin resultado
18	Q13-2112	F	8 a	Hepatitis crónica con actividad severa	Estadio II	Positivo
19	Q13-2126-3	M	16 a	Hepatitis crónica granulomatosa	Estadio 0	
20	Q14-1378	F	9 a	Hepatitis crónica con actividad mínima	Estadio 2	Sin resultado
21	Q14-2188-1	F	10 a 10 m	Hepatitis crónica con actividad leve	Estadio 0	Sin resultado
22	Q15-2123	M	1 m	Hepatitis crónica con actividad moderada	Estadio 2	Sin resultado
23	Q16-772	F	2 a	Hepatitis crónica con	Estadio 1	Sin resultado

24	Q16-922	F	1 a	actividad moderada Hepatitis crónica con actividad leve	Estadio 1	Sin resultado
25	Q18-1204	M	14 a	Hepatitis crónica con actividad moderada	Estadio 1	Sin resultado
26	Q18-2180	F	17 a	Hepatitis crónica con actividad leve	Estadio 0	Sin resultado

De los casos con los que se podrán trabajar para la realización de reacciones de inmunohistoquímica y genotipificación de RNA para VHE, se obtiene la siguiente relación por género:

TABLA 2. RELACIÓN POR GÉNERO

Género	Frecuencia	Porcentaje
Femenino	12	46.1%
Masculino	14	53.8 %
Total	26	100.0%

Se realizó división de los casos estudiados por grupos etarios como recién nacidos, lactantes, preescolares, escolares y adolescentes obteniendo los siguientes resultados:

TABLA 3. RELACIÓN POR GRUPO ETARIO

Grupo etario	Frecuencia	Porcentaje
Recién nacidos	0	0%
Lactantes	6	23.0%

Preescolares	1	3.8%
Escolares	7	26.9%
Adolescentes	12	46.1%
Total	26	100.0%

Se puede observar un menor número de casos, (total de 0) en la población de recién nacidos, sin embargo, esto se puede asociar a la definición clínica de hepatitis crónica en la que se establece que se hayan presentado con un mínimo de seis meses. A diferencia de los casos en adolescentes que equivalen a un 46.1% y se correlaciona con las actividades de los individuos asociadas a sus hábitos higiénicos y presentación de otras enfermedades.

Los cambios morfológicos que son reportados en los estudios histopatológicos para poder medir la intensidad y el daño de la hepatitis crónica son en primer lugar, la actividad. Se reportan los siguientes resultados:

TABLA 4. ACTIVIDAD DE LA HEPATITIS CRÓNICA

Actividad	Frecuencia	Porcentaje
Sin actividad	5	19.2%
Actividad leve	13	49.9%
Actividad moderada	6	23.0%
Actividad severa	2	7.6%
Total	26	100.0%

En la tabla se observa que las hepatitis crónicas presentan en su mayoría signos de actividad, sin embargo, estos son mínimos y ocasionan menor daño a largo plazo.

Otro dato histopatológico que se asocia a un, pero desenlace en los pacientes con hepatitis crónica es la fibrosis observada, valorada por la escalada de METAVIR. Se observaron los siguientes resultados:

TABLA 5. FIBROSIS HEPÁTICA

Género	Frecuencia	Porcentaje
Estadio 0	13	49.9%
Estadio 1	5	19.2%
Estadio 2	6	23.0%
Estadio 3	2	7.6%
Estadio 4	0	0%
Total	26	100.0%

La mayoría de las hepatitis crónicas no presentan ningún grado de fibrosis por lo que el pronóstico de los pacientes es mucho mejor y podría darse tratamiento oportuno.

Reacciones de inmunohistoquímica

Se realizaron las reacciones de inmunohistoquímica para la BiP con los siguientes resultados (ver anexo):

TABLA 6. RESULTADO DE INMUMNOHSITOQUÍMICA PARA BiP

Q04-2373	Negativo
Q05-436-1	Negativo
Q05-436-2	Negativo
Q05-1603	Negativo
Q08-160-2	Positivo
Q08-523-1	Negativo

Q08-1476	Positivo
Q08-2207	Negativo
Q09-247	Positivo
Q09-986-2	Positivo
Q09-1378-2	Positivo
Q09-2083-1	Negativo
Q09-2088-2	Positivo
Q10-1875	Positivo
Q11-70-1	Positivo
Q11-70-2	Positivo
Q13-1290	Positivo
Q13-2112	Negativo
Q13-2126-3	Negativo
Q14-1378	Positivo
Q14-2188-1	Positivo
Q15-2123	Positivo
Q16-772	Positivo
Q16-922	Positivo
Q18-1204	Positivo
Q18-2180	Positivo

El total de los casos positivos con marcación nuclear para BiP son los siguientes:

TABLA 7. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA BIP

Inmunomarcación	Frecuencia	Porcentaje
Positivo	17	65.3%
Negativo	9	34.6%
Total	26	100.0%

Se obtuvieron los siguientes resultados correlacionando la positividad nuclear de BiP en las biopsias con el sexo y el grupo etario de los pacientes en las siguientes gráficas:

