

## Colestasis infantil y transportadores biliares

L. Hierro y P. Jara

Servicio de Hepatología y Trasplante. Hospital Infantil Universitario La Paz. Madrid. España.

### RESUMEN

La identificación de los sistemas de transporte involucrados en la secreción de la bilis y de los genes que los codifican ha permitido conocer la etiología en la mayoría de los niños afectados de colestasis intrahepática familiar. Las mutaciones en ATP8B1 ocasionan un defecto de FIC1, una flipasa de aminofosfolípidos, y causan un espectro de enfermedad variable, desde colestasis intrahepática progresiva a colestasis benigna recurrente, debido a alteraciones en la composición lipídica de las membranas y a una expresión disminuida del factor nuclear FXR. Las mutaciones en ABCB11 originan el defecto de la bomba canalicular de sales biliares BSEP, con manifestaciones clínicas tempranas y evolución a insuficiencia hepatocelular en la infancia. Las mutaciones en ABCB4 causan una alteración en el transportador de fosfolípido a bilis MDR3, y un espectro de enfermedad variable, con daño ductal progresivo a cirrosis en niños, o con litiasis biliar, colestasis gravídica o cirrosis tardía en adultos.

### CHILDHOOD CHOLESTASIS AND BILE TRANSPORTERS

Identification of the transport systems involved in bile secretion and of the genes codifying these systems has allowed the etiology of familial intrahepatic cholestasis to be determined in most affected children. Mutations in ATP8B1 cause a defect in FIC1, an aminophospholipid flipase, and give rise to a variable spectrum of disease, ranging from progressive intrahepatic cholestasis to benign recurrent cholestasis, due to alterations in the lipid composition of the membranes and decreased expression of the nuclear factor FXR. Mutations in ABCB11 cause a defect of the canalicular bile salt export pump (BSEP), with early clinical manifestations and progression to hepatocellular failure in childhood. Mutations in ABCB4 cause an alteration in the MDR3 phospholipid transporter, and a variable spectrum of disease from pro-

gressive ductal injury to cirrhosis in children, and gallstones, cholestasis of pregnancy, or late cirrhosis in adults.

### INTRODUCCIÓN

Las hepatopatías más significativas de la infancia comienzan clínicamente en etapas muy tempranas de la vida, en recién nacidos o en lactantes pequeños. El hígado neonatal manifiesta una superposición, desde el punto de vista clínico e histológico, en la expresión de enfermedad, aunque se trate de entidades de causa distinta. La ictericia colestática es el síntoma más común que conduce a la detección de hepatopatía en niños pequeños.

Las causas de una hepatopatía neonatal son numerosas, e incluyen procesos de inflamación idiopática, infecciones, dismorfogénesis, errores innatos del metabolismo, cromosomopatías, mutaciones en genes que codifican proteínas, enzimas o transportadores. Otras se deben a interferencias en la función y el proceso de maduración hepática posnatal relacionadas con un nacimiento prematuro, enfermedades de otros órganos, defectos hormonales o toxinas bacterianas. El proceso de separación de las diversas entidades de enfermedad y el conocimiento de su causa ha sido lento y sigue siendo incompleto.

Las hepatopatías de comienzo neonatal o en lactantes pequeños que cursan con ictericia y no asocian insuficiencia hepática en la valoración inicial se engloban en la expresión colestasis infantiles. Las entidades principales dentro de las colestasis infantiles son la atresia biliar extrahepática, el síndrome de Alagille, la hepatopatía por deficiencia de alfa-1 antitripsina y las denominadas «colestasis intrahepáticas familiares». La enfermedad más frecuente es la atresia biliar, que afecta a 1 por 8.000-17.000 recién nacidos. Las colestasis intrahepáticas familiares ocurren en 1 de cada 100.000 recién nacidos.

Las «colestasis familiares» recibieron ese nombre a pesar de que el síndrome de Alagille y la deficiencia de alfa-1 antitripsina también se acompañan de colestasis intrahepática y tienen una base genética. El síndrome de Alagille es bien identificable por su fenotipo facial, la escasez ductal en la biopsia y la asociación de enfermedad en

Correspondencia: Dra. L. Hierro.  
Servicio de Hepatología y Trasplante. Hospital Infantil Universitario La Paz.  
Paseo de la Castellana, 261. 28046 Madrid. España.  
Correo electrónico: pjara.hulp@salud.madrid.org

Recibido el 8-12-2004; aceptado para su publicación el 10-12 2004.

otros órganos. La hepatopatía por deficiencia de alfa-1 antitripsina se identifica por la presencia de glóbulos PAS positivos en el hígado, valor sérico bajo de esa proteína, características migratorias anómalas en isoelectrofoque y mutaciones en el gen. Sin embargo, las «colestasis familiares» carecían de un rasgo exclusivo, y la evidencia de otros casos en la familia cobraba gran importancia para la seguridad en el diagnóstico.

En los últimos años se han producido grandes avances en el conocimiento de las entidades que originan colestasis infantil. Dentro de las «colestasis intrahepáticas familiares» se identificó primero un grupo en los que la causa era la ausencia de síntesis de ácidos biliares por diferentes deficiencias enzimáticas específicas debidas a mutaciones. Una característica de esos niños es la ausencia de elevación de los ácidos biliares séricos. Recientemente, la mayoría de niños con «colestasis intrahepática familiar» con ácidos biliares séricos elevados se han filiado como afectados de mutaciones en los genes que codifican transportadores canaliculares.

### TRANSPORTADORES BILIARES

Los componentes principales de la bilis son los ácidos biliares, destinados a una función de solubilización de la grasa de la alimentación. Los ácidos biliares son tóxicos para las membranas y deben ser transportados de forma protegida, lo que se logra mediante la asociación con fosfolípidos y colesterol.

