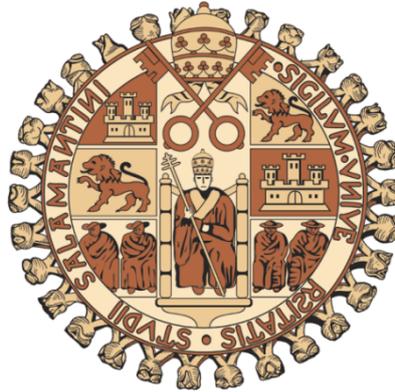


**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**BÚSQUEDA DE FACTORES CON VALOR  
DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO EN PACIENTES  
CON COLESTASIS INTRAHEPÁTICA  
GESTACIONAL**

**TESIS DOCTORAL**

**MARÍA CECILIA ESTIÚ**

**2014**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**BÚSQUEDA DE FACTORES CON VALOR  
DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO EN PACIENTES  
CON COLESTASIS INTRAHEPÁTICA  
GESTACIONAL**

Memoria que presenta **Dña. María Cecilia estú** para optar al  
Título de Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 15 de junio de 2014



D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> JESÚS MONTE RÍO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "BÚSQUEDA DE FACTORES CON VALOR DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO EN PACIENTES CON COLESTASIS INTRAHEPÁTICA GESTACIONAL" presentada por D<sup>a</sup>. María Cecilia Estiú, para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, la Dra. D<sup>ña</sup>. M<sup>a</sup> Jesús Monte Río, Catedrática del Departamento de Fisiología y Farmacología, y la Dra. D<sup>ña</sup>. Rocío I. Rodríguez Macías, Profesora Titular del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 15 de junio de dos mil catorce.

Fdo. M<sup>a</sup> Jesús Monte Río



D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, CATEDRÁTICO, DÑA. Mª JESÚS MONTE RÍO, CATEDRÁTICA, Y DÑA. ROCÍO I. RODRÍGUEZ MACÍAS, PROFESORA TITULAR, DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada "BÚSQUEDA DE FACTORES CON VALOR DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO EN PACIENTES CON COLESTASIS INTRAHEPÁTICA GESTACIONAL" presentada por D<sup>a</sup>. María Cecilia Estiú, para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección conjunta en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a 15 de junio de dos mil catorce.

Fdo. José Juan García Marín

Fdo. Mª Jesús Monte Río

Fdo. Rocío I. Rodríguez Macías



El desarrollo del trabajo experimental incluido en esta Memoria ha sido financiado en parte con cargo al CIBERehd (Instituto de Salud Carlos III), y a los siguientes Proyectos de Investigación:

Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña. VI Convocatoria. “Investigación de nuevas dianas moleculares para la detección y la quimioterapia del colangiocarcinoma”. Investigador principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo: 2009-2012.

Dirección General de Programas y Transferencia de Conocimiento del MICINN. Proyecto SAF2010-15517. “Relación entre FXR y riesgo de carcinogénesis en tejidos del circuito enterohepático. Implicaciones terapéuticas”. Investigador principal: JJ García Marín. 2011-2013.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto SA070A11-2. “Valor diagnóstico e interés como diana farmacológica en el tratamiento del colangiocarcinoma del gen SLC10A2”. Investigador Principal: R.I. Rodríguez Macías. 2011-2012.

Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León. Proyecto BIO/03/SA23/11. “Bases moleculares de la respuesta SOS mediada por el receptor nuclear FXR y su papel en la hepatocarcinogénesis”. Investigador Principal: JJ García Marín. 2011-2012.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto SA023A11-2. “Evaluación de estrategias de supresión tumoral por inducción de diferenciación celular mediante la activación de la vía de señalización regulada por el gen NR1H4”. Investigador Principal: MJ Monte Río. 2011-2013.

Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León. Proyecto BIO/SA65/13. “Estudio retrospectivo de la relación entre la respuesta al tratamiento con sorafenib en pacientes con cáncer hepático y los cambios de expresión y aparición de variantes aberrantes”. Investigador Principal: R.I. Rodríguez Macías. 2013.

Fundación Samuel Solórzano Barruso. Proyecto FS/7-2013. “Relación entre la respuesta al tratamiento con sorafenib en pacientes con cáncer hepático y los cambios de expresión y aparición de variantes aberrantes del gen *SLC22A1*”. Investigador Principal: R.I. Rodríguez Macías. 2014.

Dirección General de Investigación Científica y Técnica del MINECO. Proyecto SAF2013-40620-R. “Implicación de los genes *NR1H4*, *BIRC5* y *SLC22A1* en la quimiorresistencia y quimiosensibilización del cáncer hepático”. Investigador Principal: JJ García Marín. 2014-2016.



## AGRADECIMIENTOS:

Es para mí muy importante poder plasmar en este apartado todo mi reconocimiento a quienes han hecho posible la realización de este trabajo de Tesis Doctoral.

Mi agradecimiento:

Al Dr. D. José Juan García Marín, por la dirección de este trabajo, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis y también por haberme permitido conocer y trabajar con su grupo de investigación. La conjunción de su gran desarrollo en el plano científico y su maravilloso sentido altruista han sido fundamentales para potenciar mi voluntad de estudio e investigación acompañada por un equipo de excelencia.

A la Dra. Dña. Rocío I. Rodríguez Macías por la dirección de este trabajo, por su profesionalidad, su permanente e incondicional supervisión y su eximia calidad docente. Muchas veces me ha enseñando sin decir palabra alguna. Ha dejado en mí un acervo de conocimientos, los cuales agradezco enormemente y trasladaré a quienes me rodean.

A la Dra. Dña. M<sup>a</sup> Jesús Monte Río, por la dirección de este trabajo, por sus aportes claros y concretos brindados durante las jornadas de trabajo. Le agradezco también la confianza y el apoyo que me ha brindado durante mi permanencia en el grupo HEVEFARM del Departamento de Fisiología y Farmacología y el haber estado siempre dispuesta a responder inquietudes que le he planteado, como también haberme hecho sentir partícipe del grupo, lo cual facilitó mucho mi tarea.

A la Dra. Dña. M<sup>a</sup> Ángeles Serrano García, por aceptarme para realizar tareas con el grupo, por todo lo aprendido gracias a la calidad de los trabajos de investigación previos sobre el tema de estudio de esta Tesis, a los que se suma un enorme valor agregado, su cordialidad y calidad humana en todas las reuniones mantenidas. Tanto ella, como el resto del equipo, eran conocidos por mí a través de sus múltiples publicaciones, y fue impactante conocer a mis papers en vivo e *in situ!*

A todos los integrantes del grupo HEVEFARM (Óscar, M<sup>a</sup> José, Marta, Elisa Herráez, Elisa Lozano y Alba) con quien he compartido momentos amenos, y quienes han facilitado mis actividades de uno u otro modo.

Al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular por haberme permitido utilizar las instalaciones.

A todos los técnicos, auxiliares de laboratorio y secretarias que contribuyen para que la tarea pueda realizarse.

Quiero agradecer también al personal de distintas áreas del Hospital Ramón Sardá que colaboró para que la investigación pueda realizarse.

A la jefa de División Laboratorio Bioquímica Liliana Botto por haber permitido el uso de las instalaciones y haber consensuado con el personal la colaboración en el estudio.

A la Jefa de Sección Bioquímica Clínica: Bioquímica María del Carmen Moirón y su grupo de colaboradores quienes trabajaron día a día en el procesamiento y la conservación de las muestras.

A la encargada de Inmuno Serologías: Bioquímica Mónica Nadal por colaborar en el procesamiento de las muestras para dar cumplimiento a los requisitos para su traslado a España.

A todos los Bioquímicos de guardia que sumaron al trabajo asistencial y durante las 24 horas del día, la tarea de preparación del material del estudio, previamente a su conservación.

A todos los médicos integrantes del “Grupo de Estudio: Colestasis Intrahepática Gestacional” por trabajar en forma continua para mejorar la calidad de atención de nuestras pacientes .

Un especial reconocimiento a mi queridísima y sabia Dra. “Pesi”, por estar siempre a mi lado brindándome confianza y mostrarme un camino despejado hasta llegar a concretar el logro de este trabajo de Tesis Doctoral.

A mis padres, que desde algún lugar acompañan siempre mis decisiones, y a mis hijos, que siempre las aceptan y me ayudan todas las veces que los necesito.

**Eternamente... gracias a todos.**

## ABREVIATURAS

**ABC:** "ATP binding cassette"

**APEG:** alto peso para la edad gestacional

**ASBT:** "apical sodium-dependent bile acid transporter"

**BCRP:** "breast cancer resistance protein"

**BPEG:** bajo peso para la edad gestacional

**BSEP:** "bile salt export pump"

**CA:** ácido cólico

**CIG:** colestasis intrahepática gestacional

**CK-7:** citokeratina-7

**Ct:** ciclo umbral

**DAPI:** 4,6-diamino-2-fenilindol

**DCA:** ácido desoxicólico

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**EASL:** European Association for the Study of the Liver

**EEM:** error estándar de la media

**ESI:** ionización por electronebulización

**FCF:** frecuencia cardiaca fetal

**FXR:** "farnesoid X receptor"

**GAPDH:** gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GCA:** ácido glicocólico

**GDCA:** ácido glicodesoxicólico

**GGT:** gamma-glutamil transferasa

**GLCA:** ácido glicolitocólico

**GOT:** transaminasa glutámico oxalacética

**GPT:** transaminasa glutámico pirúvica

**GQDCA:** ácido glicoquenodesoxicólico

**GST:** glutatión-S-transferasa

**GUDCA:** ácido glicoursodesoxicólico

**HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia

**HyoDCA:** ácido hyodesoxicólico

**IS:** estándar interno

**LCA:** ácido litocólico

**LDL:** lipoproteína de baja densidad

**MAPK:** "mitogen-activated protein kinases"

**MDR:** “multidrug resistance protein”

**MLA:** meconio en líquido amniótico

**MRM:** método de análisis en QQQ, del inglés, “multiple reaction monitoring”

**MRP:** “multidrug resistance-associated protein”

**MS:** espectrometría de masas

**MS/MS:** espectrometría de masas en tándem

**m/z:** relación masa molecular/carga eléctrica

**NICE:** National Institute for Health and Clinical Excellence

**NTCP:** “sodium taurocholate cotransporting polypeptide”

**nDCA:** ácido nor-desoxicólico

**OATP:** “organic anion transporting polypeptide”

**OR:** “odds ratio”

**OST:** “organic solute transporter”

**PBS:** tampón fosfato salino

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PMS:** metabolito sulfatado de progesterona

**PM4-S:** alopregnanolona sulfato

**PM5-S:** epialopregnanolona sulfato

**PM6-S:** pregnanolona sulfato

**PM7-S:** epipregnanolona sulfato

**QDCA:** ácido quenodesoxicólico

**QQQ:** analizador triple cuadrupolo

**RNA:** ácido ribonucleico

**RNA<sub>m</sub>:** RNA mensajero

**RT:** transcripción reversa

**SIM:** método de análisis en QQQ, del inglés, “single ion monitoring”

**TCA:** ácido taurocólico

**TDCA:** ácido taurodesoxicólico

**TLCA:** ácido taurolitocólico

**TQDCA:** ácido tauroquenodesoxicólico

**TSLCA:** ácido taurosulfolitocólico

**TUDCA:** ácido tauroursodesoxicólico

**T $\alpha$ MCA:** ácido tauro-alfa-muricólico

**UDCA:** ácido ursodesoxicólico

**$\alpha$ MCA:** ácido alfa-muricólico

**$\beta$ MCA:** ácido beta-muricólico

# ÍNDICE

<b>1. OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>2.1. ÁCIDOS BILIARES</b>	<b>7</b>
2.1.1. BIOSÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS BILIARES	8
2.1.2. CONJUGACIÓN DE LOS ÁCIDOS BILIARES	8
2.1.3. PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS ÁCIDOS BILIARES	9
<b>2.2. FUNCIÓN EXCRETORA DEL HÍGADO ADULTO</b>	<b>10</b>
2.2.1. CAPTACIÓN HEPATOCELULAR DE ÁCIDOS BILIARES	10
2.2.2. EFLUJO HEPATOCELULAR DE ÁCIDOS BILIARES	11
<b>2.3. FUNCIÓN EXCRETORA DEL HIGADO FETAL</b>	<b>16</b>
<b>2.4. LA PLACENTA</b>	<b>18</b>
2.4.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA	18
2.4.2. CIRCULACIÓN PLACENTARIA	20
2.4.3. EXCRECIÓN DE ÁCIDOS BILIARES FETALES POR LA PLACENTA	21
<b>2.5. COLESTASIS INTRAHEPÁTICA GESTACIONAL</b>	<b>24</b>
2.5.1. EPIDEMIOLOGÍA	25
2.5.2. FACTORES ETIOPATOGÉNICOS	26
2.5.3. PRONÓSTICO DE LA ENFERMEDAD, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	30
2.5.4. MECONIO EN LÍQUIDO AMNIÓTICO Y CIG	35
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>37</b>

<b>3.1. PACIENTES Y MUESTRAS</b>	<b>39</b>
<b>3.2. MATERIAL</b>	<b>41</b>
4.2.3. PRODUCTOS	41
4.2.2. MEDIOS INSTRUMENTALES	42
<b>3.3. EXTRACCIÓN DE ESTEROIDES DEL SUERO</b>	<b>45</b>
<b>3.4. EQUIPO DE HPLC-MS/MS</b>	<b>46</b>
<b>3.5. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE RNAm POR RT-PCR CUANTITATIVA</b>	<b>48</b>
3.5.1. EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL	48
3.5.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)	48
3.5.3. DISEÑO DE CEBADORES	48
3.5.4. REALIZACIÓN DE LA PCR CUANTITATIVA	49
3.5.5. CUANTIFICACIÓN RELATIVA	49
<b>3.6. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA</b>	<b>51</b>
3.6.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS	51
3.6.2. INMUNODETECCIÓN	51
<b>3.7. DETERMINACIONES ANALÍTICAS</b>	<b>52</b>
<b>3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>52</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>55</b>
<b>4.1. ESTUDIO RETROSPECTIVO EN PACIENTES CON COLESTASIS GESTACIONAL</b>	<b>57</b>
4.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PACIENTES CON CIG	58
4.1.2. DATOS DE LABORATORIO	66
4.1.3. TRATAMIENTO CON UDCA	69

4.1.4. ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DE MLA Y DISTINTOS PARÁMETROS .....	73
4.1.5. CARACTERÍSTICAS DE LOS NEONATOS HIJOS DE MUJERES CON CIG .....	78
<b>4.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON UDCA EN LA COLANEMIA MATERNA .....</b>	<b>87</b>
<b>4.3. CAMBIOS EN LA COLANEMIA EN MADRES Y FETOS INDUCIDOS POR LA COLESTASIS GESTACIONAL. EFECTO DEL UDCA .....</b>	<b>91</b>
<b>4.4. CAMBIOS EN LOS NIVELES DE PROGESTERONA Y SUS METABOLITOS EN SITUACIONES DE COLESTASIS GESTACIONAL. EFECTO DEL UDCA .....</b>	<b>101</b>
<b>4.5. EFECTO DE LA COLESTASIS GESTACIONAL Y DEL TRATAMIENTO CON UDCA EN LA BARRERA PLACENTARIA PARA ÁCIDOS BILIARES Y DERIVADOS DE PROGESTERONA .....</b>	<b>109</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>113</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>117</b>



# 1. OBJETIVOS



La colestasis intrahepática gestacional (CIG), la más frecuente de las patologías hepáticas que aparecen en la gestación, cursa con prurito y un perfil bioquímico caracterizado por un aumento de la concentración sérica de ácidos biliares y, frecuentemente, también de las enzimas hepáticas y la bilirrubina. Su etiología es probablemente multifactorial. Aunque se trata, en general, de una enfermedad benigna para la madre, se asocia a graves riesgos para el *conceptus*, como parto pre-término, presencia de meconio en líquido amniótico, distrés respiratorio neonatal y muerte fetal intraútero.