TABLA 8. RELACIÓN POR GÉNERO CON BIP POSITIVA

Género	Frecuencia	Porcentaje
Femenino	8	47%
Masculino	9	52.9 %
Total	17	100.0%

TABLA 9. POSITIVIDAD PARA BIP POR GRUPO ETARIO

Grupo etario	Frecuencia	Porcentaje
Recién nacidos	0	0%
Lactantes	3	17.6%
Preescolares	2	11.7%
Escolares	2	11.7%
Adolescentes	9	52.9%
Total	17	100.0%

Se realizó la correlación entre los casos positivos para BiP y el grado de actividad y fibrosis de la hepatitis con los siguientes hallazgos:

TABLA 10. RELACIÓN BIP POSITIVA, ACTIVIDAD Y FIBROSIS

Caso	BiP	Actividad	Fibrosis
Q08-160-2	Positivo	Moderada	0

Q08-1476	Positivo	Leve	0
Q09-247	Positivo	Moderada	2
Q09-986-2	Positivo	Leve	1
Q09-1378-2	Positivo	Moderada	2
Q09-2088-2	Positivo	Sin actividad	0
Q10-1875	Positivo	Leve	0
Q11-70-1	Positivo	Leve	0
Q11-70-2	Positivo	Leve	0
Q13-1290	Positivo	Leve	0
Q14-1378	Positivo	Leve	2
Q14-2188-1	Positivo	Leve	0
Q15-2123	Positivo	Moderado	2
Q16-772	Positivo	Moderado	1
Q16-922	Positivo	Moderado	1
Q18-1204	Positivo	Moderado	1
Q18-2180	Positivo	Leve	0

TABLA 11. BIP POSITIVO CON ACTIVIDAD

Actividad	Frecuencia	Porcentaje
Sin actividad	1	5.8%
Leve	9	52.9%
Moderado	7	41.1%
Severo	0	0%
Total	17	100.0%

TABLA 12. BIP POSITIVA CON GRUPO ETARIO

Grupo	Frecuencia	Porcentaje
Recién nacido	0	0%
Lactante	3	17.6%
Preescolar	2	11.7%
Escolar	3	17.6 %
Adolescente	9	52.9%
Total	17	100.0%

Siendo la actividad leve y el grupo etario de adolescentes los más frecuentes en el grupo de casos positivos para BiP.

A continuación, se reportan los resultados de los casos para la reacción por inmunohistoquímica para eEf1 α 1 (ver anexo):

TABLA 13. RESULTADO DE INMUMNOHSITOQUÍMICA PARA eEF1 α 1

Q04-2373	Negativo
Q05-436-1	Negativo
Q05-436-2	Negativo
Q05-1603	Negativo
Q08-160-2	Negativo
Q08-523-1	Negativo
Q08-1476	Negativo
Q08-2207	Negativo
Q09-247	Negativo
Q09-986-2	Negativo
Q09-1378-2	Negativo
Q09-2083-1	Negativo

Q09-2088-2	Negativo
Q10-1875	Negativo
Q11-70-1	Negativo
Q11-70-2	Negativo
Q13-1290	Positivo
Q13-2112	Negativo
Q13-2126-3	Negativo
Q14-1378	Negativo
Q14-2188-1	Negativo
Q15-2123	Positivo
Q16-772	Positivo
Q16-922	Negativo
Q18-1204	Positivo
Q18-2180	Positivo

Se desglosa el total de casos que presentaron positividad citoplásmica para la proteína eEf1 α 1:

TABLA 14. INMUNOHITOQUÍMICA PARA EEF1A1

Inmunomarcación	Frecuencia	Porcentaje
Positivo	6	23.0%
Negativo	20	76.9 %
Total	26	100.0%

La relación de la marcación positiva para la inmunohistoquímica para eEf1 α 1 con el sexo y grupo etario son las siguientes:

TABLA 15. RELACIÓN POR GÉNERO CON EEF1A1 POSITIVA

Género	Frecuencia	Porcentaje
Femenino	2	40%
Masculino	3	60 %
Total	5	100.0%

TABLA 16. POSITIVIDAD PARA EEF1A1 POR GRUPO ETARIO

Grupo etario	Frecuencia	Porcentaje
Recién nacidos	0	0%
Lactantes	2	40%
Preescolares	0	0%
Escolares	0	0%
Adolescentes	3	60%
Total	5	100.0%

Resultados de RT-PCR para RNA de VHE

Únicamente se cuentan con resultados de RNA viral de 6 casos los cuales son los siguientes:

TABLA 17. GENOTIPIFICACIÓN DE RNA DE VHE¹²

Caso	Resultado
------	-----------

Q04-2373	Positivo
Q05-1603	Negativo
Q08-523	Positivo
Q08-2207	Positivo
Q13-2112	Positivo

Los resultados de la inmunohistoquímica para BiP y eEf1 α 1 relacionados con la genotipificación para VHE son los siguientes:

TABLA 18. RESULTADOS DE RNA PARA VHE E INMUNOHISTOQUÍMICA

Caso	VHE	BiP	eEf1 α 1
Q04-2373	Positivo	Negativo	Negativo
Q05-1603	Negativo	Negativo	Negativo
Q08-523	Positivo	Negativo	Negativo
Q08-2207	Positivo	Negativo	Negativo
Q13-2112	Positivo	Negativo	Negativo

El resto de la genotipificación no se pudo realizar por la situación actual.