La excreción biliar requiere el transporte de los componentes contra un importante gradiente de concentración, por ello requiere consumo de adenosín trifosfato (ATP) y transportadores específicos. Los ácidos biliares son sintetizados en el hígado a partir de colesterol, y su elaboración es muy compleja. Por ello, diversos sistemas participan para la reutilización de las sales biliares una vez han cumplido su función en el tubo digestivo. Hay un transportador en el íleon terminal (*apical sodium bile transporter* [ASBT]) mediante el que son rescatadas y pasan a la sangre portal. En la membrana sinusoidal del hepatocito esas sales biliares son recaptadas muy eficazmente en primer paso por varios transportadores. El principal es el NTCP (*Na-taurocholate cotransporter polypeptide*), que transporta sal biliar y sodio, y precisa del funcionamiento paralelo de una bomba Na/K ATPasa para obtener el gradiente eléctrico adecuado en el interior celular. Las sales biliares también pueden ser recaptadas por OATP-C de forma independiente del sodio. Dentro del hepatocito son transferidas al polo canalicular y excretadas, igual que las de nueva síntesis. La excreción a la bilis tiene lugar principalmente por un transportador llamado *bile salt export pump* (BSEP)<sup>1-3</sup>.

El proceso de síntesis, excreción y circulación enterohepática de las sales biliares tiene un sistema de regulación, dirigido a evitar que dentro del hepatocito aumente la concentración de ácido biliar, porque es tóxico para las membranas y organelas, sobre las que ejerce acciones de solubilización («detergentes»).

La regulación se realiza mediante la función de *farnesoid X receptor* (FXR)<sup>4,5</sup>, un receptor nuclear que funciona como un sensor fisiológico de ácidos biliares. Al unirse a ácidos biliares o sus conjugados regula la expresión de los genes involucrados en la síntesis y el transporte de ácidos biliares. En el hepatocito FXR se autoinduce e induce la expresión de BSEP (aumenta la excreción de sal biliar a bilis). Otros efectos derivan de su acción activando el SHP (*short heterodimer protein* o *small heterodimer partner*). A través del SHP se inhibe la expresión de NTCP (disminuye la entrada de sal biliar en el polo sinusoidal) y de enzimas (entre ellas, la 7 alfa-hidroxi-lasa) necesarias para la síntesis de ácido biliar a partir de colesterol (disminuye neosíntesis de ácido biliar). En el intestino, el SHP disminuye la expresión de ASBT (disminuye la absorción intestinal de sales biliares).

Respecto a los fosfolípidos que deben solubilizar las sales biliares en la bilis, son transportados mediante un sistema específico denominado MDR3 (*multi drug resistance regulator*), situado en la membrana canalicular. Es una lipasa que trasloca los fosfolípidos a la capa externa de la membrana canalicular<sup>6</sup>. Probablemente la acción de las sales biliares contribuye a separar el fosfolípido de la membrana. La regulación de la función de MDR3 es poco conocida, con datos en animales que sugieren que es modulada más por la concentración de sales biliares dentro del hepatocito que por la cantidad de sal biliar transportada por BSEP. El FXR unido a sales biliares aumenta la expresión de MDR3.

### TRASTORNOS EN LOS TRANSPORTADORES BILIARES

En la última década se ha evidenciado que una alteración en los sistemas de transporte involucrados en la formación de la bilis es el motivo de algunas enfermedades reconocidas en el pasado por sus rasgos clínicos.

El origen de estas enfermedades de los transportadores biliares es una mutación génica, heredada o esporádica. Los genes que codifican los transportadores hepáticos se han agrupado según las características de la proteína que codifican. En el caso de los transportadores que tienen un dominio de unión a ATP (*ABC-binding cassette*), los genes reciben su apelativo derivado de esa característica. Dentro de ese grupo se incluye el gen de BSEP (*ABCB11*), el de MDR3 (*ABCB4*), el del principal transportador de aniones orgánicos, glutatión reducido y bilirrubina a bilis, llamado MRP2 o cMOAT (*ABCC2*) y el gen de CFTR (*ABCC7*). Otros transportadores son ATPasas tipo P, cuyos genes se denominan de acuerdo con ellos. El gen de la proteína implicada en el transporte de cobre a bilis se denomina *ATP7B*; el que codifica FIC1 es el *ATP8B1*. Otro grupo de proteínas de transporte son codificadas por genes denominados *SLC*, como el de NTCP (*SLC10A1*), el recaptador ileal apical de ácido biliar (*SLC10A2*), el transportador de ácido biliar independiente de sodio en la membrana basolateral OATP-C (*SLC21A6*), el transportador de cationes en la membrana

sinusoidal (*SLC22A4*) y el intercambiador de Na/H NHE1 (*SLC9A1*).

Las mutaciones dan lugar a que la proteína que codifican esté ausente, en baja concentración, y/o tenga características anómalas que impiden su migración al lugar celular donde debieran actuar, la función específica que desempeñan, o bien favorecen una degradación acelerada.

Hasta ahora se han delimitado enfermedades relacionadas con mutaciones en *ABCB11* (defecto de BSEP), *ABCB4* (defecto de MDR3), *MRP2* (enfermedad de Dubin-Johnson), *ATP8B1* (defecto de FIC1), *ATP7B* (enfermedad de Wilson), *SLC10A1* (malabsorción de ácidos biliares) y *ABCC7* (fibrosis quística). Problemas que eran considerados como entidades específicas por sus manifestaciones clínicas se han revelado homogéneos en su estudio genético, como es el caso de la enfermedad de Byler, la colestasis de niños Inuit y la colestasis intrahepática benigna recurrente, todas ellas relacionadas con mutaciones en *ATP8B1*<sup>7</sup>. Además, el estudio genético ha permitido reconocer un origen diverso en individuos aparentemente afectados de la misma enfermedad. En diferentes individuos con colestasis benigna recurrente se observa que la mutación puede afectar a *ATP8B1*<sup>7,8</sup> o a *ABCB11*<sup>9</sup>; estos últimos están además afectados frecuentemente de litiasis biliar. En algunas mujeres que sufren colestasis durante el embarazo se encuentran mutaciones en *MDR3*<sup>10</sup>, pero a su vez este problema es referido por madres de pacientes con defectos de *BSEP* o de *FIC1*<sup>11</sup>, y el embarazo puede ser el desencadenante de brotes de colestasis en pacientes con CBR debida a defecto en *ABCB11*<sup>9</sup>.

