

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**UMAE HOSPITAL DE PEDIATRIA
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

Protocolo de tesis para obtener el grado de especialista en
Gastroenterología Pediátrica:

**FRECUENCIA DE COLESTASIS INTRAHEPÁTICA FAMILIAR PROGRESIVA
DETECTADA POR INMUNOHISTOQUÍMICA A TRAVÉS DE LA EXPRESIÓN DE
BSEP Y MDR3 EN BIOPSIA HEPÁTICA EN NIÑOS CON DIAGNÓSTICO DE
HEPATITIS NEONATAL IDIOPÁTICA**

Alumna: Dra. Rebeca Ivonne González Rodríguez

Residente de segundo año de gastroenterología pediátrica

Tutor: Dra. Judith Flores Calderón

Médica Jefe de Servicio de Gastroenterología

Co-tutores:

Dra. Alicia Georgina Siordia Reyes

Médico Adscrito al Servicio de Patología

Dr. Guillermo Ramón García

Médico Adscrito al Servicio de Patología

Dr. Segundo Morán Villota

Investigador Adscrito al Laboratorio de Gastro-Hepatología



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

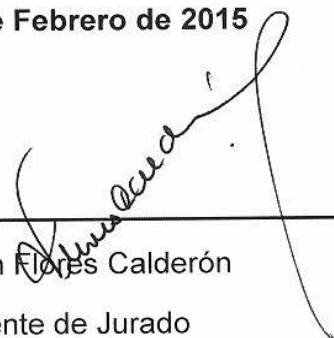
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE FIRMAS


Título: Frecuencia de colestasis intrahepática familiar progresiva detectada por inmunohistoquímica a través de la expresión de BSEP y MDR3 en biopsia hepática en niños con diagnóstico de hepatitis neonatal idiopática.

Registro: PI-2013-5656-492304


Fecha de examen profesional: 25 de Febrero de 2015



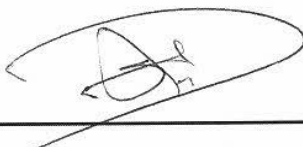
Dra. Judith Flores Calderón
Presidente de Jurado



Dra. Rocío Julia Herrera Márquez
Secretario



Dra. Alicia Rodríguez Velasco
Sinodal



Dra. Sindy Ledesma Ramírez
Sinodal

INDICE

I. RESUMEN	4
II. ANTECEDENTES	5
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
IV. JUSTIFICACIÓN	14
V. OBJETIVO	15
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	16
VII. RESULTADOS	24
VIII. DISCUSION	28
IX. CONCLUSIONES	32
X. REFERENCIAS	33
XI. TABLAS	38
XII. ANEXOS	42

I. RESUMEN

Título: *Frecuencia de colestasis intrahepática familiar progresiva (PFIC) detectada por inmunohistoquímica (IHQ) a través de la expresión de BSEP y MDR3 en biopsia hepática en niños con diagnóstico de hepatitis neonatal idiopática.*

Autores: Rebeca Ivonne González Rodríguez, Judith Flores Calderón, Alicia Georgina Siordia Reyes, Guillermo Ramón García, Segundo Morán Villota

Introducción. La colestasis intrahepática familiar progresiva (PFIC por sus siglas en inglés) son alteraciones genéticas que dan lugar a mutaciones en la proteínas transportadoras de aminofosfolípidos (PFIC 1), sales biliares (PFIC2) y PFIC 3 dada por una glicoproteína clase III multidroga resistente (MDR3) la cual media la translocación de la fosfatidilcolina a través de la membrana canalicular del hepatocito (PFIC 3). El diagnóstico diferencial de estas entidades puede realizarse por medio de las características bioquímicas y en la biopsia hepática, a través de inmunohistoquímica (IHQ). En nuestro medio no se conoce la frecuencia de PFIC, su identificación en niños con diagnóstico de HNI podría orientar hacia la prevención y tratamiento de las complicaciones derivadas de la cirrosis biliar, como la implementación de intervenciones para mejorar el estado nutricional y la inclusión temprana en programas de trasplante hepático.

Objetivo. Determinar la frecuencia de PFIC detectada por IHQ a través de la expresión de BSEP y MDR3 en biopsia hepática de niños con diagnóstico de hepatitis neonatal idiopática en la UMAE Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Material y métodos. Tipo de estudio: Estudio observacional, descriptivo, transversal. Se realizó revisión de las características clínicas y las biopsias hepáticas de pacientes con diagnóstico de hepatitis neonatal idiopática. Se realizó IHQ para detectar la ausencia proteínas transportadoras BSEP y MDR3 para confirmar o descartar PFIC. Análisis estadístico: Los resultados se expresan en promedios \pm desviación estándar, intervalos y porcentajes.

Resultados. Se incluyeron 21/35 casos. 8 (38%) del sexo femenino y 13 pacientes (62%) del sexo masculino. Se detectaron 7 pacientes con ausencia de respuesta a IHQ: 4 para BSEP, 1 para MDR3 y 2 pacientes con ausencia de tinción tanto para BSEP como MDR3. Tuvieron antecedente de consanguinidad 4/7, y 1 historia familiar de colestasis. Al comparar los hallazgos clínicos, bioquímicos e histopatológicos entre los casos con IHQ positiva vs negativa, no se encontraron diferencias significativas.

Conclusión: En este estudio encontramos que un 33% de los casos con HNI se encontró ausencia de tinción a IHQ para BSEP Y MDR3, con la limitante de corroborar el diagnóstico definitivo mediante estudio genético; aparentemente por IHQ la frecuencia de PFIC en nuestro medio es superior a lo reportado en literatura.

II. ANTECEDENTES

La colestasis es un proceso en el que existe disminución del flujo biliar, evidencia histológica de depósito de pigmentos biliares en los hepatocitos y conductos biliares, y aumento de la concentración sérica de los productos excretados en la bilis (bilirrubina, ácidos biliares, colesterol). La causa es la alteración de la formación de bilis por el hepatocito o la obstrucción del flujo en la vía biliar intrahepática o extrahepática.¹

El síndrome de colestasis neonatal constituye un grupo de enfermedades que afectan el hígado y la vía biliar durante los primeros tres meses de vida y se presenta, aproximadamente, en uno de cada 2,500 recién nacidos vivos. La hepatitis neonatal es una de las causas que lo originan con mayor frecuencia pero existen otras etiologías de tipo metabólico, genético o infeccioso.²

En países anglosajones se ha reportado que aproximadamente un 10% de los casos con colestasis intrahepática son causados por la deficiencia de alfa1-antitripsina y 20% por otros trastornos de tipo metabólico; las infecciones congénitas constituyen menos del 5%, mientras que la hepatitis neonatal idiopática (HNI) representa de un 10 a un 15% de los casos de colestasis neonatal.³

La hepatitis neonatal idiopática (HNI) se describe como la colestasis intrahepática neonatal prolongada que ocurre en los primeros 6 meses de vida, y cuya lesión histopatológica es la presencia de "células gigantes", en ausencia de otras causas de tipo infeccioso, genético u obstructivo.^{4,5} Se distinguen dos tipos de HNI: la esporádica (80%) y la familiar (20%).⁶

Existen 2 estudios realizados en nuestro país, uno de ellos con frecuencia de HNI superior al 50% en los pacientes estudiados. El primero de ellos, retrospectivo, realizado entre 2004-2006 en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional (CMN) de Occidente con reporte de 77 casos de colestasis neonatal, de los cuales el 58% correspondió a hepatitis neonatal (45 casos), 25.9% a atresia de vías biliares (AVB) y el resto correspondió a quiste de colédoco (10 casos) y neoplasia del hilio hepático (2 casos).⁷ Mientras que en el Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI se realizó un estudio similar comprendido entre 2004-2009, en niños con diagnóstico de colestasis neonatal, describiendo 64 casos; 34 niños (53%) correspondieron a AVB y 30 niños (47%) a HNI. De los pacientes con HNI, el 63% (19/30) tuvo un curso

clínico favorable con resolución de la colestasis en aproximadamente 6 meses después del diagnóstico. Sin embargo el 37%, (11/30) mostró colestasis progresiva, con deterioro progresivo de función hepática hasta cirrosis biliar⁸.

Gracias a los avances de la biología molecular y al mejor conocimiento de los mecanismos fisiológicos del sistema hepatobiliar, se ha logrado identificar diversas enfermedades cuya manifestación es colestasis intrahepática⁹, estableciendo el diagnóstico de certeza en aquellos pacientes catalogados inicialmente como HNI y que padecen colestasis intrahepática familiar progresiva (PFIC por sus siglas en inglés: *progressive familial intrahepatic cholestasis*) hasta en un 25% de los casos.¹⁰

Existen tres tipos de PFIC: PFIC1, PFIC2 y PFIC3, cada una de ellos provocado por la disminución de la síntesis, o la ausencia total, de una proteína concreta necesaria para la función secretora normal del hepatocito. El acúmulo de estos componentes dentro del hepatocito provoca el daño de estas células y las manifestaciones de la enfermedad hepática que comienzan en las primeras etapas de la vida.¹¹ Estas enfermedades recibieron denominaciones que hacían referencia a la población en que habían sido detectadas, como enfermedad de Byler¹² (el nombre del ancestro común de una población de niños Amish en Pensilvania), colestasis de niños esquimales de Groenlandia¹³, colestasis de niños indios canadienses¹⁴, colestasis de niños árabes de Israel¹⁵, entre otros.

