



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SECRETARÍA DE SALUD**

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**"FRECUENCIAS ALELICAS DE LAS VARIANTES Z Y S DEL GEN *SERPINA 1* CONDICIONANTES
DE DEFICIENCIA DE ALFA 1 ANTITRIPSINA EN NIÑOS MEXICANOS CON ENFERMEDAD
HEPÁTICA DE ETIOLOGIA NO DETERMINADA DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA"**

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE SUBESPECIALISTA EN:

GASTROENTEROLOGÍA Y NUTRICIÓN PEDIÁTRICA

PRESENTA:

DRA. INGRID GUADALUPE MARÚN HERNÁNDEZ

TUTOR DE TESIS:

DRA. FLORA ELVA ZÁRATE MONDRAGÓN

COTUTORES E INVESTIGADORES COLABORADORES

DRA. ARIADNA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL

DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA

ASESOR METODOLÓGICO

DR. SILVESTRE GARCIA DE LA PUENTE

INVESTIGADOR COLABORADOR

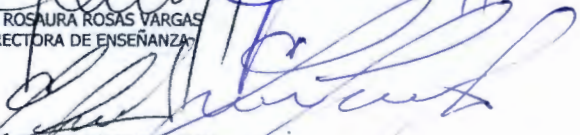
QUÍMICO MARIO DÍAZ MORALES



FRECUENCIAS ALElicas DE LAS VARIANTES Z Y S DEL GEN *SERPINA 1*
CONDICIONANTES DE DEFICIENCIA DE ALFA 1 ANTITRIPSINA EN NIÑOS
MEXICANOS CON ENFERMEDAD HEPÁTICA DE ETIOLOGIA NO
DETERMINADA DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA



DRA. ROSAURA ROSAS VARGAS
DIRECTORA DE ENSEÑANZA



DR. LUIS MARTIN GARRIDO GARCIA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO



DR. JAIME A. RAMIREZ MAYANS
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE GASTROENTEROLOGIA Y NUTRICION
PEDIATRICA.



DRA. FLORA ELVA ZÁRATE MONDRAGON
TUTOR DE TESIS



ÍNDICE

	Página
1. Resumen estructurado	2
2. Pregunta de investigación	4
3. Marco teórico y planteamiento del problema	4
4. Justificación	18
5. Objetivos	19
6. Clasificación de la investigación	19
7. Material y Métodos	20
8. Población objetivo y elegible	20
9. Criterios de inclusión	21
10. Tamaño de la muestra	21
11. Variables	22
12. Descripción general del estudio	22
13. Análisis estadístico e interpretación de resultados	24
14. Consideraciones éticas	24
15. Factibilidad	26
16. Resultados	27
17. Discusión	28
18. Conclusiones	30
19. Productos esperados	32
20. Cronograma	34
21. Bibliografía	35
22. Anexos	41

RESUMEN

Antecedentes. La deficiencia de alfa 1 antitripsina (AAT) es una enfermedad autosómica recesiva, que presenta daño hepático, el cual se puede manifestar como síndrome cenesésico, hepatitis crónica y hepatitis fulminante. En otros países, representa la primera causa congénita de trasplante hepático. De los pacientes que presentan alguna de las hepatopatías sólo en un 30-50 % de los casos se logra realizar un diagnóstico específico. En México, no existen estudios de prevalencia, frecuencia o incidencia de esta enfermedad en los pacientes pediátricos con hepatopatías de causa no determinada. Para realizar el diagnóstico de deficiencia de AAT no es suficiente medir la proteína en sangre, ya que al ser un reactante de fase aguda, esta puede estar elevada y producir falsos negativos, por lo cual se requiere la fenotipificación o la genotipificación (determinación de los alelos). **Objetivo.** Determinar las frecuencias de los alelos deficientes Z y S del gen *SERPINA-1* en niños mexicanos con enfermedad hepática de causa no determinada en el INP. **Material y Métodos:** Se realizará un estudio observacional, transversal, descriptivo y prospectivo. Se incluirán a todos los pacientes que sean atendidos en el Servicio de Gastroenterología y Nutrición del INP con diagnóstico de enfermedad hepática de causa no determinada (colestasis neonatal prolongada, hepatitis crónica, hepatitis fulminante), en el periodo de tiempo de marzo del 2010- agosto 2014. A los pacientes se les extraerá 5 ml de sangre total para la obtención de DNA mediante el método de precipitación salina. La identificación de los alelos Z y S se realizará mediante la técnica de PCR-mutagénesis dirigida (alelo Z) y fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP, alelo S). Se solicitará que firmen la carta de consentimiento informado y en mayores de 12 años de asentimiento. **Análisis estadístico:** Una vez obtenidas las frecuencias alélicas y genotípicas, se evaluará el equilibrio de Hardy-Weinberg mediante el programa en línea SNPstat

(<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>). El análisis de las variables se realizará con apoyo del programa SPSS versión 16.0, se analizará mediante estadística descriptiva utilizando medidas de tendencia central y de dispersión, y pruebas de normalidad para las variables cuantitativas. **Resultados:** se encontró un predominio de 42 hombres y 30 mujeres. En cuanto a los diagnósticos de ingreso encontramos que el más frecuente fue la hepatitis neonatal y en segundo lugar la hepatopatía crónica. La evolución fue variable según la patología de ingreso; en la hepatitis neonatal la evolución más frecuente fue la hepatopatía crónica, en la hepatopatía crónica se mantuvieron sin cambio y las hepatitis fulminantes fallecieron 4/7. Únicamente se encontraron niveles de alfa 1 antitripsina por debajo de lo normal en dos pacientes y no se logró encontrar ninguna de las variantes en ningún paciente. **CONCLUSIONES** En nuestra población hay una mayor prevalencia de casos de género masculino (58.3%), teniendo en cuenta que en la literatura se refiere un predominio del sexo femenino. Es importante el seguimiento mensual de los niños diagnosticados como hepatitis neonatal ya que como lo demuestra esta serie de casos, aquellos donde no se logró establecer el diagnóstico en más de la mitad la evolución fue hepatopatía crónica. Con esta serie de casos plantea la posibilidad de que en México la ausencia de deficiencia de alfa 1 antitripsina, podría explicarse porque genéticamente somos diferentes por el mestizaje, o bien se requiere de una muestra más grande para poder ser contundentes con esta aseveración

Palabras Clave: Hepatopatía crónica, síndrome colestasico, hepatitis fulminante, hepatitis neonatal, deficiencia de alfa 1 antitripsina

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las frecuencias de los alelos deficientes Z y S del gen *SERPINA 1* condicionantes de deficiencia de alfa 1 antitripsina en niños mexicanos con enfermedad hepática de etiología no determinada del Instituto Nacional de Pediatría?

MARCO TEÓRICO

La deficiencia de alfa 1 antitripsina (AAT) es la causa hereditaria más común de enfermedad hepática en caucásicos y es la principal indicación de trasplante hepático en niños.¹⁻²

La enfermedad hepática se puede presentar desde la edad neonatal como un síndrome de colestasis neonatal prolongado, elevación persistente de ALT y AST, en niños mayores con hepatomegalia con diferentes grados de fibrosis, y en el adulto con EPOC hasta un 40-60% presentan fibrosis a cirrosis.²

La AAT (inhibidora serpin peptidasa) es una glucoproteína formada y secretada por los hepatocitos, cuya función es neutralizar la elastasa producida por el neutrófilo, para mantener el equilibrio entre proteasas y antiproteasas a nivel pulmonar. Esta es una proteína con un relativo bajo peso molecular, compuesta por 394 aminoácidos y varias cadenas laterales de carbohidratos, esta proteína es también un reactante de fase aguda por lo cual su síntesis se puede incrementar significativamente en respuesta a la inflamación (principalmente mediada por IL 6) y al daño celular.¹⁻⁵

La AAT es codificada por un gen altamente polimórfico llamado *SERPINA-1* (inhibidora serpin peptidasa clase A, alfa 1 antiproteinasa, antitripsina, miembro 1), localizado en el brazo largo del cromosoma 14 (14q31-32.3). Se han identificado más de 120 cambios en este gen, algunos de estos cambios se consideran mutaciones y otros dado que no se

asocian claramente a daño pulmonar y/o enfermedad hepática se clasifican como polimorfismos o variantes normales. ¹⁻⁶

Los alelos o variantes de la proteína AAT se clasifican en: ²

- a. Normales. Estas variantes codifican proteínas funcionales y en concentraciones normales. Los alelos más comunes son Pi*M1 (Ala213), Pi*M1 (Val 213) en el 65-70 % de la población caucásica, Pi*M2 en el 15-20%, Pi*M3 en el 10%, Pi*M4
- b. Deficientes. Se asocian a cantidad disminuida de la proteína con funcionamiento que puede ser normal o no. Un 10-15 % de las variantes identificadas están asociadas con niveles por debajo de los considerados protectores. El alelo Pi*S (E264V, por sustitución de GAA por GTA en el exón 3) es ligeramente deficiente pero tiene niveles por arriba de los considerados protectores, mientras que el alelo Pi*Z (E342K por la transición GAG por AAG en el exón5) cursa con niveles por debajo de los considerados protectores, este alelo es el más frecuentemente encontrado y se asocia a enfermedad pulmonar y/o hepática. Existen otras variantes más raras como: Pi*I, Pi*T, Pi*Mheerlen, Pi*Mmalton, Pi*Mmineralsprings, Pi*Mprocioda, Pi*Wbethesda, Pi*Mnichinan, Pi*Plovel, Pi*Mudarte, Pi*Siiyama, Pi*Barcelona, Pi*Zausburg, entre otras.
- c. Disfuncionales. Estas variantes producen la proteína en concentraciones normales pero disfuncional, estos son raros.
- d. Nulo. Variantes raras que se asocian con concentraciones de AAT indetectables en sangre, se identifican como Pi*Nulo o Pi*Null. Se asocia a enfermedad pulmonar pero no a enfermedad hepática.