Los afectados tienen mutación en los 2 alelos, lo que concuerda con el patrón de herencia autosómica recesiva con el que se manifiestan en las familias. Algunos casos tienen mutaciones *de novo*, aunque son casos esporádicos y no debidos a herencia de sus progenitores. Dentro de cada entidad se observan numerosas mutaciones diferentes entre los afectados, a veces relacionadas con fenotipos heterogéneos pero en su mayoría causando un fenotipo parecido.

### COLESTASIS INTRAHEPÁTICA FAMILIAR PROGRESIVA

Este término se emplea para definir un síndrome consistente en colestasis crónica que empieza en edades infantiles tempranas y habitualmente progresa a cirrosis en la primera década de la vida. El prurito es el rasgo dominante en la mayoría de los niños, y a menudo muestra discordancia con el grado de ictericia, que puede ser leve o intermitente.

El reconocimiento de diferentes entidades de colestasis intrahepática familiar sucedió por la agrupación de casos de enfermedad en grupos étnicos endogámicos. Estas enfermedades recibieron denominaciones que hacían referencia a la población en que habían sido detectadas, como enfermedad de Byler<sup>11</sup> (el nombre del ancestro común de una población de niños Amish en Pensilvania), colestasis de niños esquimales de Groenlandia<sup>12</sup>, colestasis de niños indios canadienses<sup>13</sup>, colestasis de niños árabes de Israel<sup>14</sup>, etc.

Fuera de esas poblaciones había niños que parecían padecer enfermedades superponibles. Para ellos se acuñó la expresión colestasis intrahepática familiar progresiva (CIFP). La mayoría de niños con CIFP mostraban una enfermedad parecida en los aspectos principales a la enfermedad de Byler, y para ellos se adoptó la expresión síndrome de Byler. La característica más llamativa es el mantenimiento de una cifra normal de gammaglutamil transpeptidasa (GGT) en contraste con una profunda colestasis crónica con elevación de ácidos biliares séricos, ictericia, esteatorrea y prurito intenso. Faltaba una denominación genérica para agrupar a niños con enfermedad colestática hereditaria que tenían cifras de GGT elevadas.

El estudio de mutaciones en niños con enfermedad de Byler identificó alteraciones del gen *ATP8B1*. Los niños considerados semejantes a Byler, pero no descendientes, eran heterogéneos, y en ellos podían encontrarse mutaciones en *ATP8B1* o en *ABCB11*. En niños con CIFP con GGT elevada la mutación afectaba a *ABCB4*. En la terminología actual más exacta se clasifican aludiendo a la consecuencia de la mutación (defecto de FIC1, de BSEP o de MDR3) pero sigue empleándose alternativamente la denominación de CIFP tipo 1, 2 o 3<sup>15</sup>. En este contexto actual, en los niños no estudiados genéticamente es preferible el nombre de CIFP con GGT normal o CIFP con GGT elevada. La denominación CIFP se mantiene en todos, debido a que el fenotipo de enfermedad causado por mutaciones en alguno de los 3 genes implicados puede ser diferente de la de un comienzo infantil de curso grave.

La investigación de los genes implicados en el transporte hepatocitario está todavía poco extendida en los pacientes con sospecha de padecer mutaciones, debido a la carestía y laboriosidad de las técnicas. La mayoría de los casos de CIFP con estudio genético han podido ser filiados como afectados de un defecto en FIC1, BSEP o MDR3. Sin embargo, hay procesos de colestasis hereditaria originados por mutaciones en otros genes. Entre ellos se encuentra la colestasis de niños indios norteamericanos, una forma de CIFP con GGT alta, cuya alteración génica (*CIRHIA*) está localizada en 16q22, el producto del gen es una proteína destinada a organizar el ensamblaje de otras proteínas mitocondriales<sup>16</sup>. Otra CIFP con GGT alta es la colestasis noruega con linfedema (síndrome de Aagaens) en la que se ha identificado un defecto en el gen *LCSI* en el cromosoma 15<sup>17</sup>. Un entidad reconocida recientemente, con colestasis y GGT normal, es la hipercolanemia familiar de niños Amish, debida a un defecto de la proteína de la unión estrecha TJP2 (*tight junction protein 2*) y/o en BAAT (enzima conjugadora de ácido biliar con aminoácido)<sup>18</sup>. El síndrome de colestasis-artrogriposis-daño renal, con o sin ictiosis, es una forma de colestasis con GGT normal con mutación en el gen *VPS33B* (15q26) que codifica un regulador de la fusión de membrana<sup>19</sup>. Las posibilidades diagnósticas en niños con colestasis hereditaria son mucho más amplias que en el pasado<sup>20,21</sup>.

## CIFP CAUSADAS POR UN TRASTORNO EN LOS TRANSPORTADORES BILIARES

### Defecto de FIC1 (*ATP8B1*)

El gen *ATP8B1* está localizado en el cromosoma 18 (18q21) y codifica una ATPasa tipo P llamada FIC1<sup>22</sup>. FIC1 es una proteína integral de membrana. No es un transportador de ácidos biliares. Su función es aún mal conocida, en modelos animales FIC1 parece funcionar como una flipasa de aminofosfolípido transfiriéndolo desde la capa externa a la interna de la membrana. Sería responsable de mantener la capa interna de la membrana celular más rica en fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina<sup>23</sup>. Hay muchos tejidos, además del hígado, que expresan FIC1, como el páncreas, el estómago, el intestino delgado y el riñón. El hígado, comparativamente, lo expresa menos que el intestino.

La patogenia de la colestasis que manifiestan los niños con defecto de FIC1 puede ser secundaria a una inadecuada función de los transportadores canaliculares debida a cambios en la membrana celular. Otra posibilidad es que el defecto FIC1 en intestino altere el ciclo enterohepático de sales biliares. En ratones homocigotos para la mutación G308V en *ATP8B1* (la misma que presentan los niños con enfermedad de Byler) se ha observado disregulación del transportador ileal ASBT, originando una alta absorción intestinal de los ácidos biliares con los que fueron alimentados.