El mejor indicador de la severidad con que la CIG puede afectar al feto es el grado de acumulación de ácidos biliares en suero materno. En la CIG existe una alteración de la homeostasis materno-fetal de ácidos biliares, de manera que el gradiente de estas moléculas, que en gestaciones normales va en sentido feto-a-madre, se invierte, y existe un flujo neto de ácidos biliares a través de la placenta en sentido madre-a-feto. Así pues, el feto se ve expuesto a mayores niveles de estos compuestos potencialmente tóxicos que, teniendo en cuenta la fragilidad de los tejidos en desarrollo, suponen una situación de mayor riesgo que cuando esos mismos niveles se encuentran en adultos.

Aunque los derivados sulfatados de progesterona podrían estar implicados en la etiopatogénesis de la CIG se desconoce su origen o si están también elevados en el compartimento fetal. El ácido ursodesoxicólico (UDCA) es el fármaco de elección en el tratamiento de la CIG. Parte de su acción beneficiosa se debe a que mejora la función biliar en la madre y reduce su prurito. Sin embargo, no sabemos si en su mecanismo de acción se incluye la corrección de los elevados niveles de derivados sulfatados de progesterona.

En base a estos antecedentes se planteó como **objetivo general** de esta Tesis Doctoral el mejorar los criterios utilizados en la valoración de estas pacientes, así como investigar el mecanismo de acción del UDCA en CIG. Para alcanzarlo se plantearon los siguientes objetivos parciales:

**Objetivo 1º:** Llevar a cabo un estudio de corte transversal analítico en pacientes con CIG para identificar factores con valor diagnóstico y/o pronóstico y establecer, en su caso, la prevalencia y asociación de éstos con un mayor riesgo perinatal.

**Objetivo 2º:** Determinar a término en gestaciones con CIG los niveles séricos de ácidos biliares y derivados sulfatados de progesterona en el trinomio suero materno-placenta-suero fetal, y el efecto del tratamiento con UDCA sobre los mismos.

**Objetivo 3º:** Investigar a término en gestaciones con CIG la función de la barrera placentaria para ácidos biliares y derivados sulfatados de progesterona y si ésta se ve afectada por el tratamiento con UDCA.

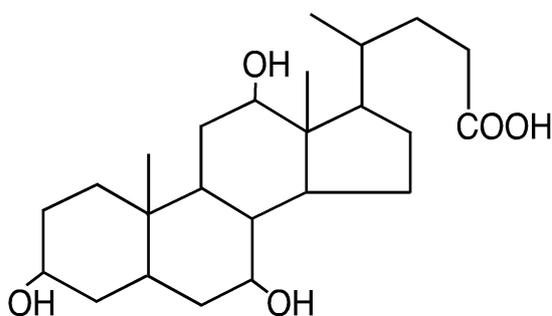
## **2. INTRODUCCIÓN**



## 2.1. ÁCIDOS BILIARES

Los ácidos biliares son ácidos carboxílicos que se forman en el hígado como resultado del metabolismo del colesterol. Son compuestos hidrosolubles, fácilmente excretables y con utilidad en procesos digestivos, que presentan una estructura anfipática, con una región hidrófila y otra hidrófoba, que les confiere propiedades detergentes, y que les permite asociarse entre sí y formar micelas a partir de una concentración determinada.

Respecto a su estructura química, los ácidos biliares son esteroides con 24 átomos de carbono, saturados, mono o polihidroxilados y con un grupo carboxilo en la cadena lateral, que puede estar conjugado con glicina o taurina (Lester, 1983). Los ácidos biliares primarios son el ácido cólico (CA: 3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -trihidroxi-5 $\beta$ -colanoico) y el ácido quenodesoxicólico (QDCA: 3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colanoico). Se sintetizan directamente en el hígado y a su paso por el intestino las bacterias de la flora intestinal los degradan dando lugar a los denominados ácidos biliares secundarios, que carecen del grupo hidroxilo en posición 7 $\alpha$ . Así, a partir del CA se produce el ácido desoxicólico (DCA), y a partir de QDCA se produce el ácido litocólico (LCA). Además de ésta, existen otras transformaciones minoritarias que producen una gran variedad de derivados de ácidos biliares. En los fluidos biológicos la mayoría de los ácidos biliares se encuentra en forma de sales, formas ionizadas solubles de estos compuestos. En la figura I-1 se muestra la estructura química del CA.



(CA).

Figura I-1. Estructura química del ácido cólico

Estos compuestos endógenos permanecen en su mayoría reclusos en la **circulación enterohepática** gracias a la existencia de proteínas transportadoras específicas localizadas en las membranas apical y basal de los ileocitos, y basolateral y canalicular de los hepatocitos. Los ácidos biliares son secretados a la bilis y concentrados en la vesícula biliar y tras la ingesta, alcanzan el duodeno, donde llevan a cabo sus funciones de digestión y absorción de las grasas y vitaminas liposolubles. La mayoría son reabsorbidos de forma activa en el íleon, aunque una alta proporción

de ácidos biliares dihidroxilados conjugados con glicina se reabsorben pasivamente en el yeyuno (Angelin et al., 1976) y los ácidos biliares libres (generalmente desconjugados por las bacterias intestinales durante el tránsito intestinal) se reabsorben de forma pasiva en el colon (Mekhjian et al., 1979). Los ácidos biliares reabsorbidos pasan mayoritariamente (99%) a las ramas de la vena porta, son transportados principalmente unidos a albúmina y lipoproteínas (Kramer et al., 1979), y son captados con gran eficacia por los transportadores de la membrana sinusoidal de los hepatocitos. Este ciclo se lleva a cabo unas 6-10 veces al día (3-4 veces por comida) con escasas pérdidas fecales, y los ácidos biliares que se pierden son reemplazados por moléculas de nueva síntesis.

### 2.1.1. BIOSÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS BILIARES

Los ácidos biliares primarios se sintetizan a partir del colesterol a través de dos vías:

- i) la vía clásica o vía neutra, denominada así porque los compuestos intermediarios son esteroides neutros. Sus productos principales son el CA y el QDCA en cantidades similares, y el paso limitante es la hidroxilación en el C7 del núcleo esteroideo llevada a cabo por la enzima microsomal colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa (gen *CYP7A1*).
- ii) la vía alternativa o vía ácida, en la que los compuestos intermediarios tienen carácter ácido. El producto mayoritario de esta vía es el QDCA (Bjorkhem, 1992), y el paso limitante es la hidroxilación en el C27 de la cadena lateral llevada a cabo por la enzima mitocondrial colesterol 27-hidroxilasa (gen *CYP27A1*).

La contribución relativa de estas vías a la biosíntesis global de ácidos biliares no está muy clara, aunque parece ser que la vía clásica desempeña un papel principal en la biosíntesis de ácidos biliares en humanos en condiciones fisiológicas, mientras que la vía alternativa puede adquirir un papel fundamental en pacientes con enfermedades hepáticas, y se cree que es la vía predominante durante la vida fetal (Deleze et al., 1978).

### 2.1.2. CONJUGACIÓN DE LOS ÁCIDOS BILIARES

Las principales biotransformaciones que experimentan los ácidos biliares son conjugaciones con aminoácidos (glicina o taurina), sulfato o ácido glucurónico. A diferencia de la amidación con glicina o taurina, la glucuronidación y la sulfatación son vías minoritarias en individuos sanos. Sin embargo, cobran importancia en situaciones,

como la colestasis, en las que los ácidos biliares se acumulan en el hepatocito, donde se sulfatan y glucuronidan para posteriormente ser regurgitados al plasma, desde donde se eliminan por vía renal (Hofmann, 1994).

### 2.1.3. PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS ÁCIDOS BILIARES

Los efectos fisiológicos de los ácidos biliares son muy diversos. En el hígado, su secreción genera el flujo biliar dependiente de los ácidos biliares por su efecto osmótico en la luz canalicular. Inducen la secreción de lípidos biliares, principalmente fosfolípidos y colesterol, y modulan la biosíntesis de colesterol. El flujo de ácidos biliares a través del hepatocito determina la cantidad de receptores de membrana para las lipoproteínas de baja densidad (LDL). En la bilis forman micelas que transportan sustancias hidrofóbicas (colesterol, protoporfirinas, etc) y actúan como tampones para el  $\text{Ca}^{2+}$ .

Las micelas, a nivel intestinal, permiten emulsionar las grasas y vitaminas liposolubles (A, D, E y K) de la dieta, facilitando así su absorción. También activan lipasas intestinales, modulan la actividad de proteasas, la motilidad intestinal, la secreción de hormonas gastrointestinales, como la colecistoquinina (Combettes et al., 1992; Izukura et al., 1991), e inducen la secreción de agua y electrolitos.

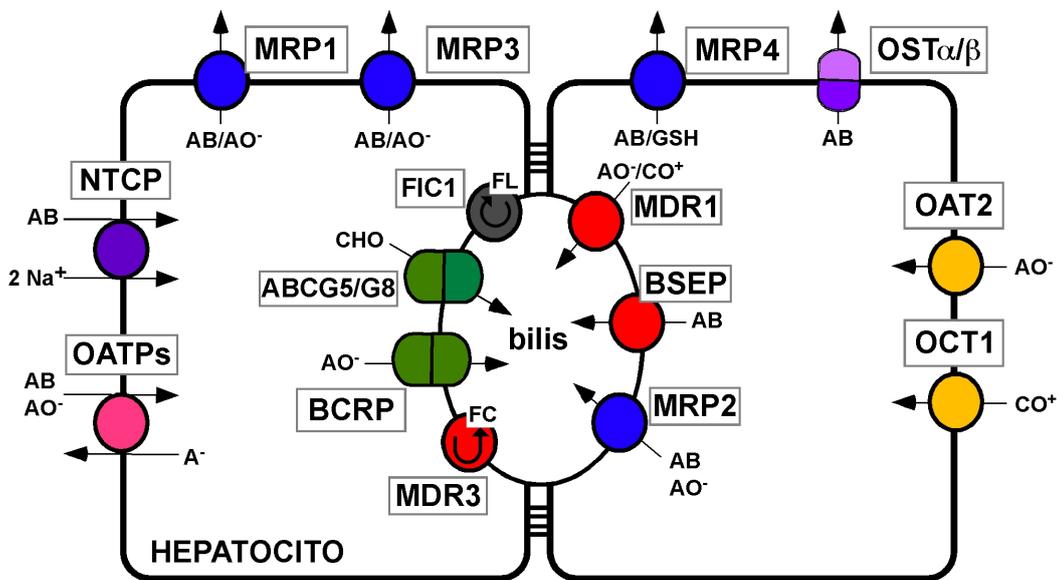
Se ha descrito que los ácidos biliares intervienen en la regulación del metabolismo de lípidos y de la glucosa (Houten et al., 2006), y también se ha confirmado que inhiben la obesidad inducida por la dieta y previenen el desarrollo de resistencia a la insulina (Ikemoto et al., 1997; Zhou & Hylemon, 2014), lo que sugiere que estos compuestos participan en la homeostasis energética.

En los últimos años se ha descrito que los ácidos biliares son moléculas de señalización con funciones sistémicas endocrinas (Zhou & Hylemon, 2014). Son capaces de activar cascadas de proteínas quinasas activadoras de mitógenos (MAPK, de "mitogen-activated protein kinases") (Qiao et al., 2003), son ligandos del receptor de membrana TGR5 (Kawamata et al., 2003) y activan receptores nucleares como FXR (de "farnesoid X receptor") (Houten et al., 2006).

Además, se ha demostrado su participación en el control de la proliferación y la apoptosis en tejidos en los que los ácidos biliares se encuentran en concentraciones elevadas (Benz et al., 1998; Marin et al., 1993).

## 2.2. FUNCIÓN EXCRETORA DEL HÍGADO ADULTO

Los sistemas de transporte hepatobiliar son esenciales para la formación de la bilis y la eliminación hepática de xenobióticos y compuestos endógenos, entre los que se incluyen los ácidos biliares (Trauner & Boyer, 2003). Estos compuestos que presentan afinidad por la vía de excreción biliar se denominan en su conjunto **compuestos colefilicos**. En la figura I-2 se muestran los principales transportadores, presentes en los hepatocitos, implicados en la captación y secreción de compuestos biliares.



**Figura I-2.** Representación esquemática de los sistemas de transporte implicados en la captación y secreción de compuestos colefilicos. AB, ácidos biliares;  $AO^-$ , aniones orgánicos;  $CO^+$ , cationes orgánicos; CHO, colesterol; GSH; glutation reducido; FC, fosfatidilcolina; FL, fosfolípidos.

### 2.2.1. CAPTACIÓN HEPATOCELULAR DE ÁCIDOS BILIARES

La membrana sinusoidal o basolateral de los hepatocitos está en contacto directo con la sangre portal a través de las células endoteliales de los sinusoides y del espacio de Disse.

La captación de ácidos biliares es realizada fundamentalmente por el co-transportador de taurocolato y sodio (NTCP de "Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporter polypeptide", gen *SLC10A1*) (Figura I-2) (Meier & Stieger, 2002).

También pertenece a esta familia de transportadores ASBT (de "Apical Na<sup>+</sup>-dependent bile salt transporter", gen *SLC10A2*), localizado en la membrana apical de los ileocitos,

y principal responsable de la captación intestinal de ácidos biliares. Su expresión también se ha detectado en el túbulo proximal renal (Craddock et al., 1998) y en colangiocitos (Lazaridis et al., 1997).

La captación de ácidos biliares independiente de  $\text{Na}^+$  es llevada a cabo por los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATPs de “Organic anion-transporting polypeptides”, genes *SLCO*), codificados por la familia de genes *SLCO* antes denominada *SLC21* (Hagenbuch & Meier, 2004).

Hasta el momento se han identificado 52 miembros de esta familia, de los que 11 se encuentran en humanos (Hagenbuch & Meier, 2004). En el hígado humano están expresadas fundamentalmente las isoformas OATP1A2 (*SLCO1A2*), OATP1B1 (*SLCO1B1*), OATP1B3 (*SLCO1B3*) y OATP2B1 (*SLCO2B1*) (Figura I-2 ) (Kullak-Ublick et al., 2001).

Una característica importante de las OATPs es la amplia variedad de sustratos que transportan, entre los que destacan ácidos biliares, colorantes orgánicos, conjugados de esteroides, hormonas tiroideas, bilirrubina conjugada (Cui et al., 2001) y no conjugada (Briz et al., 2003), y otras sustancias xenobióticas (Hagenbuch & Meier, 2004). Hay que señalar que la captación de ácidos biliares por los OATPs es cuantitativamente menos importante que la sodio-dependiente mediada por NTCP (Kullak-Ublick et al., 2000).

Aunque la especificidad de sustrato de las cuatro principales isoformas presentes en hígado humano se solapa en gran medida, cada una de ellas presenta ciertas peculiaridades. En lo que se refiere al transporte de ácidos biliares, OATP1B1 es la isoforma más relevante en la captación de estas moléculas (Kullak-Ublick et al., 2000; Meier & Stieger, 2002) aunque OATP1B3 también es capaz de transportar ácidos biliares libres y conjugados (Briz et al., 2006; Kullak-Ublick et al., 2001).