La transmisión genética de las variantes alélicas del gen *SERPINA-1* es autosómica recesiva codominante por lo cual se pueden presentar diferentes genotipos: Normal (MM), portadores (MZ, MS) y deficientes (ZZ, SZ). En los deficientes el grado de penetrancia

puede ser variable, lo que explicaría la aparición de la enfermedad hepática y pulmonar en diferentes edades con diversos grados de afectación.^{2,7}

A nivel mundial se ha estimado que existen 1.1 millón de sujetos con deficiencia severa de AAT y aproximadamente 116 millones de portadores.⁸

La prevalencia de la deficiencia de AAT en Estados Unidos en la población caucásica es de 1 en 5000-7000 habitantes, en escandinavos es 1 en 1500-3000; mientras que en Europa la prevalencia más alta de alelos Z es observada en los países del norte y oeste (media frecuencia del gen de 0.0153), disminuyendo a través del resto de Europa con la más baja en el Este (0.0092).⁹

La frecuencia del alelo S es más alta en el sur de Europa (0.0564) mientras que en el norte es menor (0.0176).⁹

En un análisis reciente de 75,390 individuos de Europa se encontró una prevalencia media del tipo Pi ZZ de 1 en 4,727, con la frecuencia más alta en Dinamarca (1:1,368) y la más baja en Rusia (1:86,065); mientras que para el tipo Pi SS fue de 1 en 934 con la más alta en Hungría (1:21) y la más baja en Finlandia (1:18,566).^{2, 6,9}

Blanco en el 2006, estimo los porcentajes de individuos con genotipos SZ, ZZ y SS; en diferentes regiones los cuales se resumen en la siguiente tabla¹⁰

PAIS	SZ	ZZ	SS
Austria	0.053	0.018	0.041
Bélgica	0.181	0.028	0.295
Dinamarca	0.151	0.073	0.078
Estonia	0.061	0.061	0.016
Finlandia	0.010	0.004	0.005

Francia	0.195	0.017	0.578
Alemania	0.041	0,010	0.044
Hungría	0.034	0.005	4.762
Italia	0.075	0.027	0.052
Latvia	0.282	0.204	0.098
Lituania	0.051	0.023	0.028
Países bajos	0.044	0.010	0.046
Polonia	0.012	0.002	0.022
Portugal	0.356	0.019	1.667
Rusia	0.007	0.001	0.009
España	0.360	0.030	1.087
Suiza	0.113	0.053	0.060
Reino Unido	0.065	0.014	0.075
Africano-Americano (EU)	0.006	0.002	0.022
Caucásico (EU)	0.022	0.036	0.052

En México se desconoce la frecuencia alélica en niños con enfermedad hepática. En adultos se ha reportado una frecuencia del alelo S del 1.5 % y del Z 0% en una población de 103 voluntarios sanos del noreste de México.¹¹

Posterior a que se describió la presencia de deficiencia de AAT en homocigotos PiZZ asociados a enfisema pulmonar prematuro, Eriksson reporta la presencia de cirrosis hepática, pero la asociación entre la deficiencia de AAT y enfermedad hepática fue por primera vez establecida por Sharp en 1969.¹² El compromiso hepático es usualmente notado en los primeros dos meses de vida con la presencia de ictericia y elevación discreta de transaminasas, estos lactantes son ingresados habitualmente como un

síndrome de hepatitis neonatal, la mayoría de los niños presentarán poco daño hepático pero persistirán con elevación de las transaminasas durante los primeros años de vida, de estos, aproximadamente el 10% desarrollarán hepatopatía crónica moderada a severa con disfunción hepática. Pocos niños pueden presentarse con prurito, hipercolesterolemia y disminución del número de los conductillos biliares; otros pueden presentarse como atresia de vías biliares (colestasis, coluria y acolia). Algunos pueden presentar hepatitis fulminante. En escolares y adolescentes se puede presentar como hepatoesplenomegalia y/o con datos de hipertensión portal (ascitis, varices esofágicas). Cuando aparece en la vida adulta, entre el 15-19% de los individuos mayores de 50 años desarrollarán cirrosis. El riesgo de enfermedad hepática en la edad de 20-40 años es de 2% mientras que a los 41-50 años es del 4%. Existe un riesgo significativamente elevado en el desarrollo de carcinoma hepatocelular en los pacientes masculinos.

Diferentes reportes han creado controversia entre la asociación de individuos heterocigotos PiZS y la presencia de enfermedad hepática, en algunos se ha encontrado una relación clara mientras que en otros no se ha demostrado está. Sin embargo, en aquellos heterocigotos con hepatitis B o C así como hepatitis autoinmune se ha reportado un daño más severo y progresivo que en pacientes normales. El grado de polimerización de la proteína S es más lento que el de la proteína Z, lo cual favorece que exista menor retención intracelular de la proteína anormal en el hepatocito y por lo tanto, en los heterocigotos SZ el comportamiento clínico que puede presentar es asintomático o comportarse como deficiente.¹³⁻¹⁷

El daño hepático está mediado por la acumulación de la AAT defectuosa en el retículo endoplásmico del hepatocito ocasionando diferentes grados de daño, histológicamente se puede apreciar desde una hepatitis de células gigantes, daño canalicular, diferentes grados de inflamación crónica y/o fibrosis, cirrosis. Típicamente se han descrito la

presencia de gránulos ácidos Schiff (PAS) positivos diastasa resistentes, su presencia sugiere el diagnóstico no siendo patognomónico, pero su ausencia no lo descarta.¹³⁻¹⁷

Las pruebas diagnósticas se dividen en tres grupos:¹⁸⁻²²

1. Nivel de AAT en sangre. Este puede dar falsas negativas, porque como se explicó previamente, al ser la AAT una proteína reactante de fase aguda, se eleva con la presencia de inflamación, infecciones, tumoraciones, etc. Los métodos utilizados para medirla son: inmunodifusión radial con un valor de 150/200-350/400 mg/dl con un nivel protector de 80 mg/dl y la nefelometría 83/120-200/220 mg/dl con un nivel protector de 50 mg/dl; 11 uM (micromolar).
2. Fenotipificación. Esta prueba determina los tipos o variantes (fenotipos) de la proteína AAT que circula en la sangre, se han identificado más de 100 variantes de la proteína. Es realizada a través de electroforesis en geles de poliacrilamida de punto isoelectrico (PIEF por sus siglas en inglés) en suero usando un rango de pH. Las letras fueron originalmente utilizadas para designar la proteína, de ánodo a cátodo, en el foco isoelectrico.
3. Biología molecular. Determina las variantes polimórficas o mutaciones en el gen *SERPINA-1*. Los usos clínicos de esta pruebas son: método diagnóstico confirmatorio, diagnóstico del estado de portador y permite ofrecer la opción de diagnóstico prenatal y de preimplantación. La recomendación de la Sociedad Americana de Tórax y la Sociedad Respiratoria Europea (ATS y ERS por sus siglas en inglés, respectivamente) es que este estudio se realice como recomendación tipo A en cualquier paciente con enfermedad hepática de origen a determinar.²²

Las manifestaciones clínicas, etiología y diagnóstico de los tres grupos de hepatopatías que en el servicio de Gastroenterología deben ser descartadas en los pacientes que ingresen al presente proyecto se describen a continuación:

COLESTASIS NEONATAL PROLONGADA ²³⁻³²

DEFINICIÓN

Cuando la cifra de bilirrubina conjugada es mayor de 2 mg/dl o más del 20% de las totales y urobilinógeno mayor de 10 mmol/dl se hace el diagnóstico de colestasis, para considerarla neonatal que aparezca desde el nacimiento hasta los 3 meses de vida extrauterina y prolongada que dure más de 15 días.

EPIDEMIOLOGÍA

La colestasis neonatal se presenta en 1:2500 nacidos vivos, de estas la más frecuente es la hepatitis neonatal idiopática en 1:4800-9000 nacidos vivos, en segundo lugar la atresia de vías biliares que se presenta en 1:8000-21000 nacidos vivos. De los casos de colestasis metabólica se encuentran en el 10-20% y de hepatitis neonatal idiopática 10-15 %. Las infecciones congénitas sólo se documentan en aproximadamente el 5% de los casos.

ETIOLOGÍA

Las causas son múltiples y se dividen en extrahepáticas (quiste de colédoco, atresia de vías biliares, estenosis del colédoco, compresiones extrínsecas, etc.) e intrahepáticas, que a su vez se subdividen en: infecciosas (TORCH, HBV, HCV, parvovirus B19, etc.), metabólicas (galactosemia, tirosinemia, hemocromatosis, glucogenosis, deficiencia de alfa

1 antitripsina, fibrosis quística, etc.), endocrinas (hipotiroidismo, panhipopituitarismo, etc.), anatómicas (Alagille, Caroli, fibrosis hepática congénita, enfermedad poliquística renal autónoma recesiva o dominante, etc.) y misceláneas (Trisomías 13, 18 y 21, etc.)

CUADRO CLÍNICO

Todo este grupo de entidades tienen como dato clínico principal la colestasis y se manifiesta como ictericia, coluria, en ocasiones hipocolia y/o acolia, hepatomegalia, esplenomegalia. Pueden encontrarse datos de hipertensión portal (sangrado de várices esofágicas, ascitis, red venosa colateral).

La presencia de irritabilidad, pobre ingesta y vómitos pueden indicar la presencia de etiología infecciosa y/o metabólica. La presencia de hipocolia y la progresión a acolia persistente orienta hacia un padecimiento obstructivo, sin embargo cuando hay un daño hepatocelular severo pueden estar también presentes. El paciente con hepatitis neonatal se ha descrito clásicamente como un varón, prematuro de bajo peso al nacer, mientras que el paciente con atresia de las vías biliares es del sexo femenino, de término y con buen peso al nacimiento. Por otro lado, malformaciones congénitas como microcefalia, cataratas, cardiopatías, etc. Pueden orientar a un origen de tipo infeccioso congénito o bien metabólico. Alteraciones en arcos vertebrales, soplo de estenosis pulmonar periférica y la presencia de embriotóxon posterior sugiere la presencia de síndrome de Alagille.