13. Discusión

De todos los casos encontrado durante la realización de la base de datos únicamente 26 contaban con el material adecuado, como son laminillas con hematoxilina y eosina, tinciones especiales de histoquímica y bloques de parafina con material suficiente para la realización de reacciones de inmunohistoquímica y genotipificación por RT-PCR para VHE.

Se realizó una comparación de los casos con diagnóstico de hepatitis crónica con relación al sexo encontrando un ligero predominio en el sexo masculino con un 53.8 % comparado con el sexo femenino, sin embargo, hasta el momento no hay suficiente información para validar la diferencia de la hepatitis crónica entre ambos sexos.

En cuanto a la comparación de los casos de hepatitis crónica con los grupos etarios, se pudo evidenciar que la presencia de esta lesión crónica es proporcional a la edad, el mayor número de pacientes se encuentran en la adolescencia con un 46.1%. Estos datos se relacionan a lo establecido en la relación sistemática en la que se evidencia que, en México, el predominio de hepatitis crónica es en la adolescencia de 11 a 19 años.¹³ Estos datos pueden asociarse a que el daño hepático debe presentarse mínimo por 6 meses para poder realizar el diagnóstico de hepatitis crónica. Así como el cambio de hábitos higiénicos y alimenticios que van presentando los niños con el pasar de los años y al aumento en la exposición a posibles vectores y fómites.

En cuanto al grado de lesión de la hepatitis crónica de estos pacientes se observó que la mayoría de los pacientes presentan actividad mínima (49.9%) de la enfermedad que consiste daño hepatocelular leve, así como necrosis en sacabocado solo en algunos espacios porta. Estos hallazgos se correlacionan positivamente con el estadio de fibrosis, observando que la mayoría de los casos todavía no presentan fibrosis (49.9%).

En cuanto a la inmunomarcación citoplásmica para BiP, se observó que la mayoría de los casos (61.5%) fueron positivos, pero esto difiere de la inmunomarcación para

eEF1 α 1 en el cual se observó una disminución con un 40%. Solamente cinco casos presentaron positividad para ambos marcadores. A pesar de que hubo casos positivos únicamente para BiP, no hubo casos positivos únicamente para eEF1 α 1. Con estos datos se pudieron conformar tres grupos: 1) sin marcación, 2) Positividad para BiP y 3) Positividad para BiP y Eef1 α 1.

En cuanto a los resultados de la genotipificación solamente se cuentan con seis resultados de los cuales el 83.3% fueron positivas para RNA de VHE. Al realizar la comparación se esperaba que los casos positivos para VHE presentaran una inmunomarcación positiva para uno o ambos marcadores, sin embargo, al contrario, se evidenció que los casos con positividad para RNA de VHE presentaron negatividad para ambos marcadores.

Aun así, es indispensable realizar la genotipificación completa de los casos estudiados para poder establecer una relación adecuada entre las reacciones de inmunohistoquímica y la presencia de VHE, así como poder determinar si la presencia de VHE se asocia una mayor actividad de la enfermedad y al estadio de la fibrosis que se observan en las biopsias.

14. Conclusiones

1. Los datos aportados demostraron, contrario a lo esperado, que los casos con RNA para VHE son negativos para los marcadores biológicos propuestos. Sin embargo, es indispensable realizar la genotipificación a todos los casos estudiados para poder tener datos más fidedignos y llegar a conclusiones sustentadas con evidencias.
2. Hasta no realizar los estudios de RT-PCR, se concluye que los marcadores biológicos para BiP y eEF1 α 1 por inmunohistoquímica son negativos en casos con RNA para VHE, esto podría ayudar a entender mejor la marcación por inmunohistoquímica de estas proteínas y poder determinar su función como método diagnóstico.

15. Cronograma de actividades

ACTIVIDAD	JULIO 2020	AGOSTO 2020	SEPTIEMBRE 2020	OCTUBRE 2020	NOVIEMBRE 2020	DICIEMBRE 2020	ENERO 2021	FEBRERO 2021	MARZO 2021	ABRIL 2021	MAYO 2021
Selección y delimitación del tema	X										
Realización del protocolo de tesis		X									
Aprobación del protocolo de tesis		X									
Realización de base de datos			X	X							
Búsqueda de material en el archivo de Patología				X	X						
Valoración del material (laminillas y bloques)					X	X					
Realización de reacciones de inmunohistoquímica								X			
Realización de Genotipificación por RT-PCR											
Recolección de resultados									X	X	
Análisis de resultados										X	
Elaboración del manuscrito										X	
Revisión del manuscrito por los tutores										X	
Impresión de la tesis										X	
Entrega de la tesis											X