### 2.2.2. EFLUJO HEPATOCELULAR DE ÁCIDOS BILIARES

Uno de los pasos limitantes en el conjunto de los procesos de transporte de compuestos colefílicos desde la sangre hasta la bilis es la secreción canalicular (Erlinger, 1996). La mayoría de los sistemas de transporte canaliculares implicados en la formación de bilis pertenecen a la superfamilia de proteínas ABC (de “ATP-binding cassette”) (Gatmaitan & Arias, 1995), que se caracterizan por ser proteínas integrales de membrana capaces de translocar una gran variedad de sustancias a través de las membranas celulares utilizando la energía de la hidrólisis del ATP.

Se han caracterizado más de 48 genes *ABC* en humanos, que pueden clasificarse en siete subfamilias basándose en sus características filogenéticas y su secuencia de aminoácidos (Dean & Annilo, 2005). Estas proteínas participan en numerosos procesos fisiológicos, como la homeostasis de esteroides, mecanismos inmunes y el transporte de sustancias endógenas y exógenas como azúcares, aminoácidos, metales, iones, péptidos y proteínas, así como un gran número de compuestos hidrofóbicos.

#### ▪ SUBFAMILIA *ABCB*

Uno de los primeros transportadores ABC descritos y mejor caracterizados es MDR1 (de "Multidrug resistance protein 1", gen *ABCB1*) o P-glicoproteína (Pgp) (Juliano, 1976). Inicialmente se la identificó como la proteína de membrana plasmática responsable del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos en células tumorales (Bosch & Croop, 1996; Goldstein, 1996; Goldstein et al., 1991), pero en la actualidad está bien establecida su presencia en células sanas como en el borde en cepillo de los túbulos renales, en la membrana canalicular de los hepatocitos, en la membrana apical de los enterocitos y en las membranas lumenales de las células endoteliales del cerebro (Cordon-Cardo et al., 1990).

A pesar de que se ha convertido en la proteína modelo en muchos de los estudios de caracterización del mecanismo de transporte de las bombas ABC (Seeger & van Veen, 2009), su papel en la formación de la bilis no está aún completamente esclarecido, aunque contribuye a la excreción canalicular de fármacos y otros xenobióticos.

Otro miembro de esta familia involucrado en la secreción de compuestos colefílicos al canalículo biliar es MDR3 (gen *ABCB4*), también denominada Mdr2 en roedores (Smit et al., 1993). Esta proteína está implicada en la translocación de fosfatidilcolina desde la cara interna a la externa de la bicapa lipídica de la membrana plasmática (Ruetz & Gros, 1994), jugando un papel fundamental para neutralizar el efecto detergente de los ácidos biliares, presentes en la bilis a una concentración elevada.

Otra ATPasa localizada en la membrana canalicular de los hepatocitos y que también transloca fosfolípidos de una cara a otra de la membrana es FIC1 o ATP8B1. Esta proteína no es un miembro de la familia ABC sino que se trata de una ATPasa de tipo II que transloca aminofosfolípidos de la cara externa a la interna, modulando la asimetría de la misma (Mouro et al., 1999).

La bomba exportadora de sales biliares (BSEP; gen *ABCB11*) es una glicoproteína de 140 kDa que se considera el principal mecanismo de secreción de ácidos biliares

monoaniónicos conjugados a bilis, mostrando una mayor afinidad por tauroquenodesoxicólico (TQDCA)> taurocólico (TCA)> tauroursodesoxicólico (TUDCA)> glicocólico (GCA) (Byrne et al., 2002; Gerloff et al., 1998).

La expresión de BSEP es predominantemente hepática, localizándose en los canaliculos biliares y en vesículas subcanaliculares de los hepatocitos. Las mutaciones del gen *ABCB11* humano pueden determinar un subtipo de Colestasis Intrahepática Familiar Progresiva o PFIC2 (“Progressive familial intrahepatic cholestasis 2”) que cursa con prurito extremo, retraso en el crecimiento y progresión hacia la cirrosis en la primera década de vida.

#### ▪ SUBFAMILIA ABCC

De esta subfamilia de transportadores ABC, denominadas proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos o MRPs (de “Multidrug resistance-associated protein”), MRP2 (gen *ABCC2*) es la que presenta una mayor expresión en el hígado. Esta proteína, de aproximadamente 190 kDa, está localizada en el dominio apical de la membrana plasmática de células polarizadas, como hepatocitos, epitelio del túbulo proximal renal y epitelio intestinal. Desempeña un papel fundamental en la detoxificación hepática mediando la excreción a la bilis de aniones orgánicos endógenos y xenobióticos (Jedlitschky et al., 1997), contribuyendo a la fuerza motriz que genera el flujo biliar. Su especificidad de sustrato es amplia, aunque tiene una mayor afinidad por los conjugados de glutation, ácido glucurónico o sulfato y algunos esteroides (Nies & Keppler, 2007).

La deficiencia adquirida o hereditaria de MRP2 en humanos, como el síndrome de Dubin-Johnson, provoca un incremento en la concentración de glucurónidos de bilirrubina en sangre, debido al reflujo de estos compuestos desde los hepatocitos hacia la sangre sistémica mediado principalmente por MRP3 (*ABCC3*), localizada en la membrana basolateral de los hepatocitos, como mecanismo compensatorio del deficiente eflujo apical mediado por MRP2 (Kartenbeck et al., 1996). La contribución de MRP3 en la homeostasis de los ácidos biliares aún no está clara, aunque en humanos se ha demostrado que transporta GCA con baja afinidad (Zeng et al., 2000).

Otro miembro de esta familia localizado en la membrana basolateral de los hepatocitos es MRP1 (*ABCC1*). En condiciones normales se encuentra poco expresada en hígado y transporta ácidos biliares dianiónicos como taurosulfolitocólico (TSLCA) y TQDCA (Trauner & Boyer, 2003).

Cuando la ruta de excreción biliar no es funcional, como ocurre en situaciones de colestasis o endotoxemia, se induce la expresión de MRP1 y MRP3 (Donner & Keppler, 2001; Soroka et al., 2001; Vos et al., 1998), que en condiciones normales están muy poco expresadas (Ogawa et al., 2000; Roelofsen et al., 1997). Este hecho es una respuesta adaptativa para reducir los efectos citotóxicos producidos por la acumulación de compuestos colefilicos, mediante su transporte de nuevo a la circulación sistémica para su posterior eliminación por vía renal (Tanaka et al., 2002).

Se ha demostrado que MRP4 (*ABCC4*), también localizada en la membrana basolateral, co-transporta ácidos biliares junto con GSH hacia el exterior del hepatocito (Rius et al., 2006; Rius et al., 2003), además de distintos fármacos. MRP4 presenta una alta afinidad por los conjugados con glicina y taurina de los ácidos QDCA y ursodesoxicólico (UDCA), además del CA (Rius et al., 2006; Rius et al., 2003).

Mientras que MRP1 y MRP4 se distribuyen ampliamente en el organismo, MRP3 parece estar principalmente expresada en hígado, riñón e intestino (Borst et al., 1999).

#### ▪ SUBFAMILIA ABCG

Los miembros de esta familia son hemitransportadores o “half transporters” que forman dímeros (homo o heterodímeros) mediante puentes disulfuro para dar lugar a un complejo de transporte funcional capaz de expulsar fuera de la célula una amplia variedad de sustratos utilizando energía de la hidrólisis del ATP.

La mayoría de los miembros de esta subfamilia, como ABCG1, ABCG4, ABCG5 y ABCG8, son bombas exportadoras de colesterol (Kusuhara & Sugiyama, 2007). Los que presentan una mayor expresión en los hepatocitos son los transportadores ABCG5 y ABCG8, que forman un heterodímero localizado en la membrana canalicular (Graf et al., 2003).

**BCRP** (de “Breast cancer resistance protein”; gen *ABCG2*) es otro miembro de esta familia de transportadores, que presenta una especificidad de sustrato mucho más amplia que el resto, incluyendo una gran variedad de fármacos antitumorales. La distribución tisular de BCRP es casi ubicua destacando su expresión en placenta, cerebro, riñón, hígado y colon (Allikmets et al., 1998). En los hepatocitos BCRP se localiza en la membrana canalicular.

Entre los compuestos endógenos que son sustratos de BCRP se encuentran varios esteroides, incluyendo los ácidos biliares (Blazquez et al., 2012), aunque transporta

con mayor eficacia derivados de estrógenos sulfatados (Imai et al., 2003; Janvilisri et al., 2005; Xu et al., 2004), y porfirinas (Krishnamurthy et al., 2004).

#### ▪ OTRAS PROTEÍNAS EXPORTADORAS

En los últimos años se ha puesto de manifiesto el papel del heterodímero OST $\alpha$ /OST $\beta$  (de “Organic solute transporter  $\alpha/\beta$ ”) en la circulación enterohepática de los ácidos biliares. Este heterodímero se localiza en la membrana basolateral de enterocitos y hepatocitos, además de en otros tejidos, y se encarga de expulsar al torrente sanguíneo ácidos biliares y otros esteroides sulfatados mediante un mecanismo de difusión facilitada (Ballatori, 2005; Ballatori et al., 2005; Dawson et al., 2005).

### 2.3. FUNCIÓN EXCRETORA DEL HIGADO FETAL

El feto posee desde temprana edad equipos enzimáticos de relativa madurez capaces de sintetizar ácidos biliares (Colombo et al., 1985; Nakagawa & Setchell, 1990), aunque la excreción biliar de estos compuestos por el hígado fetal es bastante deficiente.

A partir de resultados en modelos animales se ha propuesto que una de las causas posibles es la tardía expresión de las bombas canaliculares Mrp2 y Bsep en el hígado fetal (Macias et al., 2006; Serrano et al., 2003; Zinchuk et al., 2002). A pesar de ello, se han detectado pequeñas cantidades de ácidos biliares en la vesícula biliar y meconio de fetos humanos obtenidos de abortos de más de 12 semanas de edad (Colombo et al., 1987).

El desarrollo de las vías de síntesis de ácidos biliares precede a la maduración de los mecanismos implicados en la secreción biliar, por lo que los ácidos biliares fetales son regurgitados desde las células hepáticas hacia la sangre fetal, alcanzando niveles superiores a los que se encuentran en la sangre materna (Monte et al., 1995).

Aún no se conoce con exactitud cómo estos compuestos generados por el hígado fetal llegan a la sangre sinusoidal, aunque se han propuesto varias hipótesis. Una de ellas, es que la bidireccionalidad de algunas OATPs (Briz et al., 2006; Li et al., 2000; Mahagita et al., 2007) hace de ellas unas buenas candidatas para llevar a cabo esta función. Apoyando esta idea, se ha detectado la expresión de diversas isoformas de estos transportadores en el hígado fetal (Macias et al., 2006; St-Pierre et al., 2004). Otra posibilidad es que los compuestos colefílicos salgan de los hepatocitos fetales a través de bombas ABC localizadas en la membrana basolateral, como la Mrp1 y la Mrp3, cuya expresión se encuentra más elevada en el hígado fetal que en el materno (Macias et al., 2006; St-Pierre et al., 2004).

Se desconoce cuál es el papel de los ácidos biliares en la etapa fetal, cuando no son necesarios para participar en los procesos de digestión de grasas y vitaminas liposolubles de la dieta, sin embargo, el hígado fetal no sólo es capaz de sintetizar ácidos biliares primarios a partir del colesterol, principalmente CA y QDCA, sino también de conjugarlos (Balistreri et al., 1992; Colombo et al., 1985; Nakagawa & Setchell, 1990).

En la sangre fetal se han identificado numerosos ácidos biliares, algunos de los cuales son inusuales en adultos (Back & Walter, 1980; Deleze et al., 1978; Kimura et al., 1989; Setchell et al., 1988; Shoda et al., 1988; Tohma et al., 1985). Lo más llamativo del conjunto o "pool" de ácidos biliares fetales es la presencia de insaturaciones, junto

a niveles de hidroxilación mayores que en ácidos biliares de adultos, apareciendo ácidos biliares tetrahidroxilados. También existen peculiaridades en cuanto a la posición de los grupos hidroxilo. En el feto es posible encontrar hidroxilaciones en C1, C4 y C6 que no aparecen en adultos (Setchell et al., 1988), que convierten a estas moléculas en compuestos más hidrofílicos. Otra característica del “pool” de ácidos biliares fetales es la existencia de ácidos biliares planos debido a la presencia de insaturaciones en  $\Delta 4$  y  $\Delta 5$  o a la disposición en alfa del hidroxilo en C5 (Setchell et al., 1988).

En los últimos años se ha descubierto el papel de los ácidos biliares como moléculas de señalización con funciones endocrinas y paracrinas (Kawamata et al., 2003), y se ha descrito en la placenta la expresión del receptor de membrana TGR5 (Keitel et al., 2013), por lo que quizás pronto se pueda conocer el papel fisiológico, tanto de la síntesis temprana de ácidos biliares en el feto, como de la especial composición del “pool”.

Aunque el feto carece de flora bacteriana intestinal, se han encontrado pequeñas cantidades de ácidos biliares secundarios en suero fetal, como el DCA y el LCA, junto con ácidos biliares terciarios, como el UDCA, probablemente debido a la transferencia placentaria de estas moléculas desde la sangre materna al compartimento fetal (Monte et al., 1995).

La distinta composición del “pool” de ácidos biliares del feto y de la madre se ha explicado en términos de una selectiva transferencia transplacentaria de estos compuestos (Monte et al., 1995), junto con el distinto grado de maduración de la maquinaria enzimática relacionada con el metabolismo de los ácidos biliares (Balistreri et al., 1992).

Los ácidos biliares producidos por el feto deben ser transferidos a la circulación materna a través de la placenta, para su eliminación por el hígado, ya que si se acumulan en el compartimento fetal las consecuencias para el feto pueden ser muy graves, ya que sus tejidos son muy frágiles y están en desarrollo. En modelos de colestasis gestacional en la rata se ha visto que la hipercolanemia materna puede afectar al normal desarrollo del feto, siendo el hígado fetal el órgano más afectado (Macias et al., 2000).

## 2.4. LA PLACENTA

### 2.4.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA

La gestación es un estado activo y dinámico. En los primeros dos tercios de la misma, el objetivo principal del desarrollo embrionario es la organogénesis, mientras que en el último tercio se observa un rápido crecimiento fetal gracias a cambios en el metabolismo materno que permiten una mayor transferencia de nutrientes (Serrano, 2008).

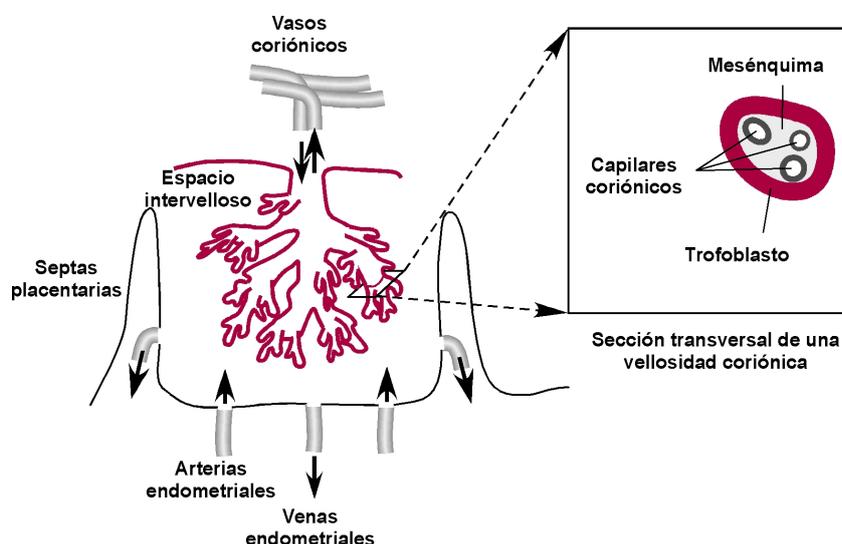
La placenta establece una estrecha relación entre el feto y su madre y desempeña un papel clave en la vida intrauterina atendiendo a las necesidades de respiración y nutrición del feto (Baticón, 1999). Además, procesa señales enviadas desde ambos compartimentos para regular la demanda fetal y el suministro materno de sustratos, asegura sus propias demandas metabólicas y transfiere sustancias de desecho fetal a la circulación materna (von Versen-Hoeynck & Powers, 2007).