DIAGNÓSTICO

La historia clínica y el examen físico, al igual que en la mayor parte de las enfermedades son de vital importancia para definir un diagnóstico, se debe de hacer énfasis en la recopilación de los antecedentes perinatales y familiares, buscando antecedentes de

abortos, enfermedades hepáticas y/o síndromes, etc. El examen físico completo: dando énfasis a la presencia de anomalías congénitas, alteraciones en el perímetro cefálico, o presencia de calcificaciones. A nivel ocular hay que realizar fondo de ojo en búsqueda de cataratas, manchas rojo cereza, etc. Cardiopulmonar: descartar la presencia de soplos que nos orienten a cardiopatías congénitas. Abdomen: es de vital importancia conocer la presencia de visceromegalias, presencia de red venosa colateral, ascitis, etc.

Laboratorio:

Estudios iniciales: BHC, EGO, Urocultivo, gasometría, electrolitos séricos, pruebas de función renal

Pruebas de función hepáticas: Inflamación: AST, ALT, DHL; excreción: GGT, bilirrubinas totales y fraccionadas, fosfatasa alcalina; y de síntesis: TP y albúmina. Hay que recordar que el TP es de utilidad por que todos los factores de coagulación son producidos en el hígado excepto el VIII y Von Willebrand que se producen en el endotelio vascular. El factor V tiene vida media de 12-24 horas por lo que es un indicador temprano de insuficiencia hepática

Perfil metabólico

Clinitest: Mide azúcares reductores en orina (glucosa, galactosa, fructosa), este estudio es de mucha utilidad ya que en un bebé que no ha sido ablactado y tiene glicemia normal y presenta un clinitest positivo, obliga a pensar en una galactosemia por lo cual se deberá de tomar un tamiz ampliado y cambiar inmediatamente la fórmula a una de soya.

Tamiz metabólico ampliado: Determina perfil de aminoácidos, perfil de acilcarnitinas, hipotiroidismo, 17-hidroxiprogesterona, tripsinógeno, glucosa 6-fosfato deshidrogenada, galactosa uridil transferasa, fibrosis quística.

Beutler: Medición de la actividad de la enzima galactosa 1 uridil transferasa.
(galactosemia clásica)

Cultivos: Hemocultivo, urocultivo, coprocultivo.

Serológicos: TORCH, CMV, VEB, VHC, VHB, parvovirus B19, VIH, herpes virus.

Otros estudios: determinación de alfa 1 antritripsina, hierro y ferritina sérica, electrolitos en sudor, determinación de ácidos biliares séricos y urinarios, determinación de succinilacetona o succinilacetato en orina.

Estudios de gabinete

El ultrasonido hepático y de vías biliares: sirve para descartar la presencia de quiste de colédoco, medir la glándula hepática y descartar la presencia de tumores y malformaciones arteriovenosas. No es de utilidad para el diagnóstico de atresia de vías biliares aunque la ausencia de vesícula biliar o una medición de menor de 1 cm. sugieren el diagnóstico pero no es definitivo.

El gammagrama hepático de excreción: valora tanto la captación del radiofármaco así como la excreción del mismo. En el caso de lesión hepatocelular no habrá adecuada captación del radioisótopo y por tanto mala excreción. En procesos obstructivos como AVB en que la captación es adecuada la excreción del radioisótopo es nula. Por lo que cuando reporta un gammagrama que excreta descartamos problema obstructivo, no así si este no excreta, no se puede diferenciar de un problema hepatocelular de un obstructivo.

Las radiografías AP y lateral de cráneo, columna vertebral y huesos largos, así como el ultrasonido transfontanelar se debe de realizar en caso de sospechar un TORCH o un síndrome genético.

El ecocardiograma es de utilidad para determinar alteraciones estructurales en el complejo TORCH, trisomías cromosómicas, así como en el síndrome de Alagille.

La biopsia hepática es un procedimiento invasivo que determina en el 90% de los casos el diagnóstico correcto (diferencia un patrón obstructivo de un daño hepatocelular). Los patrones histológicos obtenidos por punción del tejido hepático, nos orientan hacia determinadas patologías.

HEPATITIS CRÓNICA ³³⁻³⁸

DEFINICIÓN

La hepatopatía crónica se define como un síndrome clínico-patológico que tiene diversas etiologías, y se caracteriza por una inflamación crónica y necrosis hepatocelular, que frecuentemente es acompañado de fibrosis. Por definición es aquel que cumpla criterios clínicos, bioquímicos (ALT elevada 1.5 veces por arriba de los normal) e histológicos.

Los criterios clínicos y bioquímicos en el adulto deben de ser por más de 6 meses, sin embargo en niños si tienen una evolución de más de 3 meses se deberá de tratar como crónico (exceptuando hepatitis B y C).

ETIOLOGIA

Al ser un síndrome, esta patología tiene innumerables etiologías, las cuales las resumiremos en el siguiente cuadro:

INFECCIOSAS	TÓXICAS	METABOLICAS	AUTOINMUNES	OTRAS
HCV	Anticonvulsivantes: DFH, AVP,	Deficiencia de alfa 1 antitripsina	Hepatitis autoinmune	Esteatohepatitis
HBV	Antifimicos: Isoniacida, etc.	Enfermedad de Wilson	Colangitis esclerosante	Fibrosis quística
HDV	Esteroides	Glucogenosis III y IV	Cirrosis biliar primaria	Atresia de vías biliales
Toxoplasma	Minociclina	Enfermedad por almacenamiento lisosomal		Quiste de colédoco
Citomegalovirus	Nitrofurantoina	Galactosemia		Síndrome Alagille
	Propiltiouracilo	Fructosinemia		Síndrome evanescencia de conductillos
	Alfametilidopa	Tirosinemia		Hepatitis criptogénica
		Aminoacidemias orgánicas		
		Gaucher, Nieman pick, enfermedad por depósito de esteres de colesterol		
		Hemocromatosis		

CUADRO CLINICO

Los antecedentes del paciente deben de ser interrogados y tomados en cuenta sobre todo cuando exista : Historia de hiperbilirrubinemia directa en la infancia, antecedentes familiares de hepatopatía crónica y de enfermedades autoinmunes, recidiva de una hepatitis "aguda" y en niños es de suma importancia la presencia de datos clínicos persistentes por más de 3 meses. A la exploración física hay que prestar atención a la exploración del hígado, pudiendo encontrar : hígado pequeño, crecimiento lóbulo izquierdo, hígado duro o nodular, esplenomegalia firme, ascitis y/o edema, circulación venosa colateral, varices esofágicas, retraso en el crecimiento, pérdida muscular, hallazgos cutáneos (telangiectasia facial, eritema palmar), dedos en palillo de tambor, otras alteraciones inmunológicas, alteraciones oculares o en el fondo de ojo (cataratas, manchas rojo cereza, anillos de Kayser-Fleischer, etc.).

LABORATORIO Y GABINETE

Siempre se debe de realizar una biometría hemática para valorar la presencia de anemia, el tipo de la misma, y los valores de leucocitos y la diferencial; en búsqueda de infecciones o bien de procesos proliferativos.

Las pruebas de función hepática: inflamación (AST, ALT), excreción (bilirrubinas, GGT, ALP) y de síntesis (albúmina y TP).

Las determinaciones virales especialmente para VHB, VHC, VHD.

Determinaciones metabólicas en un principio la alfa 1 antitripsina, de existir sospecha de enfermedad de Wilson: ceruloplasmina y excreción de cobre en orina, de un error innato del metabolismo de moléculas pequeñas (tirosinemia, galactosemia, fructosinemia,

academias orgánicas) se deberá de solicitar el tamiz metabólico ampliado en suero y orina.

De sospechar enfermedad autoinmune se deben de solicitar autoanticuerpos (anti actina, ANA, LKM 1, soluble hepático), inmunoglobulinas y complemento.

Si los hallazgos clínicos nos orientan a una fibrosis quística se deberá de determinar electrolitos en sudor.

Los estudios de gabinete deben de incluir:

El ultrasonido hepático para valorar las características del hígado, la vía biliar y pancreática, sirve para descartar tumoraciones, hemangiomas, etc.

El gamagrama de captación con Tc 99 sirve para valorar la función hepática y descartar malformaciones vasculares.

La endoscopia se debe de realizar para el diagnóstico de varices esofágicas y documentar de esta manera hipertensión portal.

Si se sospecha en un síndrome de Budd Chiari se debe de realizar un electrocardiograma, un ecocardiograma y de ser necesaria una cateterización cardiaca con una venocavografía.

Si se está sospechando de alteraciones de la vía biliar (colangitis esclerosante, cirrosis biliar primaria, etc.) se realizará una colangiopancreatografía transendoscópica.

Si se sospecha una enfermedad por atesoramiento de lípidos o un proceso mieloproliferativo el aspirado de medula ósea es fundamental.

HEPATITIS FULMINANTE ³⁹⁻⁴⁸

Se define como la presencia de necrosis hepatocelular con insuficiencia hepática con o sin encefalopatía hepática en un paciente previamente sano.

La presentación puede ser:

- Hiperaguda : en los primeros siete días de evolución
- Aguda: 8 a 28 días.
- Subaguda: de 5 semanas a 26 semanas.

ETIOLOGÍA

La etiología de esta enfermedad puede ser de origen infeccioso, metabólica, tóxica, hipóxico-isquémica, autoinmune, etc.

En el siguiente cuadro se encuentran las etiologías más frecuentes.