Estudios muy recientes sugieren que el defecto de FIC1 causa colestasis mediada por inhibición de FXR, aunque el mecanismo por el que se altera FXR no es conocido. El estudio del hígado de un niño español con mutaciones en *ATP8B1* demostró que la expresión de FXR era muy reducida, y ese efecto parece específico del defecto FIC1, pues no sucede en niños que padecen otras formas de colestasis<sup>24</sup>. No hay asociado un defecto en el gen de FXR. En el hígado con defecto de FIC1 existía una importante reducción de ARN mensajeros de FXR, de *ABCB11* y de SHP, aproximadamente al 25% del existente en hígado normal o afectado por otras causas de colestasis<sup>24</sup>. La expresión de ARNm de *ABCB4*, NTCP y del receptor nuclear LXR fueron normales. Con técnicas de inmunohistoquímica, el receptor de BSEP se manifestaba en la membrana canalicular normalmente con autoanticuerpos a dilución 1:20, pero no a 1:50. En niños no afectados de defecto FIC1 (y sin colestasis por defecto de BSEP) el BSEP era aún detectable con la dilución 1:50.

El fenotipo de la enfermedad por defecto de FIC1 puede deberse, en parte, a una actividad postranscripcional disminuida de FXR. En el estudio de expresión de múltiples genes, de 8.300 estudiados, el niño con defecto de FIC1 tuvo cambios específicos en 163 genes, comparado con otras causas de colestasis. Los genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de ácido biliar y transportadores basolaterales y canaliculares (CYP27A1, BAAT, ABCC2, OATP-C) estaban inhibidos en este paciente. También estaba disminuida la expresión de genes implicados en varios aspectos del metabolismo lipídico: modu-

ladores y enzimas que participan en la síntesis de colesterol, tráfico intracelular y eliminación del exceso<sup>24</sup>.

En otro estudio, en células ileales de dos niños con mutaciones en *ATP8B1*, se observó inactivación de FXR, con descenso secundario de SHP y aumento de expresión de ARNm del transportador de ácido biliar ASBT<sup>25</sup>. Los autores sugirieron la hipótesis de que FIC1 actúa modificando FXR. Esa modificación, postranscripcional podría ser necesaria para la traslocación de FXR al núcleo, donde después ejerce su efecto activando la transcripción de los genes de BSEP y SHP. Así, sería previsible que los niños con defecto de FIC1 manifestaran colestasis debido a un descenso en la cantidad de receptores BSEP.

A través del estudio genético, se ha visto que las mutaciones en *ATP8B1* corresponden clínicamente a enfermedades de diferente curso y gravedad. Hay 2 formas básicas: una muy grave<sup>11</sup> (CIFP) y otra de curso intermitente, con fases colestáticas de duración variable, pero sin aparente daño histológico permanente (colestasis intrahepática benigna recurrente [CIBR]). Existen pacientes con CIFP de gravedad intermedia, que alcanzan la edad adulta. Otros pacientes aparentemente afectados de CIBR posteriormente desarrollan colestasis permanente<sup>26</sup>.

### *Clínica en niños: CIFP tipo 1*

En pacientes con defecto en FIC1 con manifestaciones de CIFP la clínica tiene variantes. La primera descripción fue la enfermedad de Byler; posteriormente, el síndrome de colestasis familiar fatal en niños esquimales de Groenlandia, y más tarde, otros pacientes no relacionados, en otros países.

En los 7 niños descritos inicialmente con enfermedad de Byler había rasgos bien definidos<sup>11</sup>. El primer síntoma era diarrea con heces blandas esteatorreicas y malolientes; se iniciaba en el primer mes de vida y persistía toda la vida del niño, con exacerbaciones paralelas a la colestasis. La ictericia comenzaba entre los 2 y 8 meses de edad; al principio era episódica, con brotes que duraban 2 a 8 semanas, y después desaparecían. Más tarde, desde la edad de 1 a 4 años, la ictericia se hacía permanente. El hígado era grande desde el principio e iba aumentando de tamaño lentamente. La talla se afectaba profundamente desde los 9 meses de edad. No hubo hallazgos histológicos específicos. En el momento de la descripción 5 de 7 casos habían fallecido por la hepatopatía, a edades comprendidas entre los 17 meses y los 8 años. Los autores notaron el parecido de la colestasis en la fase inicial de estos niños con los brotes de colestasis en pacientes afectados de colestasis benigna recurrente. Casos posteriores a la primera descripción tenían documentada la cifra curiosamente normal de GGT, una elevación de ácidos biliares séricos, una gran reducción de la excreción de sales biliares en la bilis y un aspecto granular peculiar de la bilis en microscopía electrónica, que recibió el nombre de bilis de Byler<sup>27</sup>. Se comunicaron casos aislados de pancreatitis aguda. Cuando los pacientes de ascendiente Byler fueron estudiados genéticamente en épocas recientes se observó la mutación *missense* G308V en el gen *ATP8B1*<sup>23</sup>.

En los 16 niños Inuit de Groenlandia inicialmente descritos, los primeros signos de enfermedad eran distintos<sup>12</sup>. La ictericia aparecía en los primeros 3 meses de vida. Era fluctuante pero nunca desaparecía completamente. Las heces eran esteatorreicas, pero no describían episodios de diarrea. La hepatomegalia, las hemorragias nasales y el retraso estatural eran llamativos. Las transaminasas eran normales en la mayoría de estos niños. La biopsia hepática mostraba colestasis, con fibrosis periportal en las biopsias realizadas con más tiempo de evolución. Mediante microscopia electrónica el contenido de bilis canalicular tenía un aspecto granular. Alrededor del canalículo existía una condensación en banda de microfilamentos. Al final del seguimiento, 8 pacientes habían fallecido, y el mayor de los supervivientes tenía 4 años. El estudio genético de niños de esta población identificó la mutación *missense* D554N en *ATP8B1*<sup>23</sup>.

Posteriormente se describieron muchas series de pacientes, con el diagnóstico de CIFP o de síndrome de Byler. Todos tenían GGT normal, un rasgo bioquímico muy característico que no había sido recogido en la descripción original de la enfermedad de Byler. Muchos niños en esas series tenían características histológicas iniciales distintas de las de la enfermedad de Byler.