La placenta humana a término es un órgano plano, redondeado u oval, de 15 a 20 cm de diámetro y de 2 a 3 cm de espesor en su parte más ancha, que llega a tener un peso de aproximadamente una sexta parte del peso fetal.

La implantación y la formación de la placenta son procesos altamente coordinados que implican interacciones entre las células maternas y embrionarias. La placenta comienza su desarrollo aproximadamente al final de la primera semana de gestación, cuando el blastocisto comienza a rodearse de múltiples capas de células epiteliales primordiales, el citotrofoblasto. Durante el primer trimestre, el rápido crecimiento de la placenta está dirigido principalmente por la multiplicación del citotrofoblasto, el cual predomina en este estadio del desarrollo. A medida que el citotrofoblasto pierde su actividad mitótica, se fusiona para formar el sincitiotrofoblasto, polinucleado y altamente polarizado, y el trofoblasto de anclaje y el trofoblasto de invasión de la decidua materna (Kliman, 2000). La invasión del trofoblasto en el epitelio uterino y el remodelado de las arterias espirales es lo que asegura que la unidad feto-placentaria en desarrollo reciba el suficiente suministro sanguíneo y que exista un transporte de nutrientes y gases eficiente y una eliminación adecuada de las sustancias de desecho (von Versen-Hoeynck & Powers, 2007).

Las vellosidades coriónicas son las unidades funcionales de la placenta (Figura I-3). Están constituidas por una estructura ramificada con una parte central de tejido conectivo o mesénquima que contiene macrófagos fetales o células de Hoffbauer, entre otras células, y que está fuertemente irrigada por capilares fetales (Kaufmann et al., 1985). El tejido que rodea las vellosidades y que está en contacto directo con la

sangre materna es el trofoblasto. Aunque sólo es un 13% de toda la placenta (aproximadamente 60 g) (Munro, 1980), juega importantes funciones en varios aspectos de la fisiología placentaria, como se comentará más adelante. Todas estas estructuras están rodeadas por lagos sanguíneos maternos.



**Figura I-3.** Dibujo esquemático de la estructura una vellosidad coriónica. Las flechas indican la dirección del flujo de sangre materna y fetal.

La mayor parte de la transferencia de nutrientes entre la madre y el feto ocurre a través de una única capa de células, el sincitiotrofoblasto. Los nutrientes de la sangre materna deben atravesar la membrana apical del sincitiotrofoblasto y, posteriormente, la membrana basolateral de dicha capa celular, que está adyacente al endotelio de los capilares fetales (Serrano, 2008).

Además de esta función nutricional, el sincitiotrofoblasto también posee una función endocrina presentando una alta tasa de síntesis y secreción de hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, etc. Esta característica función concuerda con la abundancia de ribosomas unidos al retículo endoplasmático, mientras que su capacidad de absorción se manifiesta por la presencia de las microvellosidades en la cara apical. En algunos puntos estas microvellosidades desaparecen y algunos autores sugieren que estas zonas lisas de la membrana son lugares clave en el intercambio de líquidos entre ambos compartimentos (Behrman, 1992).

En contraste, las células del citotrofoblasto constituyen estructuras bien definidas, con un citoplasma rico en ribosomas, de los cuales pocos están unidos al retículo endoplasmático, lo que sugiere una escasa capacidad secretora (Munro, 1980).

Una característica que hace de la placenta un órgano esencial durante la gestación es que permite la autonomía circulatoria del feto y mantiene una barrera inmunológica materno-fetal (Baticón, 1999).

#### **2.4.2. CIRCULACIÓN PLACENTARIA**

Las vellosidades coriónicas carecen de vasos sanguíneos durante las primeras dos a tres semanas de gestación, momento en el cual el embrión no posee aún un sistema circulatorio. Hacia el final de la tercera semana se forman islotes sanguíneos, que pronto se rodean de paredes vasculares primitivas y, tras ramificarse, dan lugar a la vascularización del corion. Al mismo tiempo se desarrollan el corazón y el sistema circulatorio fetal. Al final de la cuarta semana se establecen conexiones entre los vasos del corion y los del feto, formándose así un sistema circulatorio feto-placentario.

El flujo materno no se establece hasta las semanas 10-12 de la gestación (Burton & Jauniaux, 2004; Jauniaux et al., 2000). Durante el primer trimestre, antes del inicio de la llegada de sangre al espacio intervelloso, la nutrición fetal es hitiotrófica, con procesos de fagocitosis de secreciones glandulares endometriales por parte del trofoblasto (Burton & Jauniaux, 2001; Burton et al., 2002). Después de las semanas 10-12 de gestación, la sangre materna ya está en contacto con las vellosidades y tanto la transferencia de nutrientes y gases, como la eliminación de productos de desecho, se llevan a cabo a través de las membranas placentarias.

En humanos, la sangre materna se canaliza al útero por las arterias uterinas y arterias espirales desde donde surgen las arterias tortuosas. A través de los orificios de la placa basal de la placenta la sangre alcanza el espacio intervellotario. La presión de la sangre que entra tiende a rechazar a la sangre ya presente hacia la placa basal, desde donde se escapa por las numerosas comunicaciones existentes entre el espacio intervellotario y las dilatadas venas de la decidua basal, para recogerse finalmente, en su mayor parte, por el seno marginal. El resto de la sangre venosa materna es drenada por las venas uterinas situadas en la decidua basal, cuyas ramas se sitúan en las septas deciduales que separan la placenta en lóbulos denominados cotiledones.

La sangre fetal llega a la placenta proveniente del feto por las arterias umbilicales, que constituyen una prolongación de las arterias hipogástricas fetales. En la unión de la placenta con el cordón umbilical las arterias umbilicales se dividen de forma radial en las arterias placentarias, que se ramifican en la placa coriónica (Beaconsfield et al.,

1980). La sangre que retorna al feto desde la placenta es recogida por la vena umbilical, que desemboca en el conducto venoso y de allí pasa a la vena cava inferior.

La eficacia del intercambio placentario guarda relación con la distribución de la sangre que circula por los vasos uterinos y umbilicales. En humanos, el flujo sanguíneo uterino a término se ha calculado entre 400 y 700 ml/min.

A lo largo de la gestación se produce un aumento progresivo del flujo sanguíneo al *conceptus*. La dilatación de los sinusoides presentes en las vellosidades aumenta durante el desarrollo placentario, lo que determina una disminución de la resistencia vascular y, por tanto, un aumento del flujo sanguíneo a igual presión de perfusión (Kaufmann et al., 1985).

### 2.4.3. EXCRECIÓN DE ÁCIDOS BILIARES FETALES POR LA PLACENTA

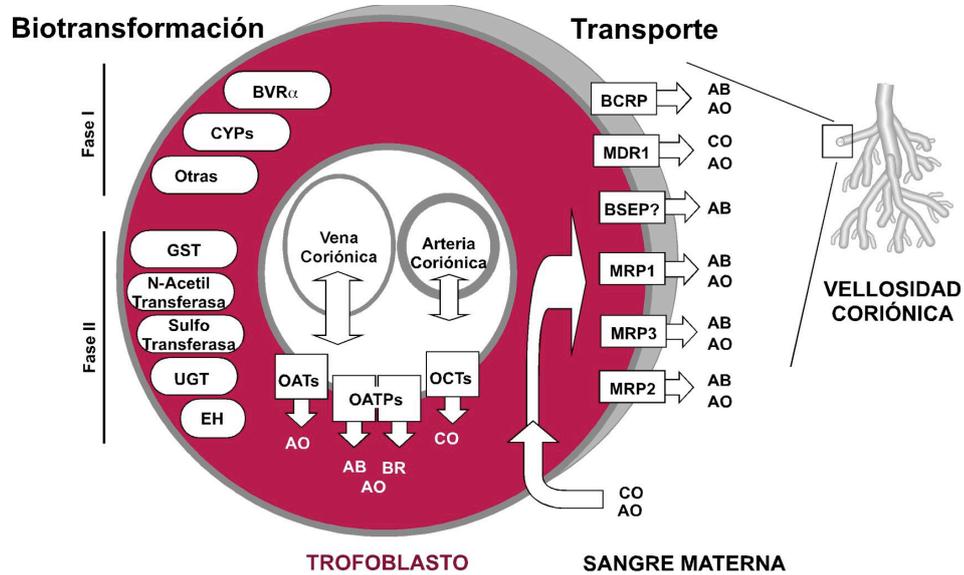
A diferencia de lo que ocurre en el adulto donde el sistema hepatobiliar en colaboración con el sistema renal son los responsables de la biotransformación y eliminación de ácidos biliares y otros compuestos de desecho, durante la vida intrauterina la principal ruta de eliminación de los productos del metabolismo fetal es la transferencia placentaria de los mismos hacia la sangre materna. Una vez en la sangre materna, el principal responsable de su destoxificación es el hígado materno, aunque también hay una pequeña contribución del riñón, que participa en la eliminación de las especies sulfatadas y glucuronidadas (Frohling & Stiehl, 1976).

Como se comentará con más detalle a continuación, en esta función excretora de tipo hepatobiliar de la placenta, también participan transportadores OATP y proteínas ABC (Figura I-4), que en conjunto confieren al proceso de transferencia placentaria características de vectorialidad en dirección feto-madre.

Hace años se pensaba que la transferencia placentaria de los ácidos biliares se llevaba a cabo por difusión simple dada su naturaleza lipídica y la existencia de un gradiente desde el feto a la madre. Sin embargo, a pH fisiológico, los ácidos biliares se encuentran en forma de aniones con escasa capacidad para atravesar las membranas celulares (Cabral et al., 1987).

Por otra parte, un sistema de difusión simple permitiría el paso de compuestos en ambas direcciones, reduciendo la eficacia del proceso excretor. Sin embargo, la transferencia desde la madre al feto es mínima, y en los últimos años, diversos trabajos han puesto de manifiesto la presencia de un transporte mediado de aniones

orgánicos colefílicos en ambos polos del trofoblasto humano y de rata (Marin et al., 1990; 2003; Serrano et al., 2003; 2007; Blazquez et al., 2012).



**Figura I-4.** Representación esquemática de transportadores de compuestos colefílicos en el trofoblasto y de las principales enzimas responsables de los procesos de biotransformación de la barrera placentaria. AB; ácidos biliares; AO, aniones orgánicos; BR, bilirrubina; BVR $\alpha$ , biliverdina reductasa alfa; CO, cationes orgánicos; CYP, enzimas citocromo P450; EH, epóxido hidrolasas; GST, glutation-S-transferasas; UGT, uridina difosfato-glucuronosiltransferasa.

En la última década, se ha detectado la expresión, a nivel de RNAm, de varias isoformas de OATPs en la placenta humana (OATP1A2, OATP2B1, OATP1B1, OATP1B3 y OATP4A1) (Briz et al., 2003; Sato et al., 2003; St-Pierre et al., 2002). Salvo OATP2B1 y OATP4A1, que presentan niveles elevados a término en la placenta humana, el resto de isoformas tiene niveles muy bajos al final de la gestación (Lammert et al., 2003; Sato et al., 2003; St-Pierre et al., 2004).

La salida de los ácidos biliares hacia la sangre materna se lleva a cabo según un mecanismo que requiere de la hidrólisis de ATP, lo que hacía pensar en la posible implicación de distintas proteínas ABC. Y dentro de las bombas ABC con capacidad para transportar ácidos biliares, MDR1 y algunas MRPs (MRP1, MRP2 y MRP3) eran las principales candidatas, ya que hace unos años se demostró su presencia en el trofoblasto humano (St-Pierre et al., 2000), así como en la placenta de rata (Serrano et al., 2003), a la vez que se descartó la implicación de BSEP, ya que se detectaron niveles muy bajos tanto en placentas humanas, como de rata a término (Patel et al., 2003; St-Pierre et al., 2004). Es interesante reseñar que la expresión de estas bombas

ABC aumentaba considerablemente tras la exposición de la placenta a niveles elevados de ácidos biliares en la sangre materna (Serrano et al., 2003). Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la proteína BCRP, que está muy expresada en la cara apical del sincitiotrofoblasto, es capaz de transportar ácidos biliares, por lo que probablemente es la principal responsable del bombeo de estas moléculas hacia el compartimento materno (Blazquez et al., 2012).

Existe cierta controversia sobre la localización celular de algunas de estas proteínas en la placenta. Por inmunofluorescencia y western blot, tanto MRP1 y MRP2 como MRP3 se han detectado en la membrana apical del sincitiotrofoblasto (St-Pierre et al., 2000), y además, MRP1 también se ha localizado en los vasos fetales y en la membrana basal del sincitiotrofoblasto (Nagashige et al., 2003; St-Pierre et al., 2000).

Las proteínas ABC presentes en la placenta confieren al proceso de transferencia placentaria características de vectorialidad feto-materna, además de jugar un papel protector en la barrera placentaria reduciendo el flujo de sustancias nocivas desde la madre al feto (Marin et al., 2004).

## 2.5. COLESTASIS INTRAHEPÁTICA GESTACIONAL

La colestasis intrahepática gestacional (CIG) es una forma reversible de colestasis que se caracteriza por prurito intenso (generalmente con inicio en el segundo o tercer trimestre de la gestación), elevación en suero de la concentración de ácidos biliares y de la actividad de las transaminasas hepáticas, y que se resuelve espontáneamente poco después del parto.

De manera general, una situación de colestasis corresponde al conjunto de manifestaciones ligadas a la disminución parcial o completa de la secreción biliar. Se denomina intrahepática cuando la alteración de la secreción biliar ocurre en el interior del hígado, y se produce por una obstrucción a nivel de las vías biliares intrahepáticas o por una limitación de la secreción biliar por parte de los hepatocitos (alteraciones en los mecanismos de transporte).

Las manifestaciones clínicas principales incluyen fatiga, prurito, ictericia y alteraciones de los parámetros analíticos.

El prurito suele ser el primer síntoma de la enfermedad. Aparece predominantemente en las palmas de las manos y de los pies, se hace más intenso durante la noche y suele agravarse con el avance de la gestación. Este síntoma se resuelve de manera habitual en las primeras cuarenta y ocho horas post-parto (Glantz et al., 2004; Arrese et al., 2008; Pathak et al., 2010). Estudios recientes han propuesto que podría deberse a la acumulación de ciertos compuestos en sangre, como el ácido lipofosfatídico (Kremer et al., 2010), que sería capaz de desencadenar picor a través de la activación local de terminaciones nerviosas (Oude Elferink et al., 2011a; Oude Elferink et al., 2011b; Bolier et al., 2013).

Otros síntomas que aparecen con menor frecuencia son ictericia y esteatorrea. La ictericia aparece en un 10-15% de los casos, y la existencia de esteatorrea subclínica con malabsorción de grasas se asocia con un posible déficit de vitamina K, aumento del tiempo de protrombina y riesgo de hemorragia post-parto (Puls & Beuers, 2007; Kondrackiene & Kupcinskis, 2008; Geenes & Williamson, 2009; Pathak et al., 2010).

Otros síntomas inespecíficos como anorexia, malestar, náuseas, vómitos o dolor abdominal son inusuales, al igual que la encefalopatía hepática y otros estigmas de fallo hepático (Lorente & Montoro, 2007; Geenes & Williamson, 2009).