INFECCIOSAS	METABÓLICAS	TOXICAS	OTRAS
VIRALES:	CARBOHIDRATOS	NECROSIS MASIVA	ISQUEMICAS
CVM	Galactosemia	Alopurinol	Síndrome de Budd Chiari
EBV	Fructosinemia	Amitriptilina	Insuficiencia cardiaca aguda
Hepatitis A	Glucogenosis	Carbamacepina	Choque
Hepatitis B		Clordiacepoxido	Infarto cardiaco
Hepatitis C		Halotano	
Hepatitis D		Hidralacina	
Hepatitis E		Indometacina	
Herpes		Isoniacina	
Parvovirus		Ketoconazol	
B19		Metildopa	
Echovirus		Nitrofurantoina	

Adenovirus		Fenobarbital	
Paramixovirus		Sulfametoxazol	
Varicela		Valproato	
Rubéola			
Ébola			
Dengue			
Fiebre amarilla			
BACTERIANAS Sífilis	PROTEINAS Tirosinemia	NECROSIS CENTROLOBULILLAR Acetaminofen	INFILTRATIVAS Leucemia
Bacillus cereus	Acidemias orgánicas	Alopurinol	Síndrome hemofagocítico
Sepsis		Diazepam	Hemangioendo- telioma
		Enflurano	Linfangioendo- telioma
		Halotano	
		Imipramina	
		Indometacina	
		Isoniazida	
		6-mercaptopurina	
		Metildopa	
		Quinidina	
		Rifampicina	
		Sulfasalazina	
		Valproato	
		Alfa interferón	
	LÍPIDOS Niemen-Pick	NECROSIS PERIPORTAL Sulfato de hierro	AUTOINMUNE Hepatitis autoinmune
	Gauche	Fósforo	

	Wolman Zellweger	Cocaína	
	OTRAS Deficiencia de alfa 1 antitripsina Hemocromatosis neonatal Errores innatos del metabolismo de los ácidos biliares Enfermedad de Wilson	ESTEATOSIS Valproato Tetraciclina Amiodarona	

DIAGNÓSTICO.

CUADRO CLÍNICO.

El cuadro clínico depende de tres diferentes factores: la pérdida de la capacidad funcional hepática, los efectos sistémicos secundarios a la acumulación de sustancias tóxicas no metabolizadas por el hígado y la capacidad de regeneración hepática.

Clásicamente el paciente es previamente sano, de edad escolar sin ningún antecedente patológico de importancia. Presenta un cuadro típico de hepatitis viral aguda, a los pocos días o semanas empeora el estado general del paciente o bien los síntomas, iniciando con datos de encefalopatía hepática (ver cuadro) y/o sangrados. El paciente a la exploración física luce muy enfermo con ictericia +++++, puede tener hedor hepático, el hígado puede ser de tamaño normal, menor o aumentado, puede existir datos de sangrado y en casos de mucha gravedad puede aparecer ascitis. Los datos de encefalopatía se resumen en el siguiente cuadro.

ESTADIOS DE ENCEFALOPATIA HEPÁTICA

ESTADIO	MANIFESTACIONES CLINICAS	ASTERIXIS	CAMBIOS EEG
I PRODRAMOS	Lentitud mental, inversión ciclo sueño-vigilia	No o muy leve	Mínimos
II	Confusión, comportamiento inapropiado, desorientación, cambios de humor	Detectable	Ritmo lento generalizado
III ESTUPOR	Somnoliento, no responde a órdenes, muy confuso, delirio, hiperreflexia, Babinsky positivo	Presente si el paciente coopera	Lenificación importante, con ondas delta
IV COMA	Inconsciente, respuesta al dolor descerebrado o decorticado	Ausente	Sin actividad, plano

LABORATORIO.

En los pacientes con hepatitis fulminante además de requerir los exámenes diagnósticos se debe de solicitar:

La biometría hemática valora la presencia de anemia, el tipo de la misma y los valores de leucocitos y la diferencial; en búsqueda de infecciones o bien de procesos proliferativos.

La determinación de electrolitos séricos (Na, K, HCO₃ y Cl) y urinarios (Na y K), química sanguínea completa (glucosa, urea, creatinina).

Las pruebas de función hepática: inflamación (AST, ALT), excreción (bilirrubinas, GGT, ALP) y de síntesis (albúmina y TP).

Las determinaciones virales especialmente para VHA, VHB, VHC, citomegalovirus, el virus de Epstein Barr, parvovirus B19, etc.

Determinaciones metabólicas en un principio la alfa 1 antitripsina, de existir sospecha de enfermedad de Wilson: ceruloplasmina y excreción de cobre en orina, de un error innato del metabolismo de moléculas pequeñas (tirosinemia, galactosemia, fructosinemia, acidemias orgánicas) se deberá de solicitar el tamiz metabólico ampliado en suero y orina.

De sospechar enfermedad autoinmune se deben de solicitar autoanticuerpos (anti actina, ANA, LKM 1, soluble hepático), inmunoglobulinas y complemento.

Los estudios de gabinete deben de incluir:

El ultrasonido hepático para valorar las características del hígado, la vía biliar y pancreática, sirve para descartar tumoraciones, hemangiomas, etc.

En este caso la biopsia hepática no es de utilidad, ya que independientemente de la causa la lesión histológica será la misma (necrosis hepatocelular submasiva o masiva), por lo cual no está indicada en este grupo de pacientes.

JUSTIFICACIÓN

En el Instituto Nacional de Pediatría, por ser un hospital de tercer nivel y de referencia de todo el país, en el Servicio de Gastroenterología y Nutrición se reciben aproximadamente 200-250 casos por año de enfermedad hepática (síndrome cenestésico, hepatitis crónica, hepatitis fulminante), en aproximadamente el 30-40 % se realiza el diagnóstico etiológico, sin embargo en el resto de los pacientes no se logra identificar la causa. Conociendo la relación que existe en otros países de la enfermedad hepática con la deficiencia de alfa 1

antitripsina y desconociendo esta en México, se hace imperativo realizar el presente estudio para determinar si en algunos de estos pacientes el cuadro clínico se debe a la presencia de alelos deficientes del gen *SERPINA-1*. Por otro lado al ser una enfermedad de herencia autosómica recesiva con un 25% de probabilidad de repetirse en cada embarazo el consejo genético a los padres de estos pacientes se hace imperativo.

OBJETIVOS

Primarios:

Determinar las frecuencias de los alelos deficientes Z y S del gen *SERPINA-1* en niños mexicanos con enfermedad hepática de causa no determinada en el Instituto Nacional de Pediatría.

Determinar si existe diferencia en la frecuencia de genotipos (MM), portadores (MZ, MS) y deficientes (ZZ, SZ) ATT en las diferentes enfermedades hepáticas de causa no determinada en niños mexicanos en el Instituto Nacional de Pediatría.

Secundarios:

Describir los niveles detectados de AAT en suero de acuerdo a los genotipos: normal (MM), portadores (MZ, MS) y deficientes (ZZ, SZ) ATT en niños mexicanos con enfermedad hepática de causa no determinada en el Instituto Nacional de Pediatría.

MATERIAL Y MÉTODO

Diseño del estudio:

Se realizará un estudio observacional, transversal, descriptivo y prospectivo.

Población objetivo:

Todos los pacientes con hepatopatía (síndrome cenestésico neonatal, hepatitis fulminante, hepatitis crónica) sin diagnóstico etiológico.

Población elegible:

Los pacientes con hepatopatía (síndrome cenestésico neonatal, hepatitis fulminante, hepatitis crónica) sin diagnóstico etiológico, que acudan al Servicio de Gastroenterología y Nutrición, del Instituto Nacional de Pediatría, en el periodo de marzo del 2010- marzo 2012

Criterios de inclusión:

Se incluirán a todos los pacientes que sean atendidos en el Servicio de Gastroenterología y Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría con diagnóstico de enfermedad hepática de causa no determinada (colestasis neonatal prolongada, hepatitis neonatal, hepatitis crónica, hepatitis fulminante), cuyos padres firmen la carta de consentimiento informado y en mayores de 12 años de asentimiento, en el periodo de tiempo de marzo del 2010- marzo 2012.

Criterios de exclusión:

Aquellos pacientes en donde el material de DNA no sea suficiente para el análisis de las variantes AAT y que no acepten una segunda toma de muestra.

Variables

Independiente: Determinación de alelos de AAT. Se realizarán con la técnica de PCR y restricción (RFLP) y/o PCR mutagénesis dirigida. (variable cualitativa nominal)

Dependientes: Enfermedad hepática: (variable cualitativa nominal)

Colestasis neonatal prolongada: Presencia de hiperbilirrubinemia directa de más de 2 gr o más del 20 % de las totales, que se presenta desde el nacimiento hasta los tres meses y dura más de 15 días.

Hepatitis crónica: Persistencia de síntomas (ictericia, astenia, adinamia, fatiga, etc.), elevación de transaminasas 1.5 arriba de lo normal por más de 3 meses y con biopsia con datos de inflamación crónica con o sin fibrosis.

Hepatitis fulminante. Presencia de necrosis hepatocelular masiva o submasiva, con disminución de la síntesis (TP prolongado) que no corrige con la administración de vitamina K con o sin encefalopatía hepática, en un hígado previamente sano.

TAMAÑO DE MUESTRA

Se estima que el 15% de la población con hepatopatía sin etiología puede tener deficiencia de AAT. El cálculo del tamaño de la muestra se efectúa basado en el margen de error que nos permitimos tener en la amplitud del intervalo de confianza al 95 %.

$p = 0.15$ $q = 0.85$ $\alpha = 0.05$ y error de 0.07 aplicando la fórmula se obtiene lo siguiente:
 $(.15 \times .85)(1.96)^2 / 0.07^2 = 99.96 = 100$

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Este será un estudio observacional, transversal, descriptivo y prospectivo.

Todos los pacientes que sean atendidos en el Servicio de Gastroenterología y Nutrición, en el periodo de marzo del 2010- marzo 2012, con enfermedad hepática de causa desconocida (colestasis neonatal prolongada, hepatitis crónica y fulminante) se incluirán en el estudio.