16. Bibliografía

1. *Hepatitis E: virología molecular, epidemiología y patogénesis*. **Francisco Rodríguez-Frías, Rosendo Jardi, María Bu.** s.l. : Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica, 2012, Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, págs. 624-634.
2. *Serological and molecular study of Hepatitis E virus in pediatric patients in Mexico*. **López-Santaella Tayde, Álvarez y Muñoz Teresa, Arenas-Huertero Francisco.** 2019, Annals of Hepatology.
3. *Estado actual de la hepatitis E*. **María Teresa Pérez García, María Luisa Mateos Lindemann.** s.l. : Medica clinical.
4. *The Clinical Perspective on Hepatitis E*. **Thomas Horvatits, Julian Schulze zur Wiesch, Marc Lütgehetmann, Ansgar W, Lohse, Sven Pischke.** s.l. : Viruses, 2019, Vol. 7.
5. *Hepatitis E Virus Mutations: Functional and Clinical Relevance*. **Hoang van Tong, Nghiem Xuan Hoan, Bo Wang, Heiner Wedemeyer, Thomas Bock, Thirumalaisamy P. Velavan.** 2016, EBiomedicine.
6. *Biological or pharmacological activation of protein kinase C alpha constrains hepatitis E virus replication*. **Wenshi Wang, Yijin Wang, Yannick Debing, Xinying Zhou, Yuebang Yin, Lei Xu.** 2017, Antiviral Research, págs. 1-12.
7. *Endoplasmic Reticulum Stress Induce Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus*. **Vidya P. Nair, Saumya Anang, Chandru Subramani, Abhilasha Madhvi, Karishma Bakshi.** 2016, PLOS PATHOGENS, págs. 1-31.
8. *Hepatitis E virus Methyltransferase Inhibits Type 1 Interferon Induction by Targeting ROG-1*. **Sangmin Kang, Changsun Choi, Insoo Choi, Kwi-Nam Han, Seong Woon Roh.** 2018, Journal of Microbiology and Biotechnology, págs. 1554-1562.
9. *Hepatitis E virus: An ancient hidden enemy in Latin America*. **Nora A Fierro, Mauricio Realpe, Tzintli Meraz-Medina, Sonia Roman, Arturo Panduro.** s.l. : World Journal of Gastroentology, 2016, Vol. 22. 2271-2283.
10. *Chronic hepatitis E: A brief review*. **Arvind R Muralll, Vikram Kotwal, Saurabh Chawla.** s.l. : World Journal of Gastroenterology, 2015, Vol. 19. 2194-2201.

11. *Histological and Immunohistochemical Features in Fatal Acute Fulminant Hepatitis E.* **Agrawal V, Goel A, Rawat A, Naik S, Aggarwal R.** 2012, Indian Journal of Pathology and Microbiology, págs. 22-7.
12. **Miriam Matus-Roman, Francisco Arenas-Huertero, Carlos Serrano-Bello.** Tesis. *Detección de RNA de Virus de la hepatitis E en pacientes con Hepatitis crónica de etiología indeterminada del Hospital Infantil de México Federico Gómez del año 2004 al 2014.* Ciudad de México : UNAM, 2017.
13. *A Systematic Review of Hepatitis E virus Infection in Children.* **Verghese Valsan, Robinson Joan,** 2014, Viral Hepatitis, (56) págs. 689-697
14. *Prevalence of hepatitis E virus infection in pediatric solid organ transplant recipients-a single-center experience.* **Hoernin A, Hegen B, Wingen A-M.** 2012, *Pediatr Transplant*; 16: 742-7
15. *Chronic hepatitis E infection in children with liver transplantation.* **Halac U, Beland K, Lapierre P.** 2012, *Gut*; 61:597-603
16. *Clinical presentation of hepatitis E virus.* **Aggrwal R.** 2011, *Virus Res*; 161:15-22
17. *Molecular Chaperone BiP Interacts with Borna Disease Virus Glycoprotein at the Cell Surface.* **Honda t, Horie M, Daito T, Ikuta K.** 2009, *J. Virol*; 83: 12622-12625
18. *Homology model and potential virus-capsid binding site of a putative HEV receptor Grp78.* **Yu H, Li S, Yang C, Wei M, Song C.** 2011, *J. Mol Model*; 17: 987.995
19. *Hepatitis E virus Entry.* **Xin Yin, Feng Zongdi.** 2019, *Viruses*; 11: 883
20. *Anvances in Hepatitis E virus Biology and Pathogenesis.* **Lin Shaoili, Zhang Yan-Jin.** 2021, *Viruses*; 13: 267
21. *Prevalence and risk factors for HEV infection in pregnant women.* **Oncu S, Okyay P, Erlug S.** 2006, *Med Sci Monit*; 12: 39-39.
22. *The global epidemiology of hepatitis E virus infection: A systematic review and meta-analysis.* **Li P, Liu J, Li Y, Su J, Ma Z, Bramer W.** 2020, *Liver international*; 40: 1516-1528.

