



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE**

**XXXII CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN**

**SCIENZE DELLA RIPRODUZIONE E DELLO SVILUPPO**

**“STUDIO MULTICENTRICO PER LA  
CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA E  
FENOTIPICA DELLE COLESTASI EREDITARIE”**

Settore scientifico-disciplinare: MED/38

**DOTTORANDA**

**Dott.ssa Lorenza Matarazzo**

**COORDINATORE**

**Prof. Paolo Gasparini**

**SUPERVISORE DI TESI**

**Prof. Giuseppe Maggiore**

**COSUPERVISORE DI TESI**

**Prof. Adamo Pio D'Adamo**

**ANNO ACCADEMICO 2018/2019**

## **INDICE GENERALE**

### **1. INTRODUZIONE**

**1.1. La colestasi in età pediatrica: eziopatogenesi, cause e classificazione.**

**1.2. Presentazione clinica.**

**1.3. Diagnosi.**

**1.4. Nuovi approcci genetici nella diagnosi di colestasi in età pediatrica.**

**1.5. Terapia.**

### **2. OBIETTIVI DELLO STUDIO**

### **3. MATERIALI E METODI**

### **4. RISULTATI**

### **5. DISCUSSIONE**

### **6. CONCLUSIONI**

### **7. BIBLIOGRAFIA**

## **1. INTRODUZIONE**

### **1.1. La colestasi in età pediatrica: eziopatogenesi, cause e classificazione.**

L'ittero rappresenta un segno comune di patologie epatiche di origine genetica o acquisita. È secondario ad un aumento della bilirubina diretta e/o indiretta, dove l'aumento della quota indiretta è tipicamente il risultato di un aumentato turn-over delle emazie con eccessivo carico della bilirubina al fegato o di un'alterazione dell'uptake epatocellulare e della coniugazione della bilirubina. L'iperbilirubinemia diretta, definita come un aumento della bilirubina diretta maggiore di 1 mg/dl per valori di bilirubina sierica totale inferiori o uguali a 5 mg/dl oppure come un aumento maggiore del 20% per valori di bilirubina totale maggiori di 5 mg/dl, definisce la colestasi.

Recenti progressi hanno permesso di comprendere meglio i meccanismi molecolari alla base del metabolismo biliare, trasporto epatocellulare, riassorbimento intestinale dei sali biliari nonché della regolazione dell'omeostasi dei sali biliari e del colesterolo. La bile, sintetizzata nel fegato, fluisce all'interno dei canalicoli biliari per essere conservata nella colecisti ed infine essere drenata nel duodeno. La funzione principale della bile è rappresentata dall'emulsione dei lipidi contenuti nei cibi, facilitandone la digestione e consentendo l'assorbimento delle sostanze liposolubili. Inoltre, la bile ha un ruolo fondamentale nel regolare l'omeostasi del colesterolo, il catabolismo dell'emoglobina e l'eliminazione di farmaci e tossine. La bile è composta da acqua, acidi biliari, ioni, fosfolipidi, colesterolo, bilirubina, proteine e xenobiotici. La bilirubina rappresenta il prodotto finale della degradazione dell'emoglobina e delle altre proteine contenenti l'eme come la mioglobina. L'eme è prima ossidato in biliverdina negli epatociti, quindi ridotto in bilirubina non coniugata che viene a sua volta coniugata con l'acido glucuronico dall'enzima uridina 5'-difosfoglucuronosiltransferasi. La bilirubina coniugata aumenta la solubilità in acqua e riduce la citotossicità della bilirubina totale.

Gli acidi biliari rappresentano un gruppo di molecole che forma la bile sintetizzati a partire dal colesterolo ed associati con gli ioni del sodio o del potassio a dare i sali biliari. Sono sintetizzati negli epatociti a generare due acidi biliari primari, l'acido colico e l'acido chenodesossicolico. Gli acidi biliari primari vengono coniugati con glicina o taurina per aumentarne la solubilità e ridurne la tossicità. Nell'intestino, ad opera dei batteri intestinali, avviene la trasformazione negli acidi biliari secondari, il deossicolico e il litocolico. La quantità degli acidi biliari sintetizzati ex novo ammonta a circa 500 mg/die. Più del 90% degli acidi biliari viene riassorbito a livello intestinale attraverso il circolo entero-epatico<sup>1</sup>.

La secrezione degli acidi biliari negli epatociti è mediata da un gruppo di proteine di trasporto denominate ATP binding cassette. Gli acidi biliari sintetizzati nell'epatocita vengono trasportati attraverso la membrana canalicolare mediante la pompa di esporto degli acidi biliari (BSEP sintetizzata dal gene ABCB11), espressa esclusivamente nella membrana canalicolare degli epatociti. Dopo essere stati secreti nel piccolo intestino, gli acidi biliari vengono riassorbiti dall'intestino distale nel circolo entero-epatico attraverso il trasportatore apicale sodio-dipendente degli acidi biliari (ASBT sintetizzato da SLC10A2) e quindi secreti nella circolazione attraverso il trasportatore basolaterale OST $\alpha$ -OST $\beta$ . La membrana basolaterale contiene trasportatori degli acidi biliari quali il polipeptide cotrasportatore Na-taurocolato NTCP (codificato da SLC10A1), OATP1B1 e OATP1B3 (codificati rispettivamente da SLCO1B1 e SLCO1B3)<sup>2</sup>. NTCP rappresenta il maggior sistema di uptake degli acidi biliari dal sangue, contribuendone per una quota pari all'80%. Un suo deficit è stato recentemente associato a ipercolanemia familiare in assenza di ittero colestatico, prurito o danno epatico. Anche i lipidi rappresentano componenti importanti della bile. La fosfatidilcolina è trasportata dalla glicoproteina P multidrug resistance tipo 3 (MDR3 codificata da ABCB4), mentre la flippasi FIC1 (codificata da ATP8B1) è necessaria per trasportare la fosfatidilserina dallo strato lipidico esterno a quello interno della membrana canalicolare consentendone la stabilizzazione e l'integrità.

Infatti, la composizione lipidica della membrana apicale canalicolare e del colangiocita rende le cellule maggiormente resistenti al danno causato dall'azione detergente degli acidi biliari. Inoltre, l'effetto detergente degli acidi biliari è ridotto grazie al loro assemblaggio in micelle miste, composte principalmente da fosfatidilcolina<sup>3</sup>. Pertanto, gli epatociti e i dotti biliari sono protetti dall'azione tossica degli acidi biliari grazie all'efflusso mediato da BSEP e alle funzioni di MDR3 e FIC1. D'altra parte, la sintesi degli acidi biliari è finemente regolata. Il ruolo chiave in questa azione è dato dal farnesoid X receptor (FXR, NR1H4), recettore nucleare altamente espresso negli epatociti e negli enterociti dell'intestino distale e del colon. Dopo essersi legato agli acidi biliari, FXR inibisce l'espressione degli enzimi deputati alla sintesi degli acidi biliari (soprattutto CYP7A1) e l'uptake sinusoidale del trasportatore NTCP, aumentando inoltre l'espressione di BSEP. FXR inibisce inoltre l'espressione del trasportatore ileale ASBT riducendo la circolazione entero-epatica degli stessi acidi biliari<sup>2,3,4</sup>.

L'ittero, definito come una colorazione gialla di cute, sclere e membrane, è un reperto comune nelle prime due settimane di vita, riscontrabile nel 2.4%-15% dei neonati. L'ittero che persiste oltre le due settimane di vita deve essere indagato con valutazione della bilirubina totale e coniugata per escludere la presenza di colestasi<sup>5</sup>.

La colestasi è definita come una riduzione della sintesi della bile o del flusso biliare che conduce a ritenzione di sostanze normalmente escrete nella bile, nel fegato. Numerosi disordini sono stati associati alla colestasi in età neonatale/infantile.

L'ittero colestatico ha un'incidenza di circa 1 ogni 2500 nati a termine. Numerose sono le cause di colestasi neonatale, suddivise solitamente in extraepatiche e intraepatiche. La causa più comune è rappresentata dall'atresia delle vie biliari (25-40%), seguita dai disordini genetici (25%).

Altre cause di colestasi includono la cisti del coledoco e la colelitiasi per le cause extraepatiche, mentre fra le cause di colestasi intraepatica troviamo disordini metabolici quali la tirosinemia tipo 1 e la galattosemia, disordini genetici colestatici quali il deficit di alfa1 antitripsina, la sindrome di Alagille, la fibrosi cistica, le colestasi progressive intraepatiche familiari, gli errori congeniti del metabolismo degli acidi biliari e ancora disordini endocrini (ipotiroidismo, panipopituitarismo), le infezioni e la colestasi associata a nutrizione parenterale<sup>6,7,8</sup>. (Tabella 1)

Tuttavia, nonostante i recenti progressi nella diagnosi delle colestasi, spesso l'eziologia rimane sconosciuta.



Le colestasi genetiche esordiscono più frequentemente in età pediatrica e occupano una quota importante delle cause di colestasi. Diversi studi indicano che almeno il 45% dei disordini colestatici in età pediatrica abbia una causa genetica. Inoltre, circa il 20% dei trapianti epatici viene eseguito per disordini monogenici, soprattutto colestatici.

Nell'ambito delle colestasi genetiche, particolare attenzione sarà posta alle colestasi intraepatiche familiari progressive (PFIC), oggetto di questa tesi. Le PFIC, descritte per la prima volta negli anni sessanta da Clayton et al<sup>9</sup> in una popolazione Amish, rappresentano un gruppo eterogeneo di disordini congeniti a trasmissione autosomica recessiva, causati da mutazioni in geni che codificano per trasportatori epato-canalicolari degli acidi biliari e dei fosfolipidi. I primi tre difetti identificati sono stati caratterizzati come PFIC tipo 1, 2 e 3 e solo negli anni novanta sono stati identificati i tre geni causa di malattia: ATP8B1, ABCB11 e ABCB4<sup>9-12</sup>. L'incidenza esatta delle PFIC non è nota ma si stima possa essere di 1/500000-1/100000 nati. Si manifestano solitamente nel primo anno di vita e sono caratterizzate da prurito severo, epatosplenomegalia, steatorrea, ritardo di crescita e sviluppo. In assenza di trattamento, progrediscono in fibrosi e cirrosi fino all'insufficienza epatica nella prima/seconda decade di vita. Rappresentano la causa di colestasi nel 10-15% dei casi e il 10-15% delle indicazioni al trapianto epatico in età pediatrica. Le PFIC tipo 1 e 2 rappresentano i 2/3 dei casi mentre la PFIC tipo 3 occupa il restante terzo. La colestasi è il segno clinico principale, solitamente ad esordio nei primi mesi di vita nella PFIC1 con episodi ricorrenti di ittero che diventano poi persistenti. Nella PFIC2 la presentazione iniziale e l'evoluzione sono più severe con ittero persistente già dai primi mesi vita e comparsa di insufficienza epatica nei primi anni di vita. La comparsa precoce di carcinoma epatocellulare e colangiocarcinoma può complicarne il decorso.

Nella PFIC tipo 3 invece la colestasi raramente si presenta nel periodo neonatale; il sanguinamento gastrointestinale da ipertensione portale e cirrosi sono i sintomi d'esordio negli adolescenti o giovani adulti.

Per quanto concerne il laboratorio, le PFIC tipo 1 e 2 hanno livelli di  $\gamma$ -glutamyltransferasi (GGT) normali, normali livelli di colesterolo sierico ed elevati livelli di acidi biliari con prurito intenso. Le transaminasi sembrano essere più alte nella tipo 2 così come l'alfafetoproteina. Nella tipo 3 invece vi sono livelli aumentati di GGT, normali livelli di colesterolo e moderatamente aumentati di acidi biliari. Dal punto di vista istologico, nella tipo 1 vi è colestasi canalicolare in assenza di una vera proliferazione duttulare, con metaplasia biliare degli epatociti. Con la progressione della malattia, l'infiammazione, la fibrosi e la cirrosi possono diventare maggiormente evidenti. Nella 2 vi sono gli stessi segni ma con un'architettura molto più sovvertita e con maggiore infiammazione, fibrosi lobulare e portale. Sono inoltre più pronunciate la necrosi epatocellulare e la trasformazione gigantomitotica. Nella tipo 3 vi è fibrosi portale e proliferazione duttulare con infiltrato infiammatorio misto. Ad uno stadio più tardivo si riscontra fibrosi portale e cirrosi biliare<sup>2,13,14</sup>.

Alcuni pazienti, soprattutto nella forma a GGT normali, rimangono non diagnosticati<sup>15</sup>. Negli ultimi anni, grazie all'avvento di nuove tecniche genetiche, nuovi geni alla base delle colestasi sono stati descritti: FXR è stato descritto in pazienti con colestasi infantile ed insufficienza epatica, TJP2 e MYO5B sono state identificate come responsabili di colestasi a GGT normali, DCDC2 è una tubulin binding protein associata a ciliopatia epato - renale e colangite sclerosante neonatale. (Tabella 2)

Vengono di seguito riportate nei dettagli le principali colestasi genetiche:

- ***PFIC tipo 1:*** conosciuta anche come malattia di Byler è causata da mutazioni nel gene ATP8B1. Questo gene codifica per un'ATPasi localizzata sul cromosoma 18, mutata anche nel fenotipo più lieve, la colestasi intraepatica ricorrente benigna (BRIC).

La proteina FIC1 è localizzata sulla membrana canalicolare dell'epatocita ed è un traslocatore di fosfolipidi (flippasi) responsabile del mantenimento dello strato di fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina nello strato interno della membrana plasmatica.

La distribuzione asimmetrica dei lipidi nel doppio strato della membrana ha un ruolo protettivo nei confronti delle elevate concentrazioni degli acidi biliari nel lume canalicolare. Sebbene l'identificazione di ATP8B1 quale gene responsabile della colestasi sia avvenuta precocemente, non è stato altrettanto facile determinare l'esatto meccanismo con cui FIC1 sia coinvolta nella colestasi. In assenza di FIC1 la membrana canalicolare è maggiormente esposta al danno degli acidi biliari e alcune proteine di membrana, inclusa BSEP, possono avere una ridotta espressione. Inoltre, attraverso la sua azione di traslocatore di fosfolipidi, FIC1 gioca un ruolo nel traffico e nel trasporto delle proteine vescicolari, azione che può risultare compromessa in caso di mutazioni in FIC1, contribuendo alla colestasi. In questi pazienti, i meccanismi alla base della colestasi deriverebbero da un sovraccarico di acidi biliari negli epatociti secondario alla ridotta secrezione e all'aumentato riassorbimento ileale degli stessi. Infatti, la ridotta funzione di ATP8B1 comporta una riduzione dell'attività di FXR e BSEP, con aumento della sintesi degli acidi biliari e dell'attività di ASBT nell'intestino.

In circa il 10% dei pazienti con PFIC1 è possibile riscontrare mutazioni in un solo allele o nessuna mutazione. In questi pazienti, altri possibili meccanismi alla base del danno includono la presenza di mutazioni in sequenze regolatori del gene o in altri geni coinvolti nella trascrizione di PFIC1 o, ancora, nel controllo della proteina stessa.

Il gene è espresso in altri organi oltre il fegato, compreso pancreas, rene e piccolo intestino, elemento che spiega le manifestazioni extraepatiche presenti in questi pazienti quali diarrea, coinvolgimento polmonare, sordità, coinvolgimento pancreatico e scarsa crescita. Sembra inoltre che FIC1 eserciti funzioni biologiche che ne spiegherebbero caratteristiche quali la bassa statura e la sordità.

È stato inoltre ipotizzato che vi sarebbe un continuum dal fenotipo benigno BRIC1 al più severo PFIC1.

Il motivo alla base del diverso fenotipo clinico presente nelle due forme potrebbe risiedere nella presenza di mutazioni che compromettono in maniera importante la funzione della proteina in PFIC1, che resterebbe invece parzialmente conservata nella BRIC1. Una chiara correlazione genotipo-fenotipo non è stata identificata. Mutazioni eterozigoti in ATP8B1 sono state inoltre identificate in alcuni casi di colestasi neonatale transitoria e colestasi intraepatica della gravidanza<sup>3,4,13,14,16</sup>.

- ***PFIC tipo 2***: precedentemente denominata sindrome di Byler, è causata da mutazioni nel gene ABCB11 che codifica per una proteina canalicolare ATP dipendente localizzata sul cromosoma 2 (BSEP). BSEP, espressa sulla membrana canalicolare degli epatociti, rappresenta la maggiore proteina di esporto degli acidi biliari. Mutazioni in questa proteina sono responsabili della ridotta secrezione degli acidi biliari presente in questi pazienti, con ridotta concentrazione degli stessi a livello biliare ed accumulo negli epatociti con danno epatocellulare. Mutazioni in BSEP sono responsabili di un fenotipo che varia dalla forma ricorrente benigna (BRIC2) alla forma più severa PFIC2. Anche in questo caso non è stata identificata una chiara correlazione genotipo-fenotipo; fenotipi severi sono più spesso associati a mutazioni che causano una proteina tronca o un difetto della produzione di proteina. Inserzioni, delezioni, mutazioni nonsenso o di splicing risultano in un'espressione di BSEP ridotta o assente. In questi casi all'immunoistochimica BSEP non sarà espressa. Anche le mutazioni missenso possono alterare il processamento e il traffico della proteina oppure ancora, distruggere i domini funzionali e la struttura della proteina. In questo caso invece l'immunoistochimica mostrerà la presenza di BSEP sulla membrana canalicolare, proteina che tuttavia non sarà funzionante. Mutazioni eterozigoti sono state riscontrate nella colestasi intraepatica della gravidanza, nella colestasi indotta da farmaci e nella colestasi transitoria del neonato. Sembra che un'attività di proteina funzionante pari al 25% determini il valore

soglia per i pazienti a rischio di colestasi.