La medición de la AAT en el Instituto Nacional de Pediatría se realiza por medio de nefelometría, la cual se basa en la formación de inmunocomplejos insolubles de la proteína y los anticuerpos anti-AAT, si durante este proceso se hace incidir un rayo de luz intenso, este es dispersado por las partículas que precipitan y la intensidad de la radiación dispersada es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra de suero. El análisis debe de efectuarse en lo posible, en muestras de suero fresco. Lo cual se hace rutinariamente en el Servicio. Los valores de referencia que se utilizan en el INP son 90-200 mg/dl, ya que en la población pediátrica estas cifras son menores que en el adulto (100-220 mg/dl). Si se desea expresar las pruebas en uM (micromolares) se puede multiplicar el resultado por 0,1923.

Una vez realizado el abordaje diagnóstico (ver flujogramas diagnósticos en anexo 1) y no se haya logrado encontrar alguna causa de la hepatopatía, se procederá a tomar 5 ml de sangre para realizar el estudio molecular del gen SERPINA-1. En caso que exista el antecedente de transfusión de menos de 3 meses, se realizará raspado de mucosa oral para la obtención de células de descamación y extracción de DNA.

Metodología molecular: ⁴⁹

Extracción de DNA.

Para el estudio molecular del gen *SERPINA-1* se obtendrá el DNA genómico mediante la técnica de precipitación salina con el kit Puregene (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA), a partir de leucocitos de sangre periférica con EDTA como anticoagulante (3-5 ml.) o de células de descamación de mucosa oral para los pacientes que hayan recibido transfusiones. El DNA genómico obtenido se cuantificará y se valorará su pureza e

integridad mediante espectrofotometría y electroforesis en agarosa. Las muestras de DNA obtenidas se conservarán a 4°C hasta su análisis.

Caracterización de los alelos deficientes Z y S del gen *SERPINA-1*:

La identificación de los alelos Z y S se realizará mediante la técnica de PCR-mutagénesis dirigida (alelo Z) y fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP, alelo S) de acuerdo a los descrito por Kaczor et al. 2007. Se emplearán los siguientes oligonucleótidos y enzimas de restricción:

Primer S forward -AAGGTGCCTATGATGAAGCGTTT

Primer S reverse -ATGATATCGTGGGTGAGTTCATGT

Primer Z forward -CATAAGGCTGTGCTGACCATCGT°C

Primer Z reverse -TTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGG

Para el alelo Z se utilizarán los siguientes parámetros de PCR: desnaturalización inicial a 96° C por 2 minutos, seguido de 36 ciclos constituidos por desnaturalización a 96° C por 30 seg., alineación-extensión a 68° C por 1 minuto, y extensión final a 72° C por 10 minutos. Para el alelo S las diferencias del programa de PCR consistirán en una etapa de desnaturalización a 96° C por 30 segundos, alineación a 60° C por 30 segundos y extensión a 72° C por 30 segundos.

Los productos de PCR serán restringidos con 2 UI de la endonucleasa *TaqI* para la detección del alelo Z, mientras que para la detección del alelo S se utilizará la enzima *RsaI*. Los productos de PCR restringidos serán resueltos en geles de agarosa de alta resolución.

Los alelos que no sean identificados como alelos S o Z se considerarán como el alelo silvestre o normal M.

RESULTADOS PRELIMINARES.

Por el momento se han reunido 18 muestras las cuales ya se procesaron pero se están checando nuevamente, tendré los resultados el próximo lunes.

La edad en meses fue 1-440 meses con una media de 58 meses.

En la siguiente tabla se muestra la distribución por género y diagnóstico.

Género	Colestasis	Hepatitis crónica	Hepatitis fulminante
18	10	7	1
Masculino 16	9	6	1
Femenino 2	1	1	0

ANALISIS ESTADISTICO

Una vez obtenidas las frecuencias alélicas y genotípicas, se evaluará si se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg mediante el programa en línea SNPstat (<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>). El análisis de las variables se realizará con apoyo del programa SPSS versión 16.0, en el cual se capturará la base de datos de los resultados obtenidos, por ser un estudio descriptivo se analizará mediante estadística descriptiva utilizando medidas de tendencia central y de dispersión, y pruebas de normalidad para las variables cuantitativas.

ASPECTOS ÉTICOS

Este proyecto, de acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud, fracción III, artículo 17, del título segundo, es una investigación con riesgo mínimo, sin embargo se ajustará a la Declaración de Helsinki de la WMA y todas y cada una de sus enmiendas. Así mismo

cumplirá con las Buenas Prácticas Clínicas de la Conferencia Internacional de Armonización.

Se solicitará Carta de Consentimiento Informado y en su caso también Carta de Asentimiento del Menor.

FACTIBILIDAD

El Instituto Nacional de Pediatría es un centro de referencia para pacientes con enfermedades hepáticas (síndrome colestasis neonatal prolongada, hepatitis crónica y hepatitis fulminante). En el Servicio de Gastroenterología y Nutrición se llegan a valorar aproximadamente 250 de estos pacientes por año, de los cuales solo en un 30-40% de ellos se logra determinar la etiología, por lo cual pensamos que obtendremos aproximadamente 100-150 muestras.

Por otro lado el Laboratorio de Biología Molecular, cuenta con personal altamente calificado para la genotipificación de los alelos S y Z; así como con el material y equipo necesario para la misma.

RESULTADOS

Se incluyeron 72 pacientes con diagnóstico de enfermedad hepática de causa no determinada, de los cuales 42 (58.3%) fueron hombres y 30 (41.7 %) mujeres, siendo sus diagnósticos de ingreso: hepatitis neonatal 33 pacientes (45.8%), hepatopatía crónica 32 pacientes (44.4%) y hepatitis fulminante 7 (9.7%).

Se encontró que la edad al momento del diagnóstico fue mediana de 7 meses (mínimo de 1 mes, máximo de 440 meses). El peso se encontró una mediana de 6.49 kg con un valor mínimo de 2.07 kg, máximo de 68 kg y en cuanto a la talla una mediana de 0.64 m con un valor mínimo de 0.42 m, máximo de 1.64 m.

A todos los pacientes se les tomaron pruebas de función hepática completas encontrando los siguientes valores: AST (aspartato aminotransferasa) con una media 438.28 DE (desviación estándar) \pm 827.76, ALT (alanino aminotransferasa) con una media de 309.59 (DE \pm 493.11), GGT (gamma-glutamil transpeptidasa) con una media de 175.59 (DE \pm 193.95), ALP (fosfatasa alcalina) con una media 440.66 (DE \pm 262.51), Albúmina con una media 3.30 (DE \pm 0.86), TP (tiempo de protrombina) con una media de 17.35 (DE \pm 10.90), TPT (tiempo parcial de tromboplastina) con una media de 35.43 (DE \pm 11.42), BD (bilirrubina directa) con una media 4.81 (DE \pm 5.02) y niveles de AAT (alfa 1 antitripsina) con una media de 179.27 (DE \pm 77.49)

De los 72 pacientes incluidos 9 (12.5%) evolucionaron a remisión de la enfermedad, 34 (47.2%) evolucionaron como una hepatopatía crónica, 15 (20.8%) evolucionaron a cirrosis y 14 (19.4%) fallecieron.

De los pacientes con diagnóstico al ingreso de hepatopatía neonatal (33 pacientes), 6 (18.18%) evolucionaron a la remisión completa de la enfermedad, 19 (57.57%) evolucionaron a hepatitis crónica, 3 (9.09%) evolucionaron a cirrosis y 5 (15.15%) fallecieron.

De los paciente con diagnóstico al ingreso de hepatopatía crónica (32 pacientes); 1 (3.125%) evoluciono a remisión de la enfermedad, 14 (43.75%) a hepatopatía crónica, 12 (37.5%) evolucionaron a cirrosis y 5 (15.625%) murieron.

En el cuadro 1 se muestra en número de pacientes de acuerdo a su diagnóstico de ingreso y el número y porcentaje de su evolución.

CUADRO 1
DIAGNÓSTICO DE INGRESO Y EVOLUCIÓN

DIAGNÓSTICO	EVOLUCIÓN				TOTAL
	NORMAL	HEPATOPATIA CRÓNICA	CIRROSIS	MUERTE	
Hepatitis Neonatal	6 (18.18%)	19 (57.57%)	3 (9.09%)	5 (15.15%)	33
Hepatopatía crónica	1 (3.12%)	14 (43.75%)	12 (37.5%)	5 (15.62%)	32
Hepatitis fulminante	2 (28.57%)	1 (14.28%)	0 (0%)	4 (57.14%)	7
Total	9	34	15	14	72

DISCUSIÓN

Llama la atención que en esta muestra hay más varones que niñas, no obstante que en la literatura se menciona que las hepatitis infecciosas son más frecuentes en varones y que la atresia de vías biliares es más frecuente en niñas, en nuestra población que no se incluyeron estas patologías hay una clara tendencia al género masculino.²⁸⁻³⁴

En cuanto a las variables de edad, peso y talla se observan claras diferencias entre el grupo de los pacientes con hepatitis neonatal contra los de hepatopatía crónica, esto se explica debido al tipo de patología, ya que como se discutió previamente el grupo de

colestasis son niños con edades comprendidas de recién nacido a los 90 días de vida y el grupo de hepatitis crónica habitualmente son niños de mayor edad, de ahí se desprende las diferencias en el peso y talla.

En cuanto a la evolución en la literatura se refiere que de los pacientes diagnosticados como una hepatitis neonatal, la mayoría de los niños presentaran poco daño hepático pero persistirán con elevación de las transaminasas durante los primeros años de vida, de estos, aproximadamente el 10% desarrollaran hepatopatía crónica moderada a severa con disfunción hepática, sin embargo en nuestra muestra observamos que el 57.57% evolucionaron a una hepatopatía crónica y el 9% presentaron cirrosis, así mismo el 15.15% fallecieron, lo cual no es compatible con lo referido en la literatura reportada.⁵⁰

Tampoco se demostró alguna diferencia en los niveles séricos de alfa 1 antitripsina entre los grupos. En la literatura se refiere que los niveles se encuentran disminuidos en un 85-90% de lo normal, lo cual no correlaciona con nuestros datos. Únicamente encontramos en dos pacientes niveles por debajo de lo normal (90-200 mg/dl) de los cuales uno fue hombre y su diagnóstico al ingreso fue hepatitis fulminante y posteriormente falleció y la otra mujer que ingreso con diagnóstico de hepatopatía crónica, la cual evoluciono a cirrosis.