Las actividades de las enzimas marcadoras de función hepática se ven alteradas; principalmente las transaminasas glutámico pirúvica (GPT) y glutámico oxalacética (GOT). También puede alterarse la  $\gamma$ -glutamilttransferasa (GGT), aunque no parece ser un marcador patognómico de la enfermedad, ya que no todas las pacientes con CIG

sufren alteraciones en los niveles séricos de esta enzima. La fosfatasa alcalina suele aumentar, pero su valor diagnóstico es limitado debido a la elevada producción de la isoenzima placentaria (Geenes & Williamson, 2009). Se ha propuesto que la enzima glutatión-S-transferasa alfa (GST- $\alpha$ ) podría tener interés diagnóstico, por presentar mayor sensibilidad y especificidad frente a otros marcadores tradicionales, aunque su uso de forma rutinaria es limitado (Geenes & Williamson, 2009; Pathak et al., 2010; Bacq, 2011).

La CIG presenta por definición una elevación de los niveles séricos de ácidos biliares, utilizándose como marcador de laboratorio diagnóstico de la enfermedad (Pathak et al., 2010; Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, 2011). Se ha descrito que durante el embarazo los niveles séricos de los ácidos biliares totales aumentan a medida que avanza la gestación y, además, cambia la proporción de las distintas especies moleculares de ácidos biliares (Pascual et al., 2002; Puls & Beuers, 2007; Arrese et al., 2008; Pathak et al., 2010). En pacientes con CIG el aumento de la colanemia es mucho mayor, aunque no existe consenso sobre si se produce antes o después de la aparición de los síntomas (Sentilhes & Bacq, 2007; Geenes & Williamson, 2009).

Se ha postulado que la proporción entre los ácidos biliares CA:QDCA podría ser un marcador más sensible de la CIG, ya que presenta cocientes menores de 1.5 en embarazos normales y mayores a este valor en pacientes con CIG (Meng et al., 1997). Sin embargo, la importancia de esta proporción es discutida, ya que parece añadir poco valor a los niveles de colanemia total y al aumento de transaminasas (Arrese et al., 2008; Geenes & Williamson, 2009).

### 2.5.1. EPIDEMIOLOGÍA

La CIG es una enfermedad poco común en el mundo, sin embargo, se ha descrito una mayor prevalencia en determinadas áreas geográficas (Figura I-5) y en algunos grupos étnicos, además de una incidencia distinta en función de la época estacional.

En un primer momento se describió una mayor prevalencia en Suecia y otros países escandinavos, y posteriormente en Chile y Bolivia, y en Portugal (Berg et al., 1986; Reyes 1997; Brites et al., 1994). En el caso de Chile, se describieron tasas más altas entre las descendientes de las poblaciones de indios de la región de Araucanía y en Bolivia entre las indias de la población aimara (Reyes et al., 1979; Reyes et al., 1978). Más tarde, quizás debido a los movimientos migratorios y a una mayor conciencia de la enfermedad, se ha descrito una mayor prevalencia en otros países europeos, USA, Asia, Australia y otros países latinoamericanos, y una menor prevalencia en Suecia y

el resto de países escandinavos, y Chile (Beuers & Puls, 2006; Arrese et al., 2008; Geenes & Williamson, 2009).



**Figura I-5.** Áreas geográficas del mundo con mayor prevalencia de CIG.

Curiosamente, la enfermedad aparece con mayor frecuencia en los meses de invierno en países como Suecia y Chile (Reyes & Sjövall, 2000; Puls & Beuers, 2007; Geenes & Williamson, 2009; Pathak et al., 2010).

## 2.5.2. FACTORES ETIOPATOGÉNICOS

La CIG se define como una entidad de etiología desconocida, en la que parecen estar implicados múltiples factores: ambientales, hormonales y genéticos. A pesar de no conocer con exactitud el mecanismo por el que se desarrolla la enfermedad, sí que se acepta su asociación clara con distintos factores de riesgo: etnia, historia de enfermedad biliar, historia de CIG previa, embarazo múltiple, edad mayor de 35 años e infección con el virus de la hepatitis C (Arrese et al., 2008).

### *Factores ambientales*

El interés por identificar posibles factores de riesgo ambientales se explica por la desigual distribución de la enfermedad en distintas partes del mundo y épocas del año,

lo que sugiere que la aparición de la enfermedad pueda verse modulada por estos factores.

Se han buscado diferencias en la exposición a distintas sustancias o nutrientes, y se ha descrito una deficiencia de selenio en pacientes con CIG (Mistry et al., 2012). Esta deficiencia no proporcionaría una protección antioxidante suficiente, favoreciendo el daño oxidativo al hepatocito, lo que podría alterar la excreción biliar. A esto hay que añadir que la deficiencia se ha observado en pacientes con CIG en países donde la ingesta de selenio es baja (Finlandia, Nueva Zelanda, Chile, regiones de China), y donde la prevalencia de la enfermedad, además, es mayor.

A pesar de numerosas investigaciones (Reyes et al., 1995; Reyes et al., 2000; Arrese et al., 2008), hasta la fecha no se ha definido claramente ningún factor ambiental que se asocie directamente con la CIG.

### ***Factores hormonales***

Gran parte de la investigación desarrollada hasta el momento ha intentado relacionar cambios en los niveles hormonales en la mujer con el desarrollo de CIG, y diversos hechos apoyan esta teoría:

- i) la enfermedad se desarrolla a finales del embarazo, cuando los niveles de hormonas sexuales son más elevados,
- ii) existe una mayor prevalencia en mujeres con embarazos múltiples, y
- iii) el riesgo es mayor en aquellas mujeres que han sido tratadas con anticonceptivos hormonales.

A todo esto hay que añadir que los síntomas de la enfermedad se resuelven rápidamente tras el parto, coincidiendo con la caída brusca de los niveles hormonales en la mujer, por lo que la asociación con estas hormonas parece lógica (Bacq, 2011).

Los estrógenos han sido el grupo de hormonas del que más se ha estudiado su implicación en el desarrollo de CIG, incluso se han propuesto mecanismos moleculares por los que podrían actuar (Pathak et al., 2010; Bacq, 2011).

Por una parte, se conoce el papel pro-colestático de los estrógenos, en particular de los metabolitos conjugados con el ácido glucurónico, como el 17 $\beta$ -glucurónido de estradiol, en modelos animales. Estos compuestos producen cambios en los niveles de expresión y en la actividad de distintos transportadores hepáticos relacionados con el transporte biliar. En concreto, disminuyen la expresión y la actividad de Ntcp, Bsep y

Mrp2 en ratas no gestantes, cambios que también se han observado durante la gestación normal en ratas (Arrese et al., 2008).

La sulfatación de los estrógenos trata de atenuar su papel colestático. Por esta razón, se ha sugerido que alteraciones en esta actividad enzimática podrían jugar un cierto papel en el desarrollo de la CIG. La determinación *in vivo* e *in vitro* de la capacidad de sulfatación durante y después del embarazo, y su comparación con mujeres no embarazadas, ha mostrado que la elevación de los niveles de estrógenos por motivos fisiológicos o iatrogénicos se asocia con alteraciones en la capacidad de sulfatación. Este hallazgo, ya conocido desde hace tiempo, supone que la alteración provocada por altos niveles de estrógenos circulantes podría contribuir a la patogénesis de la enfermedad (Davies et al., 1994).

La CIG también se ha asociado con alteraciones del metabolismo de la progesterona (Lammert et al., 2000; Arrese et al., 2008; Geenes & Williamson, 2009).

Durante el embarazo, la placenta produce esta hormona en grandes cantidades, y el hígado la utiliza como sustrato para convertirla en pregnanolona y pregnanediol. Los productos formados sufren posteriormente reacciones de transformación, siendo hidroxilados y conjugados con sulfato y con ácido glucurónico. Los metabolitos que se encuentran más elevados durante la gestación son los mono- y di- sulfatos de progesterona y, al igual que ocurría con los ácidos biliares, en mujeres con CIG se incrementan los niveles totales de estas moléculas y, además, se altera la proporción de los diferentes isómeros de los metabolitos presentes en la sangre, de tal forma que aumentan particularmente los isómeros 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  (Lammert et al., 2000).

Una de las razones que hace sospechar que la progesterona pueda estar implicada en el desarrollo de la CIG es el hecho de que la administración de progesterona durante el embarazo también parece ser un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad.

Pero, más que un aumento de los niveles totales de progesterona, se han descrito alteraciones en la proporción de sus metabolitos sulfatados séricos y en la excreción urinaria de los mismos en mujeres con CIG (Lammert et al., 2000; Geenes & Williamson, 2009). Estos cambios se explican por la existencia de alteraciones en la excreción de estos metabolitos a través de la membrana canalicular de los hepatocitos y en la biotransformación de la progesterona. Sin embargo, los hallazgos hasta el momento no son concluyentes y existe controversia acerca de si estos cambios se explican por el proceso colestático en sí mismo o por alteraciones en el metabolismo de la progesterona o de sus metabolitos sulfatados (Lammert et al., 2000; Arrese et al., 2008).

Las alteraciones de los niveles de progesterona parece que sí podrían ser atribuibles exclusivamente a la CIG, ya que en mujeres embarazadas con episodios de colestasis que se deben a otra situación clínica, como una hepatitis viral, los niveles de progesterona y sus metabolitos son similares a los que se encuentran en embarazos normales (Geenes & Williamson, 2009), aunque no parece estar claro si estos cambios en los niveles hormonales son cambios secundarios a la enfermedad o pueden estar implicados en el desarrollo de la misma.

Por un lado, se ha descrito que, en pacientes con CIG, la excreción biliar y fecal de los metabolitos de progesterona está disminuida, lo que sustenta la teoría de la alteración del transporte de los mismos (Lammert et al., 2000; Arrese et al., 2008). Otro dato destacable es que los niveles séricos de metabolitos disulfatados de progesterona se ven reducidos cuando las pacientes con CIG se tratan con UDCA, que es en la actualidad el tratamiento farmacológico de elección para la CIG. El UDCA es capaz de estimular la excreción biliar en situaciones de colestasis, y en mujeres con CIG se ha visto que consigue estimular la secreción biliar de metabolitos de progesterona sulfatados, lo que lleva a pensar en la posibilidad de que durante la enfermedad pueda existir un defecto en el transporte de éstos hacia la bilis.

Por otra parte, en suero fetal de cordón procedente de madres con CIG se ha observado una mayor cantidad de metabolitos sulfatados de progesterona, comparado con el suero de cordón de mujeres sanas, y también que los niveles de esteroides sintetizados por el feto, como el 16 $\alpha$ -hidroxi-dehidro-epiandrosterona sulfato, están disminuidos (Geenes & Williamson, 2009), lo que sugiere alguna alteración en la síntesis de esteroides por parte del feto. También existen datos *in vitro* que sugieren que ciertos metabolitos sulfatados de progesterona son capaces de provocar la trans-inhibición del transportador canalicular de ácidos biliares Bsep aunque, para ello, se requiere la secreción previa de estos metabolitos a la bilis mediante Mrp2, un transportador canalicular que tiene reducida su expresión durante la gestación (Vallejo et al., 2006). Por último, recientemente se ha descrito que los niveles elevados de metabolitos sulfatados de progesterona inhiben al receptor nuclear de ácidos biliares FXR, dando lugar a un fenotipo colestático (Abu-Hayyeh et al., 2013).

### **Factores genéticos**

Algunas alteraciones podrían indicar una predisposición familiar o étnica a la enfermedad. Las investigaciones más recientes han tratado de relacionar la CIG con mutaciones que afectan a genes que codifican proteínas implicadas en el transporte de ácidos biliares, y cada vez es mayor la evidencia de que ciertas alteraciones

genéticas constituyen factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad. Así, se han descrito mutaciones en los genes de las proteínas MDR3, ATP8B1/FIC1 y BSEP, polimorfismos en MRP2 y variantes funcionales en FXR (Lorente & Montoro, 2007; Arrese et al., 2008; Bacq, 2011).

Sin embargo, no se puede olvidar que el embarazo parece ser un estado fisiológico procolestático, con alteraciones en la función secretora biliar, en el que se ve disminuida la expresión de transportadores importantes como NTCP y MRP2, y se producen alteraciones funcionales de BSEP, principalmente provocadas por los estrógenos, aunque los metabolitos de progesterona pueden inhibir en cierto grado BSEP. Así, las variantes genéticas de los transportadores podrían predisponer a padecer la enfermedad o influir en el fenotipo, y los factores ambientales, modular la gravedad de la misma (Arrese et al., 2008).

### 2.5.3. PRONÓSTICO DE LA ENFERMEDAD, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

Las repercusiones y el **pronóstico** de la CIG son muy diferentes para la madre y para el feto. Si bien para la madre se presenta como una enfermedad *a priori* sin graves repercusiones clínicas, para el feto se asocia con un riesgo muy elevado, que puede acabar incluso en la muerte intrauterina.

Para la madre, el empeoramiento sintomático más frecuente consiste en que durante el avance de la gestación el prurito puede hacerse más intenso, y en ocasiones se agrava por la noche, pudiendo ser hasta causa de insomnio (Lorente & Montoro, 2007; Geenes & Williamson, 2009; Bacq, 2011). En una baja proporción de mujeres puede desarrollarse un cuadro de ictericia, que, a diferencia del prurito, no empeora con el avance de la gestación (Lorente & Montoro, 2007; Geenes & Williamson, 2009; Bacq, 2011).

En cuanto a la comorbilidad con otras patologías, se han descrito casos de coexistencia con otras enfermedades relacionadas con el embarazo, como preeclampsia, hígado graso agudo del embarazo o diabetes gestacional, lo que de nuevo pone de manifiesto la gran heterogeneidad en la patogénesis de la enfermedad (Sentilhes & Bacq, 2007). También varios estudios retrospectivos han relacionado la CIG con un mayor riesgo de padecer enfermedades hepáticas a largo plazo: cirrosis no alcohólica, litiasis biliar y colecistitis, incluso pancreatitis no alcohólica (Ropponen et al., 2006; Marschall & Stephansson, 2014).

Sin embargo, existe cierta controversia sobre si esos estudios retrospectivos estaban bien documentados; es decir, si el diagnóstico estaba confirmado tras el parto

verificando que el prurito y las alteraciones bioquímicas hepáticas desaparecían antes de tres semanas y si se había descartado la existencia de enfermedades hepáticas previas (Reyes 2014).

La CIG no contraindica la lactancia materna, a pesar de que existen escasos estudios que hayan analizado los niveles de ácidos biliares en la leche de mujeres con CIG y la ausencia de complicaciones en mujeres tratadas con UDCA (Brites et al., 1998; Vítek et al., 2010). El buen pronóstico indica que la enfermedad no está asociada a un aumento de la mortalidad materna. Lo que sí existe es una elevada probabilidad de recurrencia en siguientes gestaciones, aunque de severidad impredecible (Lorente & Montoro, 2007; Sentilhes & Bacq, 2007; Geenes & Williamson, 2009; Bacq, 2011).

Sin embargo, la CIG conlleva un gran riesgo para el feto, con complicaciones de significativa importancia como prematuridad, tinción meconial del líquido amniótico, distrés respiratorio del recién nacido, anomalías electrocardiográficas fetales y muerte intrauterina (Puls y Beuers, 2007; Sentilhes & Bacq, 2007; Arrese et al., 2008; Geenes & Williamson, 2009; Pathak et al., 2010).