Due mutazioni relativamente comuni in Europa sono p.D482G, che comporta una progressione di malattia più lenta e p.E297G che correla invece con una forma di PFIC2 o BRIC2 maggiormente responsiva alla terapia medica<sup>3,4,13,14,16</sup>.

- **PFIC tipo 3**: è causata da un difetto genetico nel gene ABCB4 localizzato sul cromosoma 7. Questo gene è una glicoproteina multidrug resistance di classe III (MDR3) coinvolta nell'escrezione biliare dei fosfolipidi (fosfatidilcolina) e principalmente espressa sulla membrana canalicolare degli epatociti. La colestasi è il risultato della tossicità degli acidi biliari che non vengono inattivati dai fosfolipidi con danno a carico dell'epitelio biliare. Inoltre, l'assenza di fosfolipidi nella bile destabilizza le micelle e promuove la litogenicità della bile. Lo spettro fenotipico varia dalla colestasi neonatale alla cirrosi dei pazienti giovani-adulti. Anche per questa forma mutazioni in eterozigosi possono essere responsabili della colestasi intraepatica della gravidanza tipo 3, della formazione di calcoli di colesterolo, della colestasi indotta da farmaci e della colestasi neonatale transitoria. Mutazioni in entrambe gli alleli di ABCB4 sono presenti nella maggior parte dei pazienti. In un terzo dei casi, le mutazioni conducono ad assenza di MDR3 sulla membrana canalicolare come può essere dimostrato all'immunoistochimica. La completa perdita di MDR3 è stata attribuita alla presenza di una proteina tronca o di mutazioni tipo stop codon. Nei restanti casi vi sono mutazioni missenso che possono causare sia un'alterazione della funzione di trasporto della proteina sia un alterato processamento intracellulare di MDR3. In questo caso, l'immunoistochimica mostrerà una normale espressione di BSEP. A differenza della PFIC tipo 2, i difetti di MDR3 non causano accumulo di acidi biliari negli epatociti e pertanto non causano direttamente la colestasi. Il tipo di danno è piuttosto sul modello della colangiopatia. I livelli di GGT sono elevati e a livello istologico vi è evidenza di danno biliare. Una perdita parziale di funzione della proteina può condurre ad una

progressione più lenta; vi è infatti un ampio spettro di variabilità clinica e di età di presentazione. Anche le mutazioni che causano assenza completa di MDR3 possono manifestarsi tardivamente. In alcuni casi la presentazione clinica può essere già con cirrosi biliare o colangiocarcinoma. In altri pazienti non vi è evidenza di danno biliare ma la ridotta concentrazione di fosfatidilcolina a livello biliare predispone alla precipitazione di colesterolo con formazione di calcoli. Mutazioni in MDR3 possono essere riscontrate anche nella colestasi della gravidanza di tipo 3 e nella colestasi indotta da farmaci, nonché in alcune forme di colestasi transitoria del neonato e di cirrosi idiopatica dell'adulto. I parenti eterozigoti per MDR3 sono a rischio di progressione di malattia sebbene più lenta<sup>3,13,14,16</sup>.

- **Difetto di TJP2**: descritta per la prima volta nel 2014<sup>17</sup> e clinicamente analoga alla PFIC tipo 2, è causata da mutazioni omozigoti o eterozigoti composte nel gene TJP2 localizzato sul cromosoma 9q12. La proteina tight junction 2 è una componente citoplasmatica della giunzione cellulare espressa in molti epiteli e ha l'azione di creare un link fra le proteine tight junction transmembrana e l'actina del citoscheletro. La sua assenza comporta una significativa riduzione di una proteina delle tight junction, la claudina 1, espressa soprattutto nella membrana canalicolare delle cellule epatiche con passaggio della bile, attraverso lo spazio paracellulare, nel parenchima epatico. Una condizione di omozigosi per una mutazione missenso era stata precedentemente identificata in alcuni pazienti Amish che si presentavano con ipercolanemia in assenza di danno epatico progressivo. Questa mutazione conduceva ad un ridotto legame di TJP2 alle claudine. Tuttavia, questi pazienti non presentano danno epatico severo e progressivo come è stato in seguito riscontrato in pazienti con mutazioni bialleliche che comportavano la perdita completa di TJP2<sup>18</sup>. I pazienti affetti presentano colestasi severa ad esordio nella prima infanzia con aumentato rischio di epatocarcinoma. L'attività delle GGT è normale o solo lievemente aumentata con elevati livelli di acidi

biliari, bilirubina e transaminasi; l'espressione canalicolare di BSEP e MDR3 è mantenuta. La più ampia casistica fino ad ora riportata consta di 12 bambini provenienti da 8 famiglie (la maggior parte consanguinei) con esordio nei primi mesi di vita con danno epatico severo e necessità di trapianto (9 su 12 pazienti), nonché manifestazioni extraepatiche quali coinvolgimento respiratorio e neurologico<sup>17</sup>. Questi pazienti erano negativi alla ricerca di mutazioni in ABCB11, ABCB4 e ATP8B1 e mutazioni in TJP2 sono state identificate grazie a tecniche di Next Generation Sequencing. Il meccanismo di danno sembra essere correlato alla funzione di TJP2 nel mantenere l'integrità della giunzione cellulare, tuttavia l'esatta spiegazione di come questo comporti il passaggio degli acidi biliari nello spazio paracellulare non è ancora del tutto chiarita.

Le proteine delle tight junction (1,2,3) non fanno strettamente parte delle tight junction stesse, in quanto a localizzazione citoplasmatica. Tuttavia, sono strettamente associate con le proteine che le formano quali le claudine. Le più rappresentate nel fegato sono la claudina 1 e 2. Difetti a carico della claudina1 sono stati descritti come causa di colangiopatia. Al contrario, difetti in TJP2 sono associati a colestasi in assenza di colangiopatia, suggerendo che la funzione di barriera delle tight junction non sia completamente distrutta. Nel loro studio, Sambrotta et al<sup>17,19</sup> hanno dimostrato come all'immunoistochimica la claudina 1 non era normalmente localizzata sulla membrana canalicolare, nonostante adeguati livelli di proteina. Al contrario, la localizzazione di claudina 2 non sembrava essere alterata da mutazioni in TJP2. Gli autori hanno così ipotizzato che la carenza di TJP2 da sola non sia sufficiente a causare la distruzione delle tight junctions al di fuori del fegato, dove TJP2 è essenziale per il mantenimento dell'integrità della membrana dei colangiociti.

- **Difetto di FXR**: descritto per la prima volta nel 2016<sup>20</sup>, è un disordine colestatico raro causato da mutazioni nel gene NR1H4 localizzato sul cromosoma 12 che codifica per FXR (nuclear receptor transcription factor), modulatore chiave del metabolismo dei sali

biliari. Mutazioni omozigoti di FXR sono associate a colestasi neonatale severa ad esordio precoce, coagulopatia vitamina K indipendente e rapida progressione in danno epatico terminale. La colestasi si caratterizza per bassi livelli di GGT con livelli di alfafetoproteina elevati. A livello istologico vi è diffusa trasformazione gigantocellulare, colestasi epatocellulare e proliferazione dutturale con progressione in fibrosi e cirrosi negli stadi più tardivi. FXR è un recettore nucleare e fattore di trascrizione del quale gli acidi biliari sono ligandi naturali. Oltre alla funzione di regolatore del metabolismo, gioca un ruolo importante nell'omeostasi degli acidi biliari. Se i livelli degli acidi biliari sono aumentati, FXR ne reprime la sintesi e l'uptake ed aumenta l'esporto degli acidi biliari dall'epatocita inducendo l'espressione di BSEP. FXR è inoltre coinvolto nella regolazione di altri geni della colestasi, inclusi ABCB11 e ABCB4<sup>3,4,20</sup>.

- **Difetto di MYO5B**: mutazioni a carico delle gene MYO5B sono solitamente riscontrate in pazienti affetti da diarrea da inclusione dei microvilli (MVID), tuttavia sono state recentemente identificate anche in pazienti con colestasi isolata. La malattia da inclusione dei microvilli è un disordine congenito degli enterociti responsabile di diarrea severa ad esordio neonatale. I bambini affetti si presentano con insufficienza intestinale, sono dipendenti dalla nutrizione parenterale totale e candidati al trapianto d'intestino. Le biopsie intestinali mostrano alla microscopia elettronica l'assenza dei microvilli con corpi da inclusione nel citoplasma. Le analisi molecolari hanno recentemente identificato come causa mutazioni nel gene MYO5B che codifica per una proteina del citoscheletro coinvolta nella regolazione del traffico delle proteine di membrana nelle cellule epiteliali polarizzate. La miosina 5B esercita infatti un ruolo essenziale nel mantenimento delle membrane plasmatiche e nella polarizzazione delle cellule epiteliali di molti tessuti, inclusi gli enterociti e le cellule respiratorie nonché gli epatociti. Negli epatociti, interagisce con RAB11A per facilitare il normale traffico e localizzazione di trasportatori quali la BSEP sulla membrana canalicolare. L'interazione

di MYO5B con RAB11A è essenziale per la localizzazione di BSEP sulla membrana canalicolare, con polarità cellulare aberrante in caso di difetto. Più recentemente, mutazioni in MYO5B sono state descritte in pazienti con colestasi isolata. I pazienti con colestasi da difetto di MYO5B si presentano nei primi due anni di vita con ittero, prurito, epatomegalia aumento della bilirubina coniugata e degli acidi biliari, bassi livelli di GGT e aumento da lieve a moderato delle transaminasi. Il danno epatico si caratterizza istologicamente per colestasi epatocellulare con fibrosi portale e lobulare e trasformazione gigantomitotica. All'immunohistochimica BSEP e MDR3 sono presenti ma in maniera anomala, suggerendo che siano normalmente sintetizzate ma trasportate in maniera inappropriata a livello della membrana canalicolare, con anche depositi anomali di MYO5B e RAB11A. Alcuni pazienti possono presentare sia il quadro epatico che intestinale. Comparando il profilo genetico dei pazienti con difetto di MYO5B affetti da MVID rispetto ai pazienti con colestasi isolata, sembra che i pazienti con MVID presentino più frequentemente mutazioni bialleliche severe. Mutazioni più lievi di MYO5B sembrano invece causare colestasi in assenza di danno intestinale<sup>4,21,22,23</sup>. Girard et al<sup>21</sup> concludono che la colestasi è il risultato di una ridotta funzione del pathway MYO5B/RAB11A con alterata espressione di BSEP sulla membrana canalicolare, aumentato assorbimento intestinale degli acidi biliari e uptake epatico. Qiu et al<sup>22</sup> hanno identificato tramite pannello genetico e sequenziamento dell'esoma, 15 mutazioni in MYO5B (3 note e 12 nuove) in 10 pazienti con colestasi a GGT normali in assenza di coinvolgimento intestinale. Analogamente, Gonzales et al<sup>23</sup> hanno identificato mutazioni in MYO5B in 5 pazienti con colestasi isolata a GGT normali. Nello studio, gli autori concludono che la presentazione clinica della colestasi da difetto di MYO5B ricorda le PFIC a GGT normali (tipo 1 e 2) sebbene questi pazienti presentino un quadro clinico meno severo, soprattutto della PFIC2, ed un esordio più tardivo.

- ***Sindrome ARC***: descritta per la prima volta nel 1973, la sindrome ARC è un disordine ad elevata mortalità caratterizzato dalla presenza di artrogriposi, alterazioni renali e colestasi. Solitamente i pazienti presentano mutazioni con perdita di funzione nel gene VPS33B localizzato sul cromosoma 15q26.1 che codifica per una proteina che esercita un ruolo chiave nel traffico intracellulare delle proteine ed è espressa in diversi tessuti dell'organismo compresi reni, fegato, polmoni, muscoli, cute, cuore e cervello, elemento che spiegherebbe la presenza di manifestazioni extraepatiche presenti nella sindrome. Vi è un'ampia variabilità di presentazione clinica: le anomalie muscolo-scheletriche variano dall'artrogriposi, eventualmente associata a dislocazione dell'anca, fratture patologiche e cifosi, il coinvolgimento renale varia dall'acidosi tubulare renale alla sindrome di Fanconi, al diabete insipido nefrogenico o ancora alla nefrite interstiziale e nefrocalcinosi. Il coinvolgimento epatico si manifesta con colestasi con bassi livelli di GGT, aumento degli acidi biliari e, a livello istologico, paucità dei dotti biliari intraepatici, deposito di lipofuscina, epatite gigantocellulare, fibrosi e cirrosi. Caratteristiche aggiuntive comprendono anomalie piastriniche, scarsa crescita, atrofia muscolare neurogena, malformazioni cerebrali, sordità neurosensoriale e ittiosi. La diarrea è comune e verosimilmente secondaria al malassorbimento dei lipidi. Dismorfismi quali cute lassa, orecchie ad impianto basso, criptorchidismo possono essere presenti. Sfortunatamente non vi è una cura definitiva e la prognosi è solitamente infausta con elevata mortalità infantile. La modalità di trasmissione autosomica recessiva è suggerita dal riscontro di consanguineità e della ricorrenza nei fratelli. Mutazioni in omozigosi o eterozigosi composta sono state riscontrate a carico del gene VPS33B in circa il 75% degli individui e in una parte minore di casi a carico del gene VIPAR. VPS33B codifica per una proteina cruciale in diversi steps del traffico vescicolare. VIPAR è una proteina che interagisce con VPS33B ed è coinvolta nella polarità cellulare, suggerendo che VPS33B e VIPAR siano parte di uno stesso

complesso che interferisce con RAB11A coinvolto nello smistamento e stabilizzazione delle proteine della membrana apicale comportando, a livello epatico, un'alterata localizzazione di BSEP<sup>24-27</sup>.

- **Difetto di claudina 1 (sindrome NISCH)**: la sindrome NISCH (ittiosi neonatale, colangite sclerosante) caratterizzata da ittiosi neonatale e colangite sclerosante è un disordine raro a trasmissione autosomica recessiva causata da mutazioni nel gene CLDN1 che codifica per la claudina 1, una proteina di membrana delle tight junctions. Si caratterizza per ittiosi, vacuoli nei leucociti, alopecia e colangite sclerosante inizialmente descritta in due famiglie marocchine omozigoti per una mutazione frameshift nel gene CLDN1<sup>28</sup>. Le tight junctions (TJ) sono un complesso di proteine di giunzione che contribuisce alla formazione della barriera epiteliale polarizzata controllando in maniera selettiva la permeabilità cellulare attraverso la via paracellulare. La struttura delle TJ è complessa coinvolgendo proteine integrali di membrana quali occludine, claudine e molecole di adesione. In diversi disordini, come precedentemente visto nella colestasi da difetto di TJP2, mutazioni a carico dei geni che codificano per proteine delle TJ sono state identificate. Inoltre, difetti a carico delle claudine sono stati riscontrati in caso di coinvolgimento di cute, rene, orecchio, occhio, rivelando il ruolo cruciale delle TJ e delle claudine negli epiteli.

Nel fegato, le TJ separano la bile dal plasma ed esercitano un ruolo chiave nello stabilire il polo canalicolare biliare, mantenendo la localizzazione canalicolare di specifiche proteine, sigillando i canalicoli biliari e proteggendo le cellule epatiche dall'azione tossica degli acidi biliari. Nei disordini colestatici, alterazioni delle TJ sono state riportate sia negli epatociti che nei colangiociti, dimostrando come la permeabilità paracellulare giochi un ruolo chiave nei meccanismi della colestasi. Nei pazienti con sindrome NISCH, l'aumento della permeabilità paracellulare causata da difetti della claudina1 conduce a danno a carico dei dotti biliari e degli epatociti.

L'espressione della claudina1 nei pazienti con sindrome NISCH è stata studiata da Grosse et al<sup>29</sup> confermando l'assenza di claudina1 negli epatociti e colangiociti ed osservando una normale localizzazione canalicolare di BSEP e MDR3. I pazienti presentano caratteristiche istologiche e radiologiche tipiche della colangite sclerosante, con colestasi di tipo ostruttivo. Gli autori ipotizzano che in questi pazienti il difetto di claudina1 conduca, a livello dei colangiociti, a rigurgito degli acidi biliari nell'ambiente mesenchimale periduttulare, con infiammazione pericolangiocellulare, fibrosi, ed eventualmente colangite sclerosante. A livello dei epatociti il difetto potrebbe avere, almeno inizialmente, conseguenze meno dannose poiché la bile può drenare nello spazio vascolare sinusoidale che circonda gli epatociti stessi. Vi sarebbe pertanto un ruolo chiave nell'alterata permeabilità paracellulare indotta da difetti delle proteine delle TJ nella fisiopatologia dei disordini colestatici, in particolare nella colangite sclerosante neonatale.

- **Difetto di DCDC2**: la colangite sclerosante neonatale (CSN) è una colangiopatia severa del neonato con coinvolgimento dei dotti biliari che conduce a cirrosi biliare e trapianto. Una forma specifica, la sindrome NISCH associata a difetti della claudina1, è stata precedentemente presa in considerazione. La CSN è pertanto considerata come un disordine delle TJ con alterazione degli epitelii. La ricorrenza fra fratelli e la consanguineità nei genitori, ha fatto ipotizzare una trasmissione autosomica recessiva. Per identificare nuovi geni coinvolti nella CSN, Girard et al<sup>30</sup> hanno eseguito il sequenziamento dell'esoma in due famiglie consanguinee (per un totale di 9 pazienti) con colangite sclerosante neonatale identificando, in 4 pazienti, mutazioni bialleliche missenso o in-frame a carico del gene DCDC2 (doublecortin domain containing protein 2). Il gene DCDC2 localizzato sul cromosoma 6 codifica per una proteina del cilio con due doublecortin domains nota per legare la tubulina e favorire la polimerizzazione dei microtubuli e mutata in pazienti con ciliopatia epato-renale.