En la última década, la identificación, clonación y caracterización funcional de las proteínas de transporte, han permitido caracterizar los 3 tipos de PFIC: de tipo 1 que se vincula a mutaciones en la proteína, la cual se expresa en el canalículo, pero con función todavía indefinida y las de tipos 2 y 3 que resultan de mutaciones en los transportadores que alteran directamente la formación de bilis y la consecuente producción de flujo biliar.^{11,16-18}

Colestasis intrahepática familiar progresiva de tipo 1 (CIFP1, defecto de FIC1 o enfermedad FIC1). La primera descripción de esta enfermedad se realizó en una población de niños Amish de Pensilvania, descendientes de Jacobo Byler, por lo que es denominada Enfermedad de Byler, hoy conocida como PFIC1.¹² El gen ATP8B1 se localiza en el cromosoma 18q21-q22 y codifica para una ATP-asa de tipo P, llamada FIC1. La FIC1 es una proteína integral de membrana; es el primer miembro de las ATP-asas de tipo P, subfamilia P4. Se piensa que desempeñan un papel

importante en el transporte de aminofosfolípidos a través de la membrana celular, expresándose en los siguientes tejidos: hígado, intestino, riñones y páncreas. Llama la atención que el hígado, comparativamente, lo exprese menos que el intestino.^{11,17-22}

La colestasis se presenta en estos pacientes durante el primer año de vida, con un curso fluctuante y se hace persistente entre 1 y 4 años de edad. Se acompaña de prurito, retraso del crecimiento, hepatoesplenomegalia y síntomas extrahepáticos (diarrea, pancreatitis recurrente y síntomas respiratorios). Al progresar la enfermedad hepática, los pacientes desarrollan cirrosis con insuficiencia hepática en la infancia o adolescencia temprana. Los parámetros bioquímicos acompañantes consisten en: hiperbilirrubinemia y aumento moderado de transaminasas, concentración elevada de ácidos biliares séricos y, característicamente, nivel de gamma glutamil transpeptidasa (GGT) normal o bajo. La histología hepática muestra colestasis canalicular, fibrosis portal, leve proliferación de conductos biliares y, a medida que avanza la edad, formación de puentes de fibrosis entre los espacios porta o el espacio porta y la vena centrolobulillar. A la microscopía electrónica se observa dilatación canalicular, con material amorfo y granular en su interior.^{9-11,16, 23} Se han identificado mutaciones del gen FIC1 en la colestasis intrahepática recurrente benigna de tipo 1 (CIRB1) (BRIC1, en inglés), enfermedad no progresiva, caracterizada por episodios autolimitados de ictericia y prurito que se resuelven sin afectación hepática.^{11, 17, 18, 20}

Colestasis intrahepática familiar progresiva de tipo 2 (CIFP2 defecto de BSEP o enfermedad BSEP). Los ácidos biliares sintetizados y reciclados son transportados desde los hepatocitos a través de la membrana canalicular, contra un gradiente de concentración, por intermedio de una bomba dependiente de ATP. Este transportador dependiente de ATP es codificado por el gen ABCB11 y se conoce como bomba exportadora de sales biliares (BSEP, del inglés). Las mutaciones del gen ABCB11 conducen a un defecto del transportador BSEP, el cual es responsable de la PFIC tipo 2.^{10,11, 24-27.}

Los pacientes con deficiencia de la proteína BSEP se presentan con colestasis durante la infancia. De acuerdo al curso clínico, se han descrito dos entidades diferentes: una forma leve, denominada colestasis intrahepática recurrente benigna

de tipo 2 (CIRB2) y una forma grave, conocida como CIFP2. Los pacientes con CIRB2 presentan episodios de ictericia, prurito intenso, esteatorrea, náuseas, vómitos, anorexia, dolor en hipocondrio derecho y pérdida de peso. Puede haber hepatomegalia, frecuentemente aislada. Los episodios de colestasis pueden observarse durante meses, con períodos asintomáticos, acompañados de laboratorio hepatológico normal. Esta enfermedad, a diferencia de la CIRB1 (relacionada con defectos en FIC1), puede presentar colelitiasis con relativa frecuencia (podría estar relacionada a la saturación de la bilis con colesterol) y ausencia de manifestaciones extra hepáticas. Desde el punto de vista bioquímico, durante los episodios de colestasis los pacientes presentan hiperbilirrubinemia directa, incremento de fosfatasa alcalina (FA) y ácidos biliares séricos. Las transaminasas y gamma glutamil transpeptidasa (GGT) son normales o discretamente elevadas. Los defectos en BSEP más graves, asociados a la CIFP2, presentan enfermedad progresiva, caracterizada por ictericia de comienzo temprano, prurito, retraso en la estatura con relativa conservación del estado de nutrición (peso conservado en relación a la talla), hepatomegalia y esplenomegalia. La cirrosis se ha diagnosticado tan precozmente como en el período neonatal. La ictericia puede ser intermitente durante el curso temprano de la enfermedad y luego hacerse persistente. El prurito suele ser intenso y resistente al tratamiento médico. La presentación como hemorragia secundaria a déficit de vitamina K puede ser espectacular. Los hallazgos bioquímicos incluyen hiperbilirrubinemia directa, transaminasas elevadas, GGT normal, ácidos biliares elevados y sales biliares disminuidas. Los estudios de imágenes muestran un tracto biliar normal. Probablemente, la mayoría de los niños con síndrome de Byler descritos en épocas previas a la disponibilidad del estudio genético o inmunohistoquímico, eran casos con defecto de BSEP. Estos pacientes, a diferencia de los que presentan defecto de FIC1, tienen transaminasas más elevadas, alfa-fetoproteína alta, una imagen histológica inicial en la que se destacan células gigantes multinucleadas y un curso clínico más rápido hacia la cirrosis e insuficiencia hepática.^{9-11,28-30} Es muy importante el diagnóstico diferencial entre la CIFP de tipos 1 y 2, debido a la asociación de carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma con la de tipo 2, descritos recientemente. La mayoría de los carcinomas hepatocelulares descritos, se presentan antes de los 24 meses de vida (7 de 10 pacientes con deficiencia de

BSEP), lo cual nos alerta sobre el necesario seguimiento de estos pacientes con alfafetoproteína y ecografía, desde etapas tempranas de la enfermedad.^{31,32}

Colestasis intrahepática familiar progresiva de tipo 3 (CIFP3, deficiencia de MDR3 o enfermedad MDR3). Este tercer tipo de CIFP es ocasionada por un defecto en el gen ABCB4, localizado en el cromosoma 7q21, que codifica a la MDR3. La MDR3 es una glucoproteína que funciona como un transportador de fosfolípidos y está presente en la membrana canalicular. La presencia de fosfolípidos en la bilis tiene una función citoprotectora contra la lesión de hepatocitos y células biliares inducida por los ácidos biliares.^{9-11,17,33}

La expresión clínica de esta enfermedad es variable, según la mutación ABCB4 conduzca a una proteína truncada o a una mutación sin sentido con actividad residual. Esta última situación conduce a una enfermedad relativamente menos grave, de comienzo más tardío, de progresión más lenta y buena respuesta al ácido ursodesoxicólico, lo cual podría demorar o prevenir la necesidad de un trasplante hepático. Los pacientes se presentan con cuadros de colestasis neonatal transitoria, litiasis intrahepática y vesicular de colesterol en jóvenes, cirrosis en adultos, colestasis del embarazo y CIFP de tipo 3.^{11, 34, 35} La colelitiasis se produce por el desequilibrio de los componentes de la bilis, debido a la reducción de fosfolípidos, lo cual conduce a una disminución de la solubilización del colesterol. La patogenia de la colestasis intrahepática del embarazo es multifactorial, pero existen fuertes indicios acerca de su predisposición genética. Recientes estudios han demostrado que las mutaciones en la MDR3 pueden encontrarse en el 20% de los casos. El espectro de la CIFP de tipo 3 es muy amplio y, aproximadamente, la mitad de los pacientes se presentan durante la infancia con ictericia, hipocolia, prurito, hepatomegalia y esplenomegalia (clara evidencia de hipertensión portal). Un tercio de los casos se manifiesta durante el primer año de vida y la mayoría son identificados por hepatoesplenomegalia o por complicaciones de la cirrosis durante la infancia y adolescencia. Las pruebas de función hepática se caracterizan por hiperbilirrubinemia conjugada, aumento de transaminasas, GGT, fosfatasa alcalina y ácidos biliares séricos. La enfermedad puede progresar a cirrosis, hipertensión portal e insuficiencia hepática, por lo cual muchos de estos pacientes requerirán un trasplante hepático. La evolución a cirrosis precoz en la primera década de la vida se

observa en pacientes con ausencia completa de función de la proteína MDR3.^{33,35} La biopsia hepática varía con la edad al diagnóstico. En etapas tempranas de la enfermedad se caracteriza por colestasis, con áreas portales levemente ensanchadas y proliferación ductular. Al progresar la enfermedad, la imagen histológica es la de una cirrosis biliar.^{11,35}

David-Spraul y cols. evaluaron las características clínicas, bioquímicas e histológicas en 62 niños con PFIC (1 y 2) y niveles normales de GGT. A través de inmunofluorescencia buscaron la expresión de proteínas transportadoras de membrana (BSEP y MDR3) en tejido hepático e hicieron una correlación con las mutaciones en los genes que codifican proteínas de transporte (ATP8B1 para FIC 1 y ABCB11 para BSEP). Los autores concluyen que PFIC 1 y PFIC 2 no difieren en su presentación o durante el curso de la enfermedad en cuanto a las características clínicas, bioquímicas e histológicas, sin embargo, una pequeña proporción de niños diagnosticados como PFIC con nivel normal de GGT (15%) probablemente no presenten mutaciones en ATP8B1 o ABCB11, considerándose entonces de origen idiopático.³⁶

El diagnóstico de estas entidades puede realizarse a través de la biopsia hepática, por medio de inmunohistoquímica, la cual es un procedimiento histopatológico que se basa en la utilización de un anticuerpo específico, previamente marcado mediante un enlace químico con una enzima que puede transformar un sustrato en visible, sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno, aplicado a una muestra de tejido orgánico, correctamente fijada e incluida en parafina. Con la utilización de alguna de las técnicas específicas (peroxidasa antiperoxidasa, fluoresceína, etc.), el complejo antígeno - anticuerpo así formado puede localizarse e identificarse en las muestras tisulares o citológicas a estudiar, con lo que se identifican los marcadores antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalismo celular y se determina el tipo de célula involucrado en la muestra.^{37, 38} La inmunohistoquímica directa permite evaluar la expresión en tejido hepático al identificar proteínas de membrana canalicular transportadoras de ácidos biliares y fosfolípidos, como la BSEP y MDR3. La ausencia o inmunotinción leve estaría a favor de un defecto genético; sin embargo, si es normal no descarta la alteración en su función. Por lo tanto es necesaria la secuenciación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para

determinar la presencia de mutaciones específicas en los genes que codifican proteínas de membrana transportadoras de ácidos biliares y fosfolípidos.^{33-35, 38, 39}