17.Limitaciones del estudio

Por la situación actual de la contingencia por el COVID-19 el laboratorio de Investigación en Patología Experimental se mantuvo cerrado unos meses en el año 2020 por lo que se tuvo que posponer la realización de los estudios de RT-PCR para la genotipificación de los casos para búsqueda de RNA de VHE, no pudiendo recabar estos resultados para la entrega de este proyecto.

18. Anexos

Table 3 Metavir classification for staging of hepatitis C liver disease

No scarring	0
Minimal scarring	1
Scarring has occurred and extends outside the areas in the liver that contains blood vessels	2
Bridging fibrosis is spreading and connecting to other areas that contain fibrosis	3
Cirrhosis or advanced scarring of the liver	4

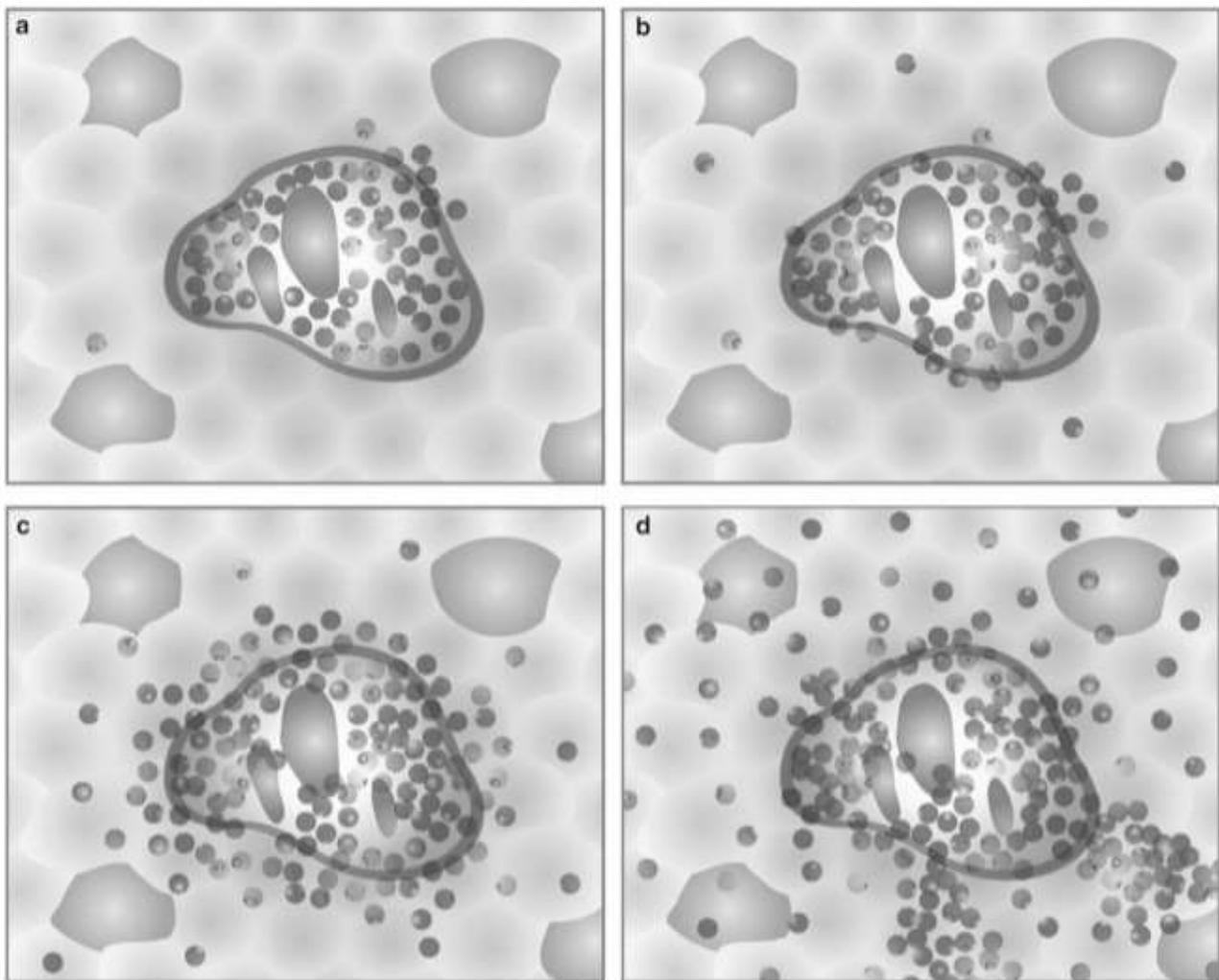
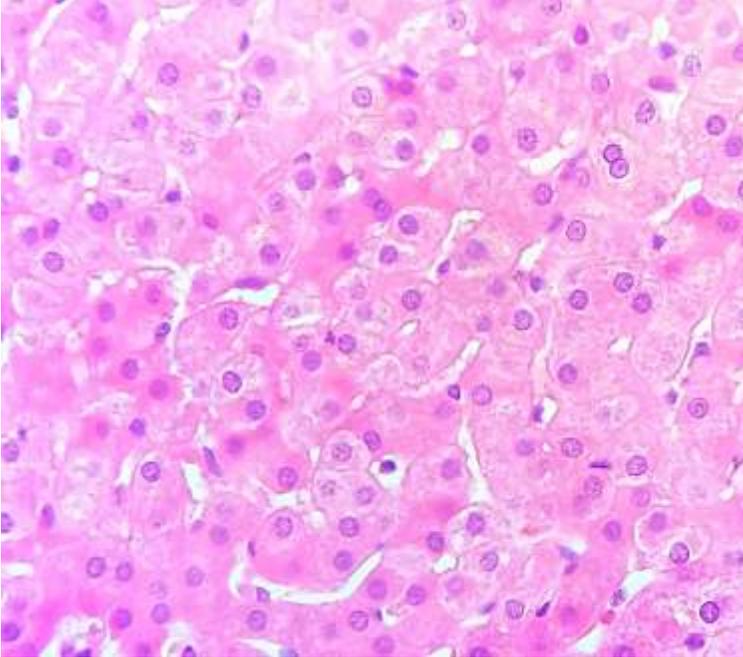
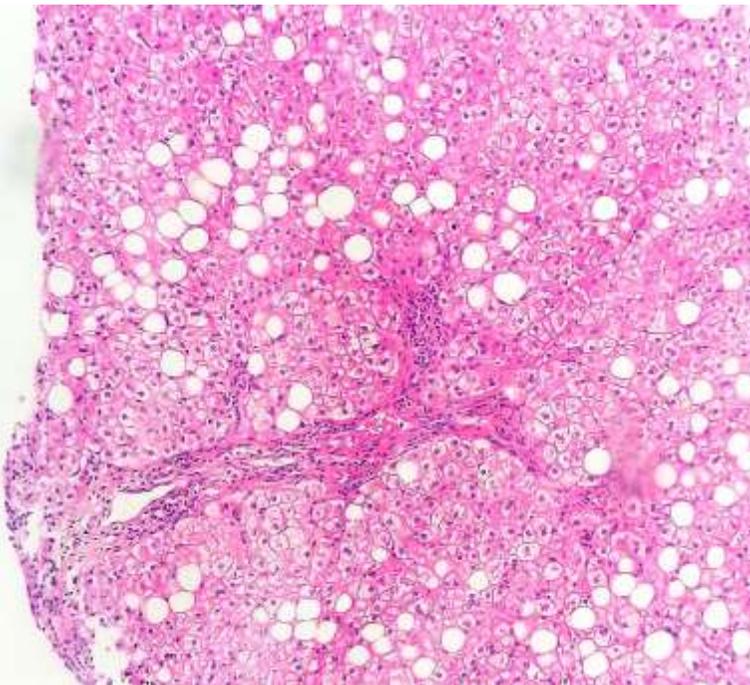