Uno de los primeros estudios genéticos reportados en niños con síndrome de Byler fue muy importante para delimitar en base a datos clínicos la enfermedad por defecto de FIC1 de otros tipos de CIFP con GGT normal. El concepto previo de «síndrome de Byler» que incluía todas las formas con GGT normal había llevado a confusión, por considerar demasiada diversidad clínica y sobre todo evolutiva dentro del mismo término. El estudio referido, en niños de Taiwan, sugería que el defecto de *ATP8B1*, diferente en su mutación respecto al de las poblaciones originales, cursaba de una manera similar a la de los niños Byler/Inuit<sup>28</sup>. El aspecto histológico es de colestasis inespecífica, sin afectar la estructura ni asociar hepatocitos gigantes multinucleados. Algunos tienen diarrea y otros no; la ictericia es persistente en casi todos; la cifra de transaminasas es leve o moderadamente alta, y la cifra de alfafetoproteína, normal.

La CIFP por defecto de FIC1 causa una mala calidad de vida por el prurito que caracteriza toda la evolución de los pacientes. La talla se afecta gravemente, probablemente por motivos adicionales a la maldigestión y malabsorción que presentan. Las infecciones o disparadores no evidentes desencadenan exacerbaciones de la ictericia. Pocos niños tienen problemas debidos a hipertensión portal. Dado que el tratamiento médico es poco eficaz en el control de los síntomas, el trasplante hepático se ha aplicado a muchos pacientes. El estudio histológico de la pieza de hepatectomía muestra fibrosis portal o cirrosis.

El curso después de trasplante hepático es complicado en un número aún indeterminado de los pacientes—tal vez en todos— con CIFP por defecto de FIC1. El restablecimiento de excreción de sales biliares por parte del injerto desencadena un síndrome consistente en diarrea crónica con heces acuosas y esteatorrea y esteatosis en el hígado con mínima repercusión funcional; en algunos niños se añaden episodios de pancreatitis aguda o sordera neurosenso-

rial. Este síndrome de diarrea impide el normal crecimiento después del trasplante. En todos los casos de CIFP con esta evolución peculiar postrasplante estudiados genéticamente se ha demostrado que están afectados de mutaciones en *ATP8B1*<sup>24,29,30</sup>. No hay una explicación aceptada para esos síntomas.

En la experiencia de nuestro centro, 7 niños con CIFP manifestaron el síndrome de diarrea crónica postrasplante. En 3 de ellos confirmamos una mutación (heterocigosis compuesta) en *ATP8B1*<sup>24</sup>. Las características clínicas previas al trasplante en estos 7 casos coinciden exactamente con las que han sido descritas en niños de otros países con defecto de FIC1.

### Defecto de BSEP (*ABCB11*)

Al estudiar a una población de niños de Oriente Medio que padecían CIFP y procedían de 6 familias consanguíneas no relacionadas entre sí, se descartó que la enfermedad estuviera ligada a mutaciones en el cromosoma 18, como en el defecto de FIC1. Aparecía relacionada con el cromosoma 2 (2q24)<sup>31</sup>. Posteriormente fue identificado el gen mutado, primero llamado *SPGP* (*sister p-glycoprotein*). Las glucoproteínas p son miembros de la clase de proteínas *ATP-binding cassette*. El nombre *SPGP* fue cambiado por el de *BSEP* (*bile salt export protein o pump*) un vez que se conoció su función, y su gen pasó a denominarse *ABCB11*<sup>32</sup>.

BSEP es el transportador responsable del paso de las sales biliares conjugadas con glicina o taurina a la bilis. Es predecible que mutaciones que afecten a su expresión o función alteren gravemente el flujo biliar. La acumulación de sales biliares en el hepatocito sería la causa del daño hepatocelular<sup>3</sup>. El estudio de la bilis en 13 niños con defecto de BSEP ha evidenciado que la concentración de sales biliares es inferior al 1% de lo normal<sup>33</sup>. El ácido ursodeoxicólico aparece en mínima cantidad en bilis, por lo que probablemente también precisa BSEP. En un caso en que se estudió la cinética de ácidos biliares se observó que la síntesis de cólico está disminuida pero la de deoxicólico está en el rango bajo de la normalidad<sup>33</sup>. En la bilis estaba también disminuida la cantidad de colesterol y fosfolípidos.

En niños con manifestaciones de CIFP el defecto de BSEP es evidenciable mediante técnicas de inmunohistoquímica en el hígado. En el hígado sano, el anticuerpo reconoce la proteína canalicular. En el defecto de BSEP no se evidencia esa proteína. En uno de los primeros estudios hubo una perfecta correlación entre ausencia completa de BSEP en la biopsia y demostración de mutaciones en el gen<sup>33</sup>. No hubo casos con mutaciones *ABCB11* que expresaran BSEP y no hubo niños que no tuviesen mutaciones *ABCB11* y no expresaran BSEP.

### Clínica en niños: CIFP tipo 2

Probablemente la mayoría de los niños con síndrome de Byler descritos en la época previa a la disponibilidad de

estudio genético o inmunohistoquímico eran casos con defecto de BSEP.

En los casos reportados la clínica de CIFP tiene un comienzo temprano, con ictericia permanente o en brotes, asociada a prurito, esteatorrea, retraso estatural con relativa conservación del estado de nutrición, y complicaciones de malabsorción de vitaminas liposolubles si no las reciben. Bioquímicamente son normales la cifra de GGT y colesterol, y hay aumento de los ácidos biliares séricos. Estos datos son comunes a los niños con defecto de FIC1. A diferencia de ellos, los niños con defecto de BSEP tienen transaminasas más elevadas, alfa-fetoproteína alta, una imagen histológica inicial en la que destacan células gigantes multinucleadas, y un curso clínico más rápido a cirrosis e insuficiencia hepática<sup>28</sup>. Es frecuente el desarrollo de litiasis biliar, no referido en niños con defecto de FIC1. En el curso posterior a trasplante hepático no hay diarrea, y la recuperación de la talla es normal.