La presentazione clinica era abbastanza simile nei 4 pazienti con colestasi neonatale e danno epatico precoce. Lo studio colangiografico eseguito all'inizio della malattia ha mostrato caratteristiche tipiche della CSN: pervietà dei dotti biliari con vie biliari intraepatiche irregolari e sottili senza alterazione delle vie biliari extraepatiche in una famiglia e irregolarità anche delle vie biliari extrapatiche nella seconda. L'istologia epatica era tipica e tutti i pazienti hanno sviluppato cirrosi precoce con ipertensione portale. Per quanto concerne il coinvolgimento renale, un paziente della prima famiglia aveva malformazioni renali e, nella seconda, un paziente aveva all'età di 4 mesi ipercalcemia renale e ipofosfatemia. Allo studio immunohistochimico, confrontato con un gruppo di controllo, è stata riscontrata un'alterazione dell'espressione e localizzazione di DCDC2.

Inoltre in tutti i pazienti è stata riscontrata una riduzione del numero di cilia a livello dei dotti biliari rispetto ai controlli, indicando la presenza di colangiociti meno ciliati. Grammatikopoulos et al<sup>31</sup> hanno studiato 29 pazienti con CSN con i seguenti risultati: consanguineità nei genitori riscontrata in 16 pazienti da 12 famiglie, un esordio nel primo anno di vita (età mediana 6 settimane) nella maggior parte dei pazienti, presentazione clinica con ittero, acolia fecale, coagulopatia, sanguinamento gastrointestinale, ascite, splenomegalia e, dal punto di vista biochimico, aumento della bilirubina, GGT, transaminasi e albumina. Lo studio con colangiopancreatografia endoscopica retrograda eseguita in 15 pazienti e con colangiogrammi in 1, ha evidenziato irregolarità dal dotto epatico comune ai piccoli dotti intraepatici. Coinvolgimento extraepatico è stato riscontrato in 5 pazienti, 3 dei quali con coinvolgimento renale. Sedici pazienti sono stati sottoposti a trapianto epatico, 4 sono deceduti. Tramite sequenziamento dell'esoma sono state identificate mutazioni in DCDC2 in 7 pazienti. In questi, lo studio immunohistochimico ha mostrato mancata espressione di DCDC2 (6 pazienti) ed assenza delle cilia primarie nei colangiociti alla microscopia elettronica (5

pazienti). Cinque pazienti sono stati sottoposti a trapianto, per colestasi e prurito severo, uno è deceduto due anni dopo trapianto, ed uno è deceduto mentre era in lista. L'ecografia renale eseguita in 6 pazienti ha mostrato la presenza di una cisti renale in un paziente. La funzionalità renale era normale in tutti. Mentre era in lista, un paziente ha sviluppato insufficienza renale. La CSN è una forma severa e rara di colangiopatia, e come dimostrato in questo studio, l'assenza di coinvolgimento renale suggerisce un tipo distinto di ciliopatia. Di particolare interesse nei pazienti con mutazioni in DCDC2 è il coinvolgimento biliare con infiammazione, irregolarità delle vie biliari e colestasi.

<b>DIFETTO</b>	<b>GENE</b>	<b>CLINICA</b>	<b>GGT</b>	<b>OUTCOME</b>
FIC1	ATP8B1	Colestasi intraepatica, manifestazioni extra-epatiche	Normali	Progressione di malattia, steatosi e diarrea dopo trapianto epatico
BSEP	ABCB11	Colestasi intraepatica, elevato rischio di epatocarcinoma	Normali	Progressione rapida di malattia, possibile ricorrenza dopo trapianto
MDR3	ABCB4	Colangiopatia	Elevate	Progressione variabile, possibile esordio in adolescenza-età adulta
TJP2	TJP2	Colestasi intraepatica, manifestazioni extra-epatiche	Normali	Progressione rapida, necessità di trapianto epatico
FXR	NR1H4	Colestasi intraepatica, coagulopatia, elevati livelli di alfafetoproteina	Normali	Progressione rapida
MYO5B	MYO5B	Colestasi intraepatica, MVID	Normali	Progressione moderata
ARC	VPS33B/ VIPAR	Colestasi intraepatica, artrogriposi, anomalie renali	Normali	Elevata mortalità
CLAUDINA1 (NISCH)	CLDN1	Colangite sclerosante neonatale, ittiosi	Elevate	Progressiva
DCDC2	DCDC2	Colangite sclerosante neonatale	Elevate	Progressiva

Tabella 2. Colestasi genetiche: eziologia, presentazione clinica, livelli di GGT e outcome.

## 1.2. Presentazione Clinica.

Le colestasi si caratterizza clinicamente per la presenza di ittero protratto solitamente associato ad epatomegalia. L'ipo-acolia fecale è particolarmente indicativa di atresia delle vie biliari. La splenomegalia può essere presente in caso di cirrosi e ipertensione portale o nelle patologie da accumulo. Possono esserci manifestazioni secondarie alla carenza di vitamine liposolubili (ADEK), quali ad esempio il rachitismo da carenza di vitamina D. La coagulopatia può portare a sanguinamento e, se non corretta dalla somministrazione di vitamina K, essere indicativa di danno epatico severo con insufficienza epatica. Il prurito, secondario all'aumento degli acidi biliari, caratterizza solitamente tutte le forme di colestasi, eccetto i difetti di sintesi degli acidi biliari, e può essere così invalidante da rappresentare un'indicazione al trapianto epatico.

Le anomalie neurologiche possono essere presenti in caso di sindromi con coinvolgimento extraepatico o in caso di encefalopatia epatica con iperammoniemia. Irritabilità, ipoalimentazione, vomito e letargia possono esserci in caso di infezione o disordini metabolici. Dismorfismi faciali si riscontrano nella sindrome di Alagille o in altre malattie congenite, così come anomalie cardiache, polisplenia, malrotazione intestinale e situs inversus.

Pertanto, l'esame clinico di un bambino con colestasi non si deve concentrare solo sull'addome ma anche sulla presenza di alterazioni dismorfiche, scarsa crescita, coinvolgimento cutaneo, renale, neurologico o respiratorio. La valutazione oculistica permette di escludere anomalie quali embriotoxon posteriore tipico della sindrome di Alagille, corioretinite in caso di infezioni congenite, cataratta in caso di galattosemia.

L'anamnesi con valutazione della consanguineità nei genitori, storia alla nascita di infezioni materne, colestasi della gravidanza e l'epoca gestazionale sono elementi essenziali.

In merito alla storia anamnestica, è fondamentale stabilire il momento d'esordio dell'ittero e la presenza di feci ipo-acoliche ed urine ipercromiche, dato maggiormente indicativo di colestasi. A tal proposito sono state messe a punto delle scale colorimetriche (stool color card) per la valutazione del colore delle feci. La diretta osservazione delle urine e delle feci rappresenta infatti la prima valutazione clinica di fronte ad un paziente con ittero<sup>6,7,8,32</sup>.

### **1.3. Diagnosi.**

Dopo la valutazione clinica, gli esami di laboratorio rappresentano il secondo step diagnostico di fronte ad un paziente con colestasi. Il primo esame da eseguire in caso di ittero che si protrae oltre le due settimane di vita è la determinazione della bilirubina totale e coniugata che, qualora aumentata, è indicativa di colestasi. Altri esami di laboratorio comprendono: AST, ALT, GGT, ALP, albumina, coagulazione, emocromo, glicemia, funzionalità tiroidea, dosaggio alfa1antitripsina, cortisolo, test del sudore, dosaggio degli acidi biliari plasmatici ed urinari, screening metabolico con determinazione degli amminoacidi sierici e degli acidi organici urinari.

I livelli delle GGT rappresentano un elemento utile per la diagnosi differenziale delle varie forme colestasi, permettendo di distinguere le forme a GGT normali da quelle a GGT elevate. Analogamente, il dosaggio degli acidi biliari permette di indirizzare verso un difetto di sintesi degli acidi biliari che si manifesta con colestasi con GGT normali ma livelli degli acidi biliari plasmatici bassi, dalle altre forme di colestasi a GGT normali in cui gli acidi biliari sono aumentati.

L'ecografia addome è essenziale come parte della valutazione iniziale per esaminare struttura, dimensioni e composizione del fegato, l'eventuale presenza di lesioni a carico delle vie biliari extraepatiche (calcoli, cisti del coledoco), i segni dell'atresia delle vie

biliari quali il triangular cord o l'assenza della colecisti, eventuali segni di cirrosi o lesioni vascolari.

La colangio-RM è di aiuto per la diagnosi di colangite sclerosante nei pazienti con GGT elevate. La colangiopancreatografia endoscopica retrograda permette la visualizzazione del sistema biliare con valore diagnostico in particolare per l'atresia delle vie biliari.

La biopsia epatica rimane il gold standard nell'iter diagnostico di un paziente con colestasi. Le caratteristiche istologiche tipiche in caso di ostruzione extraepatica sono la proliferazione dei dotti biliari, la stasi biliare, la fibrosi e l'infiammazione portale. Nelle colestasi intraepatiche l'istologia mostra colestasi canalicolare, trasformazione gigantomitotica, fibrosi portale e lobulare, metaplasia biliare e, in caso di colangiopatia, cirrosi biliare, fibrosi periduttulare.

Come precedentemente visto, di particolare importanza è lo studio con immunohistochimica basato sulla colorazione con anticorpi anti BSEP e MDR3. La colorazione assente o ridotta è diagnostica in particolare per le PFIC tipo 2 e 3. Una normale colorazione non ne preclude tuttavia la diagnosi dal momento che alcune mutazioni sono associate solo a difetti funzionali della proteina<sup>6,7,8,32</sup>.

#### **1.4. Nuovi approcci genetici nella diagnosi di colestasi in età pediatrica.**

L'analisi genetica è fondamentale nei pazienti con colestasi, permettendo di ottenere la diagnosi definitiva nella maggior parte dei casi.

I test genetici si sono largamente evoluti nelle ultime due decadi, grazie all'impiego di tecniche di nuova generazione. Fra queste, il targeted gene sequencing (TGS) e il whole exome sequencing (WES), come precedentemente visto, si sono dimostrati particolarmente utili nella diagnosi di nuovi geni associati a colestasi e, in maniera più ampia, a disordini monogenici. La tecnica Sanger, comunemente impiegata, si è dimostrata particolarmente efficace, tuttavia non è utilizzabile come screening di larga

scala essendo in grado di effettuare il sequenziamento di un singolo gene per volta. Dall'altro lato, la tecnica di Next Generation Sequencing (NGS) ha reso possibile il sequenziamento di molti geni in più individui contemporaneamente generando grandi quantità di dati in maniera rapida e con costi contenuti. L'utilizzo di pannelli "orientati" (targeted) ha il vantaggio di studiare un numero di geni che si ipotizza siano coinvolti nella malattia. Il sequenziamento dell'intero genoma (regioni introniche e codificanti), avviene mediante il whole genome sequencing, mentre il whole exome sequencing restringe il sequenziamento alla regione codificante dei geni. Il sequenziamento dell'esoma è una tecnica ampiamente usata che ha permesso l'identificazione di nuovi geni. Ciò nonostante, una percentuale di pazienti affetti rimane senza diagnosi genetica, probabilmente a causa di mutazioni non identificabili dai test disponibili o poiché a carico di geni non noti o ancora non associati alla malattia<sup>33</sup>.

Nell'ambito dell'epatologia pediatrica, l'impiego più importante della NGS è nel campo delle colestasi in cui ha permesso di identificare e caratterizzare nuovi geni coinvolti nelle colestasi sia nella forma a GGT normali (TJP2, FXR, MYO5B), che elevate (CLDN1, DCDC2).

Recentemente diversi autori<sup>34-38</sup> hanno pubblicato la loro esperienza basata sull'utilizzo di NGS nei pazienti affetti da colestasi permettendo, come nello studio di Nicastro et al<sup>38</sup>, di creare una flow-chart di orientamento diagnostico per la valutazione di questi pazienti.

(Figura 1)

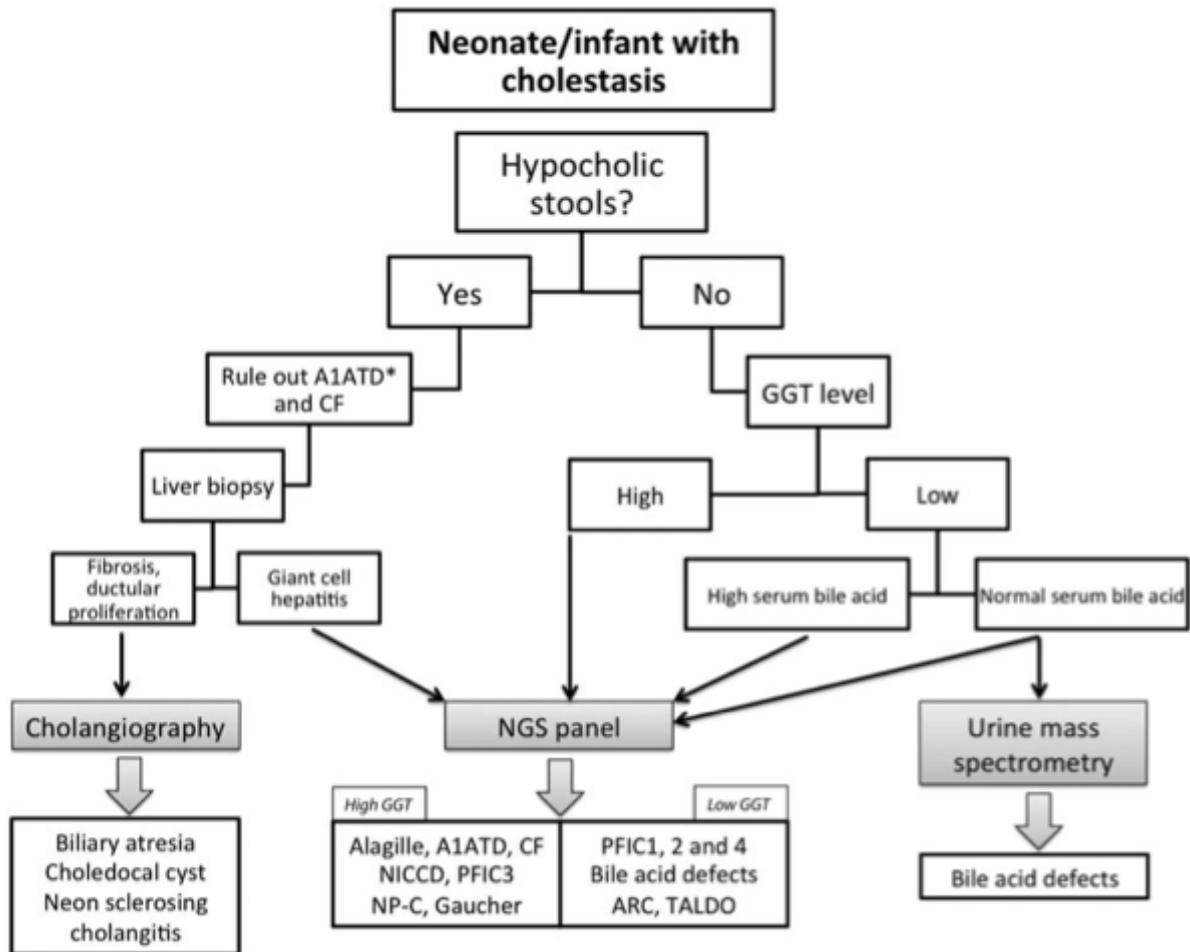


Figura 1. Flow-chart per l'approccio alla colestasi in età pediatrica (tratto da referenza 38)

## 1.5. Terapia.

La terapia medica rappresenta la prima linea di trattamento nei pazienti con colestasi. Gli obiettivi sono trattare il prurito, migliorare lo stato nutrizionale, correggere il difetto di vitamine liposolubili e le complicanze del danno epatico avanzato come l'ascite e il sanguinamento da varici esofagee.

La terapia medica di prima linea è rappresentata dall'acido ursodesossicolico (UDCA) alla dose di 10-30 mg/kg/die (600 mg/m<sup>2</sup>/die) che in alcune forme permette di ottenere una buona risposta sul piano clinico e laboratoristico. Questo riguarda soprattutto la PFIC tipo 3 con mutazioni missenso e quindi i pazienti che presentano una forma più lieve di colestasi<sup>39-40</sup>.

Il prurito può essere trattato con la rifampicina, induttore enzimatico, le resine chelanti gli acidi biliari quali la colestiramina, gli antistaminici, gli antagonisti degli oppioidi come il naltrexone o ancora la sertralina.