En un estudio que se realizo en Escandinavia se hizo un tamiz a 200,000 neonatos y se encontraron 127 con la mutación ZZ, de estos 14 tenían colestasis y 9 de los 14 enfermedad hepática severa, otros 8 de los 127 tenían alteraciones moderadas como elevación de ALT, BT ó hepatomegalia, se les hizo un seguimiento a los 18 años de edad y se observo que más del 85% persistían con elevación de transaminasas sin evidencia de disfunción hepática.⁵¹ No obstante que los pacientes fueron estrictamente seleccionados y que hasta donde se planteó en el presente protocolo se les descartó otras patologías, por el momento no se logró identificar ninguna variante del gen

SERPINA 1, y por ello no fue posible realizar la determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Esto llama fuertemente la atención, ya que como se discutió anteriormente sabemos que la causa metabólica más frecuente en este grupo de pacientes es la deficiencia de alfa 1 antitripsina, ocupando el primer lugar de las causas congénitas de trasplante hepático.

Los resultados obtenidos plantean algunas interrogantes y pueden deberse a:

1. La muestra recolectada aun no es suficiente, por lo cual continuaremos incluyendo más pacientes.
2. La población mexicana es diferente genéticamente y esto implicaría que el riesgo de esta patología es menor. Esto se podría sustentar con el único estudio encontrado en México en donde se reportó en adultos una frecuencia del alelo S del 1.5 % y Z del 0% en una población de 103 voluntarios sanos del noreste de México.¹¹ Sin embargo se requieren realizar más estudios al respecto para poder concluir lo anterior.

CONCLUSIONES

1.- En nuestra población hay una mayor prevalencia de casos de género masculino (58.3%), teniendo en cuenta que en la literatura se refiere un predominio del sexo femenino.

2.- Es importante el seguimiento mensual de los niños diagnosticados como hepatitis neonatal ya que como lo demuestra esta serie de casos, aquellos donde no se logró establecer el diagnóstico en más de la mitad la evolución fue hepatopatía crónica.

3.- Con esta serie de casos plantea la posibilidad de que en México la ausencia de deficiencia de alfa 1 antitripsina, podría explicarse porque genéticamente somos diferentes por el mestizaje, o bien se requiere de una muestra más grande para poder ser contundentes con esta aseveración

PRODUCTOS ESPERADOS

Con el presente trabajo de investigación esperamos obtener:

1. Obtención de grado de posgrado en Gastroenterología y Nutrición Pediátrica
2. Presentación en Congreso Nacional e Internacional de Gastroenterología y Genética
3. Artículo que describa la asociación de deficiencia de alfa 1 antitripsina en pacientes pediátricos mexicanos con enfermedad hepática

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

La realización del presenta trabajo de investigación implican las siguientes acciones:

Julio-septiembre 2008	Revisión de la bibliografía
Septiembre-octubre 2008	Elaboración proyecto de investigación
Septiembre-octubre 2008	Elaboración de hojas de concentración de datos
Enero 2009-diciembre 2010	Presentación en Seminarios de Maestría
Julio 2009	Presentación a los Comités de Ética Médica y Comité de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría

marzo del 2010- agosto 2014	Recopilación de muestras y datos Análisis molecular
Agosto 2014	Captura de la base de datos con la información obtenida de las hojas de recolección de datos
Septiembre 2014	Análisis de resultados
Septiembre 2014	Elaboración de gráficas
Septiembre 2014	Obtención de conclusiones
Octubre 2014	Redacción del artículo de publicación
Octubre 2014	Envío del artículo a publicación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Psacharopoulos HT, Mowat AP, Cook PJJ, Carlisle PA, Portmann, Rodeck CH. Outcome of liver disease associated with alpha 1 antitrypsin deficiency (PiZ). Arch Dis Child 1983;58:882-7.
2. ScLade-Bartusiak K, Cox DW. Alpha 1-Antitrypsin Deficiency. Gene Reviews. www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi/book0gene&part=alpha1-a
3. Wood AM, Stockley RA. Alpha one antitrypsin deficiency: from gene to treatment. Respiration 2007;74:481-92.
4. Perlmutter DH, Brodsky JL, Balistreri WF, Trapnell BC. Molecular pathogenesis of alpha 1 antitrypsin deficiency associated liver disease: a meeting review. Hepatology 2007;45:1313-23.

5. Greene CM, Miller DW, Carroll T, et al. Alpha 1 antitrypsin deficiency: a conformational disease associated with lung and liver manifestations. *J Inherit Metab Dis* 2008;31:21-34
6. Vidal R, Blanco I, Casas F, Jordi R, Miravittles M and National Alpha 1 Antitrypsin Registry Committee. Guidelines for diagnosis and management of alpha 1 antitrypsin deficiency. *Arch Bronconeumol* 2006;42(12):645-59
7. Baldo G, Ayala A, Melendez M, Nonnemacher K, Lima L, et al. Prevalence of the serpin peptidase inhibitor (alpha 1 antitrypsin) PI*S and PI*Z alleles in Brazilian children with liver disease. *Genet Mol Biol* 2008;31(2):
8. Luisetti M, Seersholm N. a 1 antitrypsin deficiency. *Thorax* 2004;59:164-9.
9. Blanco I, Fernández E, Rodríguez MC, Fernández A. Frecuencias alélicas del gen de la alfa 1 antitripsina en la población general de una comarca de Asturias. *Med Clin (Barc)* 1999;133:366-70
10. Blanco I, de Serres FJ, Fernández-Bustillo E, et al. Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of alpha 1 antitrypsin deficiency in European countries. *Eur Respir J* 2006;27:77-84.
11. Sánchez-Dominguez CN, Buenfil-Lozano JA, Molina-Guajardo CA, Borjas-Almaguer OD, et al. Frequency of S and Z alleles for alpha 1 antitrypsin and tumor factor aspha -308 promoter polymorphism in northeastern México. *Allergy Asthma Proc* 2008;29(4):406-10
12. Sharp HL, Bridges RA, Krivit W, Freier EF. Cirrhosis associated with alpha 1 antitrypsin deficiency: a previously unrecognized inherited disorder. *J Lab Clin Med* 1969;73:934-9.
13. Fairbanks KD, Tavill S. Licer disease in alpha 1 antitrypsin deficiency: a review. *Am J Gastroenetrology* 2008;103:2136-41

14. Campbell KM, Arya G, Ryckman FC, Alonso M, Tiao G, Balistreri WF, Bezerra JA. High prevalence of alpha 1 antitrypsin heterozygosity in children with chronic liver disease. *JPGN* 2007;44:99-103
15. Chapell S, Hadzic N, Stockey R, Guetta-Baranes T, Morgan K, Kalsheker N. A polymorphism of the alpha 1 antitrypsin gene represents a risk factor for liver disease. *Hepatology* 2008;47:127-32
16. Bakula A, Socha P, Pawlowska J, Teisseyre M, Jankowska I, Kalicinski P. Good and bad prognosis of alpha 1 antitrypsin deficiency in children: when to list for liver transplantation. *Transp Proc* 2007;39:3186-8
17. Wu SS, Chadarevian JP, McPhaul L, Riley NE, Leeuwen FW, French SW. Coexpression and accumulation of ubiquitin +1 and ZZ proteins in livers of children with alpha 1 antitrypsin deficiency. *Ped Develop Path* 2002;5:293-8
18. Rachelesfsky G, Hogarth K. Issues in the diagnosis of alpha 1 antitrypsin deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:833-8
19. Cox DW, Mansfield T. Prenatal diagnosis of alpha 1 antitrypsin deficiency and estimates of fetal risk for disease. *J Med Gen* 1987;24:52-9.
20. Snyder MR, Katzmann JA, Butz ML, Yang P, Dawson DB, Halling KC, Highsmith WE, Thibodeau SN. Diagnosis of alpha 1 antitrypsin deficiency: an algorithm of quantification, genotyping and phenotyping. *Clin Chemistry* 2006;52(12):2236-42
21. Ferraroti I, Scabini R, Campo I, Ottaviani S, Zorzetto M, Gorrini M, Luisetti M. Laboratory diagnosis of alpha 1 antitrypsin deficiency. *Translational Res* 2007;150:267-74
22. Hogarth K, Rachelesfsky G. Screening and Familial Testing of patients for α 1 antitrypsin deficiency. *Chest* 2008;133:981-8.
23. Elferink RO. Cholestasis. *Gut* 2003; 52(Suppl II):42-48

24. Venigalla S, Gourley GR. Neonatal cholestasis. *J Arab Neonatal Forum* 2005; 2: 27-34.
25. Valadares MRL. Neonatal cholestasis. *J Pediatr (Rio J)* 2000; 76 (Supl 2): S187-97.
26. Suchy FJ. Neonatal cholestasis. *Pediatr rev* 2004; 25 (11): 388-95.
27. Pérez FT, López SP, Tomás E, Gutierrez ML, Lledo JL, CAcho G, Santander C, Fernandez RCM. Abordaje diagnóstico y terapéutico del síndrome colestásico. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96 (1):60-73.
28. Venigalla S, Gourley GR. Neonatal cholestasis. *Semin Perinatol* 2004; 28: 348-55
29. Los EL, Lukovac S, Wemer A, Dijkstra T, Verkade HJ, Rings EH. Nutrition for children with cholestatic liver disease. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 2007; 59:147-57.
30. Protheroe SM, Kelly DA. Cholestasis and end stage liver disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1998; 12(4): 823-41.
31. Jensen D. Cholestasis. *Clinics in Liver Disease*, 2004. Vol 8: 11-15.
32. Manzanares J., López Manzanares E., Medina Benítez E. Cholestasis in Neonates and Infants. A Diagnostic Guide. *Annals in Pediatric*, 2003. Vol. 58: 162-167.
33. Kelly DA, McKiernan PJ. Metabolic liver disease in the pediatric patient. *Clin Liver Dis* 1998;2(1):1-30
34. Rajeshwari K, Gogia S. The clinical spectrum of chronic liver disease in children presenting to a tertiary level teaching hospital in New Delhi. *Trop Doct* 2008;38(2):101-2.
35. Hsu EK, Murray KF. Hepatitis B and C in children. *Nat Cli pract Gastroenterol Hepatol* 2008;5(6):311-20