En un intento de determinar un nivel de ácidos biliares a partir del cual éstos podrían llegar a ser tóxicos para el feto y/o podrían aumentar significativamente la morbi-mortalidad perinatal se realizó un estudio en el año 2004 (Glantz et al.) que concluyó que con concentraciones en suero materno por encima de 40  $\mu\text{M}$  se producía un incremento significativo en la aparición de riesgos fetales. Este valor de ácidos biliares, que está aceptado que se asocia a una CIG severa (con mayor riesgo potencial para los neonatos), es muy valioso a la hora de decidir la pauta a seguir en embarazos que cursan con CIG, aunque sería útil conocer otros factores vinculados con la fisiopatología y etiología, ya que podrían permitir mejorar el pronóstico perinatal obtenido a partir de los niveles de ácidos biliares.

La prematuridad se plantea como un mecanismo protector al feto en situaciones de colanemias elevadas. Esta afirmación se apoya en la relación directa encontrada entre el riesgo de parto prematuro y los niveles de ácidos biliares en suero materno (Glantz et al., 2004; Pata et al., 2011), junto a los hallazgos que relacionan niveles séricos elevados de ácidos biliares con un aumento de la actividad biológica de la oxitocina (Puls & Beuers, 2007; Arrese et al., 2008; Geenes & Williamson, 2009).

La aspiración de líquido amniótico se ha asociado con distrés respiratorio del recién nacido. Se ha descrito que el distrés respiratorio es consecuencia de la aspiración broncoalveolar del meconio, y que el riesgo es proporcional a la concentración sérica de ácidos biliares (Sentilhes & Bacq, 2007; Geenes & Williamson, 2009). Existen hallazgos de niveles elevados de ácidos biliares en el fluido bronco-alveolar de niños con distrés respiratorio hijos de madres con CIG (Geenes & Williamson, 2009), y se ha

propuesto que podrían provocar un aumento de la actividad de la fosfolipasa A2 y una disminución del surfactante pulmonar en estos neonatos (Puls & Beuers, 2007; Sentilhes & Bacq, 2007; De Luca et al., 2009; Geenes & Williamson, 2009). Estudios recientes de nuestro grupo han demostrado, en un modelo de colestasis gestacional en ratas, que la acumulación de ácidos biliares en el pulmón fetal desencadena una respuesta inflamatoria y un aumento de expresión de la fosfolipasa A2 en los macrófagos alveolares (Herraez et al., 2014).

Las anormalidades en el ritmo y frecuencia cardiacas del feto son reversibles, antes y durante el parto. El ácido taurocólico (TCA) parece estar implicado provocando alteraciones en la dinámica del calcio (Arrese et al., 2008; Geenes & Williamson, 2009).

Se desconocen los mecanismos implicados en la complicación más grave de la enfermedad, la muerte fetal intrauterina, que ocurre generalmente en el último mes de embarazo, entre las semanas 37-39. Las autopsias revelan signos de anoxia aguda sin retraso del crecimiento fetal, por lo que no parece explicarse por hipoxia uterina o mala perfusión placentaria crónica (Lorente & Montoro, 2007; Sentilhes & Bacq, 2007).

Se han descrito diferentes mecanismos por los cuales los ácidos biliares podrían estar implicados en la muerte del feto. Por un lado, el CA produce vasoconstricción de las venas coriónicas, lo que apoyaría la hipótesis de una disminución abrupta del flujo sanguíneo y la alteración de la oxigenación del feto, que como consecuencia provocaría la muerte del mismo (Puls & Beuers, 2007; Pathak et al., 2010). Por otra lado, se ha descrito que el TCA provoca alteraciones funcionales en miocardiocitos de neonatos de rata en cultivo, provocando arritmias y alteraciones de la contractilidad, mediadas por receptores muscarínicos tipo M2 (Abdul Kadir et al., 2013).

Los ácidos biliares pueden provocar estrés oxidativo y aumento de la apoptosis en la placenta y el hígado fetal (Perez et al., 2005; Perez et al., 2006; Pathak et al., 2010), sin embargo, no parece que estos fenómenos puedan asociarse con la muerte súbita intrauterina, y tampoco existen, hasta la fecha, suficientes evidencias que permitan asociar la presencia de meconio en líquido amniótico y la muerte fetal intrauterina (Pathak et al., 2010).

El **diagnóstico** de la CIG debe basarse en la aparición de prurito, elevación de niveles de GOT e incremento de los niveles séricos de ácidos biliares en ayunas, habiendo sido excluidas otras causas de disfunción hepática y prurito. El diagnóstico de la patología se confirma si los marcadores se normalizan tras el parto. Las recomendaciones internacionales apuntan a usar en embarazadas rangos específicos para las pruebas de función hepática. Se recomienda reducir el límite superior del rango en las concentraciones de bilirrubina y actividades de transaminasas y GGT. No

se recomienda modificar el rango de ácidos biliares y es importante que éstos se determinen en ayunas, dado que los niveles séricos de ácidos biliares pueden aumentar bastante tras la ingestión de comida (EASL, 2009; Royal College of Osbtetricians and Gynaecologists, 2011).

La conducta obstétrica en el manejo de la CIG tiene como objetivo reducir los síntomas y las anomalías bioquímicas de la madre, y reducir el riesgo de estrés fetal, prematuridad y muerte intrauterina repentina. Para lograr este objetivo, las opciones son realizar un estrecho seguimiento fetal, administrar fármacos e inducir el parto cuando proceda.

La monitorización fetal consiste en realizar un seguimiento de la función cardíaca y los movimientos fetales, con el objetivo de ver si se encuentran dentro de la normalidad. También se debe monitorizar el grado de colanemia materna, ya que cuando se eleva puede tener graves repercusiones (Glantz et al., 2004). Sin embargo, la predicción y prevención de las complicaciones fetales no es simple y la guía del NICE (National Institute for Health and Clinical Excellence) del Reino Unido refleja que en la actualidad los datos bioquímicos no permiten predecirlas, por lo que las decisiones no se deben basar exclusivamente en éstos (Royal College of Osbtetricians and Gynaecologists, 2011).

El objetivo de la administración de fármacos es mejorar los síntomas y signos maternos y prevenir las complicaciones de la madre y del feto de forma precoz (ya que la enfermedad se instaura al final de la gestación) y sin efectos perjudiciales para ninguno de ellos.

Para el **tratamiento** de la CIG se ha planteado el uso de gran variedad de fármacos: antihistamínicos, benzodiazepinas, fenobarbital, dexametasona, S-adenosil-N-metionina, colestiramina, UDCA, etc. En la actualidad el UDCA es el tratamiento más efectivo en la CIG (Puls & Beuers, 2007). Por ello, es la primera línea de tratamiento (EASL, 2009), y puede administrarse a las mujeres embarazadas con CIG cuando refieran síntomas. El tratamiento con UDCA ha mostrado ser efectivo para resolver los síntomas y mejorar las pruebas de función hepática.

Es un tratamiento bien tolerado y que parece ser seguro en las etapas finales del embarazo. Actúa resolviendo rápidamente el prurito y mejorando los parámetros bioquímicos (bilirrubina, transaminasas), sin efectos perjudiciales conocidos para el feto (Lorente & Montoro, 2007; Puls & Beuers, 2007).

Su mecanismo de acción consiste en estimular la secreción biliar mediante la regulación post-transcripcional de la expresión de transportadores hepatocelulares canaliculares como MRP2 y BSEP. Además, tiene efectos anti-apoptóticos sobre los

hepatocitos, y reduce la permeabilidad de la membrana mitocondrial a iones y la liberación de citocromo C (Puls & Beuers, 2007).

Por otra parte, el UDCA disminuye los niveles séricos de  $17\beta$ -glucurónido de estradiol, el principal metabolito pro-colestático de estrógenos, y restituye el transporte alterado de ácidos biliares entre el feto y la madre a través de la placenta. En el modelo de colestasis gestacional en la rata se ha observado que esto podría deberse al aumento de expresión de transportadores ABC en la placenta (Serrano et al., 2003). Además, previene las alteraciones estructurales en el trofoblasto inducidas por la colestasis materna (Puls & Beuers, 2007).

Como consecuencia de su efecto, además de reducir la colanemia, el tratamiento con UDCA normaliza las ratios CA:QDCA y de conjugados de glicina:taurina, además de reducir la excreción urinaria de metabolitos sulfatados de progesterona, que se explica, según algunos autores (Glantz et al., 2008) debido a que el UDCA alteraría el metabolismo de la progesterona, reduciendo la formación de metabolitos sulfatados de progesterona a niveles normales.

En definitiva, el UDCA, al normalizar los valores de ácidos biliares en sangre, parece que disminuye la prematuridad y las complicaciones fetales sin efectos perjudiciales para el feto. Se ha visto que mejora el distrés respiratorio y protege a los cardiomiocitos en modelos animales de arritmias inducidas por ácidos biliares (Sentilhes y Bacq, 2007; Geenes y Williamson, 2009; Pathak et al., 2010; Miragoli et al., 2011). Sin embargo, a pesar de recomendar su uso, la asociación europea para el estudio del hígado (EASL) concluye que con la información disponible actualmente no hay datos suficientes que permitan establecer una relación del tratamiento con UDCA con la prevención de riesgos fetales (EASL, 2009).

También hay que valorar suplementar vitamina K cuando el tiempo de protrombina está aumentado (EASL, 2009).

La decisión de inducción del parto dependerá de los síntomas de la paciente, la edad gestacional y las condiciones del cuello uterino, siempre que se haya conseguido la madurez pulmonar del feto. El momento idóneo parece ser la semana 38 de gestación aunque, en casos con ictericia, parece razonable la inducción en la semana 36, si existe maduración pulmonar fetal. Es decir, se procede a la inducción del parto antes o después en función de los resultados de las pruebas bioquímicas. La razón principal de la elección de este momento para la inducción es que las muertes intrauterinas súbitas son más frecuentes entre las semanas 37-39 de gestación (Sentilhes et al., 2006; He et al, 2011).

A pesar de todo, no existen recomendaciones basadas en la evidencia, por lo que la decisión dependerá de la valoración del riesgo de prematuridad y morbilidad frente al riesgo de complicaciones intrauterinas.

#### 2.5.4. MECONIO EN LÍQUIDO AMNIÓTICO Y CIG

La presencia de meconio en líquido amniótico (MLA) es un conocido factor de riesgo validado de manera consistente. La exposición al mismo puede generar morbilidad en cualquier feto o neonato, no es un hecho exclusivo para hijos de madres con CIG. Durante la vida intrauterina se han descrito diversas alteraciones histopatológicas en el cordón y la placenta expuestos a meconio: necrosis a nivel de arteria umbilical y en vasos superficiales placentarios, trombosis y edema en vellosidades y focos de apoptosis en placenta. Estas lesiones se han asociado a bajo score de Apgar al nacer y aumento del ingreso a cuidados intensivos neonatales (Espinheira et al., 2011). También se ha observado que las horas transcurridas desde la descarga de meconio hasta el nacimiento incrementa el número de alteraciones en los tejidos expuestos.

Clínicamente, del total de neonatos que han sido expuestos a MLA, al menos 1 de cada 3-5 niños necesita intubación y ventilación mecánica (Cleary & Wiswell, 1998; Bhutani, 2008). El síndrome de aspiración de meconio, que se presenta en algunos de estos neonatos, es una enfermedad principalmente de los nacidos cercanos al término, a término y post-término (Dargaville & Copnell, 2006). Si bien su incidencia está disminuyendo, debido fundamentalmente al avance en el campo obstétrico, no deja de ser una complicación con morbilidad respiratoria severa en los recién nacidos. La enfermedad se caracteriza por distrés respiratorio, pobre distensibilidad pulmonar, hipoxemia, opacificación pulmonar e hiper-expansión pulmonar (Dargaville, 2012). La obstrucción de la vía respiratoria por meconio puede dar origen a un atrapamiento de aire (mecanismo valvular) y, como consecuencia de ello, iniciar alguna de las patologías englobadas dentro del síndrome de escape de aire, siendo las más frecuentes: enfisema intersticial pulmonar, neumotórax y neumomediastino (Lotze et al., 1998; Vain et al, 2004).

En CIG el MLA adquiere particular relevancia por varias razones:

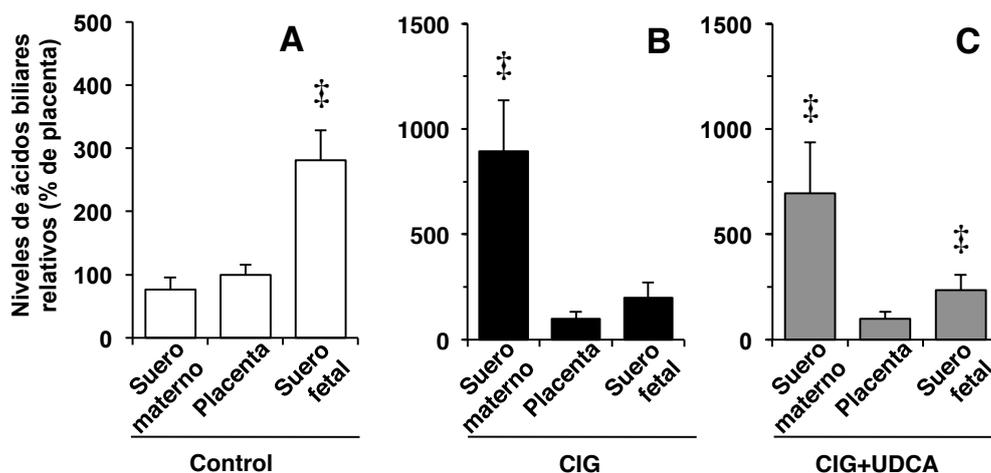
- i) Tiene una frecuencia de presentación dos veces más alta que en embarazos sin la patología.
- ii) La población de nacidos pre-término es el doble de la esperada, siendo este grupo altamente vulnerable para desarrollar distrés respiratorio y todas las patologías incluidas en el síndrome de escape de aire (Fanaroff, 2008).

iii) Podría existir una alteración del surfactante pulmonar, lo cual facilitaría o agravaría el distrés respiratorio incluso en neonatos donde este tipo de patología no es esperable (cerca al término) (Dargaville & Mills, 2005; El Shahed et al., 2007; Wirbelauer & Speer, 2009).

El meconio está compuesto por sustancias maternas y fetales. Contiene proteínas, esteroides, ácidos biliares y moléculas inorgánicas. El patrón de ácidos biliares en meconio es diferente a cualquier otro. Posee ácidos biliares inusuales en diferente concentración según se trate de un neonato proveniente de una madre sin patología o de una madre con CIG (Rodrigues et al., 1999).

El tratamiento con UDCA disminuye el “pool” total de ácidos biliares en suero materno, con una disminución menor en la proporción de CA en relación al resto de ácidos biliares. Se ha visto también disminución de ácidos biliares en sangre de cordón umbilical, calostro y líquido amniótico (Brites & Rodrigues, 1998; Brites, 2002). El tratamiento restaura la capacidad de la placenta para llevar a cabo la transferencia vectorial de ácidos biliares. No se ha visto modificación de los patrones de ácidos biliares en meconio.

Es necesario remarcar que son múltiples los factores que parecen estar implicados en la enfermedad y que, aunque en las últimas décadas se ha mejorado considerablemente el cuidado de las pacientes con CIG, gracias al conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos (EASL, 2009), continúa siendo necesario investigar la fisiopatología de la enfermedad y los mecanismos de daño fetal, para poder prevenir las complicaciones derivadas de la enfermedad. También es necesario disponer de marcadores que permitan detectar embarazos de riesgo, así como realizar estudios que esclarezcan la seguridad y eficacia de los tratamientos existentes, y promuevan la búsqueda de alternativas para los mismos.