Recentemente nuove molecole sono state impiegate soprattutto nei pazienti con PFIC di tipo 2. Come precedentemente visto, alcuni pazienti hanno mutazioni che non interferiscono con la funzione di BSEP ma alterano la corretta localizzazione della proteina. La non corretta localizzazione delle proteine apicali rappresenta un potenziale bersaglio per alcuni farmaci che agiscono mediante funzione di chaperon. Pazienti con ridotta sintesi della proteina o con ridotta espressione canalicolare di BSEP possono così trarre vantaggio dall'impiego del 4-fenilbutirrato che proprio grazie alla sua azione di molecola chaperon consente il ripristino dell'espressione di BSEP<sup>41-42</sup>. In tal senso, anche gli steroidi rappresentano una valida opzione terapeutica consentendo di aumentare l'espressione di BSEP. Engelmann et al<sup>43</sup> nel loro studio riportano come gli steroidi migliorino il prurito e riducano i livelli degli acidi biliari e della bilirubina nei pazienti con PFIC 2 con mutazioni missenso.

Infine, nuove molecole in grado di bloccare il circolo enteroepatico mediante inibizione di ASBT si stanno sperimentando con l'obiettivo di ridurre l'accumulo epatico degli acidi biliari; analogamente, molecole che agiscono come agonisti del FXR, quali l'acido obeticolico, in grado di inibire la sintesi degli acidi biliari, sono in fase di studio.

Per quanto concerne l'approccio chirurgico, la diversione biliare è una tecnica che si prefigge l'obiettivo di ridurre la circolazione enteroepatica limitando l'accumulo degli acidi biliari. Viene solitamente impiegata nei pazienti con PFIC tipo 1 e 2 che non rispondono alla terapia medica e non sono ancora candidati al trapianto epatico.

Il trapianto epatico rappresenta infine l'ultima scelta terapeutica nei pazienti con insufficienza epatica, epatocarcinoma o nei casi di prurito resistente alla terapia medica e alla diversione biliare. Va tuttavia considerato che nella PFIC tipo 1 le manifestazioni extraepatiche non migliorano ma al contrario, possono peggiorare dopo il trapianto. La diarrea può infatti essere aggravata dalla ripresa del circolo biliare e spesso si associa a steatosi severa e/o steatoepatite che può portare a cirrosi e necessità di ritrapianto<sup>44,45</sup>. Inoltre, nel caso della PFIC2 è stata riportata la ricorrenza del difetto secondaria alla presenza di anticorpi circolanti anti BSEP (alloimmunizzazione del ricevente contro la proteina BSEP del donatore)<sup>46</sup>.

## **2. OBIETTIVI DELLO STUDIO**

Lo studio si propone i seguenti obiettivi:

- Descrivere le caratteristiche cliniche, biochimiche ed istologiche, la risposta alla terapia ed il follow-up di una popolazione selezionata di pazienti affetti da colestasi genetiche;
- Identificare mediante tecniche di NGS i pazienti affetti da colestasi genetiche secondarie a mutazioni nei geni ATP8B1, ABCB11 e ABCB4 o in geni recentemente/scarsamente/non ancora indagati quali causa di colestasi;
- Scoprire nuove associazioni tra il fenotipo delle colestasi genetiche e geni recentemente/scarsamente/non ancora indagati nonché geni attualmente ritenuti responsabili di altri fenotipi clinici.

### **3. MATERIALI E METODI**

È stato condotto uno studio di tipo interventistico, multicentrico, retrospettivo e prospettico ad arruolamento consecutivo. Per essere arruolati i pazienti dovevano soddisfare i seguenti criteri di inclusione: età all'esordio < 18 anni; almeno uno tra i seguenti segni: iperbilirubinemia diretta > 1,5 mg/dl, GGT > 200 U/L, acidi biliari plasmatici > 50 mmol/l, evidenza di malattia biliare alla biopsia epatica; assenza di mutazioni a carico dei geni *ATP8B1*, *ABCB11*, *ABCB4* per i pazienti arruolati retrospettivamente; assenza di anomalie maggiori a carico delle vie biliari extraepatiche o della giunzione biliopancreatica (atresia delle vie biliari, cisti del coledoco); assenza di altre cause di epatopatia.

Il protocollo di studio è stato approvato dal comitato etico del centro coordinatore e dei centri aderenti ed è stato ottenuto il consenso informato per la partecipazione allo studio da parte di tutti i partecipanti. I dati relativi ai pazienti arruolati sono stati inseriti dai centri aderenti in una scheda di raccolta dati accessibile tramite applicazione web. Sono stati raccolti, in provette in EDTA, i campioni di sangue periferico dei probandi e, qualora disponibili, dei genitori.

#### *Estrazione DNA Genomico*

Il DNA genomico dei probandi e dei rispettivi genitori è stato estratto dai campioni di sangue periferico mediante lo strumento automatico QIA Symphony SP/AS (Qiagen) e il Kit QIA Symphony DSP (Qiagen).

Nel caso in cui si partiva da una ridotta quantità di sangue periferico per ottenere la massima resa l'estrazione è stata eseguita con la metodica del "salting out". Successivamente utilizzando lo strumento NanoDrop della ThermoFisher è stata misurata la concentrazione e la qualità del DNA estratto.

Infine, ogni campione è stato portato alla concentrazione di 50 ng/μl in un volume finale di 30 μl. Ad ogni campione estratto è stato assegnato un codice univoco costituito dalla sigla COL seguito da numeri progressivi.

### Sequenziamento dell'Esoma

Il DNA dei probandi è stato sottoposto all'analisi mediante Next Generation Sequencing (NGS). La fase di pre-processazione e il sequenziamento dell'esoma è stato eseguito con la tecnologia Illumina presso l'azienda Macrogen Inc (Seoul, Korea).

Il kit Human All Exon V6 Library è stato utilizzato per la selezione delle regioni da amplificare mentre il kit NovaSeq 150bp PE sequencing è stato utilizzato per il sequenziamento con un coverage di 50X. Dalla Macrogen sono stati inviati in formato FASTQ i risultati per ciascun esoma eseguito.

Questi file sono stati quindi valutati per qualità mediante il tool FASTQc e successivamente analizzati mediante l'utilizzo della piattaforma GATK4.1 per ottenere quindi infine il file in formato VCF.

Il software GATK e la pipeline di analisi sviluppata al BROAD Institute di Cambridge sono disponibili al sito <https://software.broadinstitute.org/gatk/best-practices/>.

Tutte le varianti sono state annotate con la versione più recente di ANNOVAR.

### Interpretazione delle Varianti

I VCF annotati sono stati caricati su un database relazionale PostgreSQL mediante l'interfaccia pgAdmin 4, che ha permesso di filtrare tutte le varianti ripetute perché errori sistematici dello strumento. Inizialmente si parte da un VCF contenente circa dalle 30000 alle 40000 varianti ottenendo dopo il filtro un numero ridotto di circa 3000/40000 varianti.

Oltre alle varianti ripetute vengono escluse, nell'ambito della ricerca di varianti monogeniche, tutte quelle varianti che hanno una frequenza, nella popolazione, maggiore dell'1%.

Sono state aggiunte alle varianti ulteriori informazioni riguardanti la funzione dei geni in cui si trova la variante e la loro associazione se presente con le malattie, mediante l'utilizzo di due diversi database, OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) e DDG2P (Development Disorders Genotype-to-Phenotype).

Per l'interpretazione delle varianti sono stati inoltre consultati i seguenti database: 1000 Genomes Browser, Exome Aggregation Consortium (ExAC) Browser, Genome Aggregation Database (gnomAD), ClinVar, The Human Gene Mutation Database (HGMD) che hanno permesso di identificare mutazioni causative in geni noti e riportati in letteratura.

La prioritizzazione delle varianti nelle regioni codificanti è stata effettuata mediante filtri funzionali che considerano la conservazione dei residui coinvolti (PhyloP e GERP score) e la predizione dell'impatto della variante sulla funzione proteica (CADD score, PolyPhen-2 e SIFT). Trattandosi di una patologia autosomica recessiva abbiamo ricercato le varianti in omozigosi e in eterozigosi composta.

Il sequenziamento Sanger è stato effettuato per confermare le varianti candidate e potenzialmente patogenetiche nel probando e successivamente nei genitori per verificarne la segregazione familiare.

#### 4. RISULTATI

Sono stati arruolati 25 pazienti, con una predominanza del sesso maschile (19/25, 76% Figura 2) ed un'età mediana all'esordio di 0.8 anni (range 0- 15.1).

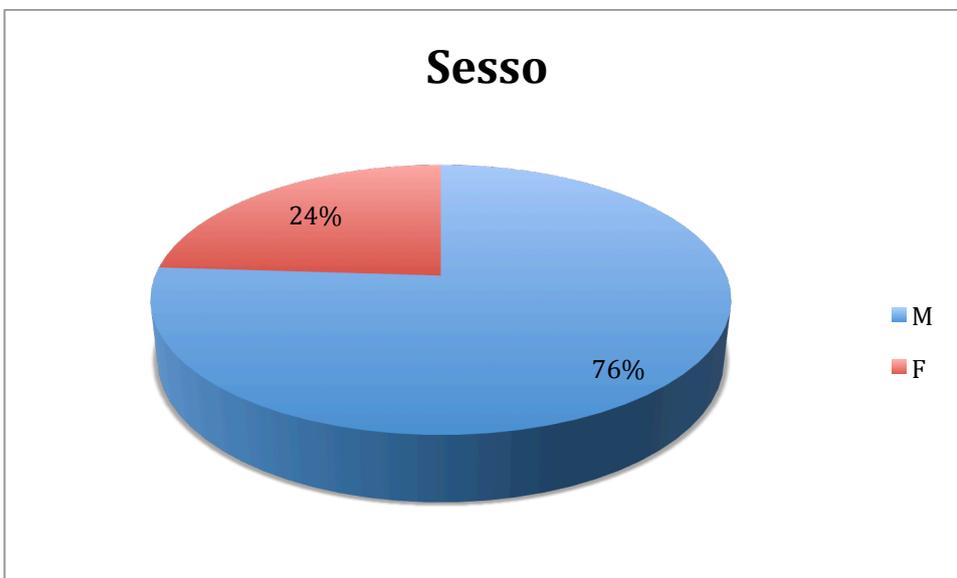


Figura 2. Percentuale dei due sessi nella popolazione oggetto di studio.

Il 68% dei pazienti (17/25) era di origine italiana, con una provenienza, nei restanti casi dai Paesi Balcani (3/25, 12%), Marocco (3/25, 12%), Tunisia (1/25, 4%) e Filippine (1/25, 4%). (Figura 3)

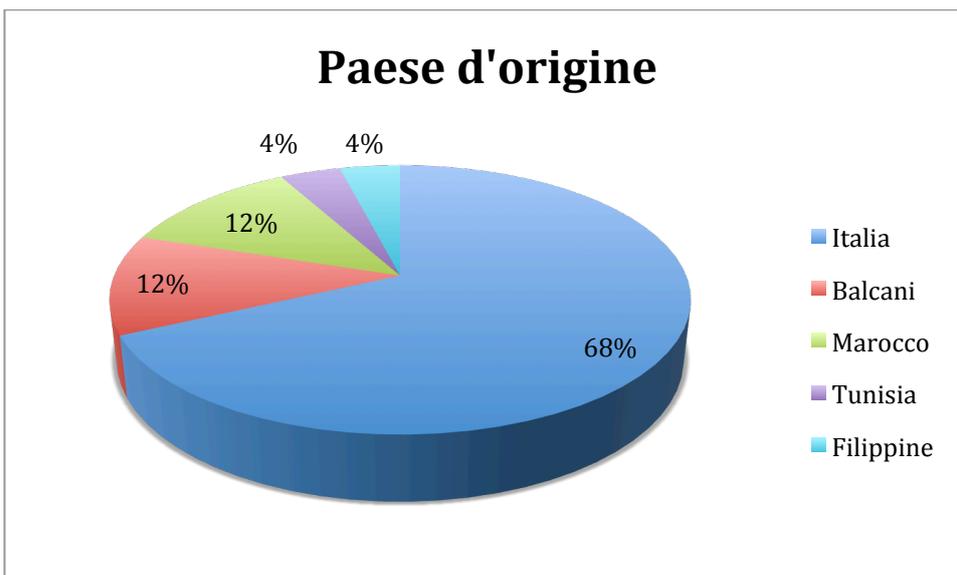


Figura 3. Provenienza della popolazione oggetto di studio.

Un'anamnesi positiva per consanguineità era presente in un solo caso (1/25, 4%) mentre, per quanto concerne l'anamnesi familiare, è stata riscontrata colestasi gravidica in tre madri (12%) e colelitiasi in due genitori (8%). La durata media del follow-up è stata di 3.7 anni (range 0.1-25.6). Le manifestazioni cliniche all'esordio comprendevano epatomegalia (68%), ittero (57%), prurito (43%), scarsa crescita (33%), feci ipocoliche (33%) e splenomegalia (28%). (Figura 4)

In un paziente la colestasi è stata investigata nell'ambito dello screening familiare (sorella maggiore affetta). Oltre alla colestasi sono state riscontrate le seguenti manifestazioni extraepatiche: diarrea in tre pazienti, bassa statura in due pazienti (in uno associata a malattia infiammatoria intestinale e sordità), coinvolgimento renale in due pazienti (rene a ferro di cavallo in un paziente affetto inoltre da malattia infiammatoria cronica intestinale e insufficienza renale con necessità di trapianto nel secondo), ipotonia in un paziente e sovrappeso in due pazienti (uno con storia di pancreatite).

Infine, in un paziente la presentazione clinica è avvenuta con ematemesi secondaria a varici esofagee.

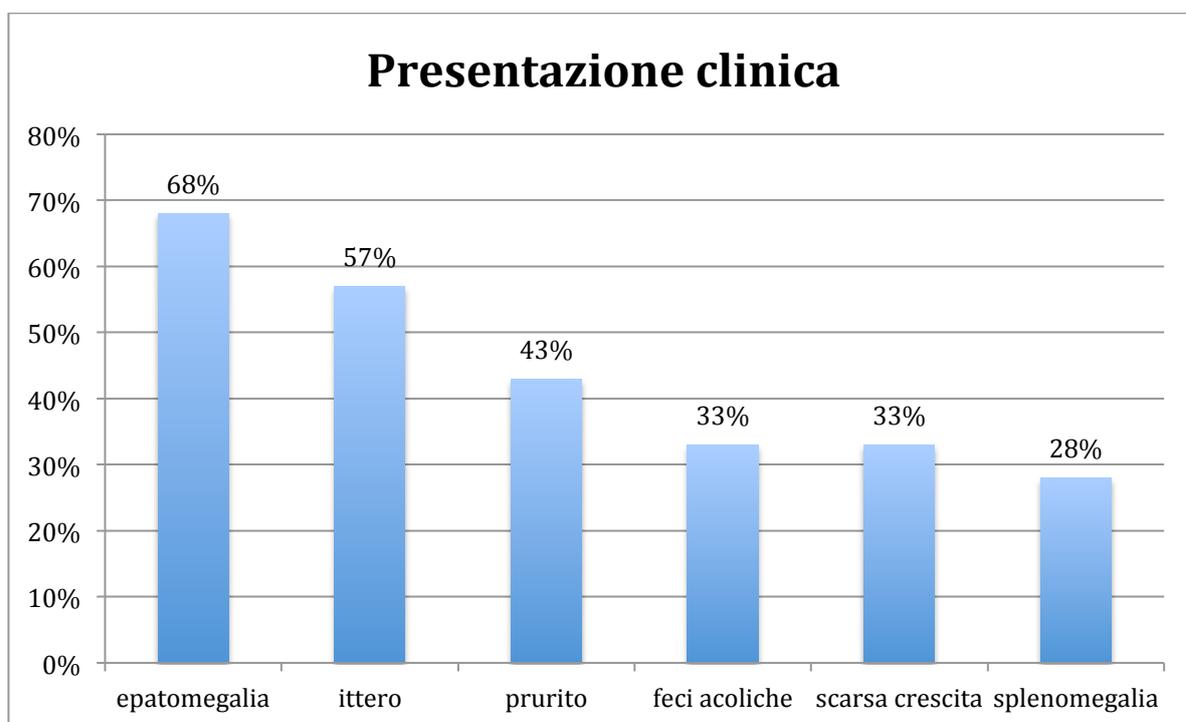


Figura 4. Caratteristiche cliniche all'esordio.

Per quanto concerne i dati di laboratorio, all'esordio due pazienti presentavano anemia associata, in un paziente, a linfopenia e piastrinopenia secondarie a ipertensione portale.

Il valore mediano delle ALT era 184 U/L (range 54 - 650) ed il valore mediano della bilirubina totale e diretta rispettivamente di 5.5 mg/dl e 3.2 mg/dl. Gli acidi biliari erano aumentati nell'81% dei pazienti ed una lieve predominanza delle forme a GGT elevate è stata osservata (64% Figura 5). Coagulopatia definita per valori di INR>1.2 era presente in 2 pazienti (dato disponibile per 12/25 pazienti).