En PFIC, tipo 1 (PFIC-1), la proteína transportadora de sales biliares (BSEP) característica del PFIC 2 se expresa normalmente, a diferencia del PFIC 2 en donde no se expresa (histológicamente se observa daño de los hepatocitos y ausencia de tinción en los canalículos); se puede hacer el diagnóstico diferencial de estas 2 entidades con GGT baja.⁴⁰ En niños con manifestaciones de PFIC 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. Con técnicas de inmunohistoquímica, el receptor de BSEP se manifiesta en la membrana canalicular normalmente con autoanticuerpos a dilución 1:20, pero no a 1:50.⁴¹

En relación al PFIC tipo 3, 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. 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.^{33,35}

Finalmente, el tratamiento de PFIC, 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, dextrinomaltosa y triglicéridos de cadena media [TCM]) y cereales parcialmente dextrinados. Es necesario el aporte de vitaminas liposolubles, regulado según el valor en suero y las pruebas de coagulación. El ácido ursodesoxicólico (AUDC) 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, 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 PFIC con GGT normal comunicó la normalización bioquímica y desaparición del prurito en 11 casos evaluados 2 a 4 años después de iniciar AUDC (20-30 mg/kg/día). Actualmente se emplea AUDC en todas las formas de PFIC pero se considera que la población de

niños con más capacidad de ser beneficiados en términos de pronóstico son los pacientes con PFIC tipo 3. Un 30% de los niños con PFIC-3 responde al tratamiento. 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 AUGC puedan alcanzar una reducción de la toxicidad de las sales biliares por debajo del umbral crítico que ocasiona daño ductal.⁴²

El conocimiento en nuestro medio, de este grupo de enfermedades colestásicas, permitirá realizar un diagnóstico temprano, con base en los síntomas clínicos y las pruebas de función hepáticas, incluyendo la medición de GGT y concentración de ácidos biliares, diagnóstico confirmable, en un buen número de casos con inmunohistoquímica en biopsia hepática. La oportuna sospecha diagnóstica, permite implementar un plan de tratamiento para prevenir o retrasar el desarrollo de cirrosis o la inclusión temprana en un programa de trasplante hepático.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la última década, la identificación, clonación y caracterización funcional de las proteínas de transporte, han permitido caracterizar los 3 tipos de síndromes de PFIC: de tipo 1 que se vincula a mutaciones en la proteína FIC1 (familiar intrahepatic cholestasis protein-1), la cual se expresa en el canalículo, pero con función todavía indefinida y las de tipos 2 y 3 (PFIC2 y PFIC3), que resultan de mutaciones en los transportadores que alteran directamente la formación de bilis y la consecuente producción de flujo biliar.

El estudio histopatológico de la biopsia hepática es una herramienta diagnóstica que aparte de establecer el grado de daño hepático, actualmente permite la búsqueda intencionada de proteínas transportadores por medio de inmunohistoquímica, y así es posible identificar en forma temprana la PFIC.

Por lo anterior, surgen las siguientes preguntas de investigación:

1. Cuál es la frecuencia de PFIC detectada por inmunohistoquímica a través de la expresión de BSEP y MDR3 en biopsia hepática de niños con diagnóstico de hepatitis neonatal idiopática en la UMAE Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI?

IV. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se cuenta con herramientas diagnósticas más precisas para las enfermedades colestásicas progresivas que se manifiestan en el período neonatal, destacan la identificación de proteínas mediante la técnica de inmunohistoquímica y las mutaciones por biología molecular.

En México no se conoce la frecuencia de la colestasis intrahepática familiar progresiva. La identificación de los pacientes con colestasis intrahepática progresiva en niños con diagnóstico de HNI podría orientar hacia la prevención y tratamiento de las complicaciones derivadas de la cirrosis biliar, como la implementación de intervenciones para mejorar el estado nutricional y la inclusión temprana en programas de trasplante hepático.

V. **OBJETIVO**

1. Determinar la frecuencia de PFIC detectada por inmunohistoquímica en biopsia hepática en los niños con diagnóstico de hepatitis neonatal idiopática en la UMAE Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI.

VI. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

LUGAR DE REALIZACIÓN DEL ESTUDIO. Servicio de Gastroenterología Pediátrica del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

DISEÑO DEL ESTUDIO. Estudio observacional, descriptivo, transversal.

POBLACION DE ESTUDIO. Recién nacidos y lactantes con diagnóstico de hepatitis neonatal atendidos entre el año 2008 a 2012 que se hayan sometido a biopsia hepática.

Criterios de inclusión

1. Pacientes con edad menor a 12 meses al momento de la captación en el estudio con diagnóstico previo de hepatitis neonatal idiopática.
2. Pacientes de ambos sexos.
3. Con biopsia hepática suficiente (más de 8 espacios porta).

Criterios de no inclusión

1. Diagnóstico de colestasis extrahepática.
2. Falla hepática aguda sin diagnóstico preciso.

Criterios de eliminación

1. Biopsias hepáticas con mala preservación tisular, evitando de esta manera falsos negativos

DEFINICIÓN DE VARIABLES

1. Anti Proteína BSEP (ABCB11)

- Definición conceptual: La proteína BSEP es uno de los tres miembros de la superfamilia llamada transportadora (ABC) conocida como ATP-binding cassette. La disminución o ausencia de la proteína transportadora de sales biliares (BSEP), produce la entidad referida como PFIC 2, caracterizada por un defecto en la excreción de las sales biliares.
- Definición operacional: Se valorará la expresión a nivel citoplasmático en de tejidos incluidos en parafina, en cortes a 3 micras de espesor para su manejo con soluciones químicas y con tinciones de inmunohistoquímica detectada con el sistema peroxidasa-antiperoxidasa.

Escala de medición: Cualitativa nominal

Categoría: presente o ausente.

2. Anti-proteína MDR3 (ABCB4)

- Definición conceptual: Proteína MDR3 pertenece a la superfamilia llamada transportadora (ABC) conocida como ATP-binding cassette. Es una glicoproteína clase III multidroga resistente (MDR3) P- glicoproteína (P-gp) la cual media la translocación de la fosfatidil-colina a través de la membrana canalicular del hepatocito y forma un complejo con los ácidos biliares y actúa previniendo que estos dañen las membranas canaliculares y celulares que son ricas en lípidos.
- Definición operacional: Se valorará la expresión a nivel citoplasmática en de tejidos incluidos en parafina, en cortes de 3 micras de espesor para su manejo con soluciones químicas y con tinciones de inmunohistoquímica detectada con sistema peroxidasa-antiperoxidasa.

Escala de medición: Cualitativa nominal

Categoría: presente o ausente.

VARIABLES DE INTERES

CLINICAS:

3. Edad de inicio de la ictericia

Definición conceptual: tiempo que ha vivido una persona, animal o persona⁴³.

Definición operacional: tiempo que ha vivido un lactante hasta el momento en que se identifica la presencia de coloración amarilla en piel y/o escleras corroborando que sea secundaria a hiperbilirrubinemia conjugada (BT > 2 mg/dl o BD más del 20% de la BT).

Escala de medición: Cuantitativa discreta

Categorías: días

4. Tiempo de evolución de la ictericia

Definición conceptual: es la magnitud física con la que medimos la duración o separación de acontecimientos sujetos a cambio, de los sistemas sujetos a observación, esto es, el período que transcurre entre el estado del sistema cuando éste aparentaba un estado X y el instante en el que X registra una variación perceptible para un observador (o aparato de medida).

Definición operacional: consignación en el expediente de la presencia de tinte amarillento en conjuntivas, escleras o piel.

Escala de medición: Cuantitativa discreta

Categorías: días

5. Historia de colestasis neonatal en algún hermano.

Definición conceptual: es el antecedente familiar de haber tenido uno o más hermanos con colestasis neonatal.

Definición operacional: se obtendrá el dato a partir de interrogatorio directo a los padres y/o el registro del antecedente en el expediente clínico.

Escala de medición: Cualitativa nominal.

Categorías: presente o ausente.

6. Child-Pugh (Anexo 1)

Definición conceptual: clasificación clínica y bioquímica de severidad de la enfermedad hepática.

Definición operacional: se realiza de acuerdo al grado de ascitis, las concentraciones plasmáticas de bilirrubina y albúmina, el tiempo de protrombina, y el grado de encefalopatía (Anexo 2).

Escala de medición: Cuantitativa ordinal.

Categoría: Una puntuación total de 5-6 es considerada grado A (enfermedad bien compensada); 7-9 es grado B (compromiso funcional significativo); y 10-15 es grado C (enfermedad descompensada). Estos grados se correlacionan con una sobrevida del paciente al año y a los 2 años.

7. PELD (Pediatric End Liver Disease).

Definición conceptual: Modelo clínico diseñado por la Red Unida para la Compartición de Órganos (United Network for Organ Sharing – siglas en inglés UNOS), la cual es una organización benéfica sin fines de lucro que opera la Red para la Adquisición y Trasplante de Órganos. El Modelo para Enfermedades Terminales del Hígado (MELD) se usa para pacientes mayores de 12 años, mientras que el Modelo para Enfermedades Terminales del Hígado en Pacientes Pediátricos (PELD) se usa para los niños hasta los 11 años.

Definición operacional: se usa en menores de 11 años de edad, asigna a cada individuo una calificación (número) basada en la urgencia con que necesita un trasplante de hígado dentro de los tres meses siguientes. El número se calcula mediante una fórmula basada en resultados bioquímicos (INR, albúmina) así como características clínicas (falla de crecimiento, menores de un año de edad).

Escala de medición: Cuantitativa ordinal.