En nuestra experiencia, el defecto de BSEP explica el 43% de los casos de CIFP con GGT normal que atendemos. En 10 niños con ausencia de tinción para BSEP en la biopsia, las características fueron la ictericia desde el período neonatal o aparecida antes de los 6 meses, con un curso inicial en el que el 70% de los casos alcanzaron cifras de bilirrubina < 2 mg/dl seguido nuevamente por ictericia permanente o en brotes. La biopsia realizada en los primeros meses de vida mostró transformación gigantoceular en el 80% de los casos. En la evolución las transaminasas eran notablemente altas y con frecuencia mostraban inversión del ratio aspartato aminotransferasa (AST)/alanina aminotransferasa (ALT) desde el principio de la enfermedad. En el 40% de los casos la talla se afectó gravemente. Todos mantuvieron el peso conservado para la talla. El 60% tuvo litiasis biliar. La mitad de los niños desarrolló bruscamente insuficiencia hepática con coagulopatía grave, coincidiendo con fiebre y/o datos sugerentes de colecistitis asociada. Se realizó trasplante hepático a los nueve niños que fueron atendidos en los últimos 15 años, debido a la gravedad clínica de la colestasis, o en la fase de insuficiencia hepática. La pieza de hepatectomía mostraba hialina de Mallory, cirrosis con fibrosis portal o extensa fibrosis intersticial. La evolución post-trasplante fue satisfactoria en todos.

### Defecto de MDR3 (ABCB4)

El tercer tipo de CIFP corresponde a un defecto en el gen *ABCB4*, localizado en el cromosoma 7 (7q21), que codifica MDR3<sup>6</sup>. En el modelo animal, ratones sin expresión de *mrd2* (equivalente al MDR3 humano), se evidencia una disminución de fosfolípido en bilis y daño ductal. Ese mismo hallazgo se encuentra en niños con CIFP debida a defecto de MDR3. La concentración de sales biliares en la bilis es normal. La ausencia de fosfolípidos en la bilis se supone causa una desestabilización de las micelas que conduce a litogenicidad de la bilis con cristalización del colesterol, lo que conduciría a obstrucción de los conductos biliares de pequeño calibre. Además, los canalículos y

los conductos biliares están expuestos al efecto dañino de las sales biliares.

La enfermedad es variable según la mutación *ABCB4* conduzca a una proteína truncada, o sea una mutación *missense* con actividad residual<sup>6</sup>. Clínicamente se ha correlacionado con defecto de MDR3 un espectro de enfermedad que abarca casos de CIFP, colestasis neonatal transitoria, litiasis biliar de colesterol en jóvenes, cirrosis en adultos, colestasis inducida por anticonceptivos orales y colestasis del embarazo.

El diagnóstico se realiza mediante inmunohistoquímica en biopsia hepática. El 66% de los pacientes no expresan MDR3 en el canalículo, un 22% manifiesta una tinción débil, y un 11% expresa MDR3 normalmente<sup>34</sup>. El estudio de las mutaciones es de ayuda para identificar correctamente los casos con expresión aparentemente normal en la inmunohistoquímica, y también porque la gravedad de la enfermedad se ha correlacionado con la presumible consecuencia de cada mutación. Un *stop codon* al comienzo de la secuencia causa enfermedad grave, mientras que determinadas mutaciones *missense* se asocian a una enfermedad de inicio más tardío, con progresión menos rápida y respuesta favorable a tratamiento con ácido ursodeoxicólico. No en todos los pacientes fenotípicamente afectados se ha identificado una mutación en el gen *ABCB4*; otros fueron heterocigotos. En la serie de Jacquemin, 22 de 31 pacientes con enfermedad sugerente analizados mediante SSCP tuvieron mutación (13 homocigota, 9 heterocigota)<sup>6,34</sup>, probablemente debido a que hay mutaciones aún no identificadas y a que es necesaria la secuenciación completa del gen, pero no puede excluirse que el estado heterocigoto pueda causar enfermedad. Algunos padres de niños afectados padecen colestasis gravídica o litiasis biliar.

### Clínica en niños: CIFP tipo 3

Los niños se caracterizan por una colestasis con antecedente familiar compatible con una herencia autonómica recesiva. El espectro de enfermedad CIFP tipo 3 es más amplio y distinto de los niños con CIFP 1 o 2. El inicio clínico solamente en un tercio de los casos es detectado en el primer año de la vida, es rara la manifestación como una colestasis neonatal. La mayoría de los niños descritos fueron identificados por hepatosplenomegalia o por complicaciones de cirrosis a lo largo de la infancia o adolescencia. Tienen datos analíticos de colestasis, con elevación de GGT (VNx13), de bilirrubina (VNx2) y de ácidos biliares séricos (VNx25) pero en el curso de la enfermedad la colestasis puede ser anictérica, y el prurito es poco pronunciado o no evidente. La cifra de transaminasas es elevada (VNx5) y la de colesterol, habitualmente normal<sup>34</sup>.

La biopsia hepática muestra colestasis, con proliferación ductal e inflamación portal. En el curso de la enfermedad la imagen histológica es de cirrosis biliar. Los niños presentan como complicaciones principales una evolución progresiva de signos de hipertensión portal, sangrado digestivo y fallo hepatocelular. La evolución a cirrosis pre-

coz, en la primera década de la vida, es propia de pacientes con mutaciones que causan una ausencia completa de función de MDR3<sup>6</sup>. Las mutaciones que conllevan una actividad residual permiten mayor supervivencia y se especuló pudieran ser la causa de cirrosis inexplicada en adultos, una suposición que ya ha sido evidenciada incluso en estado de heterocigosis<sup>35</sup>.

### TRATAMIENTO DE LA COLESTASIS INFANTIL POR DEFECTO DE TRANSPORTADORES BILIARES

El tratamiento médico incluye la modificación de la dieta, para que sea de fácil absorción y proporcione un 120% de los requerimientos calóricos normales para su edad. La alimentación se basa en preparados lácteos modificados (con proteína hidrolizada, dextrinomaltoza y triglicéridos de cadena media [MCT]) y cereales parcialmente dextrinados. Además, se precisan alimentos naturales adaptados a la edad del niño, a los que se añade aceite MCT y aceite de oliva (como fuente de ácidos grasos esenciales). Es necesario el aporte de vitaminas liposolubles, regulado según el valor en suero y las pruebas de coagulación. Las dosis en nuestra práctica son: vitamina D<sub>3</sub>, 2.000 U/día; vitamina K, 10 mg oral semanal; vitamina E, 100-400 mg/día, y calcio, 20-50 mg/kg/día. A pesar de ello, la evolución puede complicarse con enfermedad ósea metabólica, y muchos muestran piel gruesa, cambios retinianos y retraso del crecimiento.