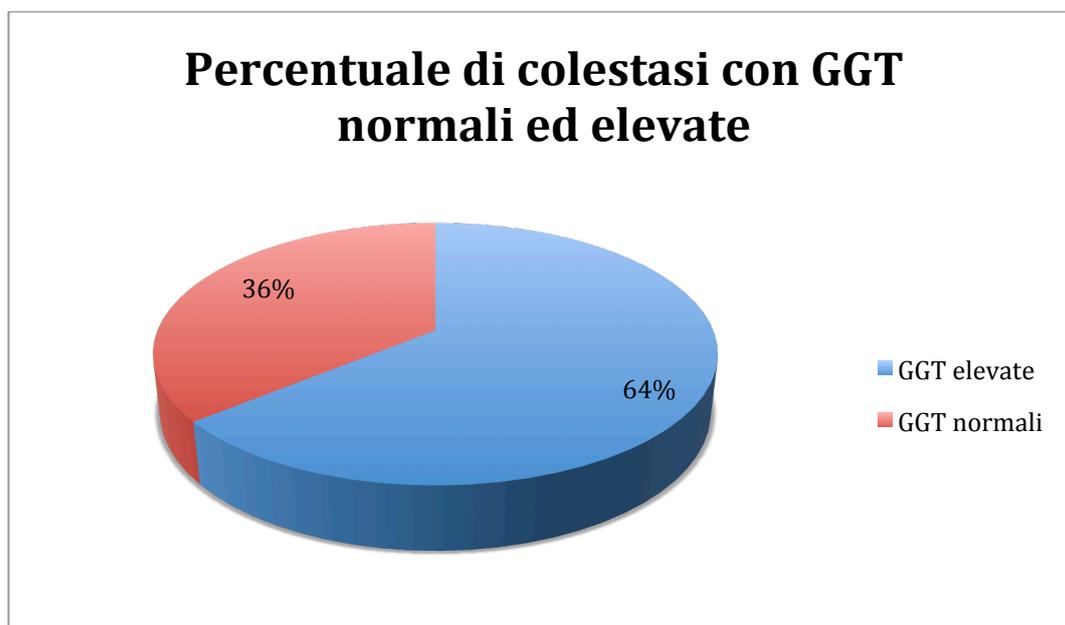


Figura 5. Percentuale di pazienti con colestasi a GGT normali e elevate.

All'esordio, il 27% dei pazienti aveva un riscontro ecografico di epatomegalia ed il 9% di splenomegalia; 5 pazienti presentavano ipercogenicità epatica, 2 anomalie delle vie biliari, 1 calcolosi biliare e 1 segni di cirrosi. (Figura 6)

La colangio-RM, eseguita in 11/25 pazienti, ha mostrato anomalie delle vie biliari in 2 pazienti, in uno già riscontrate ecograficamente.

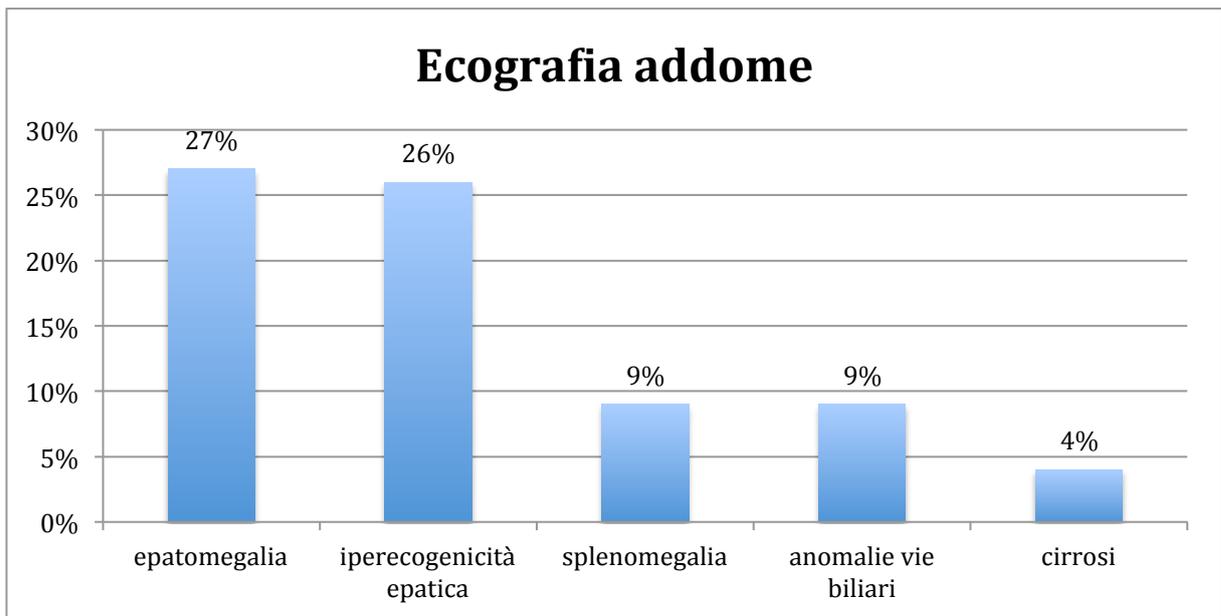


Figura 6. Reperti ecografici all'esordio.

La biopsia epatica è stata eseguita in 16/25 pazienti (60%) con il riscontro di un'istologia compatibile con colestasi intraepatica nelle forme a GGT normali e con colangiopatia per le forme a GGT elevate. Il 72% dei pazienti (18/25) aveva eseguito analisi genetiche mediante studio di singoli geni o di pannelli di geni coinvolti nei disordini colestatici.

La terapia medica all'esordio consisteva nell'utilizzo di UDCA, supplementazione con vitamine liposolubili e trattamento del prurito con rifampicina come terapia di prima linea seguita da colestiramina, antistaminici e naloxone.

Quattro pazienti (16%) hanno ricevuto trapianto epatico e, fra questi, un paziente ha ricevuto un secondo trapianto combinato con trapianto renale per insufficienza renale cronica. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad analisi genetica mediante sequenziamento dell'esoma (WES) e conferma Sanger nei probandi e, qualora disponibili, nei genitori. Lo studio delle zone di omozigosità, al fine di stabilire eventuali consanguineità, e indirizzare la ricerca di eventuali varianti laddove non sono state ancora riscontrate è in fase di realizzazione.

I risultati completi delle analisi genetiche, attualmente disponibili per 8 pazienti, hanno mostrato una prevalenza di mutazioni a carico del gene della miosina 5B (MYO5B), presenti in 6 pazienti; mutazioni a carico del gene ABCB4 (PFIC tipo 3) sono state riscontrate in 2 pazienti, mentre per i restanti le analisi genetiche sono ancora in corso.

### **Pazienti affetti da mutazioni a carico del gene MYO5B**

#### ***Paziente 1***

Paziente di origine bosniaca, primogenito, nato a termine da parto eutocico in gravidanza normodecorsa, peso alla nascita 2900 grammi. Genitori non consanguinei, anamnesi familiare negativa. All'età di 10 mesi comparsa di ittero con prurito, non epatomegalia, feci normocoliche. Crescita staturale-ponderale e sviluppo psicomotorio nella norma. Agli esami ematici riscontro di iperbilirubinemia coniugata (bilirubina totale 6.2 mg/dL, coniugata 5.2 mg/dL), incremento delle transaminasi (AST 73 - 272 U/L, ALT 64 - 311 U/L), GGT normali (13 U/L), acidi biliari aumentati (496.9 mmol/l), coagulazione e protidosintesi nella norma. I restanti esami ematici compreso l'assetto lipidico, la funzionalità renale, le immunoglobuline e le vitamine liposolubili risultavano nella norma, così come l'ecografia epatica. Non eseguita biopsia epatica, veniva avviata terapia con UDCA e rifampicina. Durante il follow-up si osservava stabilità del quadro clinico con, all'ultima valutazione, lieve incremento delle transaminasi, GGT persistentemente normali e acidi biliari aumentati con prurito sostanzialmente ben controllato dalla terapia con rifampicina. Escluse le più comuni cause di colestasi, nel sospetto di una PFIC, il paziente è stato sottoposto a sequenziamento dell'esoma e conferma Sanger con riscontro di eterozigosi composta per due varianti missenso nel gene MYO5B: c.A1961G:p.Y654C nell'esone 16 (NM\_001080467), non descritta in precedenza e c.C2470T:p.R824C nell'esone 20 (NM\_001080467), già nota. Le analisi Sanger eseguite anche sui genitori hanno confermato lo stato di portatori: il padre è risultato eterozigote per

la variante c.C2470T:p.R824C nell'esone 20 e la madre eterozigote per la variante c.A1961G:p.Y654C nell'esone 16. (Figura 7)



Figura 7. Elettroferogrammi rispettivi delle conferme Sanger nel probando (COL\_1), e in entrambi i genitori (COL1M e COL1P) delle varianti missenso c.A1961G; p.Y654C e c.C2470T; p.R824C.

## ***Paziente 2***

Secondogenito, origine italiana, nato a termine da gravidanza normodecorsa, taglio cesareo, peso alla nascita 3300gr. Genitori non consanguinei. Anamnesi familiare negativa. Fin dai primi mesi di vita segnalato alvo diarroico in progressivo peggioramento e scarsa crescita. Clinicamente presenza di addome globoso ed epatomegalia. Agli esami ematici riscontro di ipertransaminasemia (AST 133 U/L, ALT 199 U/L), con GGT nella norma (20 U/L), lieve aumento della bilirubina (totale 2.0 g/dL, diretta 1.2 g/dL), protidemia 5.5 g/dL (albumina 3.63 g/dL), funzionalità renale, glicemia e acido lattico nella norma. Successivo riscontro di coagulopatia responsiva alla vitamina K e vitamine liposolubili inferiori ai range di

riferimento per cui veniva avviata supplementazione. Escluse le cause principali cause di malassorbimento ed eseguita EGDS, nella norma.

Alle successive valutazioni, comparsa di prurito intenso con aumento agli esami ematici degli acidi biliari (fino a 161.2 mmol/L) e delle transaminasi (ALT 354 U/L, AST 194 U/L) con GGT sempre nella norma. Riscontro inoltre di acidosi metabolica all'emogasanalisi. Veniva avviata terapia con UDCA, rifampicina, vitamine liposolubili, bicarbonato e supporto nutrizionale. La biopsia epatica mostrava un quadro compatibile con colestasi intraepatica: "parenchima epatico ad architettura lobulo-laminare mantenuta, con metaplasia acinare degli epatociti associata a trasformazione gigantocellulare, lieve rigonfiamento epatocitario. La colorazione immunoistochimica per ck7 evidenzia minima neoduttulazione marginale e metaplasia colangiolare di sparsi epatociti, senza distribuzione zonale preferenziale, minima fibrosi perisinusoidale".

Eseguita ricerca mutazioni a carico dei geni ATP8B1 e ABCB11 nonché pannello genetico, risultati nella norma. Durante il follow-up persistenza di diarrea cronica con necessità di ricorrere a cicli di nutrizione parenterale e incremento del prurito trattato con colestiramina e naloxone. Agli esami ematici persistenza di transaminasi moderatamente aumentate e di acidosi metabolica.

Alla luce del coinvolgimento intestinale oltre che epatico, è stata ripetuta biopsia intestinale con microscopia elettronica che ha mostrato un'atrofia parziale dei microvilli.

Eseguito tentativo terapeutico con steroidi con miglioramento clinico e biochimico ma con successivo sviluppo di cortico-dipendenza e di effetti collaterali secondari alla terapia steroidea per cui, sulla base di quanto noto in letteratura per la PFIC di tipo 2, è stata recentemente avviata terapia con fenilbutirrato sodico.

Nel sospetto di un difetto di miosina5B con coinvolgimento intestinale ed epatico, è stata eseguita analisi mediante WES e successiva conferma Sanger con riscontro di eterozigosi composta per due varianti, non note, a carico del gene MYO5B (NM\_001080467): una

variante nucleotidica che sostituisce un amminoacido con un nuovo codone di stop c.C754T; p.Q252X nell'esone 6 e una variante missenso c.C1550T; p.P517L nell'esone 13.

La madre è risultata portatrice per la variante dell'esone 6, mentre il padre per la variante dell'esone 13. (Figura 8)

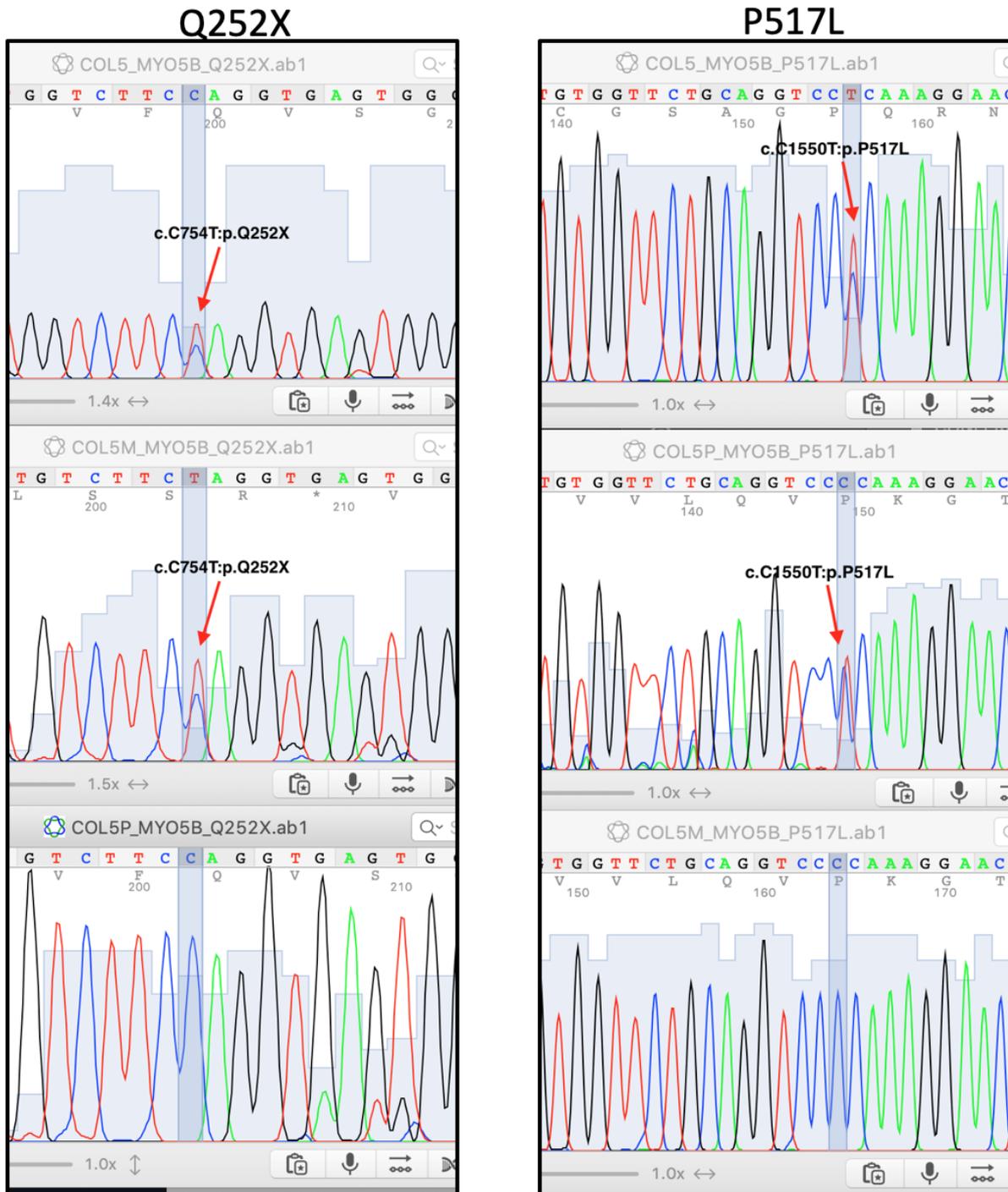


Figura 8. Elettroferogrammi relativi alle conferme delle varianti Q252X e P517L evidenziate nel probando (COL5) e nei rispettivi genitori (COL5M e COL5P).

### ***Pazienti 3 e 4***

Si tratta di due fratelli di origine marocchina, figli di genitori non consanguinei. Anamnesi familiare negativa, altri due fratelli in buona salute. La prima paziente, nata a termine da parto eutocico, presentava crescita staturale-ponderale e sviluppo psicomotorio nella norma. All'età di 18 mesi veniva segnalata comparsa di prurito con feci ipo-acoliche e riscontro agli esami ematici di ipertransaminasemia (AST 90-115 U/L, ALT 160-213 U/L), bilirubina totale 0.89-2.17 mg/dL, bilirubina diretta 0.37-1.24 mg/dL, GGT nella norma e acidi biliari aumentati (476.3  $\mu\text{mol/L}$ ). Protidosintesi, coagulazione e vitamine liposolubili nella norma. Clinicamente si evidenziava epatomegalia. Ecografia addome nella norma. Posta in terapia con UDCA, rifampicina e vitamine liposolubili, nel sospetto di PFIC tipo 1-2, veniva eseguito pannello genetico risultato negativo.

Il fratello, quartogenito, nato a termine da parto eutocico in gravidanza normodecorsa, peso alla nascita 2360 gr. Crescita e sviluppo riferiti sempre nella norma. Alla luce del riscontro di colestasi nella sorella, all'età di 10 mesi venivano eseguiti esami ematici con evidenza di transaminasi sostanzialmente nella norma, bilirubina totale 0.39 mg/dl, diretta 0.11 mg/dl e acidi biliari progressivamente aumentati (da 18.9 a 302.90  $\mu\text{mol/L}$ ). Vitamine liposolubili, protidemia e coagulazione nella norma così come l'ecografia addome.

Durante il follow-up, in entrambi, colestasi ben controllata sul piano clinico e laboratoristico con transaminasi sostanzialmente normali e acidi biliari moderatamente aumentati. Non eseguite biopsie epatiche.