BIOQUIMICAS:

8. Gama glutamiltransferasa (GGT).

Definición conceptual: enzima microsomal que cataliza la transferencia de grupos gamaglutamil entre péptidos tales como glutatión a otros aminoácidos. Se encuentra en el epitelio biliar y en hepatocitos. Su elevación traduce obstrucción biliar y colestasis intrahepática.⁴⁴

Definición operacional: como parte de los estudios de rutina se determinará a través de un método automatizado y estandarizado el nivel sérico de GGT a todo niño que se incluya en el estudio y durante el seguimiento.

Escala de medición: cualitativa ordinal.

Categorías: De acuerdo a los valores de referencia normales por grupo etario (<1 mes: <385 UI/L, 1-2 meses: <225 UI/L, 2-4 meses: <135 UI/L, 4-7 meses: <75 UI/L, 7 meses a 15 años: <45 UI/L) se determinará un nivel: normal, alto o bajo.

9. Fosfatasa Alcalina (FA)

Definición conceptual: enzima hidrolasa responsable de eliminar grupos de fosfatos, de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides.⁴⁴

Definición operacional: como parte de los estudios de rutina se determinará a través de un método automatizado y estandarizado el nivel sérico de FA a todo niño que se incluya en el estudio y durante el seguimiento.

Escala de medición: cuantitativa ordinal.

Categorías: el rango normal es, en mujeres: 64-306 UI/L y en hombres 80-306 UI/L; aunque éstos valores pueden variar ligeramente de un laboratorio a otro.

10. Alanina aminotransferasa (ALT)

Definición conceptual: enzima aminotransferasa, anteriormente conocida como *transaminasa glutámico-pirúvica* (GPT), con gran concentración en el hígado, y en menor medida en los riñones, corazón y músculos. Cataliza la transferencia de un grupo amino desde la alanina al alfa-cetoglutarato, los productos de esta transaminación reversible son piruvato y glutamato.⁴⁴ Definición operacional: como parte de los estudios de rutina se determinará a través de un método automatizado y estandarizado el nivel sérico de ALT a todo niño que se incluya en el estudio y durante el seguimiento.

Escala de medición: cuantitativa ordinal.

Categorías: los valores normales de ALT es 7 a 33 U/L en mujeres y entre 8 y 50 U/L en hombres, aunque también depende del criterio del laboratorio.

11. **Aspartato aminotransferasa (AST)**

Definición conceptual: enzima aminotransferasa, antes conocida como *transaminasa glutámico-oxalacética* (GOT) y también llamada aspartato transaminasa (AST) se encuentra en varios tejidos del organismo de los mamíferos, especialmente en el corazón, el hígado y el tejido muscular. Esta enzima cataliza la reacción de transferencia de un grupo amino desde el L-aspartato al 2-oxoglutarato formándose L-glutamato y oxaloacetato. Esta enzima utiliza el piridoxal 5'-fosfato como cofactor.⁴⁴

Definición operacional: como parte de los estudios de rutina se determinará a través de un método automatizado y estandarizado el nivel sérico de AST a todo niño que se incluya en el estudio y durante el seguimiento.

Escala de medición: cuantitativa ordinal.

Categorías: el rango normal es de 10 a 34 UI/L.

HISTOLOGICAS (Anexo 2)

12. **Colestasis en biopsia hepática**

Definición conceptual: Depósitos de pigmento biliar en los hepatocitos⁴⁴

Definición operacional: Evaluación en biopsia hepática.

Escala de medición: cualitativa ordinal.

Categorías: leve, moderada y severa.

13. **Eosinofilia**

Definición conceptual: Presencia de eosinófilos en espacio porta

Definición operacional: Evaluación en biopsia hepática.

Escala de medición: cualitativa ordinal.

Categorías: leve, moderada y severa.

14. **Células gigantes**

Definición conceptual: Transformación de hepatocito en patrón gigantocelular.

Definición operacional: Evaluación en biopsia hepática.

Escala de medición: cualitativa ordinal.

Categorías: leve, moderada y severa.

15. **Fibrosis portal**

Definición conceptual: Ensanchamiento de espacios porta.

Definición operacional: Evaluación en biopsia hepática.

Escala de medición: cualitativa ordinal.

Categorías: leve, moderada y severa.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis descriptivo: Los resultados se expresan en promedios \pm desviación estándar, intervalos y porcentajes.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Estudio observacional, descriptivo, transversal.

Muestreo de tipo no probabilístico, tipo conveniencia.

RECOLECCIÓN Y MEDICIÓN DE DATOS

1. Se identificaron a los niños con diagnóstico histopatológico de hepatitis neonatal idiopática que hayan sido atendidos en el servicio de Gastroenterología Pediátrica del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI durante el período 2008-2014.
2. Se revisaron los expedientes clínicos para reunir información requerida en la hoja de recolección de datos.
3. Aquellos pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión se les evaluaron las *características clínicas y bioquímicas*.
4. Las características histológicas únicamente se evaluaron en los pacientes que contaron con bloques de parafina de la biopsia hepática, la cual es parte del abordaje de estudio del paciente con hepatopatía crónica. Posteriormente se efectuó inmunohistoquímica con la técnica descrita en el anexo 3.

ASPECTOS ÉTICOS

El presente estudio se llevó a cabo de acuerdo con los lineamientos del Reglamento en Materia de Investigación de la Ley General de Salud en su artículo 17, se considera un **estudio sin riesgo**, ya que la biopsia hepática que se analizó formó parte del protocolo de estudio de paciente con hepatopatía crónica. Además toda la información se manejó de manera confidencial, evitando la identificación de los sujetos. No requirió consentimiento informado.

FACTIBILIDAD

Recursos humanos: El Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI tiene médicos certificados en Gastroenterología y Patología Pediátrica con amplia experiencia en la atención de pacientes con enfermedades hepáticas crónicas además de contar con los pacientes necesarios para llevar a cabo el estudio.

Recursos materiales: Hojas, lápices, computadora, expedientes clínicos, reactivos para técnica de inmunohistoquímica.

Recursos financieros: Durante el estudio se colectaron los datos clínicos, bioquímicos e histopatológicos que se realizan normalmente en estos pacientes, lo que implica apoyo financiero por el fondo de investigación en salud (FIS).

VII. RESULTADOS

De un total de 35 pacientes con diagnóstico de hepatitis neonatal de células gigantes, se realizó la evaluación de los datos demográficos, clínicos, bioquímicos, histológicos y de inmunohistoquímica de 21 pacientes con colestasis que reunieron los criterios de inclusión y cuyo seguimiento en promedio fue de 6 meses (6-8 meses); ocho pacientes (38%) fueron del sexo femenino y 13 pacientes (62%) del sexo masculino; el peso al nacimiento fluctuó entre 1.2 a 5.2 Kg; cuatro (19%) pacientes con antecedente de consanguinidad y sólo un paciente con antecedente familiar de colestasis en un hermano. La edad promedio al momento de realizar la biopsia hepática fue de 2.5 meses (1-6 meses).

En relación a las características clínicas de los pacientes, la ictericia se presentó desde la primera semana de vida hasta los 3 meses de edad. Siete pacientes además de colestasis presentaron ascitis al diagnóstico, la cual revirtió en tres pacientes y en cuatro pacientes persistió durante el seguimiento. La mayor parte de los pacientes (16/21) se encontraban en estadio B de Child-Pugh. El valor promedio del PELD (por sus siglas en inglés: *Pediatric End Liver Disease*) previo a la realización de biopsia hepática fue 17.1; en tanto, durante el seguimiento realizado a los pacientes disminuyó a 13.9 (Tabla 1). En tanto, al realizar comparación de los grupos según la presencia o ausencia de tinción de inmunohistoquímica para BSEP y MDR3, tenemos que la única característica distintiva entre ambos grupos fue la presencia de consanguinidad presentada en 2 pacientes con ausencia de tinción para BSEP y MDR3, así como en 1 paciente con tinción ausente para BSEP y en otro con ausencia de tinción para MDR3. El peso al nacimiento no mostró una diferencia significativa entre los subgrupos. El paciente con ausencia de expresión de MDR3 tuvo el inicio de presentación de ictericia más tardío (3 meses) comparado al resto de los subgrupos. Sólo hubo antecedente de colestasis familiar en 1 paciente del grupo con ausencia de expresión de BSEP y MDR3. En relación a la evaluación de Child-Pugh, la mayor parte de los pacientes con inmunohistoquímica negativa se encontraban en estadio B, similar al grupo de pacientes con expresión positiva de BSEP y MDR3 (Tabla 2). Conforme a lo descrito en la literatura, al realizarse comparación de los scores establecidos para evaluar la severidad de la enfermedad hepática, la indicación de trasplante hepático está determinada por la presencia de un daño hepático crónico avanzado, con un puntaje de Child-Pugh

mayor o igual a 7 o un puntaje PELD mayor o igual a 15 puntos. Puede considerarse también la aparición de complicaciones asociadas a mal pronóstico (ascitis de difícil manejo o refractaria al tratamiento médico; encefalopatía hepática crónica o recurrente; peritonitis bacteriana espontánea; síndrome hepato-renal, síndrome hepatopulmonar, hemorragia digestiva alta de origen portal en pacientes con marcado deterioro de la función hepática (>B >7 puntos en la escala de Child-Pugh) o hemorragia recurrente de difícil manejo.

En la evaluación de las variables bioquímicas no hubo diferencia significativa entre cada subgrupo evaluado tanto al momento de captación en el estudio como en el seguimiento posterior (Tabla 3).

Los hallazgos histopatológicos más frecuentes fueron colestasis moderada, presencia de células gigantes, eosinofilia leve y fibrosis portal en la población que presentó IHQ positiva para expresión de BSEP y MDR3; mientras que el grupo con IHQ negativa no tuvo diferencia significativa con los hallazgos histológicos referidos. (Tabla 4).

Se detectaron 7 pacientes con ausencia de respuesta a inmunohistoquímica: 4 para BSEP, 1 para MDR3 y 2 pacientes con ausencia de tinción tanto para BSEP como MDR3 (Tabla 5).