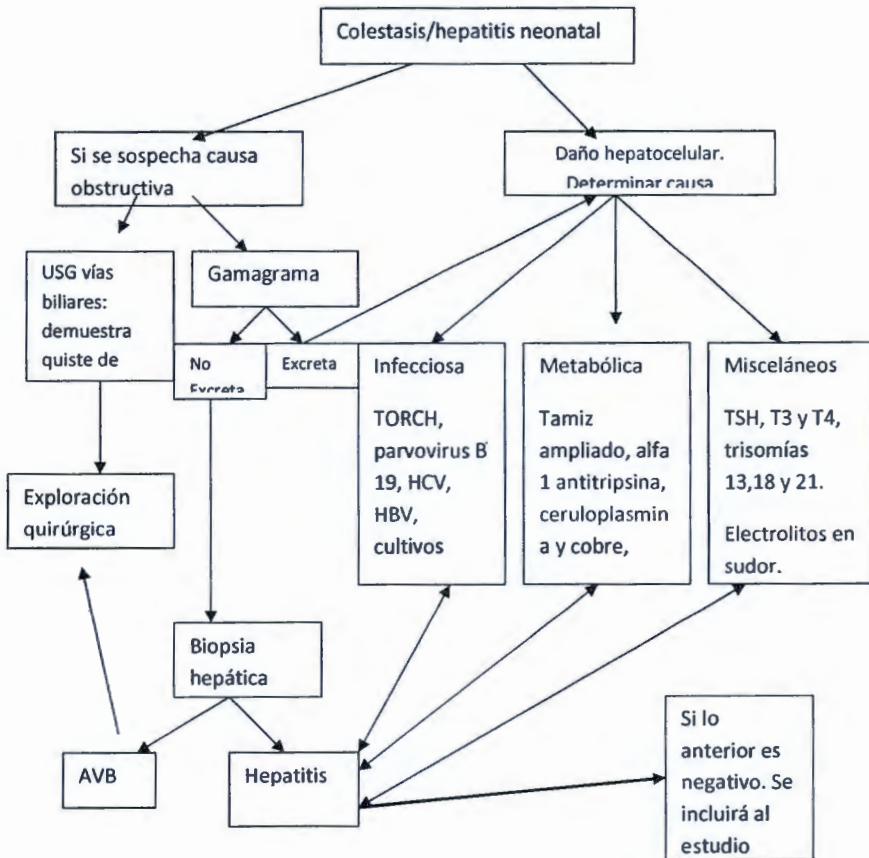
36. Dunn W, Schwimmer JB. The obesity epidemic and non-alcoholic fatty liver disease in children. *Curr Gastroenterol Rep* 2008;10(1):67-72
37. Kelly DA. Current issues in pediatric transplantation. *Pediatr Transplant* 2006;10(6):712-20
38. Squires RH Jr. Autoimmune hepatitis in children. *Curr Gastroenterol Rep* 2004;6(3):225-30
39. Ciocca M, Ramonet M, Cuarterolo M, López S, Cernadas C, Alvarez F. Prognostic factors in paediatric acute liver failure. *Arch Dis Child* 2008;93(1):48-51
40. Squires RH Jr. Acute liver failure in children. *Semin Liver Dis* 2008;28(2):153-66
41. Norris W, Paredes AH, Lewis JH. Drug induced liver injury in 2007. *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24(3): 287-97
42. Gotthard D, Riediger C, Weiss KH, Encke J, Schemmer P, Schmidt J, Sauer P. Fulminant hepatic failure: etiology and indications for liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22(suppl 8):viii5-viii8
43. Cochran JB, Losek JD. Acute liver failure in children. *Pediatr Emerg Care* 2007; 23(2):129-35
44. Bucuvalas J, Yazigi N, Squires RH Jr. Acute liver failure in children. *Clin Liver Dis* 2006;10(1):149-68
45. Lee WS, McKiernan P, Kelly DA. Etiology, outcome and prognostic indicators of childhood hepatic failure in the United Kingdom. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40(5):575-81
46. Alonso EM. Acute liver failure in children: the role of defects in fatty acid oxidation. *Hepatology* 2005;41(4):717-21

47. Saviuc P, Danel V. Acute acetaminophen overdose. *Rev Prat* 2008;58(8):861-5.
48. Bhaduri BR, Mieli-Vergani G. Fulminant hepatic failure: pediatric aspects. *Semin Liver Dis* 1996;16(4):349-55
49. Kaczor M.P., Sanak M., Szczeklik A. Rapid and inexpensive detection of α 1-antitrypsin deficiency-related alleles S and Z by a real-time polymerase chain reaction suitable for a large-scale population-based screening. *J Mol Diagn* 2007; 9:99-104.
50. Suchy F. Liver disease in children, Cambridge Medicine, 3rd. Edition, 2007,p 545-571
51. Sveger T. The natural history of liver disease in alpha-1-antitrypsin deficient children. *Acta Paediatrica Scandinavia* 1995;77:847-51.