Entrambi i fratelli sono stati sottoposti a sequenziamento dell'esoma e successiva conferma Sanger con identificazione della mutazione, già descritta in letteratura, c.C2470T;p.R824C nell'esone 20 del gene MYO5B (NM\_001080467), in condizione di omozigosi. L'analisi genetica eseguita nella madre (padre non disponibile), ha confermato lo stato di portatrice. (Figura 9)

## R824C

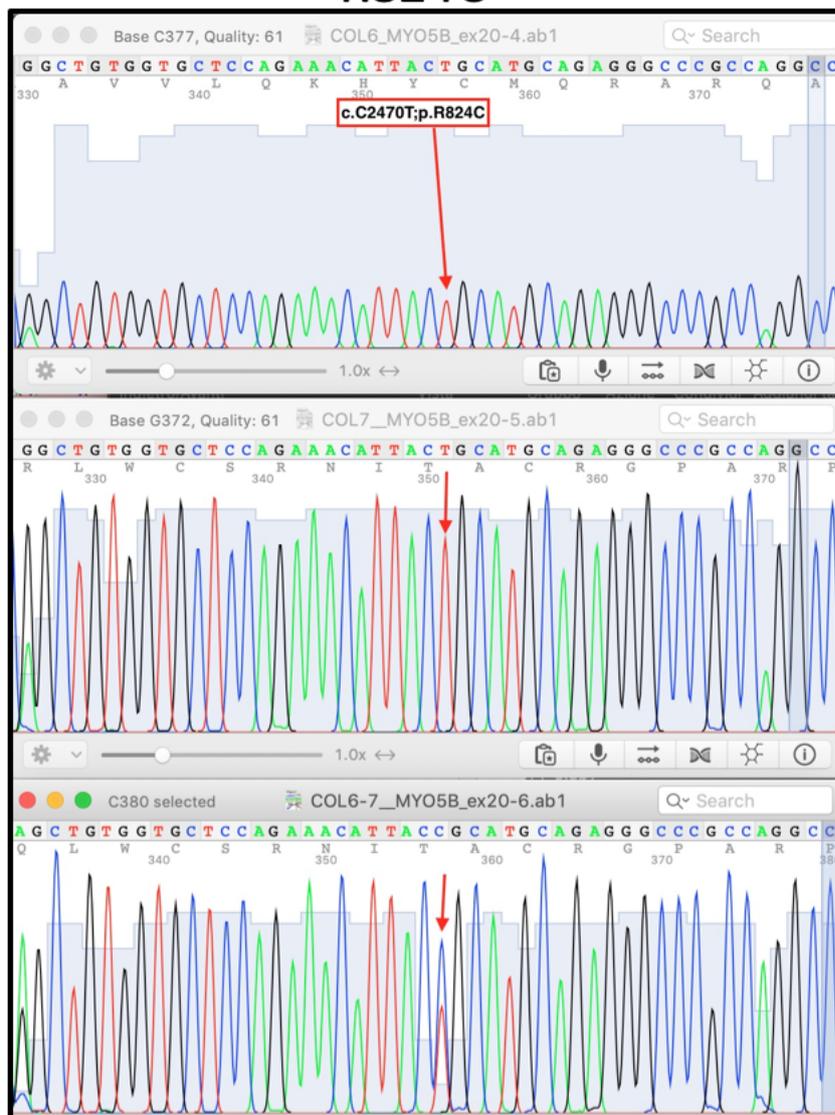


Figura 9. Analisi Sanger nei pazienti 3-4 (COL6 e COL7) e nella madre (COL6-7) relativi alla mutazione R824C.

### ***Paziente 5***

Paziente di origine italiana, nato a termine, peso alla nascita 3200 gr. Nei primi mesi di vita riferito alvo diarroico. All'età di due anni comparsa di prurito intenso e riscontro di epatomegalia. Agli esami ematici, aumento delle transaminasi fino a 2 volte la norma, iperbilirubinemia diretta con GGT nella norma e aumento degli acidi biliari. Eseguita ecografia addome, nella norma. Per allungamento del tempo di protrombina veniva trattato

con vitamina K ed si avviava terapia con UDCA, rifampicina, colestiramina e vitamine liposolubili.

Nel sospetto di colestasi familiare intraepatica progressiva, veniva eseguita biopsia epatica con evidenza di modesta colestasi intraepatica, lieve fibrosi e infiammazione, in assenza di trasformazione gigantocellulare. L'indagine immunohistochimica per BSEP risultava nella norma e la ricerca di mutazioni in ATP8B1 e ABCB11 negativa. Durante il follow-up eseguita colangio-RM (nella norma) e ripetuta biopsia epatica a distanza di 4 anni con riscontro di fibrosi portale e periportale con formazione di setti porto-portali, proliferazione duttulare biliare. Transaminasi e GGT sempre nella norma.

Veniva eseguita pertanto analisi WES con riscontro di eterozigosi composta per le mutazioni c.C274T;p.R92C a carico dell'esone 3, nota in letteratura, e c.574delA; p.I192Sfs\*47 a carico dell'esone 5, non nota, del gene MYO5B (NM\_001080467). Entrambe le varianti sono state confermate con il sequenziamento Sanger nel probando e nei genitori che sono risultati rispettivamente portatori della variante sull'esone 3 (padre) e della variante sull'esone 5 (madre). (Figura 10)

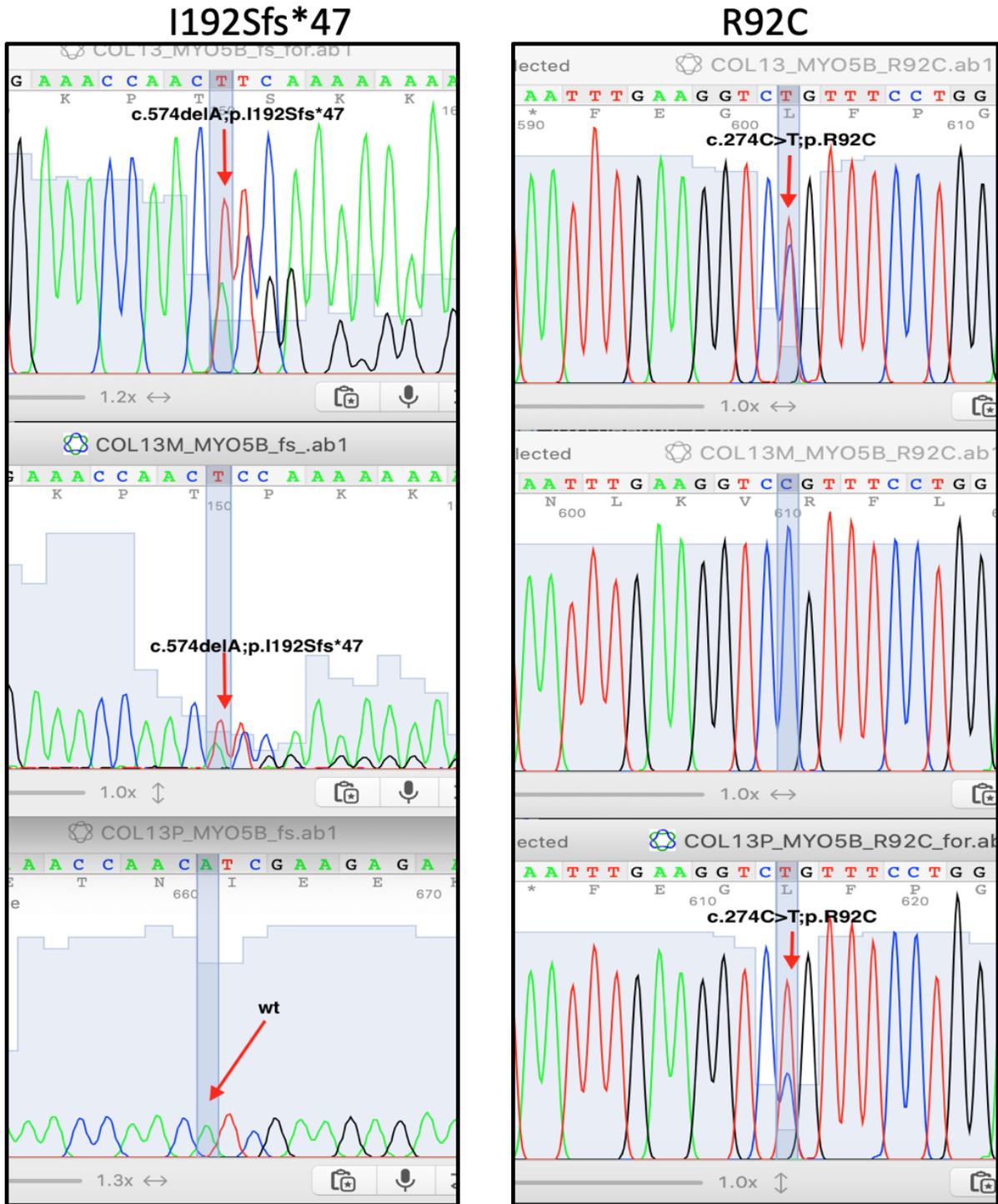


Figura 10. Elettroferogrammi relativi alle conferme della variante R92C nel probando (COL13) e nel padre (COL13P) e del frameshift I192S\*47 confermato nel probando e nella madre (COL13M).

### ***Paziente 6***

Paziente di origine marocchina figlia di genitori non consanguinei, due fratelli in buona salute. In anamnesi familiare, storia di colestasi gravidica nella madre. All'età di due mesi comparsa di ittero con feci normocromiche e successivo prurito. Clinicamente epatomegalia omogenea di consistenza aumentata, crescita staturale-ponderale nella norma. Agli esami ematici ipertransaminasemia (AST 319 U/l ALT 357 U/l), iperbilirubinemia diretta (totale 5.08 mg/dl, diretta 4.98 mg/dl), GGT normali e progressivo aumento dei livelli di acidi biliari (28 – 223  $\mu\text{mol/l}$ ). Coagulazione e protidemia nella norma. Risultata negativa la ricerca genetica per le colestasi intraepatiche, compreso pannello genetico. Veniva avviata terapia con UDCA, rifampicina e vitamine liposolubili. Durante il follow-up persistenza dell'ittero, transaminasi moderatamente aumentate, aumento della bilirubina diretta e degli acidi biliari, GGT nella norma.

Eseguito sequenziamento dell'esoma con riscontro di omozigosi per la mutazione nota in letteratura c.C2470T; p.R824C a carico dell'esone 20 del gene MYO5B (NM\_001080467). La variazione nucleotidica è stata confermata nel probando e nei genitori mediante sequenziamento di prima generazione. (Figura 11)

# R824C

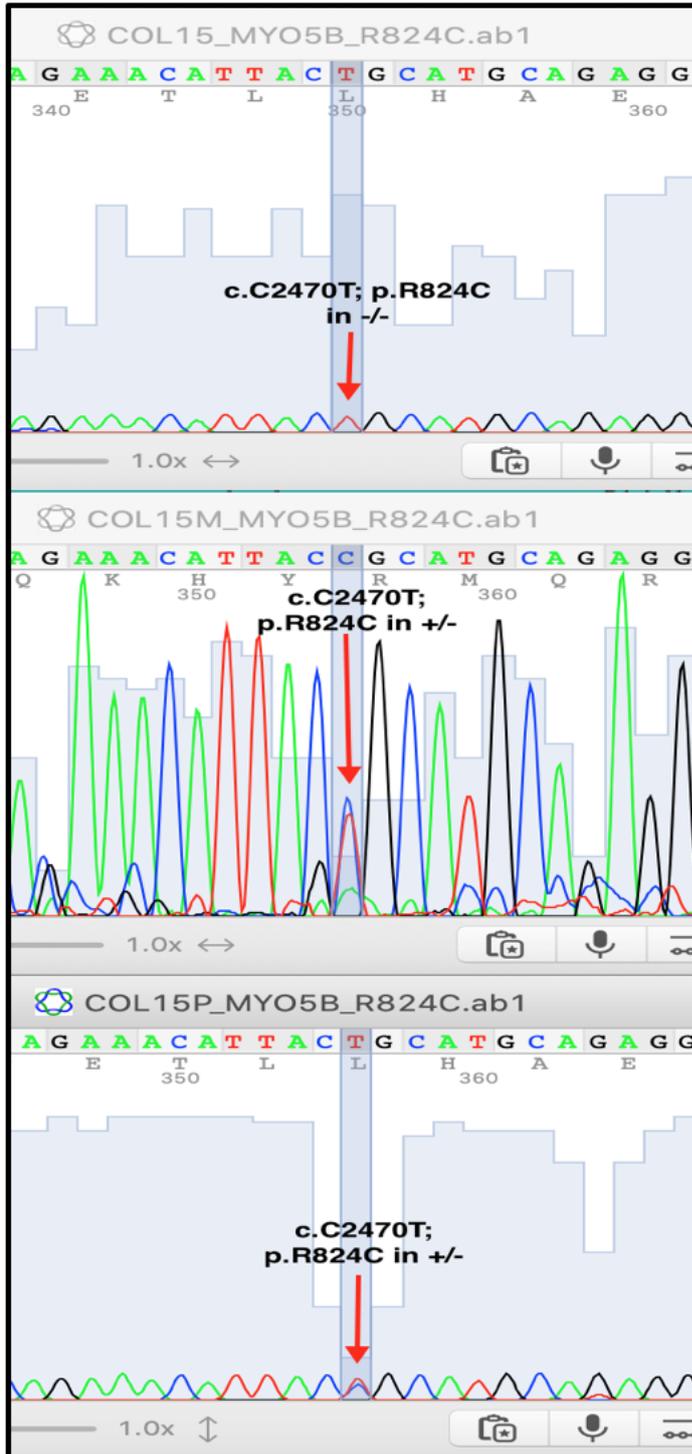


Figura 11. Elettroferogramma relativo alle conferme della variante R824C nel probando (COL15) in omozigosi e in entrambi i genitori (COL15M e COL15P) in eterozigosi.

## *Pazienti affetti da mutazioni a carico del gene ABCB4*

### *Paziente 1*

Paziente di origine albanese, nato a termine da parto eutocico, buona crescita staturale - ponderale. Anamnesi familiare negativa. Riferita buona salute fino all'età di 13 anni quando si presentava con ematemesi. Segnalato prurito negli ultimi mesi. Alla valutazione clinica riscontro di splenomegalia in assenza di epatomegalia.

Gli esami ematici mostravano un emocromo con segni di ipersplenismo (Hb 9.3 g/dL, GB 3.140/mmc, N 2000, L 700, PLT 57.000/mmc), sintesi epatica nella norma (albumina 4.26 g/dL, INR 1.1, aPTTr 1.09), AST 47 U/L, ALT 57 U/L, GGT 55 U/L, acidi biliari 25.1 mmol/L, bilirubina totale 0.66 mg/dL, bilirubina diretta 0.17 mg/dL. All'ecografia addome fegato ad ecostruttura lievemente disomogenea, con lobo sinistro di dimensioni aumentate, vena porta dilatata e marcata splenomegalia. All'angio-TC addome presenza di varici gastriche, esofagee e in assenza di lesioni cavernomatose a carico della vena porta.

Eseguita EGDS con legatura delle varici esofagee ed effettuati accertamenti diagnostici quali autoimmunità e colangiogrammi risultati negativi.

La biopsia epatica mostrava un quadro di cirrosi diffusa incompleta di tipo biliare in evoluzione duttopenica e, all'indagine immunohistochimica, ridotta espressione di MDR3.

Veniva avviata terapia con pantoprazolo, propranololo, UDCA ed eseguita analisi genetica mediante WES e successiva conferma Sanger con evidenza di eterozigosi composta a carico del gene ABCB4 (NM\_000443) con le seguenti mutazioni: c.C959T;p.S320F nell'esone 9, variante già descritta, e c.C1682G;p.S561X nell'esone 14, non descritta in letteratura. Le conferme Sanger effettuate anche sulla madre (padre non disponibile) hanno confermato lo stato di portatrice per la variante a carico dell'esone 14. (Figura 12)

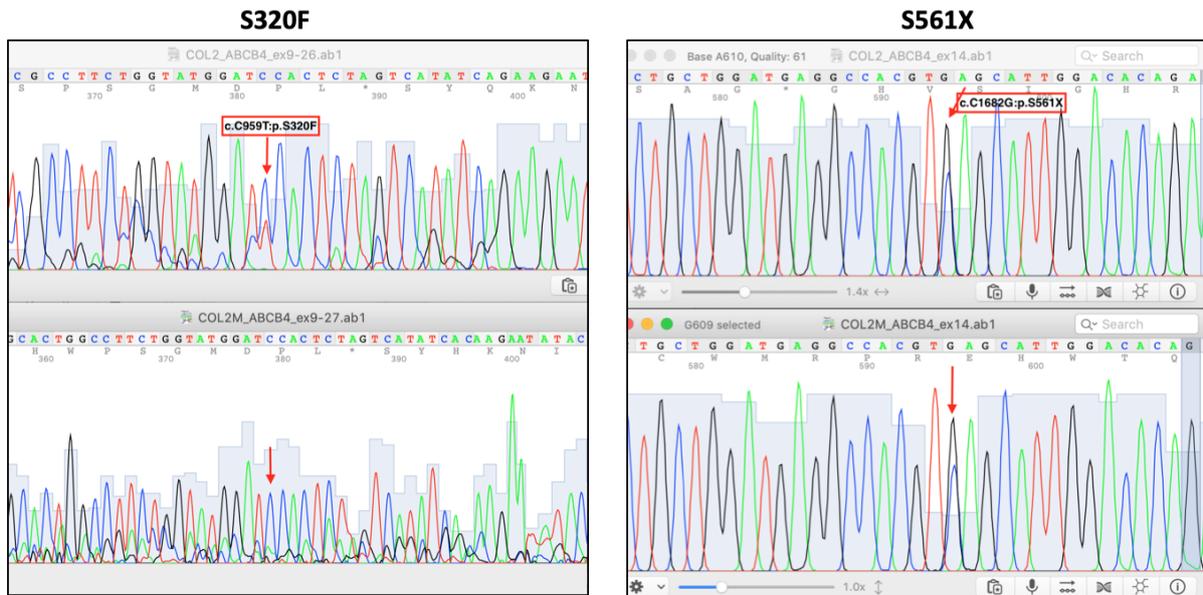


Figura 12. Elettroferogrammi relativi alle conferme delle varianti S320F confermata nel probando (COL2) e la S561X confermata nel probando e nella madre (COL2M).