Figure 3 Batts-Ludwig diagrams of necroinflammatory activity. Note that all grades of activity contain portal inflammation; therefore, it is a defining feature of chronic hepatitis and not assessed separately from other necroinflammatory lesions. (a-c) Activity grades 1 through 3. Confluent necrosis, in the form of bridging necrosis, is present only in activity grade 4 (d). These versions adapted with permission from Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol* 1995;19:1409-1417.¹³

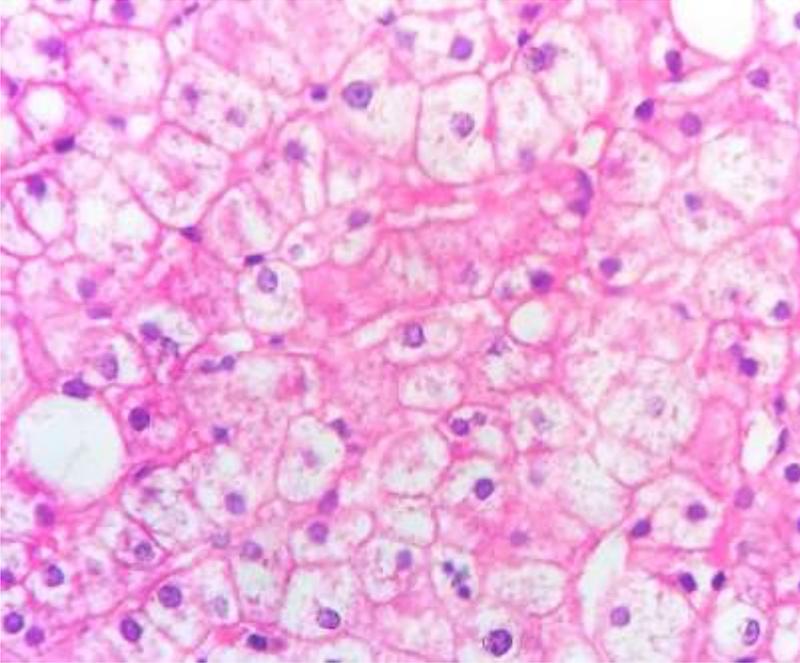
Caso de hepatitis crónica de etiología indeterminada con Hematoxilina y eosina y tinción de Masson



Se observan hepatocitos con patrón trabecular conservado, membranas citoplásmicas bien definidas. Caso diagnosticado como hepatitis crónica sin actividad con fibrosis estadio 0.