El grupo con ausencia de reacción inmunohistoquímica para BSEP (Figura 1 y 2, ver anexo 3), estuvo conformado por 4 pacientes, 2 mujeres y 2 varones (casos 1, 2, 5, 6), de los cuales se distinguen las siguientes características: tanto en los casos 1 y 2, el inicio de la ictericia fue a los 3 meses de edad, a diferencia de los casos 5 y 6, en los cuales la ictericia tuvo una aparición más temprana, al mes de edad. Sólo en el caso 5, hubo antecedente de consanguinidad. Todos los pacientes al momento de ser captados en el estudio se encontraban en estadio B de Child-Pugh, de los cuales la mitad de ellos (casos 1 y 5) evolucionaron a estadio A, lo cual establece que la enfermedad hepática se compensó; mientras que el caso 2 se mantuvo en estadio B, lo que se traduce clínicamente como enfermedad hepática con compromiso funcional y el caso 6 progresó a estadio C, es decir, enfermedad hepática descompensada. En relación al grupo de pacientes cuya inmunohistoquímica fue positiva para BSEP, MDR (n: 14), al inicio del estudio, la mayoría de ellos estaba en estadio B (n: 10), 3 pacientes en estadio A y sólo 1 paciente en estadio C de Child

Pugh. Conforme al seguimiento, el 50% de la población mencionada evolucionó a estadio A Child-Pugh, reflejando compensación de la enfermedad hepática; mientras que sólo 5 pacientes se ubicaron en estadio B y hubo progresión a estadio C de Child-Pugh en 2 pacientes. En relación al puntaje PELD, los casos 1 y 2 tuvieron descenso en cuanto al puntaje, mientras que los casos 5 y 6 tuvieron discreto incremento del mismo.

El caso 3 tuvo inmunohistoquímica con ausencia de tinción para MDR3, correspondió a una lactante de sexo femenino, con inicio de ictericia a los 3 meses de vida, con antecedente de consanguinidad, pero sin historia familiar de colestasis y como hallazgo clínico se detectó ascitis, la cual persistió durante el seguimiento. Se mantuvo en estadio A de Child-Pugh durante el tiempo de estudio, por lo que habrá de considerarse que la presencia de ascitis estuviera en relación a la hipoalbuminemia (2.5 g/dl) con la que cursaba el paciente al momento de ser incluido en el estudio. En relación al puntaje PELD, el promedio para la población con IHQ negativa para expresión de BSEP y MDR3, disminuyó de 23 puntos al inicio del estudio a 17.6 puntos conforme se mantuvo el seguimiento.

En los casos 4 y 7 no se detectó reacción inmunohistoquímica para BSEP ni para MDR3, ambos tuvieron inicio de ictericia antes de los 3 meses de edad así como antecedente de consanguinidad pero sólo uno de ellos tenía historia familiar de colestasis (caso 4) y se encontraban en estadio B de acuerdo a la escala Child-Pugh, el cual no varió durante el seguimiento. El caso 4 tuvo incremento en puntaje PELD y el caso 7 disminuyó conforme se evaluó nuevamente durante el seguimiento.

En la tabla 6 se muestran las determinaciones bioquímicas de los pacientes con ausencia de tinción de inmunohistoquímica tanto para BSEP, MDR3 ó ambos, en los cuales lo más destacable es la hipoalbuminemia, la cual tuvo traducción clínica en los pacientes correspondientes a los casos 3 y 5, los cuales presentaban ascitis al diagnóstico, la cual persistió en el seguimiento. No hubo datos sugestivos de falla en síntesis hepática; mientras que en todos los casos hubo hipertransaminasemia, la cual sólo tuvo mejoría significativa en el caso 7, mientras que en relación a la GGT conforme a los valores séricos por grupo de edad, se mantuvo normal en la mayoría de los casos, salvo el caso 3 en el cual persistió elevada conforme al seguimiento.

Como se mostró en la tabla 2, no hubo diferencia significativa en los parámetros bioquímicos evaluados al comparar la población con inmunohistoquímica positiva y negativa, si bien, los valores de GGT fueron menores en la población con inmunohistoquímica positiva para BSEP, MDR3 respecto al grupo que no expresó dichos marcadores.

En la tabla 7 se muestran las características histológicas de los casos clínicos sugestivos de PFIC, así como la correlación con la inmunohistoquímica. En el caso de los pacientes con IHQ ausente para BSEP, lo más relevante fue que la mitad de ellos mostró presencia moderada de células gigantes (casos 1 y 5), siendo leve en los casos 2 y 6; Mientras que en el caso 3, tanto la colestasis, la fibrosis portal y la presencia de células gigantes se clasificó como moderada, siendo leve la eosinofilia. Tanto los casos 4 y 7 presentaron colestasis leve, la presencia de células gigantes fue moderada en el caso 4 y leve en el caso 7; mientras que la eosinofilia sólo se detectó en el caso 4; finalmente, ambos casos tuvieron leve fibrosis portal.

En tanto a la evolución de los pacientes con inmunohistoquímica positiva, todos continúan seguimiento en la consulta externa del servicio de gastroenterología pediátrica, con manejo médico de la hepatopatía crónica con la que cursan.

VIII. DISCUSIÓN

Los resultados del estudio permiten dar cuenta que los pacientes con colestasis neonatal, aunque presentan características clínicas similares, representan un grupo heterogéneo ya que en el 33 % de nuestros casos se pudieron identificar subgrupos utilizando otras pruebas diagnósticas que se han incorporado para este fin, como son las técnicas de inmunohistoquímica para la detección de PFIC.

El hallazgo del antecedente de consanguinidad en 4 de 7 pacientes con ausencia de tinción en inmunohistoquímica (casos 3, 4, 5, 7); así como antecedente familiar en un caso, concuerdan con lo publicado en otras series en donde la mitad de los casos de pacientes con PFIC, reportan antecedente familiar de colestasis y/o consanguinidad.¹³⁻¹⁵ Clayton y cols., fue uno de los primeros en describir dicha asociación al estudiar la población Amish, en una familia con antecedente de consanguinidad donde 4 hermanos cursaron con ictericia, hepatoesplenomegalia, talla baja y que fallecieron en la primer década de la vida.¹² Asimismo, Nielsen y cols., realizaron un estudio similar en Groenlandia, donde reportaron 16 casos de niños con enfermedad de Byler, de los cuales el 50% tuvo desenlace fatal antes de los 3 años de edad.¹³ Esta relación ha sido descrita en otras poblaciones alrededor del mundo según estudios realizados en Norteamérica¹⁴, y en Arabia.¹⁵

Con base en las características clínicas y bioquímicas en los lactantes estudiados, no fue posible identificar algunos factores fenotípicos que permitan sospechar la presencia de uno u otro subgrupo PFIC, aunque sugerimos que conforme se amplíe tiempo de seguimiento, se tomen en cuanto las manifestaciones extrahepáticas adicionales a esta patología genética, ya que se han reportado diferencias clínicas entre los pacientes con PFIC. Por ejemplo se ha sugerido que los pacientes con PFIC1 y PFIC2 cursan con ictericia, prurito y diarrea secretora, ésta última con predominio de presentación en el PFIC1, aunque esta última forma no se buscó en la población estudiada ya que no se obtuvo tejido fresco para la realización de Microscopia electrónica para la búsqueda de bilis granular la cual orienta a este diagnóstico. La diarrea en estos casos se ha documentado puede persistir después del trasplante de hígado, lo cual refleja el papel importante de FIC en el intestino, donde se expresa.⁴⁵ Otras manifestaciones extrahepáticas asociadas con PFIC1 incluyen baja estatura, sordera neurosensorial, pancreatitis, y esteatosis hepática,

pueden experimentar remisión y recidiva de los síntomas sin tratamiento, sin embargo, ninguno de los pacientes estudiados presentó clínica compatible con dichos trastornos que nos pudieran hacer sospechar dicha entidad patológica. PFIC2 se asocia con un curso continuo de los síntomas; una vez que la colestasis se desarrolla, los pacientes progresan rápidamente a insuficiencia hepática.⁴⁶

En el caso de PFIC tipo 3, compatible con el caso 3, llama la atención su presentación en el grupo estudiado porque se ha descrito que generalmente tiene presentación tardía, sólo un tercio de los pacientes presenta colestasis durante la infancia, esto según lo referido por Jacquemin y cols.,³⁵ los cuales han descrito un amplio espectro de la enfermedad, que va desde colestasis transitoria hasta litiasis o cirrosis biliar en la edad adulta. El resto se vuelven sintomáticos en la adolescencia. El prurito tiende a ser menos grave que en PFIC1 y PFIC2,³⁵ y clínicamente se distingue de los otros tipos de PFIC por la elevación de GGT, la cual se corroboró en este caso. Llama la atención que no hubo una diferencia significativa de los valores de GGT, al realizar comparación de los grupos que expresaron y no la inmunohistoquímica tanto para BSEP como MDR3.