### ***Paziente 2***

Paziente di origine italiana, primogenito, nato a termine, PN 2905 gr, genitori non consanguinei, anamnesi familiare negativa. All'età di 3 mesi comparsa di prurito con riscontro agli esami ematici di moderato incremento delle transaminasi e delle GGT (ALT 95 U/L, AST 76 U/L, GGT 91 U/L), bilirubina totale 0.92 mg/dl, coagulazione e protidemia nella norma. Alla valutazione clinica riscontro di lieve epatomegalia. Posto in terapia con UDCA e vitamine liposolubili. Durante il follow-up peggioramento del prurito, trattato con terapia antistaminica, ed aumento delle transaminasi (AST 191 U/L, ALT 550 U/L, acidi biliari 89.5 mcmmol/L). Ecografia addome nella norma, Eseguita biopsia epatica compatibile con epatopatia cronica colestatica in iniziale evoluzione fibrotica. All'ultimo controllo i valori delle ALT e GGT si mantenevano entro 2-3 volte la norma.

Eseguito sequenziamento dell'esoma e conferma Sanger con riscontro di eterozigosi composta per le mutazioni c.A1229G;p.K410R a carico dell'esone 11 e c.A335G:p.E112G a carico dell'esone 5 del gene ABCB4 (NM\_000443), non note in letteratura. La mutazione

K410R è stata confermata anche nel padre mentre la variante E112G anche nella madre.

(Figura 13)

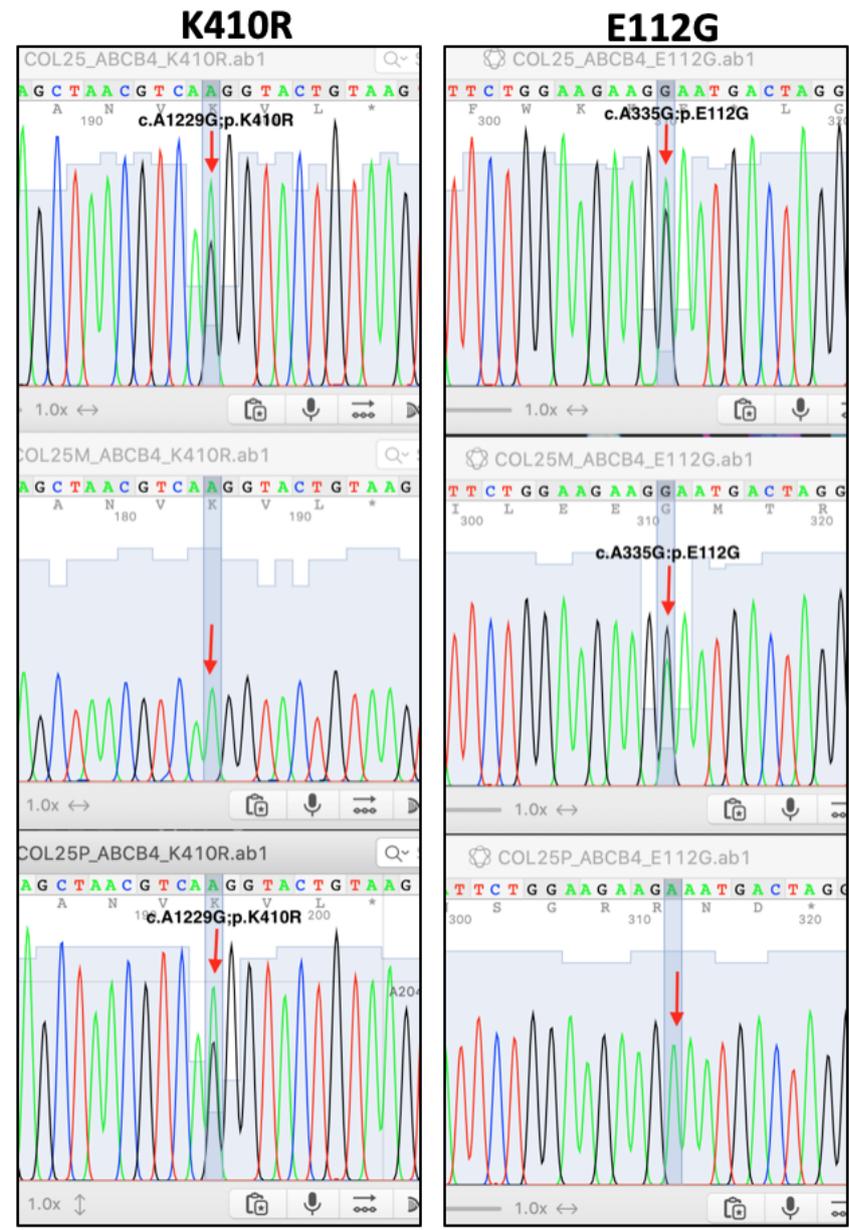


Figura 13. Mediante analisi Sanger nel paziente 2 (COL25) e in entrambi genitori (COL25M e COL25P) sono state confermate la mutazione K410R nel probando e nel padre e la mutazione E112G nel probando e nella madre.

Paziente	Gene	Mutazione probando	Mutazione nota	Mutazione genitori	Fenotipo
1	MYO5B	c.A1961G:p.Y654C esone 16 / c.C2470T:p.R824C esone 20	esone 20	P: R824C M: Y654C	colestasi
2	MYO5B	c.C754T:p.Q252X esone 6 / c.C1550T:p.P517L esone 13	no	P: P517L M: Q252X	colestasi + intestino
3	MYO5B	c.C2470T:p.R824C esone 20	si	P: ND M: R824C	colestasi
4	MYO5B	c.C2470T:p.R824C esone 20	si	P: ND M: R824C	colestasi
5	MYO5B	c.C274T:p.R92C esone 3 / c.574delA:p.I192Sfs*47 esone 5	esone 3	P: R92C M: I192Sfs*47	colestasi
6	MYO5B	c.C2470T:p.R824C esone 20	si	P: R824C M: R824C	colestasi
1	ABCB4	c.C959T:p.S320F esone 9 / c.C1682G:p.S561X esone 14	esone 9	P: ND M: S320F	esordio in adolescenza
2	ABCB4	c.A1229G:p.K410R esone 11 / c.A335G:p.E112G esone 5	no	P: K410R M: E112G	esordio nei primi mesi di vita

Tabella 3. Mutazioni e fenotipo dei pazienti affetti da difetto di miosina5B e PFIC tipo 3 che hanno completato le analisi genetiche. ND: non disponibile; P:padre; M:madre

## 5. DISCUSSIONE

In considerazione delle diverse eziologie e dei sintomi non sempre di facile inquadramento, la diagnosi di colestasi in età pediatrica resta ancora una sfida difficile.

Lo studio dei meccanismi genetici responsabili delle colestasi ereditarie si è espanso negli ultimi anni con l'obiettivo di definire meglio le basi molecolari della secrezione biliare, della fisiologia epatica e dei meccanismi causa di danno. L'identificazione dei primi difetti genetici è avvenuta alla fine degli anni sessanta, nelle famiglie Amish e del Middle East con un fenotipo compatibile con quello delle PFIC<sup>9</sup>. Solo negli anni novanta sono stati identificati i tre geni causa di malattia: ATP8B1, ABCB11 e ABCB4<sup>9-12</sup>.

Nelle forme severe, che presumibilmente coinvolgono una proteina assente o non funzionante, i pazienti solitamente si presentano con colestasi nell'infanzia. Tuttavia, fenotipi più lievi possono essere presenti come risultato di diversi polimorfismi genetici con un esordio più tardivo o con le forme benigne tipo BRIC, colestasi della gravidanza, colelitiasi e predisposizione alla colestasi da farmaci. Nell'ambito delle colestasi vi sono tuttavia pazienti con presentazione atipica o in cui il disordine genetico non è stato identificato.

Per questi pazienti, diverse possibilità possono essere prese in considerazione, la prima è che si tratti di disordini ereditari con fenotipo simile (vedasi gli errori congeniti di sintesi degli acidi biliari o le colestasi sindromiche) e, nei restanti casi, che si tratti di difetti genetici non ancora identificati.

Il continuo sviluppo delle tecniche genetiche e il costo notevolmente ridotto delle analisi negli ultimi anni, hanno permesso una maggiore caratterizzazione delle colestasi ereditarie. Chiarire le cause genetiche della malattia epatica è importante non soltanto ai fini diagnostici, ma soprattutto per comprendere i meccanismi fisiopatogenetici alla base, i fattori che possono influenzare la storia naturale ed, in particolare, orientare la scelta terapeutica<sup>47</sup>.

Recentemente, le tecniche genetiche di Next Generation Sequencing hanno reso possibile il sequenziamento di multipli geni, in più individui, contemporaneamente. Attualmente, la strategia maggiormente impiegata comprende l'utilizzo di pannelli genetici orientati, con successivo ricorso al sequenziamento dell'esoma. Tuttavia, il recente abbattimento dei costi, ha permesso che sempre più centri impieghino già in prima battuta l'analisi mediante sequenziamento dell'esoma. L'applicazione di queste nuove tecniche allo studio dei disordini colestatici ha permesso la scoperta di altri geni coinvolti nelle colestasi, sia nelle forme a GGT normali (TJP2, FXR, MYO5B) che elevate (CLDN1, DCDC2).

Nonostante le nuove tecniche, una minoranza di pazienti rimane ancora senza una causa genetica identificata, probabilmente secondaria a mutazioni nei geni noti ma che non sono identificabili dai test di routine oppure a mutazioni in geni non ancora identificati come causa di colestasi. Recentemente diversi autori hanno pubblicato la loro esperienza basata sull'approccio mediante NGS nello studio dei pazienti affetti da colestasi.

Herbst et al<sup>34</sup> hanno applicato un pannello di 93 geni associati a colestasi in 15 pazienti precedentemente riferiti per PFIC e sottoposti ad analisi Sanger per i geni ATP8B1, ABCB4 e ABCB1, successivamente riesaminati con pannello di geni. Sono state considerate 20 mutazioni comprese 7 in ATP8B1, 10 in ABCB11 e 3 in ABCB4. Il pannello è stato inoltre utilizzato prospetticamente in 6 pazienti con colestasi con istologia o presentazione clinica atipica. Tutte e 20 le mutazioni sono state confermate tramite impiego del pannello genetico con in aggiunta, per i pazienti prospettici, il riscontro in 4 pazienti di 6 nuove mutazioni patogenetiche e 2 mutazioni già note (PFIC 2, Niemann Pick tipo c1, PFIC atipica e rene policistico autosomica recessivo). In due pazienti la causa genetica non è stata identificata.

Shagrani et al<sup>35</sup> riportano la loro esperienza su una popolazione di 98 pazienti affetti da colestasi, con un elevato tasso di consanguineità, sottoposti ad un pannello di 189 geni coinvolti in patologie gastro-intestinali, inclusi quelli correlati a disordini colestatici.

Mutazioni causanti patologia sono state identificate in 60 pazienti (61%) con il riscontro di 37 mutazioni di cui 15 nuove. Sedici pazienti (25%) avevano mutazioni in ABCB11, 12 (20%) in ABCB4 e 7 (12%) in UGT1A1. La stessa percentuale di pazienti con mutazioni a carico di TJP2 è stata identificata. Nello specifico, mutazioni a carico dei geni coinvolti nelle PFIC sono state riscontrate in 29 pazienti (50%) di cui 16 (55%) in ABCB11 e 12 (41%) in ABCB4. Le altre diagnosi genetiche comprendevano la sindrome di Alagille, i difetti di sintesi degli acidi biliari, la tirosinemia, la malattia di Wilson, la sindrome di Dubin - Johnson, le malattie da accumulo del glicogeno e i difetti a carico del gene SLC10A2, MYO5B e VIPAS 39.

Togawa et al<sup>36</sup> hanno applicato un pannello di 18 geni a pazienti affetti da colestasi senza precedente diagnosi suddivisi in pazienti con colestasi genetica caratterizzata clinicamente, in pazienti senza diagnosi ma con complicanze quali la prematurità, le infezioni, le anomalie metaboliche e in pazienti senza complicanze. 109 pazienti sono stati arruolati di cui 31 (28%) con una diagnosi clinica di colestasi genetica. 28 pazienti (26%) hanno ricevuto una diagnosi genetica con mutazioni in JAG1, NOTCH2, ABCC2, SLC25A13, ATP8B1 o ABCB11. In 22 (79%) pazienti la diagnosi genetica era concorde con la clinica. Per gli altri 6 pazienti delle altre due categorie, 1 è stato diagnosticato con sindrome di Alagille, 3 con sindrome di Dubin - Johnson, 1 con colestasi da deficit di citrina e 1 con PFIC2/BRIC2. La detection rate calcolata nel primo gruppo era del 71% (22/31) tuttavia, se calcolata globalmente, scendeva al 28%.

I pannelli multigenici, rappresentano una valida alternativa all'analisi Sanger dal momento che possono analizzare più geni contemporaneamente. Tuttavia, le grandi inserzioni/delezioni (indels), non possono essere individuate. Per tale ragione, Wang et al<sup>37</sup> hanno condotto uno studio basato sull'utilizzo di un pannello composto da 61 geni correlati a colestasi comprendente anche 25 note ampie inserzioni/delezioni.

Per essere validato, il pannello è stato applicato prima a 54 pazienti già con diagnosi genetica di colestasi, quindi ad altri 141 pazienti con colestasi. Nei primi 54 pazienti, 74 mutazioni patogenetiche sono state riscontrate mediante analisi Sanger. Nei restanti 141 pazienti, un totale di 127 varianti sono state scelte dopo studio con pannello per essere validate mediante analisi Sanger. Di queste, 123 (96.9%) sono state confermate come vere. Varianti patogenetiche sono state identificate in 59 pazienti (41.8%). In totale, 29 pazienti hanno ottenuto una diagnosi genetica con una detection rate del 22%, incluse due ampie indels in 2 pazienti con deficit di citrina. I disordini identificati sono stati: deficit di citrina (32.3%), Dubin - Johnson (22.6%), Alagille (19.4%) e PFIC2/BRIC2 (9.8%).

Nicastro et al<sup>38</sup> riportano la loro esperienza basata su un approccio genetico ai pazienti con colestasi. I pazienti arruolati hanno ricevuto una valutazione di primo livello e sono stati stratificati in base al colore delle feci e ai livelli di GGT. I pazienti con feci ipocoliche sono stati sottoposti a biopsia epatica per escludere l'atresia delle vie biliari dopo esclusione del deficit di alfa1antitripsina. I pazienti con feci normocoliche sono stati successivamente suddivisi sulla base dei livelli delle GGT. Infine, i pazienti in cui il fenotipo clinico suggeriva una diagnosi specifica sono stati sottoposti direttamente ad analisi di specifici loci. Tre diversi pannelli genetici sono stati realizzati basandosi sulle caratteristiche dei pazienti. Un approccio iniziale con WES è stato riservato a casi con fenotipo complesso in assenza di elementi suggestivi di una chiara eziologia o qualora una condizione veniva sospettata ma la presentazione clinica era atipica o incompleta. Di 170 pazienti con colestasi neonatale/infantile, 125 sono stati considerati eleggibili, con un'età mediana alla prima valutazione di 2 mesi (1-11) ed un tempo medio di follow-up di 15 mesi (6-98). Consanguineità era presente in 5 pazienti (4%) ed in 4 (3%) vi era una storia di familiarità per patologie epatiche nei parenti di primo grado. Coagulopatia, definita per un INR > 1.2 era presente nel 32%. Il 77% (96/125) dei pazienti aveva feci ipocoliche e di questi 74 hanno ricevuto una diagnosi di AVB. 29 pazienti avevano feci normocoliche di cui 17 con

GGT elevate e 12 normali (tutti con aumento degli acidi biliari). In totale, 50 pazienti sono stati sottoposti a test genetici, in 38 mediante l'utilizzo di pannelli. Lo studio mediante WES è stato condotto in 6 pazienti. Una diagnosi finale è stata raggiunta in 29 su 48 pazienti con una detection rate del 60%. La sindrome di Alagille, la PFIC di tipo 2 e il deficit di alfa 1 antitripsina sono state le cause genetiche più comuni (rispettivamente 30%, 13% e 6%). Il 14% (18/125) dei pazienti è rimasto con un'eziologia indeterminata, sebbene 6 di questi siano stati studiati con sequenziamento dell'esoma.

Nel nostro studio sono stati arruolati 25 pazienti affetti da disordini colestatici con un'età mediana all'esordio di 0.8 anni (0- 15.1) e seguiti per un follow-up medio di 3.7 anni (0.1- 25.6). Una lieve predominanza (64%) delle forme a GGT elevate è stata osservata. Il 72% dei pazienti (18/25) aveva già eseguito analisi genetiche mediante analisi Sanger o pannelli di geni coinvolti nelle colestasi genetiche. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad analisi genetica mediante WES e conferma Sanger nei probandi e, qualora disponibili, nei genitori. I risultati completi delle analisi genetiche erano disponibili per 8 pazienti, fattore che indubbiamente limita le conclusioni dello studio.