Caso diagnosticado como Hepatitis crónica con actividad moderada, fibrosis estadio 2.

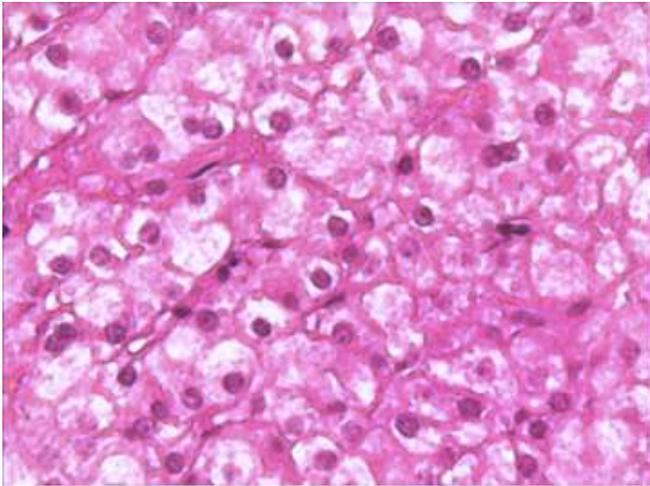


Caso diagnosticado como hepatitis crónica con actividad leve y fibrosis estadio 1. Se observan los hepatocitos en vidrio esmerilado.

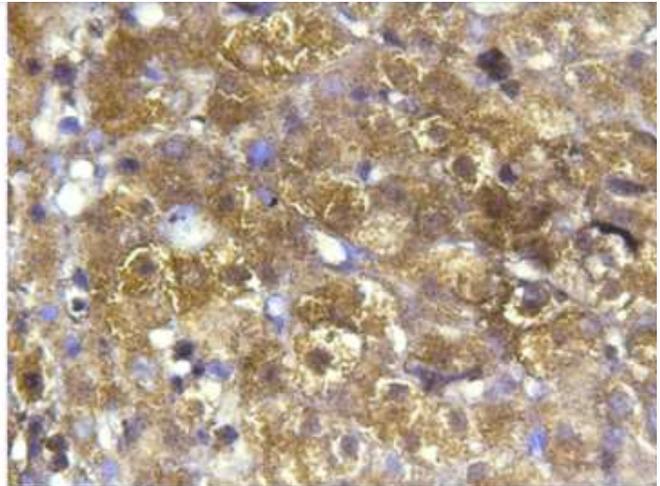


Caso previo donde se puede observar con la tinción de tricrómico de Masson la fibrosis en el espacio porta (Estadio 2).

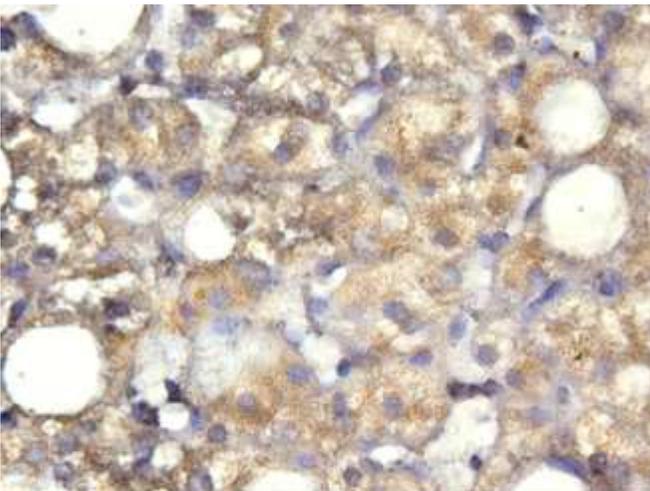
Casos de hepatitis crónica con positividad para reacción de inmunohistoquímica para proteína BiP.