En la comparación de los subgrupos de pacientes con PFIC algunos autores sugieren que las pruebas bioquímicas tradicionales pueden orientar el diagnóstico, sin embargo en este grupo de lactantes no se puede apreciar una diferencia relacionada con ninguna de las pruebas funcionales hepáticas. Se ha mencionado que la GGT está más elevada en el grupo PFIC tipo 3, siendo hasta 3 a 10 veces mayor sobre el límite superior comparada con los otros subgrupos, pero es poco probable encontrarlo entre los lactantes, si bien ha sido descrita con edad de presentación entre el primer mes de edad hasta los 20 años sólo un tercio de los pacientes se diagnostican antes del año de vida y muy rara vez su debut es como colestasis neonatal, siendo la atresia de vías biliares el principal diagnóstico diferencial. La mayor parte de estos niños se diagnostican en la adolescencia debido a que presentan hepatoesplenomegalia o bien complicaciones derivadas de la cirrosis hepática.⁵¹

Llama la atención la presencia de ascitis al momento del diagnóstico, la cual se detectó en el primer mes de vida, en dos pacientes (casos 3 y 5), la cual persistió durante el seguimiento, porque en otras series no se menciona como una

manifestación inicial de los pacientes con PFIC. Probablemente este hallazgo esté relacionado con la hipoalbuminemia, sin embargo, no se descarta que pueda estar ocasionada también por enteropatía o afectación de estado nutricional, lo cual no fue evaluado por el presente estudio; o bien sospechar posibilidad de insuficiencia hepática, aunque bioquímicamente no había datos de falla en síntesis hepática.^{40,41}

Considerando los recursos técnicos disponibles para este estudio, se pudo identificar a pacientes con PFIC tipo 2 y PFIC tipo 3 que según la literatura representan el mayor porcentaje de los casos de PFIC.¹⁹

Knisely y cols³¹, en una serie de 11 pacientes pediátricos con cuadro clínico sugestivo de PFIC, identificaron por medio de análisis inmunohistoquímico en 10 de ellos, que el anticuerpo anti- BSEP se encontraba con inmunotinción leve o ausente en la membrana canalicular y el análisis genético reveló mutaciones en el gen ABCB11. Esto podría explicarse en relación a que la proteína se encuentre alterada en su estructura (“truncada”) o bien en su conformación genética (alteraciones a nivel de mRNA.^{33, 50}

Es conveniente recalcar que la identificación de los pacientes PFIC tipo 2 tiene implicaciones pronósticas considerando la posibilidad de desarrollo temprano de carcinoma hepatocelular y en el caso de los pacientes con PFIC tipo 3 su mejor pronóstico está relacionado con la buena respuesta al tratamiento con ácido ursodesoxicólico.⁴²

En dos de los casos estudiados el resultado de la inmunohistoquímica fue positivo para PFIC tipo 2 y PFIC tipo 3; esta situación ha sido mencionada en estudios previos, uno de ellos el efectuado por Chen y cols.,⁴⁰ en niños de Taiwán donde el hallazgo bioquímico de GGT elevada estableció la diferencia en relación a los pacientes afectados de PFIC3; y aunque no hay una descripción extensa de estos casos, también podría tratarse de una limitación de la técnica y probablemente en estos casos se necesite la identificación de las mutaciones características de uno u otro grupo por técnicas de biología molecular. 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.^{33,35}

En relación a la evolución del PFIC2, pocos pacientes han sobrevivido hasta la tercera década de vida sin tratamiento debido a la progresión rápida de cirrosis e insuficiencia hepática, como a la predisposición al desarrollo de carcinoma hepatocelular, mayormente asociado a PFIC2, aunque no existe un estándar para el seguimiento de los pacientes se ha sugerido medir los niveles de alfafetoproteína en suero y realizar una ecografía hepática cada 6 meses.⁴⁶

En los pacientes con PFIC tipo 1 el trasplante hepático se indica por mala calidad de vida determinada principalmente por prurito intenso y cirrosis. En la evolución post trasplante siempre se caracteriza por ausencia de recuperación de crecimiento, diarrea crónica y esteatosis del injerto; recientemente se ha descrito que hasta el 50% de estos pacientes podrían beneficiarse de la derivación biliar parcial mediante anastomosis de asa yeyunal de vesícula biliar al exterior⁴⁷; sin embargo, pueden presentarse complicaciones a corto plazo asociadas como las descritas por Arnell⁴⁸ en un grupo de 13 pacientes pediátricos, de los cuales 8/13 presentaron coagulopatía, 1 paciente presentó crisis convulsivas por hipocalcemia y 4 pacientes complicaron con deshidratación y desequilibrio hidroelectrolítico debido a pérdidas elevadas por estoma, 1 paciente tuvo disfunción del estoma y no hubo mejoría clínica de colestasis ni del prurito por lo que se realizó el trasplante hepático.

En el caso de PFIC 2, la indicación de trasplante es por insuficiencia hepática y en general son menos las complicaciones post trasplante a diferencia del PFIC1 pero se han descrito también buenos resultados con la derivación biliar externa.⁴⁸

Hori y cols⁴⁹, reportaron una serie de 14 pacientes con PFIC (11 PFIC 1 y 3 PFIC 2), a los cuales se realizó trasplante hepático de donador vivo relacionado; 3/11 pacientes con PFIC 1 murieron mientras que los 3 pacientes con PFIC 2 sobrevivieron. Hasta un 30% de los pacientes con PFIC 3 responden a dosis elevadas de ácido ursodesoxicólico (30 mg/kg/día), los pacientes con mutaciones severas, es decir, aquellas heterocigotas o que no expresan ambos alelos³³, no tienen respuesta a manejo médico y el trasplante hepático es el tratamiento.

En relación al tratamiento empleado para la población estudiada fue el mismo que se refiere en la literatura para el manejo médico de pacientes con hepatopatía crónica a base de vitaminas liposolubles y ácido ursodesoxicólico.⁴²

IX. CONCLUSIONES

Los resultados del estudio sugieren lo siguiente:

1. No se encontró alguna característica clínica en particular que pudiera diferenciar los subgrupos con inmunohistoquímica negativa, aunque habrá de tomarse en cuenta que no fue el objetivo como tal de nuestro estudio, además que las manifestaciones extrahepáticas acontecen en su mayoría posterior a la etapa de lactante. En relación a las características bioquímicas, salvo la discreta elevación de GGT en el caso 3 sugestivo de PFIC 3, fue la única diferencia respecto al resto de subgrupos.
2. Dentro de la población estudiada, 7 de 21 casos presentaron ausencia de respuesta a inmunohistoquímica, lo cual representa el 33% de la población estudiada, superior a lo reportado en la literatura, aunque en los casos 4 y 7 donde hubo ausencia de tinción tanto para BSEP como MDR3, se sugiere complementar el abordaje diagnóstico por medio de biología molecular para establecer el diagnóstico de certeza, en búsqueda de la mutación genética involucrada.
3. Todos los pacientes se encuentran actualmente en seguimiento por la consulta externa con manejo médico de hepatopatía crónica por lo que debido a los resultados del presente estudio, deberá priorizarse según el PELD obtenido.
4. Se considera que el presente estudio si bien tuvo limitación en la cantidad de pacientes estudiados, tiene la nobleza de ser pionero en su ramo en nuestro país y deberá complementarse con seguimiento. Se requiere continuar con la inclusión de un mayor número de pacientes que permitan avanzar en la descripción y comparaciones de las características clínicas y bioquímicas entre los diferentes grupos de PFIC.
5. Finalmente sugerimos el uso de inmunohistoquímica en aquellos pacientes con diagnóstico de hepatitis neonatal idiopática en los cuales no hay resolución clínica ni bioquímica de la colestasis, ante la sospecha de

PFIC y todo lo que esto implica en su evolución, como en el caso del tipo PFIC 2 mayormente relacionado a neoplasias.

X. REFERENCIAS

1. Balistreri W F. Liver Disease in Infancy and Childhood, en Schiff ER, Sorrel MF and Maddrey WC, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1999:1369-1421.
2. Sokol RJ, Mack C, Narkewicz MR. Pathogenesis and outcome of biliary atresia: current concepts. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 37 (1): 4-21.
3. Suchy FJ. Neonatal cholestasis. *Pediatr Rev* 2004; 25: 388-396.
4. Suchy FJ. Approach of the infant with cholestasis. Suchy FK, Sokol RJ, Balistreri WF. *Disease of the Liver*. Ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1995; 1: 1357-1512.
5. Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. Genetic basis and treatment. *Clin Liver Dis*. 2000; 4 (4): 753-763.
6. Dellert S. Neonatal cholestasis, in: Walker WA, Durie P, Hamilton. *J Pediatr Gastroenterol Disease*. 2000, 3a. ed., Ontario: Decker:880-894
7. Larrosa HA. Duodenal tube in the diagnosis of biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31 (S2): 311-315
8. Flores J, Villasís MA, Ledesma S. Factores pronósticos relacionados con la mortalidad de niños con colestasis neonatal. Tesis de examen para la subespecialidad en Gastroenterología Pediátrica. Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI. 2009.
9. Balistreri WF, Bezerra JA, Jansen P, Karpen SJ, Shneider B, Suchy F. Intrahepatic cholestasis: Summary of an American Association for the Study of Liver Diseases single-topic conference. *Hepatology*. 2005; 42 (1): 222-235.
10. Balistreri W, Bezerra JA. Whatever happened to “Neonatal Hepatitis”? *Clin Liver Dis*. 2006; 10 (1): 27-53.

11. Alissa FT, Jaffe R, Shneider BL. Update on Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008; 46 (3): 241-252.
12. Clayton RJ, Iber FL, Ruebner BH, McKusick VA. Byler disease. Fatal familial intrahepatic cholestasis in an Amish Kindred. *Amer J Dis Child.* 1969; 117:112-124.
13. Nielsen IM, Ornvold K, Brock Jacobsen B, Ranek L. Fatal familial cholestatic syndrome in Greenland Eskimo children. *Acta Paediatr Scand.* 1986; 75: 1010-1016.
14. 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.
15. 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; 24:548-554.
16. Whittington PF, Freese DK, Alonso EM. Clinical and biochemical findings in progressive familial intrahepatic cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994; 18:134-141.
17. Jansen PL, Sturm E. Genetic cholestasis, causes and consequences for hepatobiliary transport. *Liver Int* 2003; 23(5):315-322.
18. Van Mil SC, Houwen RHJ, Klomp LWJ. Genetics of familial intrahepatic cholestasis syndromes. *J Med Genet* 2005; 42: 449-463.
19. Bull LN, Carlton VE, Stricker NL. Genetics and morphological findings in progressive familial intrahepatic cholestasis (Byler disease [PFIC1] and Byler syndrome): evidence for heterogeneity. *Hepatology* 1997; 26:155-164.
20. Bull LN, Van Eijk MJT, Pawlikowska L. A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet* 1998; 18:219-224.
21. Eppens E, Van Mil S, de Vree J. FIC1, the protein affected in two forms of hereditary cholestasis, is localized in the cholangiocyte and the canalicular membrane of the hepatocyte. *J Hepatol* 2001; 35:436-443.
22. Ujhazy P, Ortiz D, Misra S. Familial intrahepatic cholestasis 1: studies of localization and function. *Hepatology* 2001; 34:768-775.