**Figura 15.** Niveles relativos de ácidos biliares totales en muestras pareadas de suero materno, placenta y suero fetal obtenidas de gestaciones control (n=25) o complicadas con CIG sin tratamiento (n=9) o con tratamiento con UDCA (n=15). Los valores son media±EEM. ‡,  $p < 0.05$ , comparado con la placenta por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni.

El siguiente paso de este estudio consistió en analizar el gradiente entre los tres compartimentos y, para ello, se asumió la simplificación de que existía una distribución homogénea de los ácidos biliares en los distintos tejidos placentarios que componían el homogenado del que se parte para hacer la extracción de estas moléculas y que estos tejidos presentan un valor de densidad medio de aproximadamente 1 g/ml.

Utilizando esta aproximación, los resultados indicaron que en el grupo control los ácidos biliares totales en la placenta se encontraban entre los niveles séricos en madres y fetos, pero más próximos a los determinados en suero materno (Figura 15A). En el grupo de CIG, a pesar del importante aumento de ácidos biliares en el compartimento materno, los niveles en placenta se mantuvieron relativamente bajos (Figuras 15B y 15C). Es interesante destacar que en los dos grupos de CIG (con y sin tratamiento) los niveles de ácidos biliares en el tejido placentario fueron menores que en el suero fetal (Figuras 15B y 15C).

Este estudio demuestra que la reducción de la colanemia en las gestantes con CIG tratadas con UDCA se debe principalmente a una menor acumulación de ácidos biliares endógenos. Puesto que existen especies de ácidos biliares con mayor capacidad de producir daño tisular que otras, la determinación del perfil de especies moleculares acumuladas en suero materno-placenta-suero fetal durante la CIG proporciona una información valiosa. En cuanto a los ácidos biliares primarios, en el suero de mujeres con CIG se produce una importante elevación de las especies de las familias del CA y QDCA, principalmente conjugadas con taurina y glicina, mientras que

el aumento de estos ácidos biliares en el suero fetal fue mucho menor. Respecto a los ácidos biliares secundarios, más tóxicos, el DCA estaba aumentado en el compartimento materno, pero sólo se detectaron cantidades muy pequeñas en el suero fetal y en la placenta. En nuestro estudio no encontramos un aumento de los niveles séricos de LCA en mujeres con CIG, independientemente de que recibieran o no tratamiento con UDCA, excepto para el TSLCA, cuyas concentraciones estaban elevadas en suero materno y placenta. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos recientemente por Geenes et al. (2014a), pero no con estudios anteriores que referían niveles muy elevados de LCA en mujeres argentinas con CIG (Castaño et al., 2006).

Al considerar los efectos beneficiosos del tratamiento con UDCA al reducir los niveles de ácidos biliares tóxicos es importante tener en cuenta que parte del “pool” de ácidos biliares maternos es reemplazado por UDCA. Por esta razón, desde un punto de vista clínico, un análisis más interesante que el considerar los ácidos biliares totales es calcular los niveles de ácidos biliares endógenos sin incluir la familia del UDCA. Haciéndolo así, se aprecia un efecto beneficioso más marcado de este ácido biliar en el suero materno y fetal y en la placenta. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en modelos animales de colestasis obstructiva en ratas gestantes, que revelaron que la alteración en la capacidad de la placenta de llevar a cabo la transferencia de ácidos biliares se restauraba parcialmente cuando los animales recibían UDCA (Macias et al., 2000).

En las gestaciones normales, los ácidos biliares son sintetizados por el hígado fetal desde una edad gestacional muy temprana y son transferidos mayoritariamente a través de la placenta hacia la circulación materna, donde las concentraciones son menores que en el compartimento fetal (Monte et al., 1995). Así, en el grupo control había un gradiente moderado en dirección feto-a-madre con la placenta colocada en medio. El aumento de ácidos biliares en la madre cambia el sentido del gradiente transplacentario de estas moléculas desde la sangre materna hacia la circulación fetal, lo que afecta a la vía de detoxificación a través de la placenta (Marin et al., 2003). Los resultados de contenido de ácidos biliares en el tejido placentario proporcionan una información útil para entender cómo se produce el manejo de ácidos biliares en esta situación de homeostasis alterada. El hecho de que los niveles de estas moléculas en la placenta fueran menores que en la sangre materna y fetal en CIG, a pesar del importante aumento en la sangre materna, apoya el concepto de que existe una barrera placentaria para los ácidos biliares.

#### 4.4. CAMBIOS EN LOS NIVELES DE PROGESTERONA Y SUS METABOLITOS EN SITUACIONES DE COLESTASIS GESTACIONAL. EFECTO DEL UDCA

El hecho de que la CIG se desarrolle generalmente durante el último tercio de la gestación, cuando los niveles de estrógenos y progesterona están más elevados, y que se resuelva poco después del parto, cuando los niveles séricos de estas hormonas caen rápidamente, ha llevado a pensar en una posible asociación de estrógenos, progesterona o sus metabolitos con la etiopatogénesis de la CIG.

La administración de progesterona cuando existe amenaza de parto pre-término es una práctica habitual, a pesar de que existe cierta controversia porque se ha considerado un factor de riesgo para el desarrollo de la CIG (Carbonne & Rosenblatt, 2005). Varios estudios han descrito alteraciones en la proporción de los metabolitos sulfatados de progesterona en suero y en su excreción urinaria en mujeres con CIG (Meng et al., 1997; Lammert et al., 2000), y se han explicado, en parte, por la existencia de alteraciones en la excreción biliar de estos metabolitos y en la biotransformación de la progesterona (Lammert et al., 2000; Arrese et al., 2008).

Los cambios en los niveles de progesterona parecen relacionados directamente al desarrollo de la CIG y no a un defecto de su eliminación por el hígado, ya que en mujeres embarazadas con episodios de colestasis que se deben a otra situación clínica, como una hepatitis viral, los niveles de progesterona y sus metabolitos son similares a los que se encuentran en embarazos normales (Geenes & Williamson, 2009). Sin embargo, no está claro si estos cambios en los niveles hormonales son secundarios a la enfermedad o pueden estar implicados en el desarrollo de la misma.

No se sabe si en fetos de madres con CIG también aumentan los metabolitos sulfatados de progesterona, y hasta la fecha no existen estudios que hayan medido conjuntamente distintas especies moleculares de ácidos biliares y de metabolitos de progesterona en gestaciones que cursan con CIG sin y con tratamiento con UDCA para ver si existe relación en los cambios de estas moléculas. Por esta razón, nos planteamos analizar en sangre materna, en placenta y en sangre de cordón umbilical los 4 metabolitos sulfatados de progesterona más abundantes en el suero de mujeres embarazadas: sulfato de alopregnanolona (PM4-S), sulfato de epialopregnanolona (PM5-S), sulfato de pregnanolona (PM6-S) y sulfato de epipregnanolona (PM7-S) (Pascual et al., 2002; Hill et al., 2011).

Como en el caso de los ácidos biliares, la detección de los PMS se realizó por HPLC-MS/MS mediante un analizador de triple cuadrupolo con la técnica de ionización por

electrospray y trabajando en polaridad negativa. Las condiciones para la detección se pusieron a punto en el Trabajo de Grado de la Lda. Dña. Laura Gómez-Rodríguez. Los parámetros fijados para el análisis de los PMS en el modo *MRM* se recogen en la tabla 22.

**Tabla 22.** Parámetros específicos para los metabolitos de progesterona y su análisis en el modo *MRM*.

Metabolito	Masa en MS1	Masa en MS2	Volaje fragmentador (V)	Energía colisión (eV)	Polaridad
	( <i>m/z</i> )	( <i>m/z</i> )			
PM4-S	397.1	97.2	130	45	ESI-
PM5-S	397.1	97.2	130	45	ESI-
PM6-S	397.1	97.2	130	45	ESI-
PM7-S	397.1	97.2	130	45	ESI-

Al ser idénticos los pesos moleculares y las transiciones *m/z* en todos ellos, la separación cromatográfica se convertía en una etapa previa imprescindible para poder identificarlos inequívocamente. El trabajo de puesta a punto del método aconsejó como mejores tiempos de retención para cada uno de los compuestos los que se recogen en la tabla 23.

**Tabla 23.** Tiempo de retención de los derivados sulfatados de progesterona.

PM	Tiempo retención (min)
PM7-S	4.72
PM5-S	4.73
PM6-S	5.64
PM4-S	6.24

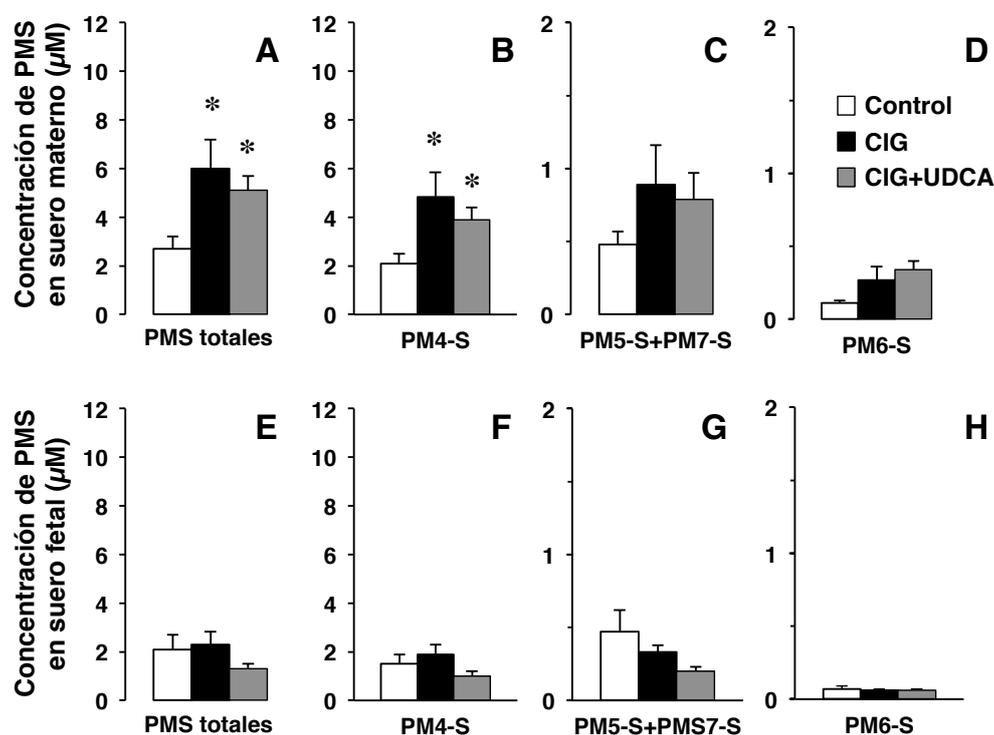
El tiempo de retención para el PM5-S y para el PM7-S era prácticamente igual, porque no fue posible su resolución modificando las características de la elución, ni de la columna cromatográfica. Además, como ya se ha mencionado, dado que se trata de epímeros que sólo se diferencian en la posición del H del C5, no era posible discriminar entre ellos mediante la técnica de detección con MS/MS. Por ello, se decidió analizar conjuntamente la mezcla de PMS-5+PMS-7, pero teniendo en cuenta que, según la bibliografía, los niveles en sangre materna de PMS-5 son 10 veces superiores que los de PM7-S (Hill et al., 2011).

Para llevar a cabo estos análisis utilizamos una alícuota de las muestras procesadas para la determinación de ácidos biliares y, como comentamos anteriormente, los

resultados se corrigieron con los niveles del estándar interno nDCA, añadido al comienzo del procesamiento.

Los resultados de las determinaciones de los PMS individuales y totales en suero materno y fetal en gestaciones control y con CIG sin/con tratamiento con UDCA se muestran en la figura 16. Los niveles de PMS totales se encontraron marcadamente elevados en el suero de las pacientes con CIG comparados con los controles (Figura 16A). Esto se debía principalmente a un aumento de los niveles de PM4-S (Figura 16B), y en menor medida al aumento del resto de metabolitos analizados (Figuras 16C y 16D). El tratamiento con UDCA no redujo la concentración sérica de ninguno de los derivados sulfatados de progesterona (Figuras 16C-16E), ni los niveles de PMS totales (Figura 16A).

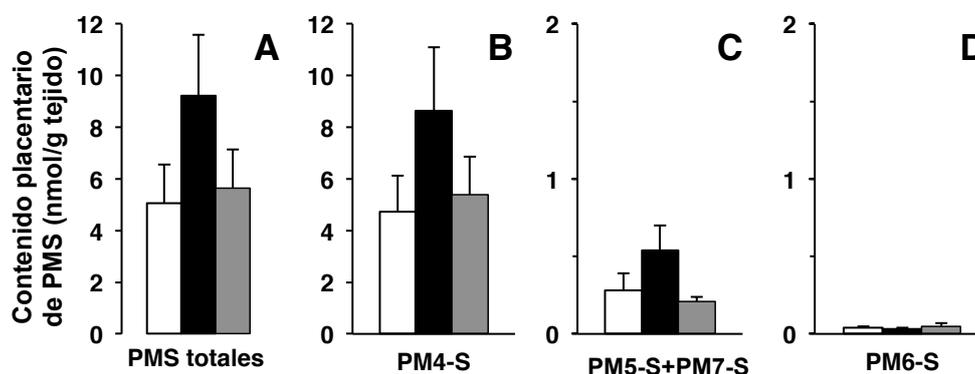
Los niveles de PMS en suero fetal control fueron similares, aunque ligeramente inferiores, a los encontrados en el suero materno. No se vieron modificados por la CIG, a pesar del aumento significativo encontrado en el compartimento materno y los niveles fueron ligeramente inferiores, aunque no significativamente, en el grupo de CIG+UDCA (Figuras 16E-16H).



**Figura 16.** Niveles de derivados sulfatados de progesterona (PMS), sulfato de alopregnanolona (PM4-S), sulfato de epialopregnanolona + sulfato de epipregnanolona (PM5-S+PM7-S) y sulfato de pregnanolona (PM6-S) en suero materno (A-D) y fetal (E-H) en gestaciones control (n=25) o complicadas con CIG sin tratamiento (n=9) o con tratamiento con UDCA (n=15). \*,  $p < 0.05$ , comparado con los controles apropiados por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Los PMS se determinaron también en el mismo tejido placentario utilizado para medir ácidos biliares (Figura 17). A pesar de que existía una importante variabilidad, se encontró una tendencia al aumento de los niveles de PM4-S (Figura 17B) y PM5-S+PM7-S (Figura 17C) en CIG, que no se observaba en el tejido procedente de gestantes con CIG tratadas con UDCA (Figuras 17A-17D).

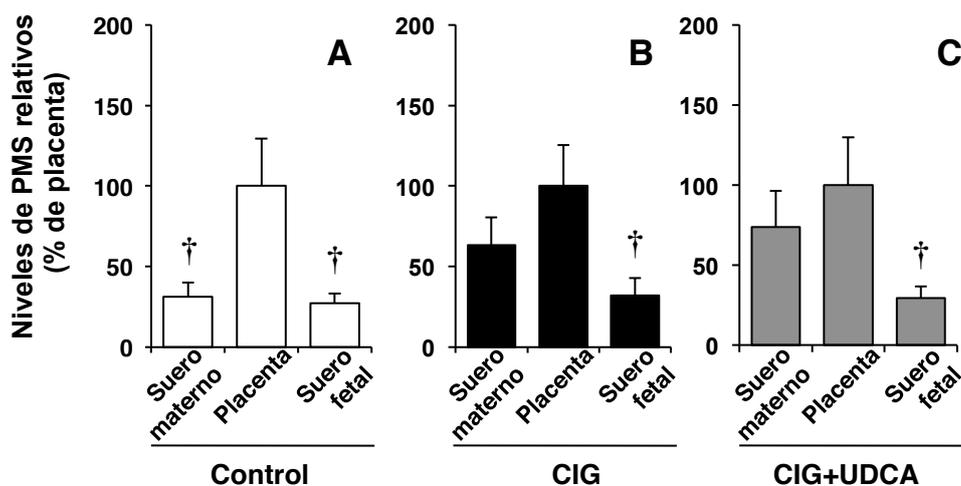
Es importante destacar que el PM4-S, el derivado más abundante y el que más se incrementaba, tanto en la placenta como en el suero de las pacientes con CIG, resultó ser el metabolito sulfatado más colestático en estudios realizados en un modelo de hígado de rata perfundido "in situ" (Vallejo et al., 2006).