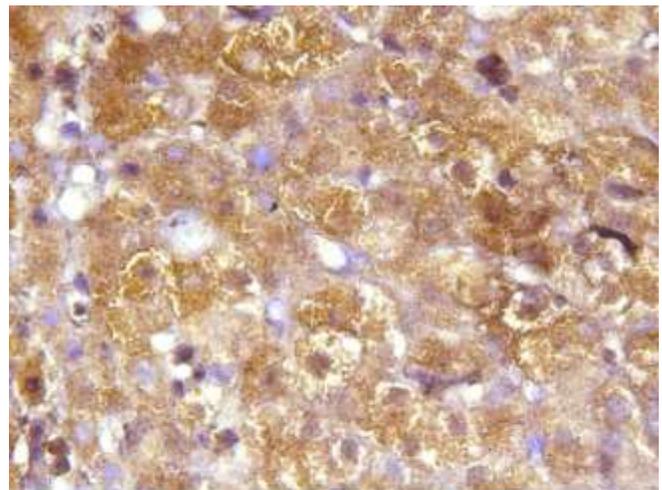
Q-14-1378. H&E



Q-14-1378. BiP

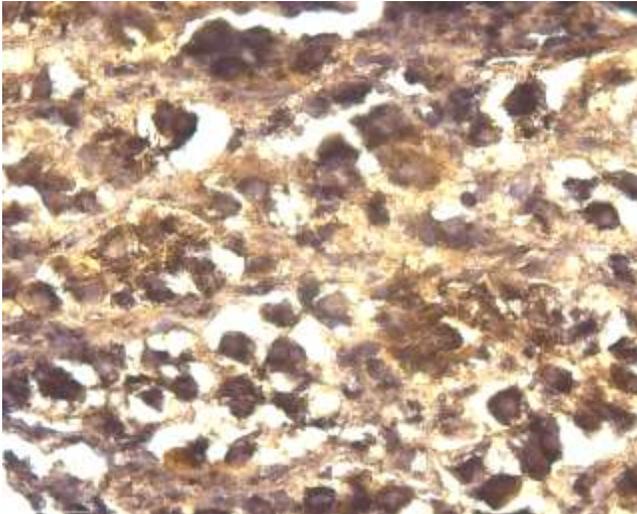


Q-09-986-2

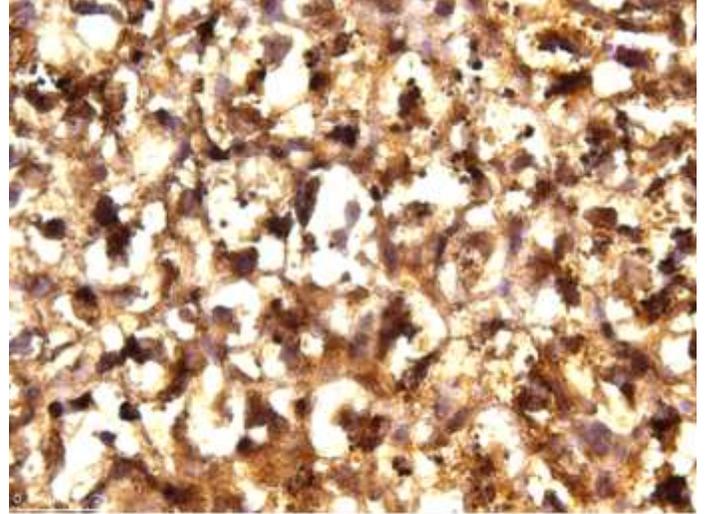


Q-14-1378

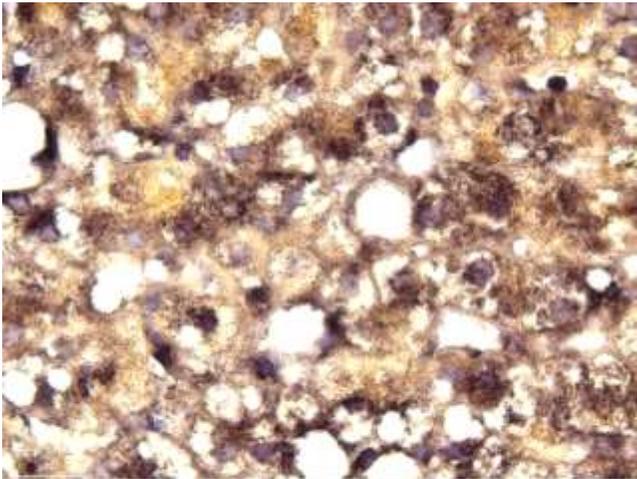
Casos de hepatitis crónica con positividad para reacciones de inmunohistoquímica para BiP y eEf1 α 1



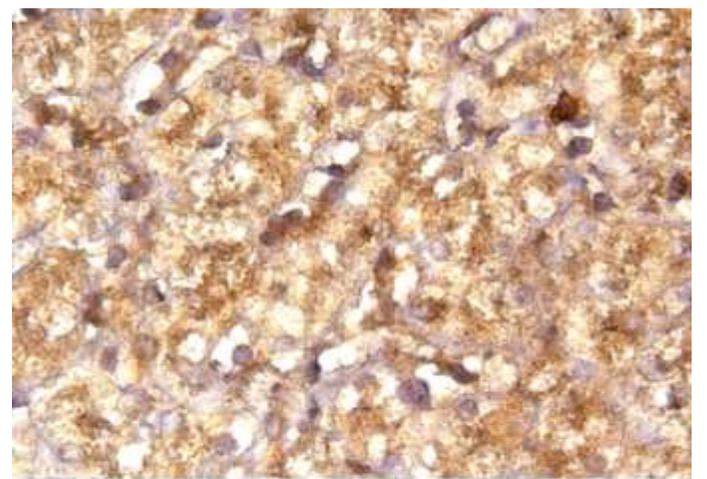
Q-16-772



Q-15-2123



Q-13-1290



Q-16-922