Los niños con CIFP han sido tratados con fenobarbital (5 mg/kg/día) resino-colesteramina (2-8 g/día), ácido ursodeoxicólico (10-30 mg/kg/día) y/o rifampicina (10 mg/kg/día). Los efectos de estos fármacos atenúan el síntoma más desagradable: el prurito, pero rara vez lo eliminan en pacientes con CIFP tipos 1 y 2. Bajo este tratamiento, los síntomas colestáticos se mantienen en grados que asocian lesiones cutáneas por rascado o alteran su capacidad de concentración en juegos, aprendizaje y conciliación del sueño. No obstante, algunos casos con fenotipo más leve consiguen buena calidad de vida con la ayuda de esos fármacos.

El ácido ursodeoxicólico fue recibido con esperanza en el tratamiento de CIFP. El UDCA promueve el flujo biliar y aumenta la excreción endógena de sales biliares, limita su reabsorción intestinal al competir con los naturales por el transportador, y es más hidrofílico, por lo que el enriquecimiento en UDCA del *pool* de ácido biliar total, con disminución de las sales biliares endógenas, disminuye la toxicidad para el hepatocito y el ducto biliar en condiciones de colestasis. Un estudio multicéntrico con 26 pacientes afectados de CIFP con GGT normal comunicó la normalización bioquímica y desaparición del prurito en 11 casos evaluados 2 a 4 años después de iniciar UDCA (20-30 mg/kg/día)<sup>36</sup>. En un estudio paralelo en niños con CIFP y GGT elevada, el tratamiento con UDCA obtuvo normalidad bioquímica en 6 de 13 casos<sup>36</sup>. Actualmente se emplea UDCA en todas las formas de CIFP, pero se considera que la población de niños con más capacidad de ser beneficiados en términos de pronóstico son los pacientes con CIFP tipo 3. Un 30% de los niños con CIFP-3 res-

ponde al tratamiento<sup>6</sup>. Se especula que pacientes con actividad MDR3 residual y alguna cantidad de fosfolípido en la bilis, combinado con la sustitución parcial de las sales biliares por UDCA puedan alcanzar una reducción de la toxicidad de las sales biliares por debajo del umbral crítico que ocasiona daño ductal.

En niños con CIFP con GGT normal algunos grupos han comunicado un efecto favorable sobre el curso de la enfermedad con técnicas quirúrgicas, como la derivación externa parcial biliar o la exclusión ileal. Ambas están dirigidas a impedir la reabsorción ileal de las sales biliares. La técnica más usada es la derivación desde la vesícula, a través de un asa de yeyuno de 10-15 cm con estoma en la piel abdominal. En el 75% de los niños que no tienen cirrosis en el momento de esta cirugía hay mejoría en las pruebas de función hepática<sup>37</sup>. También fue comunicado que resolvía el prurito intratable y revertía el fracaso del crecimiento<sup>38</sup>. En algunos casos se ha documentado una clara mejoría histológica<sup>39</sup>. Es posible que el efecto de esta derivación quirúrgica disminuya a lo largo del tiempo, y aumente la sintomatología de diarrea previa en algunos.

El trasplante hepático es la opción terapéutica más útil si los síntomas no son controlados con fármacos o derivación biliar externa. En niños el trasplante hepático tiene una supervivencia global del 90% a 5 años. El diagnóstico de certeza sobre el defecto subyacente ayuda a establecer el momento adecuado del trasplante. Como ya se comentó, los niños con defecto de FIC1, tal vez por la expresión de FIC1 en múltiples órganos, tienen una evolución postrasplante que no restablece la calidad de vida en la medida óptima que logran los niños CIFP-2 o CIFP-3.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Jansen PLM. Foreword: from classic bile physiology to cloned transporters. *Semin Liver Dis.* 2000;20:245-50.
2. Bañales JM, Medina JF. Mecanismos moleculares en la formación de la bilis. *Gastroenterol Hepatol.* 2004;27:320-4.
3. Thompson R, Strautnieks S. BSEP: function and role in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Semin Liver Dis.* 2001;21:545-50.
4. Karpen SJ. Nuclear receptor regulation of hepatic function. *J Hepatol.* 2002;36:832-50.
5. Trauner M, Boyer JL. Cholestatic syndromes. *Curr Opin Gastroenterol.* 2004;20:220-30.
6. Jacquemin E. Role of multidrug resistance 3 deficiency in pediatric and adult liver disease: one gene for three diseases. *Semin Liver Dis.* 2001;21:551-62.
7. Klomp LWJ, Vargas JC, Van Mil SWC, Pawlikowska L, Strautnieks SS, Van Eijk MJT, et al. Characterization of mutations in ATP8B1 associated with hereditary cholestasis. *Hepatology.* 2004;40:27-38.
8. Tygstrup N, Steig BA, Juijn JA, Bull LN, Howen RHJ. Recurrent familial intrahepatic cholestasis in the Faroe Islands. Phenotypic heterogeneity but genetic homogeneity. *Hepatology.* 1999;29:506-8.
9. Van Mil SWC, Van der Woerd WL, Van der Brugge G, Sturm E, Jansen PLM, Bull LN, et al. Benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 is caused by mutations in ABCB11. *Gastroenterology.* 2004;127:379-84.