Tuttavia, anche avendo a disposizione solo risultati preliminari, il dato che sicuramente emerge di più è relativo alla percentuale di mutazioni riscontrate a carico del gene della miosina 5B, presenti in 6 pazienti. Questo dato sottolinea il ruolo del gene MYO5B quale causa di colestasi intraepatica a GGT normali; gene che dovrebbe essere da subito incluso nella valutazione diagnostica di questi pazienti.

Come precedentemente riportato il gene MYO5B, classicamente associato alla diarrea da inclusione dei microvilli, è stato recentemente identificato come responsabile di colestasi a GGT normali, anche in pazienti senza coinvolgimento intestinale.

A tal proposito, i nostri 6 pazienti affetti da difetto di MYO5B, presentavano un fenotipo assai variabile da casi asintomatici identificati mediante screening familiare a forme intermedie e, in un paziente, a coinvolgimento sia intestinale che epatico.

L'estrema variabilità fenotipica mostra come debbano essere ancora chiariti con esattezza i meccanismi alla base del difetto; il riscontro di nuove mutazioni nella nostra casistica rappresenta senza dubbio un valore aggiunto nella caratterizzazione di questi pazienti, in particolare per futuri studi sulla correlazione genotipo-fenotipo.

I restanti due pazienti che hanno terminato le analisi genetiche avevano mutazioni a carico del gene ABCB4, anche in questo caso con fenotipo variabile dall'esordio precoce con colestasi alla presentazione tardiva in età adolescenziale con i segni di malattia avanzata.

Nel nostro studio i pazienti sono stati sottoposti a sequenziamento dell'esoma e conferma Sanger nei probandi e nei genitori. Infatti, l'attuale riduzione dei costi delle nuove tecniche genetiche, ha fatto propendere, come per altri studi, per l'utilizzo in prima battuta del sequenziamento dell'esoma piuttosto che di pannelli genetici.

Dillon et al<sup>48</sup> nella loro analisi riportano i vantaggi e gli svantaggi delle due tecniche. I pannelli genetici, data la loro natura, producono un minor numero di dati, riducendo la possibilità di riscontri secondari quando comparati al WES. Si presume che i pannelli costino meno del WES ma questo non è sempre vero e spesso i pannelli richiedono di essere riadattati per incorporare i nuovi geni identificati; inoltre i loro dati hanno un utilizzo limitato in caso di diagnosi future o di casi non diagnosticati. Dall'altro lato, il WES offre il vantaggio di un approccio meno ristretto, permettendo l'identificazione di varianti in loci non considerati e consentendo di avere dati in geni non ancora associati a disordini, che possono essere rianalizzati e quindi condurre a diagnosi non ancora identificate al momento della valutazione iniziale.

I limiti del WES includono il problema dell'interpretazione di un grande volume di dati con un'elevata possibilità di identificare varianti di significato non noto. Nonostante le loro differenze, entrambe le tecniche rappresentano uno strumento utile nello studio dei disordini monogenici. Pochi sono gli studi volti a comparare direttamente la performance diagnostica e i costi delle due tecniche e le attuali raccomandazioni sono spesso basate

sull'esperienza clinica piuttosto che sull'evidenza. Una delle maggiori considerazioni è che avendo i pannelli una percentuale di copertura maggiore questo comporta una percentuale maggiore di diagnosi nel caso di fenotipi ben identificati. In questo studio gli autori hanno comparato tre pannelli genetici con WES in una coorte di 145 pazienti con sospetti disordini monogenici. L'analisi mediante WES ha portato alla diagnosi in geni non inclusi in almeno 1 dei 3 pannelli nel 42% dei casi. Se al contrario fosse stato selezionato un pannello, il 23% dei pazienti non sarebbe stato diagnosticato. Nel 26% dei casi, anche il pannello meno costoso, sarebbe costato comunque più dell'esoma. La valutazione della copertura del WES ha rilevato che la probabilità di perdere una variante clinicamente rilevante in una lista di geni candidati, era al massimo dell'8%. Gli autori concludono che la più ampia copertura del WES lo rende un'alternativa superiore e con costi ai pannelli genetici simili nello studio dei disordini monogenici complessi.

## **6. CONCLUSIONI**

La colestasi intraepatica familiare progressiva comprende una famiglia di malattie in continua crescita ed evoluzione.

Le nuove tecniche genetiche hanno contribuito a chiarire meglio la conoscenza dei meccanismi alla base della malattia grazie all'identificazione di nuovi geni e allo studio dei diversi fenotipi associati a ciascun gene.

L'utilizzo di pannelli genetici e il sequenziamento dell'esoma sono analisi entrate oramai nella pratica quotidiana per lo studio dei pazienti con disordini colestatici, anche grazie al notevole abbattimento dei costi che si è verificato negli ultimi anni.

I progressi dati dall'applicazione di queste tecniche genetiche alla colestasi in età pediatrica, integrati con la valutazione clinico-laboratoristica ed istologica, permette sempre più di identificare non solo i meccanismi patogenetici di base ma anche la differente risposta alla terapia impiegata, guidando nella scelta dell'approccio terapeutico più adeguato.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

1. Chen HL, Wu SH, Hsu SH, Liou BY, Chen HL, Chang MH. Jaundice revisited: recent advances in the diagnosis and treatment of inherited cholestatic liver diseases. *J Biomed Sci.* 2018 Oct 26;25(1):75. doi: 10.1186/s12929-018-0475-8.
2. Sticova E, Jirsa M, Pawłowska J. New Insights in Genetic Cholestasis: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2018 Jul 26;2018:2313675. doi: 10.1155/2018/2313675. eCollection 2018.
3. Bull LN, Thompson RJ. Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. *Clin Liver Dis.* 2018 Nov;22(4):657-669. doi: 10.1016/j.cld.2018.06.003. Epub 2018 Aug 3.
4. Henkel SA, Squires JH, Ayers M, Ganoza A, Mckiernan P, Squires JE. Expanding etiology of progressive familial intrahepatic cholestasis. *World J Hepatol.* 2019 May 27;11(5):450-463. doi: 10.4254/wjh.v11.i5.450.
5. Feldman AG, Sokol RJ. Neonatal Cholestasis. *Neoreviews.* 2013 Feb 1;14(2). doi: 10.1542/neo.14-2-e63.
6. Fawaz R, Baumann U, Ekong U, Fischler B, Hadzic N, Mack CL et al. Guideline for the Evaluation of Cholestatic Jaundice in Infants: Joint Recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017 Jan;64(1):154-168. doi: 10.1097/MPG.0000000000001334.
7. Andrianov MG, Azzam RK. Cholestasis in Infancy. *Pediatr Ann.* 2016 Dec 1;45(12):e414-e419. doi: 10.3928/19382359-20161118-01.
8. De Bruyne R, Van Biervliet S, Vande Velde S, Van Winckel M. Clinical practice: neonatal cholestasis. *Eur J Pediatr.* 2011 Mar;170(3):279-84. doi: 10.1007/s00431-010-1363-8. Epub 2011 Jan 20.

9. Clayton RJ, Iber FL, Ruebner BH, McKusick VA. Byler disease. Fatal familial intrahepatic cholestasis in an Amish kindred. *Am J Dis Child.* 1969 Jan;117(1):112-24.
10. Bull LN, van Eijk MJ, Pawlikowska L, DeYoung JA, Juijn JA, Liao M et al. A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat. Genet.* 1998; 18: 219–24.
11. Strautnieks SS, Bull LN, 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.
12. De Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J et al. Mutations in MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 1998; 95: 282–7.
13. Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2012 Sep;36 Suppl 1:S26-35. doi: 10.1016/S2210-7401(12)70018-9.
14. Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Orphanet J Rare Dis.* 2009 Jan 8;4:1. doi: 10.1186/1750-1172-4-1.
15. Davit-Spraul A, Fabre M, Branchereau S, Baussan C, Gonzales E, Stieger B et al. ATP8B1 and ABCB11 analysis in 62 children with normal gamma-glutamyl transferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): phenotypic differences between PFIC1 and PFIC2 and natural history. *Hepatology.* 2010 May;51(5):1645-55. doi: 10.1002/hep.23539.
16. Srivastava A. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *J Clin Exp Hepatol.* 2014 Mar;4(1):25-36. doi: 10.1016/j.jceh.2013.10.005. Epub 2013 Nov 23.

17. Sambrotta M, Strautnieks S, Papouli E, Rushton P, Clark BE, Parry DA et al. Mutations in TJP2 cause progressive cholestatic liver disease. *Nat Genet.* 2014 Apr;46(4):326-8. doi: 10.1038/ng.2918. Epub 2014 Mar 9.
18. Carlton VE, Harris BZ, Puffenberger EG, Batta AK, Knisely AS, Robinson DL et al. Complex inheritance of familial hypercholanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. *Nat Genet.* 2003 May;34(1):91-6.
19. Sambrotta M, Thompson RJ. Mutations in TJP2, encoding zona occludens 2, and liver disease. *Tissue Barriers.* 2015 Mar 17;3(3):e1026537. doi: 10.1080/21688370.2015.1026537. eCollection 2015 Jul-Sep.
20. Gomez-Ospina N, Potter CJ, Xiao R, Manickam K, Kim MS, Kim KH et al. Mutations in the nuclear bile acid receptor FXR cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Commun.* 2016 Feb 18;7:10713. doi: 10.1038/ncomms10713.
21. Girard M, Lacaille F, Verkarre V, Mategot R, Feldmann G, Grodet A et al. MYO5B and bile salt export pump contribute to cholestatic liver disorder in microvillous inclusion disease. *Hepatology.* 2014 Jul;60(1):301-10. doi: 10.1002/hep.26974. Epub 2014 May 27.
22. Qiu YL, Gong JY, Feng JY, Wang RX, Han J, Liu T et al. Defects in myosin VB are associated with a spectrum of previously undiagnosed low  $\gamma$ -glutamyltransferase cholestasis. *Hepatology.* 2017 May;65(5):1655-1669. doi: 10.1002/hep.29020. Epub 2017 Mar 23.
23. Gonzales E, Taylor SA, Davit-Spraul A, Thébaut A, Thomassin N, Guettier C et al. MYO5B mutations cause cholestasis with normal serum gamma-glutamyl transferase activity in children without microvillous inclusion disease. *Hepatology.* 2017 Jan;65(1):164-173. doi: 10.1002/hep.28779. Epub 2016 Oct 5.

24. Jang JY, Kim KM, Kim GH, Yu E, Lee JJ, Park YS, Yoo HW. Clinical characteristics and VPS33B mutations in patients with ARC syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009 Mar;48(3):348-54
25. Cullinane AR, Straatman-Iwanowska A, Zaucker A, Wakabayashi Y, Bruce CK, Luo G et al. Mutations in VIPAR cause an arthrogyriposis, renal dysfunction and cholestasis syndrome phenotype with defects in epithelial polarization. *Nat Genet.* 2010 Apr;42(4):303-12. doi: 10.1038/ng.538. Epub 2010 Feb 28.
26. Eastham KM, McKiernan PJ, Milford DV, Ramani P, Wyllie J, van't Hoff W et al. ARC syndrome: an expanding range of phenotypes. *Arch Dis Child.* 2001 Nov;85(5):415-20.
27. Hanley J, Dhar DK, Mazzacova F, Fiadeiro R, Burden JJ, Lyne AM et al. Vps33b is crucial for structural and functional hepatocyte polarity. *J Hepatol.* 2017 May;66(5):1001-1011. doi: 10.1016/j.jhep.2017.01.001. Epub 2017 Jan 9.
28. Baala L, Hadj-Rabia S, Hamel-Teillac D, Hadchouel M, Prost C, Leal SM et al. Homozygosity mapping of  a locus for a novel syndromic ichthyosis to chromosome 3q27-q28. *J Invest Dermatol.* 2002 Jul;119(1):70-6.
29. Grosse B, Cassio D, Yousef N, Bernardo C, Jacquemin E, Gonzales E. Claudin-1 involved in neonatal ichthyosis sclerosing cholangitis syndrome regulates hepatic paracellular permeability. *Hepatology.* 2012 Apr;55(4):1249-59. doi: 10.1002/hep.24761. Epub 2012 Mar 1.
30. Girard M, Bizet AA, Lachaux A, Gonzales E, Filhol E, Collardeau-Frachon S et al. DCDC2 Mutations Cause Neonatal Sclerosing Cholangitis. *Hum Mutat.* 2016 Oct;37(10):1025-9. doi: 10.1002/humu.23031. Epub 2016 Aug 24.
31. Grammatikopoulos T, Sambrotta M, Strautnieks S, Foskett P, Knisely AS, Wagner B et al. Mutations in DCDC2 (doublecortin domain containing protein 2) in neonatal

- sclerosing cholangitis. *J Hepatol.* 2016 Dec;65(6):1179-1187. doi: 10.1016/j.jhep.2016.07.017. Epub 2016 Jul 25.
32. Catzola A, Vajro P. Management options for cholestatic liver disease in children. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017 Nov;11(11):1019-1030. doi: 10.1080/17474124.2017.1359538. Epub 2017 Jul 28.
33. Nicastro E, D'Antiga L. Next generation sequencing in pediatric hepatology and liver transplantation. *Liver Transpl.* 2018 Feb;24(2):282-293. doi: 10.1002/lt.24964.
34. Herbst SM, Schirmer S, Posovszky C, Jochum F, Rödl T, Schroeder JA et al. Taking the next step forward - Diagnosing inherited infantile cholestatic disorders with next generation sequencing. *Mol Cell Probes.* 2015 Oct;29(5):291-8. doi: 10.1016/j.mcp.2015.03.001. Epub 2015 Mar 13.
35. Shagrani M, Burkholder J, Broering D, Abouelhoda M, Faquih T, El-Kalioby et al. Genetic profiling of children with advanced cholestatic liver disease. *Clin Genet.* 2017 Jul;92(1):52-61. doi: 10.1111/cge.12959. Epub 2017 Mar 17.
36. Togawa T, Sugiura T, Ito K, Endo T, Aoyama K, Ohashi K et al. Molecular Genetic Dissection and Neonatal/Infantile Intrahepatic Cholestasis Using Targeted Next-Generation Sequencing. *J Pediatr.* 2016 Apr;171:171-7.e1-4. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.01.006. Epub 2016 Feb 5.
37. Wang NL, Lu YL, Zhang P, Zhang MH, Gong JY, Lu Y et al. A Specially Designed Multi-Gene Panel Facilitates Genetic Diagnosis in Children with Intrahepatic Cholestasis: Simultaneous Test of Known Large Insertions/Deletions. *PLoS One.* 2016 Oct 5;11(10):e0164058. doi: 10.1371/journal.pone.0164058. eCollection 2016.
38. Nicastro E, Di Giorgio A, Marchetti D, Barboni C, Cereda A, Iascone M, D'Antiga L. Diagnostic Yield of an Algorithm for Neonatal and Infantile Cholestasis Integrating Next-Generation Sequencing. *J Pediatr.* 2019 Aug;211:54-62.e4. doi: 10.1016/j.jpeds.2019.04.016. Epub 2019 May 31.

39. 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.
40. 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, 120:1448-1458.
41. Gonzales, Grosse B, Schuller B, Davit-Spraul A, Conti F, Guettier C et al. Targeted pharmacotherapy in progressive familial intrahepatic cholestasis type 2: Evidence for improvement of cholestasis with 4-phenylbutyrate. *Hepatology*. 2015 Aug;62(2):558-66. doi: 10.1002/hep.27767. Epub 2015 Apr 8.
42. Gonzales E, Grosse B, Cassio D, Davit-Spraul A, Fabre M, Jacquemin E. Successful mutation-specific chaperone therapy with 4-phenylbutyrate in a child with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *J Hepatol*. 2012 Sep;57(3):695-8. doi: 10.1016/j.jhep.2012.04.017. Epub 2012 May 16.
43. Engelmann G, Wenning D, Herebian D, Sander O, Dröge C, Kluge S, Kubitz R. Two Case Reports of Successful Treatment of Cholestasis With Steroids in Patients With PFIC-2. *Pediatrics*. 2015 May;135(5):e1326-32. doi: 10.1542/peds.2014-2376. Epub 2015 Apr 6.
44. Nicastro E, Stephenne X, Smets F, Fusaro F, de Magnée C et al. Recovery of graft steatosis and protein-losing enteropathy after biliary diversion in a PFIC 1 livertransplanted child. *Pediatr Transplant*. 2012 Aug;16(5):E177-82. doi: 10.1111/j.1399-3046.2011.01514.x. Epub 2011 Jun 15.
45. Miyagawa-Hayashino A, Egawa H, Yorifuji T, Hasegawa M, Haga H, Tsuruyama T et al. Allograft steatohepatitis in progressive familial intrahepatic cholestasis type 1 after living donorliver transplantation. *Liver Transpl*. 2009 Jun;15(6):610-8. doi: 10.1002/lt.21686.

46. Keitel V, Burdelski M, Vojnisek Z, Schmitt L, Häussinger D, Kubitz R. De novo bile salt transporter antibodies as a possible cause of recurrent graft failure after liver transplantation: a novel mechanism of cholestasis. *Hepatology*. 2009 Aug;50(2):510-7. doi: 10.1002/hep.23083.
47. Chen HL. Mining the idiopathic genetic cholestasis syndrome. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Mar;28(3):389-91. doi: 10.1111/jgh.12114.
48. Dillon OJ, Lunke S, Stark Z, Yeung A, Thorne N, Gaff C et al. Exome sequencing has higher diagnostic yield compared to simulated disease-specific panels in children with suspected monogenic disorders. *Eur J Hum Genet*. 2018 May;26(5):644-651. doi: 10.1038/s41431-018-0099-1. Epub 2018 Feb 16.