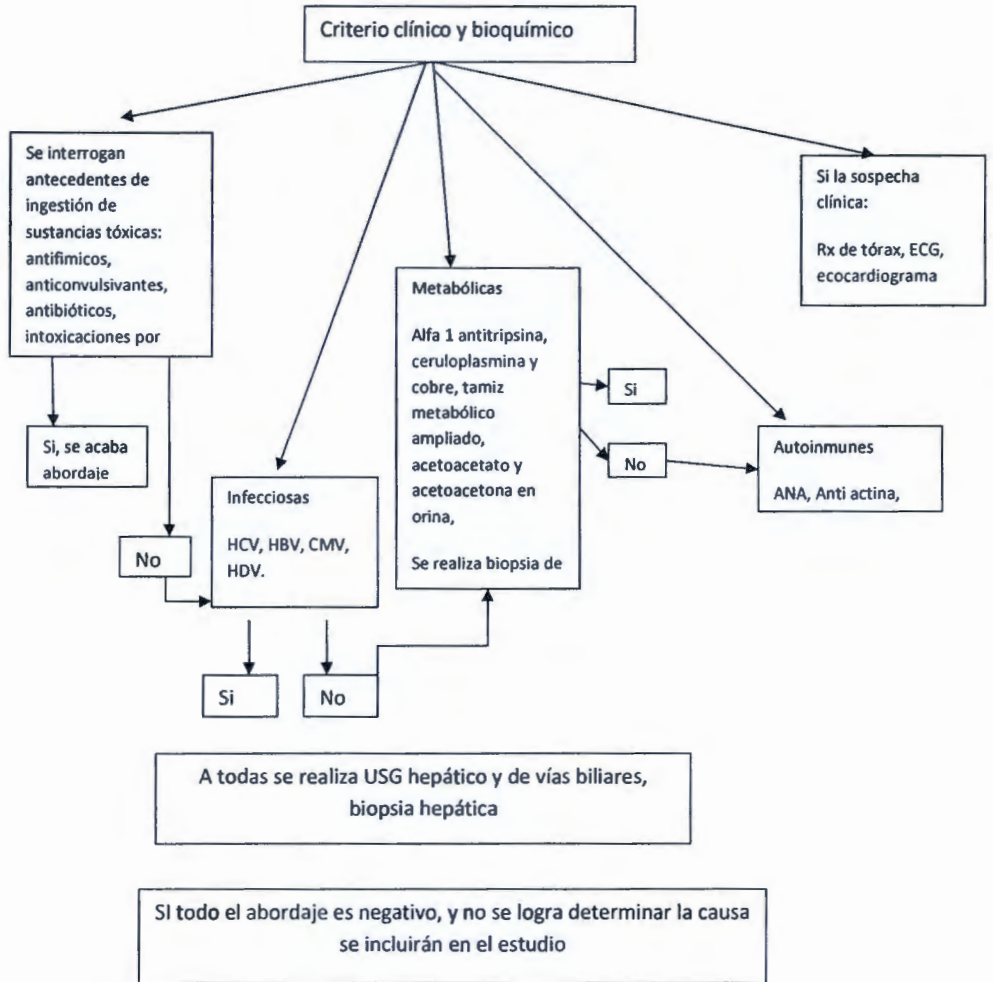
ANEXO 1

FLUJOGRAMAS DIAGNÓSTICOS

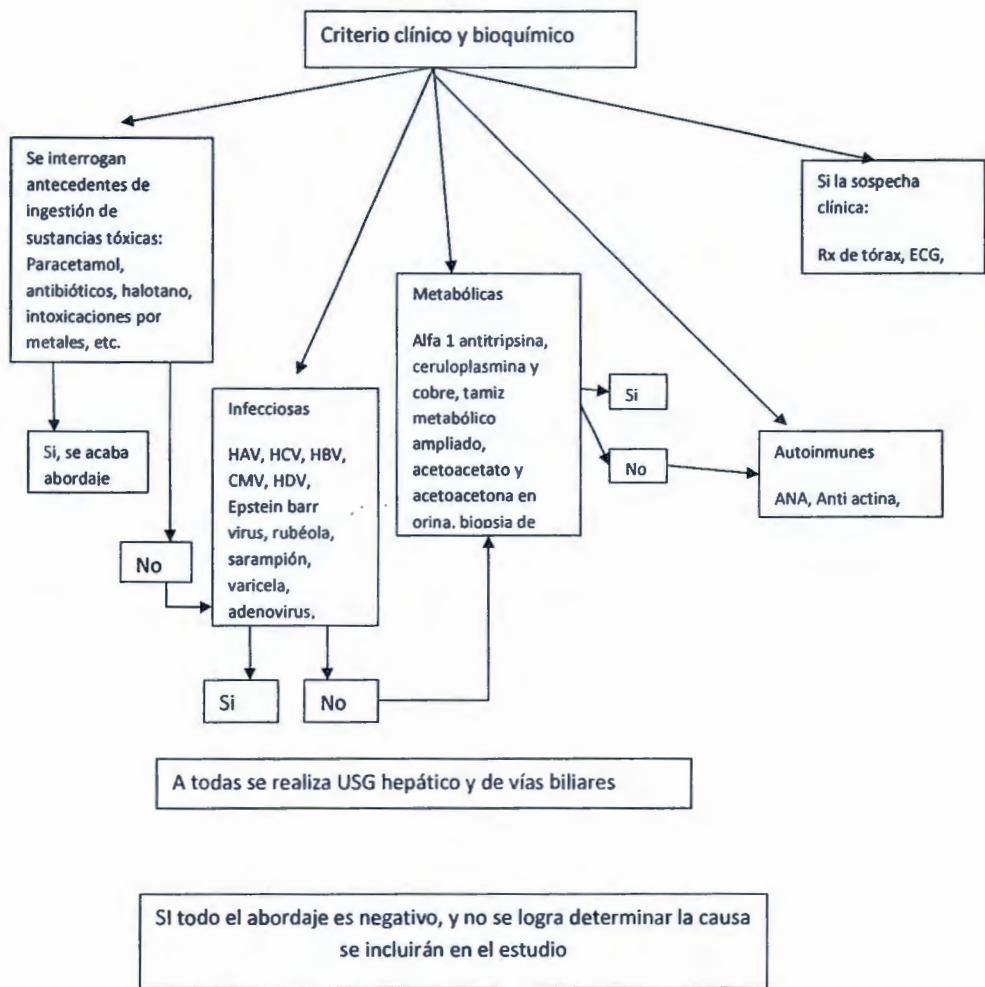
SÍNDROME COLESTASIS/HEPATITIS NEONATAL PROLONGADA



HEPATOPATIA CRÓNICA



HEPATITIS FULMINANTE



HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

1. Nombre _____

2. Número de expediente _____

2. Teléfono _____

3. Fecha de nacimiento _____

4. Fecha _____

5. Género ()

1. Masculino

2. Femenino

6. Edad al diagnóstico en meses ()

7. Diagnóstico ()

1. Hepatitis neonatal

2. Hepatitis crónica

3. Hepatitis fulminante

8. Determinación de alfa 1 antitripsina en suero ()

9. Determinación de alelos ()

1. MM

2. MS

3. MZ

4. SS

5. SZ

6. ZZ

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Sr. _____, se invita a su
hijo _____ con número de registro _____

en el INP a participar en el protocolo de investigación sobre **FRECUENCIAS ALELICAS DE LAS VARIANTES Z Y S DEL GEN *SERPINA 1* CONDICIONANTES DE DEFICIENCIA DE ALFA 1 ANTITRIPSINA EN NIÑOS MEXICANOS CON ENFERMEDAD HEPÁTICA DE CAUSA NO DETERMINADA**, realizada por la Dra. Flora Zárate Mondragón, Dra. Ariadna González del Ángel y el Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza; la primera del Servicio de Gastroenterología y Nutrición, los doctores González y Alcántara del Departamento de Genética y del Laboratorio de Biología Molecular, del Instituto Nacional de Pediatría.

Como usted sabe su hijo padece de una enfermedad hepática (colestasis neonatal, hepatitis crónica, hepatitis fulminante), y no obstante que se le han determinado todas las causas diagnósticas, no se ha logrado determinar la causa de su problema hepático.

La deficiencia de alfa 1 antitripsina es una de las posibilidades diagnósticas, en Estados Unidos es la primera causa genética (se hereda) de trasplante hepático, sin embargo con la determinación de esta en sangre no se logra realizar el diagnóstico adecuadamente, por lo cual pensamos que el diagnóstico de esta patología está subestimado, por lo que el motivo de este protocolo es determinar los alelos (parte de los genes) que determinan la producción de esta proteína de síntesis hepática (se produce en el hígado).

Para la determinación alélica se requiere la toma de una muestra venosa de aproximadamente 5 ml, la toma de esta muestra tiene un riesgo mínimo y las molestias que pueden causar es dolor en el sitio de punción. En caso que exista el antecedente de transfusión de menos de 3 meses, se realizará raspado de mucosa oral para la obtención de células de descamación y extracción de DNA.

Esta muestra se enviará al departamento de Genética y Laboratorio de Biología Molecular para la determinación de los alelos. Este estudio no tendrá ningún costo para el paciente y tampoco recibiremos un pago por la participación.

Este estudio es de suma importancia, ya que si su niño tiene alguno de los alelos deficientes podría explicar el cuadro clínico, y serviría para darle consejo genético acerca de la recurrencia de la enfermedad, así como un pronóstico de la misma.

Me han explicado a mi total satisfacción todos los aspectos del proyecto de investigación. Estoy enterado que se le extraerá 5 ml de sangre venosa para la determinación de los alelos deficientes (partes de los genes), y que se me informará el resultado de estos, de

tal manera que de tener alguna variante deficiente, recibiré consejo genético. Se me ha explicado que el material genético no será utilizado para otros fines ni en otros estudios.

He sido informado que en caso de no querer participar en dicho protocolo, la atención que recibe y que en un futuro solicite para mi hijo no sufrirá ningún cambio.

Cualquier duda con respecto al estudio podré comunicarme al 10840900 a la ext. 1520 del Servicio de Gastroenterología y Nutrición con la Dra. Flora Zárate Mondragón.

Me será entregada una copia de este consentimiento informado.

Por medio de la presente otorgo mi autorización para que mi hijo

(a) _____ de
_____ meses, con el número de registro _____, participe
como paciente en dicho protocolo.

Se otorga el presente Consentimiento Informado en la Ciudad de México, D.F. a los
_____ días del mes de _____ del año _____.

PROTESTO LO NECESARIO

Nombre y firma del padre, madre o tutor.

TESTIGOS

Nombre y firma

Nombre y firma

Quien aplica el consentimiento _____

Firma _____

CARTA DE ASENTIMIENTO

(pacientes mayores de 12 años)

Se te invita a participar en el protocolo de investigación sobre **FRECUENCIAS ALELICAS DE LAS VARIANTES Z Y S DEL GEN *SERPINA 1* CONDICIONANTES DE DEFICIENCIA DE ALFA 1 ANTITRIPSINA EN NIÑOS MEXICANOS CON ENFERMEDAD HEPÁTICA DE CAUSA NO DETERMINADA**, realizada por la Dra. Flora Zárate Mondragón, Dra. Ariadna González del Ángel y el Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza; la primera del Servicio de Gastroenterología y Nutrición, los doctores González y

Alcántara del Departamento de Genética y del Laboratorio de Biología Molecular, del Instituto Nacional de Pediatría.

Como sabes padeces de una enfermedad hepática (hepatitis crónica, hepatitis fulminante), y no obstante que se te han realizado muchas de las causas diagnosticables, no se ha logrado determinar la causa de tu problema hepático.

La deficiencia de alfa 1 antitripsina es una de las posibilidades diagnósticas, en Estados Unidos es la primera causa genética (se hereda) de trasplante hepático, sin embargo con la determinación de esta en sangre no se logra realizar el diagnóstico adecuadamente, por lo cual pensamos que el diagnóstico de esta patología está subestimado, por lo que el motivo de este protocolo es determinar los alelos (parte de los genes) que determinan la producción de esta proteína de síntesis hepática (se produce en el hígado).

Para la determinación alélica se requiere que me tomen una muestra venosa de aproximadamente 5 ml, el riesgo es mínimo y puede causar dolor en el sitio de punción. En caso que exista el antecedente de transfusión de menos de 3 meses, se realizará raspado de mucosa oral para la obtención de células de descamación y extracción de DNA.

Esta muestra se enviará al departamento de Genética y Laboratorio de Biología Molecular para la determinación de los alelos. No tendrá ningún costo para ti y tu familia ni tampoco se les dará un pago por su participación.

Este estudio es de suma importancia, ya que si tengo alguno de los alelos deficientes podría explicar mi cuadro clínico, y serviría para darme consejo genético acerca de la recurrencia de la enfermedad, así como un pronóstico de la misma.

Me han explicado a mi total satisfacción todos los aspectos del proyecto de investigación. Estoy enterado que se me extraerá 5 ml de sangre venosa para la determinación de los alelos deficientes (partes de los genes), y que se me informará el resultado de estos, de tal manera que de tener alguna variante deficiente, recibiré consejo genético. Se me ha explicado que el material genético no será utilizado para otros fines ni en otros estudios.

He sido informado que en caso de no querer participar en dicho protocolo, la atención que recibo y que en un futuro solicite no sufrirá ningún cambio.

Cualquier duda con respecto al estudio podré comunicarme al 10840900 a la ext. 1520 del Servicio de Gastroenterología y Nutrición con la Dra. Flora Zárate Mondragón.

Me será entregado una copia de este asentimiento informado.

Por medio de la presente otorgo mi autorización para participar en este proyecto, previo consentimiento de mi padre, madre o tutor

Se otorga el presente Asentimiento Informado en la Ciudad de México, D.F. a los _____ días del mes de _____ del año _____.

PROTESTO LO NECESARIO

Nombre y firma del menor

TESTIGOS

Nombre y firma

Nombre y firma

Quien aplica el consentimiento _____

Firma _____