23. Egawa H, Yorifuji T, Sumazaki R. Intractable diarrhea after liver transplantation for Byler's disease: successful treatment with bile adsorptive resin. *Liver Transpl* 2002; 8: 714-716.
24. Strautnieks SS, Kagalwalla AF, Tanner MS. Identification of a locus for progressive familial intrahepatic cholestasis PFIC2 on chromosome 2q24. *Am J Hum Genet* 1997; 61(3):630-633.
25. Byrne JA, Strautnieks SS, Mieli-Vergani G. The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* 2002; 123:1649-1658.
26. Thompson R, Strautnieks S. BSEP: function and role in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Semin Liver Dis* 2001; 21:545-550.
27. Wang L, Soroka C, Boyer J. The role of bile salt export pump mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type II. *J Clin Invest* 2002; 110: 965-972.
28. Suchy FJ and Ananthanarayanan M. Bile salt excretory pump: biology and pathobiology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 43:S10-S16.
29. Strautnieks SS, Byrne JA, Pawlikowska L. Severe bile salt export pump deficiency: 82 different ABCB11 mutations in 109 families. *Gastroenterology* 2008; 134:1203-1214.
30. Kagawa T, Watanabe N, Mochizuki K. Phenotypic differences in PFIC 2 and BRIC 2 correlate with protein stability of mutant BSEP and impaired taurocholate secretion in MCDK II cels type. *J Clin Invest* 2002; 110: 965-972.
31. Knisely AS, Strautnieks SS, Meier Y, et al. Hepatocellular carcinoma in ten children under five years of age with bile salt export pump deficiency. *Hepatology* 2006; 44:447-452.
32. Scheimann AO, Strautnieks SS, Knisely A. Mutations in bile salt export pump (ABCB11) in two children with progressive familial intrahepatic cholestasis and cholangiocarcinoma. *J Pediatr* 2007; 150:556-559.
33. De Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma P, Aten J et al. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:282-287.
34. Lucena JF, Herrero JI, Quiroga J, et al. A multidrug resistance 3 gene mutation causing cholelithiasis, cholestasis of pregnancy, and adulthood biliary cirrosis. *Gastroenterology* 2003; 124:1037-1042.

35. Jacquemin E, De Vree JM, 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; 120:1448-1458.
36. David-Spraul A, Fabre M, Branchereau S, et al. ATP8B1 and ABCB11: Analysis in 62 children with normal gamma-glutamyltransferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC). Phenotypic differences between PFIC 1 and PFIC 2 and natural history. *Hepatology* 2010; 51 (5):1645-1655
37. Keitel V, Burdelski M, Warskulat U, Külhkamp T, Keppler D. Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 2005; 41(5): 1160-1172.
38. Noe J, Stieger B, Meier PJ. Functional expression of the canalicular bile salt export pump of human liver. *Gastroenterology* 2002; 123: 1659–1666.
39. Byrne JA, Strautnieks SS, Mieli-Vergani G, Higgins CF, Linton KJ, Thompson RJ. The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* 2002; 123:1649–1658.
40. 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 glutamyltranspeptidase levels. *J Pediatr.* 2002 Jan;140(1):119-24.
41. Jansen PL.M, 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 Dec; 117(6):1370-9.
42. 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 Mar; 25(3):519-23.
43. Real Academia de la Lengua Española 22ª edición. <http://www.rae.es>. Visitas durante septiembre 2010.
44. Lee V. Laboratory assessment of liver function and injury in children in: Suchy. *Liver disease in children.* 2007; Cambridge University, 3a. ed: 163-175.
45. Lykavieris P, van Mil S, Cresteil D, Fabre M, Hadchouel M, Klomp L, Bernard O, Jacquemin E: 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, 39:447-452.
46. Jacquemin E: Role of multidrug resistance 3 deficiency in pediatric and adult liver disease: one gene for three diseases. *Semin Liv Dis* 2001, 21:551-562.
47. Ekinci S, Karnak I, Gurakan F, et al. Partial external biliary diversion for the treatment of intractable pruritus in children with progressive familial intrahepatic cholestasis: report of two cases. *Surg Today*. 2008;38(8):726-30
48. Arnell H, Bergdahl S, Papadogiannakis N, Nemeth A, Fischler B. Preoperative observations and short-term outcome after partial external biliary diversion in 13 patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *J Pediatr Surg*. Jul 2008;43(7):1312-20.
49. Hori T, Egawa H, Takada Y, et al. Progressive familial intrahepatic cholestasis: a single-center experience of living-donor liver transplantation during two decades in Japan. *Clin Transplant* Sep 2011;25(5):776-785.
50. Deleuze JF, Jacquemin E, Dubuisson C, Cresteil D, Dumont M, Erlinger S, Bernard O, Hadchouel M: Defect of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 1996, 23:904-908.
51. Hierro L, Jara P. Colestasis infantil y transportadores biliares. *Gastroenterol Hepatol* 2005; 28(7):388-395.
52. Bellomo-Brandao MA, Escanhoela C, Meirelles L, et al. Analysis of the histologic features in the differential diagnosis of intrahepatic neonatal cholestasis. *World J Gastroenterol* 2009; 4:478.

XI. TABLAS

Tabla 1. Características demográficas y clínicas en 21 casos con Hepatitis Neonatal Idiopática

	N
Género	
Femenino	8 (38%)
Masculino	13 (62%)
Peso al Nacimiento (kg)*	2.67 (1.2- 5.2)
Consanguinidad	4 (19%)
Edad al momento de la biopsia (meses)*	2.5 (1- 6)
Edad al inicio de la ictericia (meses)*	1.5 (0.5- 3)
Child- Pugh	A 4 (19%) B 16 (76%) C 1 (5%)
PELD[§] *	17.1 (7- 27.9)
Ascitis	
Al diagnóstico	7(33%)
Resuelta	4 (19%)

*Variable expresada en promedio, valor mínimo y valor máximo; §Pediatric End Liver Disease

Tabla 2. Características clínicas en población estudiada clasificada según IHQ.

Variable	Grupo1 (n=14) Colestasis BSEP (+) MDR (+)	Grupo 2 (n=4) BSEP (-)	Grupo 3 (n=1) MDR 3 (-)	Grupo 4 (n=2) BSEP (-) MDR3 (-)
Género				
Femenino	4	2	1	1
Masculino	10	2	0	1
Consanguinidad	0	1	1	2
Peso al Nacimiento (kg)*	2.83 (1.2-5.2)	2.82 (2.5-3.3)	2.8	2.75 (2.3-3.2)
Edad al momento de la biopsia (meses)*	2.8 (1-6)	2 (1-3)	3	1.5 (1-2)
Edad al inicio de la ictericia (meses)*	1.5 (0.25-3)	2 (1-3)	3	1
Coolestasis Familiar	0	0	0	1
Ascitis				
Al diagnóstico	5	1	1	0
Persistente	3	1	1	0

Child-Pugh				
A	3	0	1	0
B	10	4	0	2
C	1	0	0	0

valores expresados en promedio, mínimo y máximo.

Tabla 3. Características bioquímicas en 21 pacientes con Hepatitis Neonatal idiopática según la tinción de inmunohistoquímica.

Parámetro Bioquímico	Grupo 0 (N: 14) IHQ (+) BSEP, MDR3	Grupo 1 (N: 7) IHQ (-) BSEP, MDR3	P
Albúmina (mg/dl)	2.63	2.62	.937
TP (seg)	13.71	13.86	.790
INR	1.314	1.343	.812
BT (mg/dl)	9.38	10.43	.159
BD (mg/dl)	6.29	6.80	.073
ALT (UI/DL)	138.36	147.86	.421
AST (UI/DL)	150.07	168.14	.727
GGT (UI/DL)	100.50	184.86	.042
FA (UI/DL)	274.93	298.71	.163

Tabla 4. Comparación de características histológicas de 21 casos con IHQ positiva o negativa.

Hallazgo histológico	IHQ Positiva) N: 14	IHQ negativa N: 7
<u>Colestasis</u>		
Leve	2	3
Moderada	10	3
Severa	1	1
Nula	1	0
<u>Células Gigantes</u>		
Leve	5	3
Moderada	9	4
Severa	0	0
<u>Eosinofilia</u>		
Leve	8	5
Moderada	1	1
Nula	5	1
<u>Fibrosis Portal</u>		
Leve	8	4
Moderada	4	3
Severa	1	0
Nula	1	0

Tabla 5. Características clínicas de los pacientes con ausencia de tinción en inmunohistoquímica

No.	Género	Inicio de la ictericia (meses)	Consanguinidad	Historia familiar de colestasis	GGT UI/DL	Child-Pugh inicio/seguimiento	PELD ^s inicio/seguimiento	IHQ (-)
Caso 1	Masculino	3	No	No	110-100	B/A	23.2/17	BSEP
Caso 2	Femenino	3	No	No	120-70	B/B	24.9/23.3	BSEP
Caso 3	Femenino	3	Sí	No	247-314	A/A	23/17.6	MDR3
Caso 4	Masculino	2	Sí	Sí	108-60	B/B	12.5/17.6	BSEP, MDR3
Caso 5	Femenino	1	Sí	No	74-104	B/A	14.7/15	BSEP
Caso 6	Masculino	1	No	No	158-150	B/C	27.4/28.7	BSEP
Caso 7	Masculino	1	Sí	No	120-56	B/B	7/5	BSEP, MDR3

^sPediatric End Liver Disease

Tabla 6. Características bioquímicas de los pacientes con ausencia de tinción en IHQ*

No.	Albúmina (g/dl)	TP (seg)	INR	ALT (UI/L)	AST (UI/L)	GGT (UI/L)	FA (UI/L)
Caso 1	2.5-2.7	16-12	1.4-1.2	145-85	150-90	110-100	250-195
Caso 2	2.9-2.7	16-14	1.5-1.5	110-115	105-120	120-70	238-215
Caso 3	2.5-2.1	13-12	1.21.1	165-138	173-147	247-314	256-227
Caso 4	3.1-3	12-14	1.1-1.5	147-152	135-145	108-60	297-269
Caso 5	2.6-2.2	12-13	1.2-1.3	164-184	154-170	74-104	263-105
Caso 6	2.1-2.6	17-18	1.5-1.7	198-172	185-158	158-150	247-108
Caso 7	2.7-2.9	14-14	1.2-1.3	144-61	303-49	120-56	350-145

*Valores bioquímicos al inicio y seguimiento del estudio.