10. Deleuze JF, Jacquemin E, Dubuisson C, Cresteil D, Dumont M, Erlinger S, et al. Defect of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology*. 1996;23:904-8.
11. Clayton RJ, Iber FL, Ruebner BH, McKusick VA. Byler disease. Fatal familial intrahepatic cholestasis in an Amish Kindred. *Amer J Dis Child*. 1969;117:112-24.
12. Nielsen IM, Ornvold K, Brock Jacobsen B, Ranek L. Fatal familial cholestatic syndrome in Greenland Eskimo children. *Acta Paediatr Scand*. 1986;75:1010-6.
13. Drouin E, Russo P, Tuchweber B, Mitchell G, Rasquin-Weber A. North American Indian cirrhosis in children: a review of 30 cases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;31:395-404.
14. Naveh Y, Bassan L, Rosenthal E, Berkowitz D, Jaffe M, Mandel H, et al. Progressive familial intrahepatic cholestasis among the arab population in Israel. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1997;24:548-54.
15. Jacquemin E, Hadchouel M. Genetic basis of progressive familial intrahepatic cholestasis. *J Hepatol*. 1999;31:377-81.
16. Chagnon P, Michaud J, Mitchell G, Mercier J, Marion JF, Drouin E, et al. A missense mutation (R565W) in cirhin (FLJ14728) in North American Indian childhood cirrhosis. *Am J Genet*. 2002;71:1443-9.
17. Bull LN, Roche E, Song EJ, Pedersen J, Knisely AS, Van der Hagen CB, Eiklid K, et al. Mapping of the locus for cholestasis-lymphedema syndrome (Aagenaes syndrome) to a 6.6-cM interval on chromosome 15q. *Am J Hum Genet*. 2000;67:994-9.
18. Carlton VEH, Harris BZ, Puffenberger EG, Batta AK, Knisely AS, Robinson DL, et al. Complex inheritance of familial hypercholesterolemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. *Nat Genet*. 2003;34:91-6.
19. Gissen P, Johnson CA, Morgan NV, Stapelbroek JM, Forshaw T, Cooper WN, et al. Mutations in VPS33B, encoding a regulator of SNARE-dependent membrane fusion, cause arthrogryposis-renal dysfunction-cholestasis (ARC) syndrome. *Nat Genet*. 2004;36:400-4.
20. Knisely AS. Progressive familial intrahepatic cholestasis: an update. *Pediatr Develop Pathol*. 2004;7:309-14.
21. Baussan C, Cresteil D, Gonzales E, Raynaud N, Dumont M, Bernard O, et al. Genetic cholestatic liver diseases: the example of progressive familial intrahepatic cholestasis and related disorders. *Act Gastro-Enterologica Belgica*. 2004;67:179-83.
22. Bull LN, Van Ejik MJT, Pawlikowska L, De Young J, Juijn JA, Liao M, et al. Identification of a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet*. 1998;18:219-24.
23. Van Mil SWC, Klomp LWJ, Bull LN, Houwen RHJ. FIC1 disease: a spectrum of intrahepatic cholestatic disorders. *Sem Liver Dis*. 2001;21:535-44.
24. Álvarez L, Jara P, Sánchez-Sabaté E, Hierro L, Larrauri J, Díaz MC, et al. Reduced hepatic expression of farnesoid X receptor in hereditary cholestasis associated to mutation in ATP8B1. *Human Mol Genet*. 2004;13:2451-60.
25. Chen F, Ananthanarayanan M, Emre S, Neimark E, Bull LN, Knisely SS, et al. Progressive familial intrahepatic cholestasis, type 1, is associated with decreased Farnesoid X Receptor activity. *Gastroenterology*. 2004;126:756-64.
26. Van Ooteghem NA, Klomp LW, Van Berge-Henegouwen GP, Houwen RH. Benign recurrent intrahepatic cholestasis progressing to progressive familial intrahepatic cholestasis: low GGT cholestasis is a clinical continuum. *J Hepatol*. 2002;36:439-43.
27. Bull LN, Carlton VEH, Stricker NL, Baharloo S, DeYoung JA, Freimer NB, et al. Genetic and morphological findings in Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis (Byler disease (PFIC-I) and Byler Syndrome): evidence for heterogeneity. *Hepatology*. 1997;26:155-64.
28. Chen HL, Chang PS, Hsu HC, Ni YH, Hsu HY, Lee JH, et al. FIC1 and BSEP defects in Taiwanese patients with chronic intrahepatic cholestasis with low  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase levels. *J Pediatr*. 2002;140:119-24.
29. Lykaveris P, Van Mil S, Cresteil D, Fabre M, Hadchouel M, Klomp L, et al. Progressive familial intrahepatic cholestasis type 1 and extrahepatic features: no catch-up of stature growth, exacerbation of diarrhea, and appearance of liver steatosis after liver transplantation. *J Hepatol*. 2003;39:447-52.
30. Nagasaka H, Yorifuji T, Kosugiyama K, Egawa H, Kawai M, Murayama K, et al. Resistance to parathyroid hormone in two patients with familial intrahepatic cholestasis: possible involvement of the ATP8B1 gene in calcium regulation via parathyroid hormone. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;39:404-9.
31. Strautnieks SS, Kagalwalla AF, Tanner MS, Knisely AS, Bull L, Freimer N, et al. Identification of a locus for progressive familial intrahepatic cholestasis PFIC2 on chromosome 2q24. *Am J Hum Genet*. 1997;61:630-3.
32. Strautnieks S, Bull LB, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, et al. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet*. 1998;20:233-8.
33. Jansen PLM, Strautnieks SS, Jacquemin E, Hadchouel M, Sokal EM, Guido JE, et al. Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology*. 1999;117:1370-9.
34. Jacquemin E, De Vree JLM, Cresteil D, Sokal EM, Sturm E, Dumont M, et al. The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology*. 2001;120:1448-58.
35. Lucena JF, Herrero JI, Quiroga J, Sangro B, García-Foncillas J, Zabalegui N, et al. A multidrug resistance 3 gene mutation causing cholelithiasis, cholestasis of pregnancy, and adulthood biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 2003;124:1037-42.
36. Jacquemin E, Hermans D, Myara A, Habes D, Debray D, Hadchouel M, et al. Ursodeoxycholic acid therapy in pediatric patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology*. 1997;25:519-23.
37. Whittington PF, Freese DK, Alonso EM, Schwarzenberg SJ, Sharp HL. Clinical and biochemical findings in progressive familial intrahepatic cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1994;18:134-41.
38. Ng VL, Ryckman FC, Porta G, Miura IK, De Carvalho E, Servidoni MF, et al. Long-term outcome after partial external biliary diversion for intractable pruritus in patients with intrahepatic cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;30:152-6.
39. Kurbegov AC, Setchell KDR, Haas JE, Mierau GW, Narkewicz M, Bancroft JD, et al. Biliary diversion for progressive familial intrahepatic cholestasis: improved liver morphology and bile acid profile. *Gastroenterology*. 2003;125:1227-34.