Tabla 7. Características histológicas de los pacientes con ausencia de tinción en inmunohistoquímica

No.	Colestasis	Células Gigantes	Eosinofilia	Fibrosis Portal	IHQ (-)
Caso 1	MODERADA	MODERADA	LEVE	MODERADA	BSEP
Caso 2	SEVERA	LEVE	MODERADA	MODERADA	BSEP
Caso 3	MODERADA	MODERADA	LEVE	MODERADA	MDR3
Caso 4	LEVE	MODERADA	LEVE	LEVE	BSEP, MDR3
Caso 5	LEVE	MODERADA	LEVE	LEVE	BSEP,
Caso 6	MODERADA	LEVE	LEVE	LEVE	BSEP
Caso 7	LEVE	LEVE	NULA	LEVE	BSEP, MDR3

XII. ANEXOS

ANEXO 1

Escala de Child- Pugh

Parámetro	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3
Ascitis	Ausente	Leve	Moderada
Bilirrubina , mg/dL	≤ 2	2-3	>3
Albúmina , g/dL	$>3,5$	2,8-3,5	$<2,8$
Tiempo de protrombina * Segundos sobre el control * INR	1-3 $<1,8$	4-6 1,8-2,3	>6 $>2,3$
Encefalopatía	No	Grado 1-2	Grado 3-4

Una puntuación total de 5-6 es considerada grado A (enfermedad bien compensada); 7-9 es grado B (compromiso funcional significativo); y 10-15 es grado C (enfermedad descompensada). Estos grados se correlacionan con una sobrevida del paciente al año y a los 2 años.

Grado	Puntos	Sobrevida al año (%)	Sobrevida a los 2 años (%)
A: enfermedad bien compensada	5-6	100	85
B: compromiso funcional significativo	7-9	80	60
C: enfermedad descompensada	10-15	45	35

ANEXO 2

	Leve	Moderado	Severo
Colestasis	Depósitos de pigmento biliar en algunos hepatocitos de la zona 3 del ácino.	Hepatocitos con pigmento biliar en dos ácinos de la zona 3 asociado con la presencia de colestasis canalicular.	La mayoría de los hepatocitos con pigmento biliar asociado con colestasis canalicular.
Eosinofilia en el infiltrado inflamatorio	Raramente hay eosinófilos en algunos espacios porta.	Algunos eosinófilos en varios espacios porta y raro en el parénquima.	Muchos eosinófilos en todos los espacios porta y parénquima.
Presencia de células gigantes	Ocurre en 30% de los hepatocitos.	Entre 30% y 60% de los hepatocitos.	Mayor al 60% de los hepatocitos.
Fibrosis portal	Discreto ensanchamiento de espacios porta.	Ensanchamiento de algunos espacios porta.	Ensanchamiento de todos los espacios porta.

⁵⁰Bellomo-Brandao MA, Escanhoela C, Meirelles L, et al. Analysis of the histologic features in the differential diagnosis of intrahepatic neonatal cholestasis. World J Gastroenterol 2009; 4:478-483

ANEXO 3

Técnica de Inmunohistoquímica:

Se procedió a realizar el estudio de inmunohistoquímica con sistema peroxidasa-antiperoxidasa por un histotecnólogo capacitado en la técnica de acuerdo a las recomendaciones de los proveedores.

Se realizaron cortes de 3 a 4 μm de tejido incluido en parafina, previamente fijado en formol amortiguado al 10%, utilizando porta objetos con poly-L lysina. (0.1% en agua destilada). El tejido fue desparafinado en la estufa a 56° C durante 30 minutos y rehidratado desde xilol hasta agua destilada pasando por alcoholes a concentraciones menores (5 minutos en cada uno de las soluciones). Posteriormente se efectuó la recuperación antigénica con DAKO target retrieval solution al 10% durante 10 minutos en olla express. Una vez que se enfrió (temperatura ambiente) se retiró del recuperador y se enjuagó con agua destilada ó PBS. La peroxidasa se bloqueó por 10 minutos con DAKO peroxidase blocking al

3% (se debe mantener cubierto para evitar el contacto con la luz) y se lavó con agua destilada.

Los cortes fueron incubados en cámara húmeda durante 20 minutos con los anticuerpos primarios: BSEP (1:50 DAKO corporation, Carpinteria Ca. Anticuerpo **monoclonal** de ratón **anti-mAb** humano Clona Ki-S5 Isotipo IgG kappa. **Código No M 7187**) y MDR3 (1:150 DAKO corporation, Carpinteria Ca. Anticuerpo **policlonal** de conejo **anti-mAb** Código **No A0485**).

El anticuerpo primario fue detectado con un anticuerpo secundario biotinilado. Una vez aplicado, se incubó durante 30 minutos streptavidina conjugada (peroxidasa de rábano). Posteriormente se reveló con el cromógeno diamino-bencidina (DAB) por 5 minutos y finalmente fue contrastado con hematoxilina.

El tejido fue deshidratado con alcoholes de menor a mayor concentración (70%, 90% y 100%) y xilol. Las preparaciones se montaron con resinas.

En cada caso se incluyó un control positivo conocido (se utilizó tejido hepático sano de paciente con meduloblastoma, sin metastásis). Los resultados se vaciaron en una hoja de recolección de datos por cada paciente y posteriormente se vaciaron en una base de datos electrónica en Excel. Posteriormente, se procedió a analizar la información y se elaboró el informe final de resultados.

Figura 1. Expresión normal de BSEP en la membrana canalicular del hepatocito.

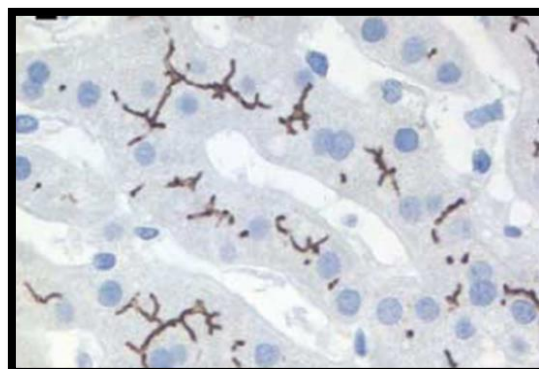


Figura 2. Ausencia de tinción canalicular específica para BSEP (PFIC 2)

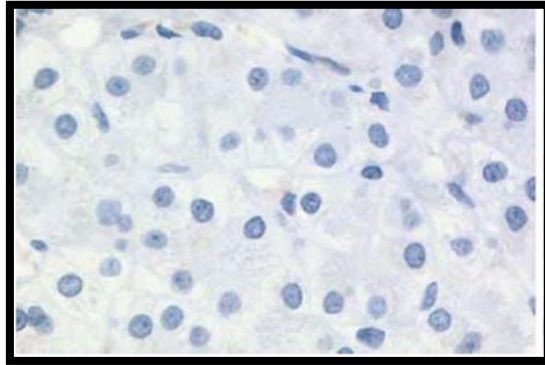


Figura 3. Hepatitis neonatal: Colestasis intracelular, edema y hepatocitos multinucleados.

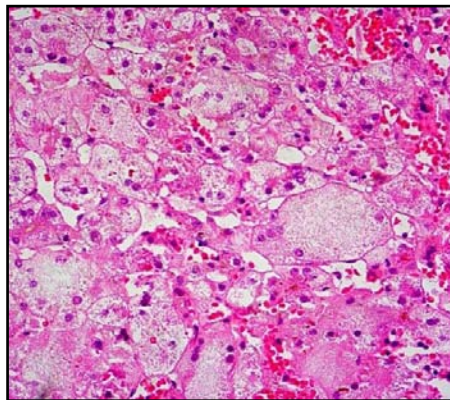
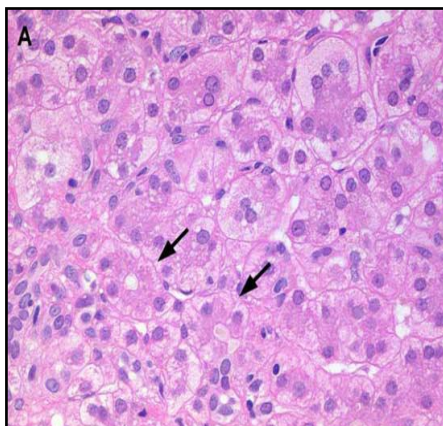


Figura 4. Biopsia hepática de paciente con PFIC 2 que muestra colestasis canalicular y células gigantes multinucleadas.



Cuadro 1. Características principales en los tipos de PFIC

	PFIC 1	PFIC 2	PFIC 3
Genética			
Gen	ATP8B1	ABCB11	ABCB4
Cromosoma	18q21-22	2q 24	7q 21
Proteína	FIC1	BSEP	MDR3
Clínica			
Ictericia	Progresiva	Rápidamente progresiva	Aparición tardía
Diarrea	++++	-	-
Prurito	++++	++	++
Crecimiento	Detención	Detención	-
Litiasis	-	-	+
Pancreatitis	+	-	-
Sordera	+		
Laboratorio			
GGT	N	N	Aumentada
AB suero	Aumentado	Aumentado	Aumentado
AB bilis	Disminuido	Disminuido	Normal
Histología			
Microscopia óptica	Inespecífica	Transformación gigantocelular	Proliferación ductular Cirrosis biliar
Microscopia electrónica	Bilis granulosa	Bilis amorfa	Bilis normal
Inmuno- Histoquímica	Expresión normal MDR3, BSEP	No expresión BSEP	No expresión MDR3, expresión débil o normal

AB: Ácidos biliares; GGT: Gama glutamil transpeptidasa.