**Figura 17.** Contenido de derivados sulfatados de progesterona (PMS) (A), sulfato de alopregnanolona (PM4-S) (B), sulfato de epialopregnanolona + sulfato de epipregnanolona (PM5-S+PM7-S) (C) y sulfato de pregnanolona (PM6-S) (D) en tejido placentario de mujeres control (n=25) o con gestaciones complicadas con CIG sin tratamiento (n=9) o con tratamiento con UDCA (n=15). \*, p<0.05, comparado con las placentas control por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni.

La figura 18 muestra la comparación de los niveles relativos de PMS en los compartimentos materno, placentario y fetal en gestantes control (Figura 18A), con CIG (Figura 18B) y con CIG+UDCA (Figura 18C). Encontramos que, a diferencia de lo que ocurría para los ácidos biliares (Figura 15), en todos los casos, la placenta fue el elemento de este trío que contenía los niveles más elevados de PMS.

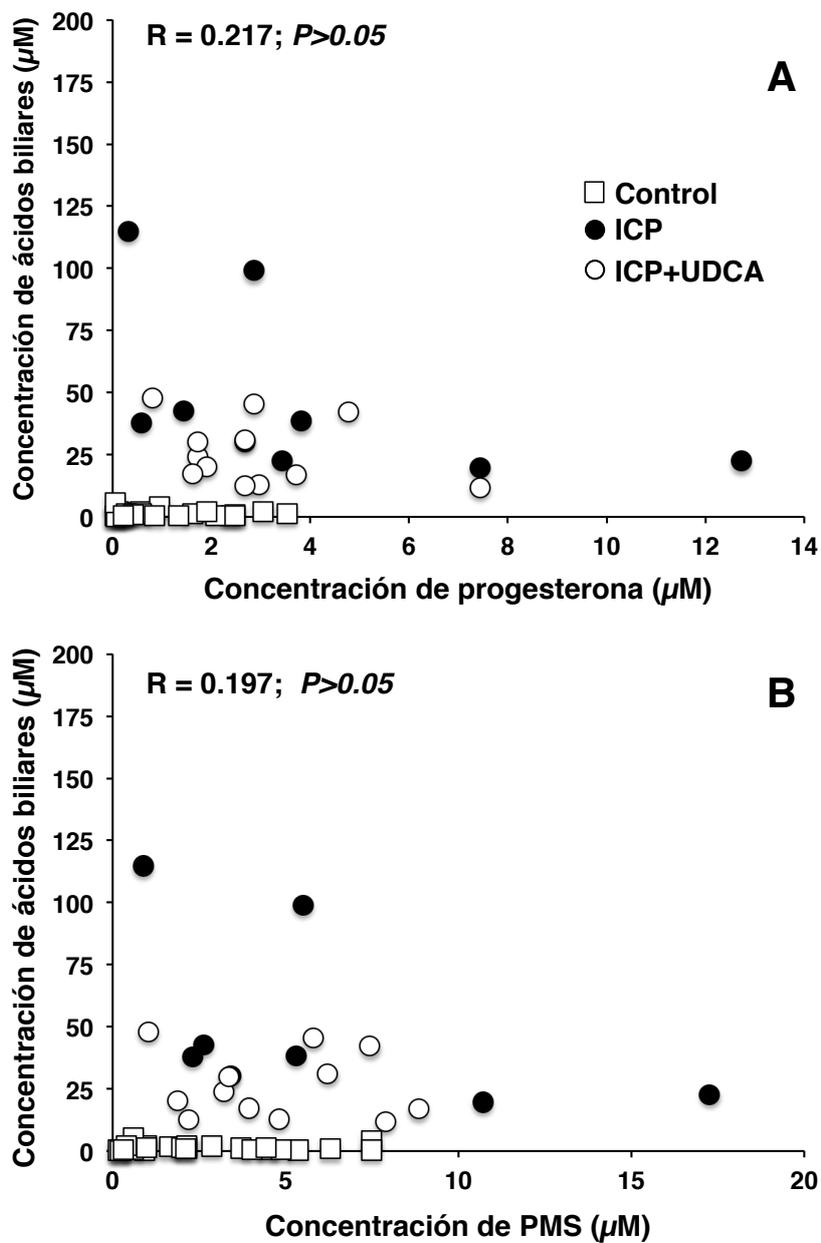
La CIG se acompañó de una acumulación de PMS en el suero materno, desapareciendo las diferencias significativas con el tejido placentario, mientras que los niveles de PMS en suero de cordón umbilical se mantuvieron consistentemente bajos. El tratamiento con UDCA no tuvo un efecto significativo en los niveles o en el balance de PMS observado en el trío madre-placenta-feto (Figura 18).



**Figura 18.** Niveles relativos de derivados sulfatados de progesterona totales (PMS) en muestras pareadas de suero materno, placenta y suero fetal obtenidas de gestaciones control (n=25) o complicadas con CIG sin tratamiento (n=9) o con tratamiento con UDCA (n=15). Los valores son media  $\pm$  EEM. †,  $p < 0.05$ , comparado con la placenta por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni.

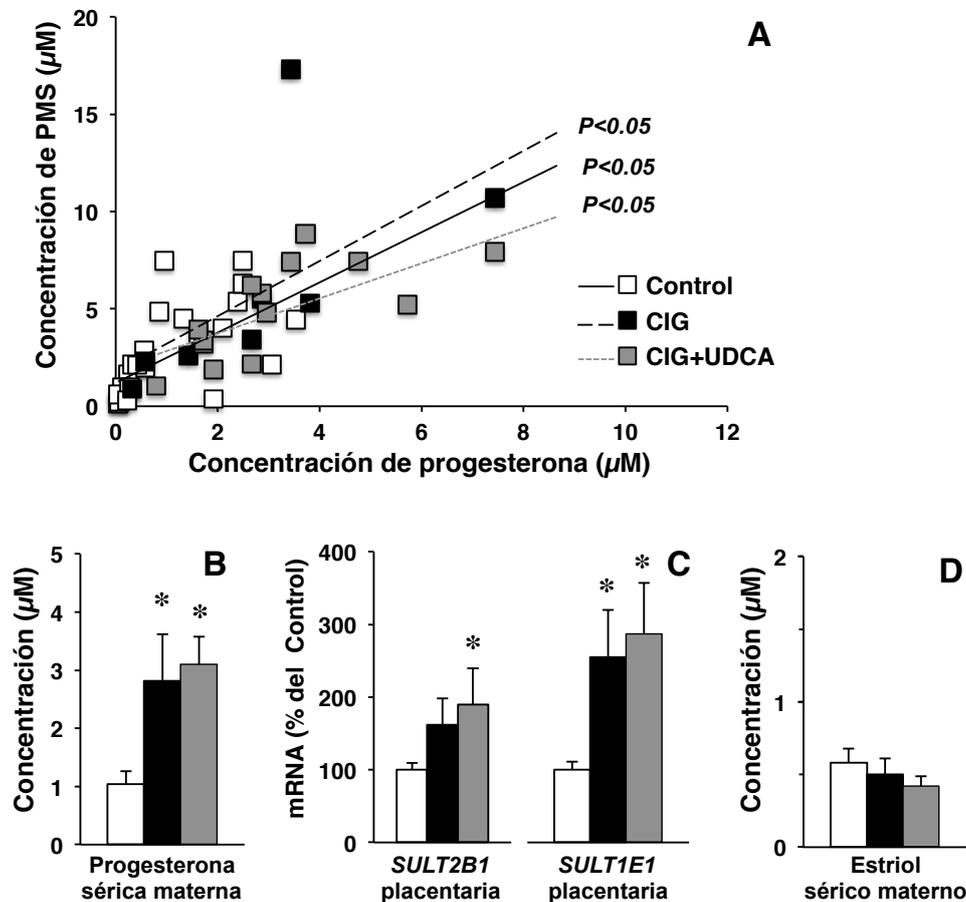
Puesto que el UDCA fue capaz de corregir la acumulación de ácidos biliares en el suero materno de las pacientes con CIG (Figura 13) sin modificar los niveles de PMS (Figura 16), decidimos investigar si existía relación entre los niveles de ácidos biliares y progesterona o sus derivados sulfatados. Para el análisis de la progesterona se utilizó un ensayo de ELISA.

No encontramos correlación entre los niveles de ácidos biliares y progesterona (Figura 19A) y, como cabía esperar a la vista de los resultados que se acaban de comentar, tampoco entre los niveles de ácidos biliares y los metabolitos sulfatados de la hormona (Figura 19B).



**Figura 19.** Relación entre las concentraciones de progesterona y de ácidos biliares totales (A) y de metabolitos sulfatados de progesterona totales (PMS) y de ácidos biliares totales (B) en suero materno a término obtenido de gestaciones control (n=25) o complicadas con CIG sin tratamiento (n=9) o con tratamiento con UDCA (n=15).

Por el contrario, sí encontramos correlaciones significativas entre los niveles séricos de progesterona y sus derivados sulfatados, que fueron similares en los 3 grupos de mujeres; control, CIG y CIG+UDCA (Figura 20A).



**Figura 20.** Relación entre las concentraciones de progesterona y de metabolitos sulfatados de progesterona totales (PMS) en suero materno a término obtenido de gestaciones control ( $n=25$ ) o complicadas con CIG sin tratamiento ( $n=9$ ) o con tratamiento con UDCA ( $n=15$ ) (A). Valores medios de progesterona (B) y estriol (D) en suero materno. Abundancia relativa del RNAm de las enzimas sulfotransferasas *SULT2B1* y *SULT1E1* en la placenta a término (C). Los valores son media  $\pm$  EEM. \*,  $p < 0.05$ , comparado con las muestras control por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni. Los valores de coeficiente de correlación (A) fueron: Control:  $R=0.632$ ,  $P < 0.05$ ; CIG:  $R=0.891$ ,  $P < 0.05$ ; CIG+UDCA:  $R=0.702$ ,  $P < 0.05$ .

Estos datos fueron consistentes con el aumento en la concentración sérica de progesterona en pacientes con CIG, que no se corrigió con el tratamiento con UDCA (Figura 20B). Para investigar si, además de una mayor producción de progesterona, también había una mayor biotransformación de esta hormona, determinamos por PCR cuantitativa a tiempo real los niveles de expresión de dos sulfotransferasas: la *SULT2B1*, encargada de sulfatar preferentemente pregnenolona (Geese & Raftogianis,

2001), y la *SULT1E1*, capaz de sulfatar hormonas esteroideas, incluyendo la pregnenolona (Dawson, 2012).

Como se puede apreciar en la figura 20C, la abundancia relativa del RNAm de *SULT2B1* y *SULT1E1* fue superior en el tejido placentario de gestantes con CIG, y se mantenía con el tratamiento con UDCA. Hay que señalar que los niveles de RNAm de *SULT2B1* fueron mil veces superiores a los de *SULT1E1* en el tejido placentario, por lo que cuantitativamente los cambios en *SULT2B1* serían más relevantes.

Para dilucidar si el efecto beneficioso del UDCA podía estar mediado por cambios en otras hormonas esteroideas que también están aumentadas durante la gestación y que son potencialmente colestáticas, como los estrógenos, decidimos determinar la concentración de estriol en suero materno mediante un ensayo de ELISA. Sin embargo, como se muestra en la figura 20D, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de estriol en suero materno entre los tres grupos experimentales.

En estudios previos se había descrito que la progesterona y sus derivados sulfatados disminuían en suero materno tras el tratamiento con UDCA y los autores proponían que podía ser debido a una mayor secreción biliar por la potente actividad colerética de este ácido biliar (Glantz et al., 2008). Una cuestión interesante que se planteaba era si la eliminación de estos compuestos colestáticos podía ser responsable, en parte, del efecto beneficioso del UDCA. Nuestros resultados sugieren que no es así, ya que el tratamiento con UDCA logró reducir la colanemia, pero sin afectar a los niveles de PMS.

En resumen, la elevación de PMS en las gestantes con CIG podría estar relacionada con un aumento en la síntesis y biotransformación de progesterona, lo que concuerda con la correlación entre los niveles séricos de progesterona y sus metabolitos sulfatados y con la sobre-expresión de las enzimas *SULT2B1* y *SULT1E1* que hemos encontrado en placentas de mujeres con CIG.

#### 4.5. EFECTO DE LA COLESTASIS GESTACIONAL Y DEL TRATAMIENTO CON UDCA EN LA BARRERA PLACENTARIA PARA ÁCIDOS BILIARES Y DERIVADOS DE PROGESTERONA

Como ya se ha comentado, durante la vida intrauterina la placenta facilita la transferencia de ácidos biliares y otros aniones colefilicos desde la circulación fetal a la materna y actúa como una barrera que limita el paso de moléculas presentes en la sangre materna hacia el compartimento fetal. Esta función de tipo “hepatobiliar” se lleva a cabo gracias a la presencia de transportadores de aniones orgánicos en la cara basal (fetal) del trofoblasto y de bombas exportadoras ABC en la cara apical (materna) (Serrano et al., 2007).

Como último objetivo de esta Tesis Doctoral nos planteamos determinar si el efecto beneficioso del UDCA estaba relacionado con cambios en la expresión de proteínas transportadoras en la barrera placentaria para los ácidos biliares y los PMS. Para ello, analizamos, por PCR cuantitativa a tiempo real, los cambios en la expresión de *OATP1B3*, el principal transportador responsable del transporte de ácidos biliares en el trofoblasto (Briz et al., 2003), y de las bombas exportadoras transportadoras de aniones orgánicos localizadas en la placenta (Serrano et al., 2007; Azzarolli et al., 2007; Blazquez et al., 2012). Los resultados se expresaron como porcentaje de la abundancia del RNAm en las muestras control. Los niveles de RNAm de *OATP1B3* en las placentas de los grupos control, CIG y CIG+UDCA fueron  $100 \pm 19$ ,  $106 \pm 26$  y  $85 \pm 12$ , respectivamente.

Como se deduce a la vista del valor de ciclo umbral (Ct) medio obtenido para cada una de las bombas ABC en la PCR (Tabla 24), en las placentas del grupo control, la abundancia relativa del RNAm de *ABCG2* fue alta y similar a la de *ABCB1* y *ABCC1*, mientras que los niveles de *ABCC3* y, sobretodo, de *ABCC2* fueron menores.

**Tabla 24.** Efecto de la CIG y del tratamiento con UDCA en la expresión de bombas exportadoras ABC en placentas humanas a término.

Gen	Ct Control	Control	CIG	CIG+UDCA
<i>ABCG2</i>	20	$100 \pm 14$	$268 \pm 42^a$	$257 \pm 44^a$
<i>ABCC1</i>	21	$100 \pm 14$	$143 \pm 19$	$146 \pm 19$
<i>ABCC2</i>	38	$100 \pm 22$	$128 \pm 39$	$82 \pm 59$
<i>ABCC3</i>	24	$100 \pm 15$	$170 \pm 51$	$157 \pm 45$
<i>ABCB1</i>	19.5	$100 \pm 26$	$301 \pm 33^a$	$232 \pm 38$

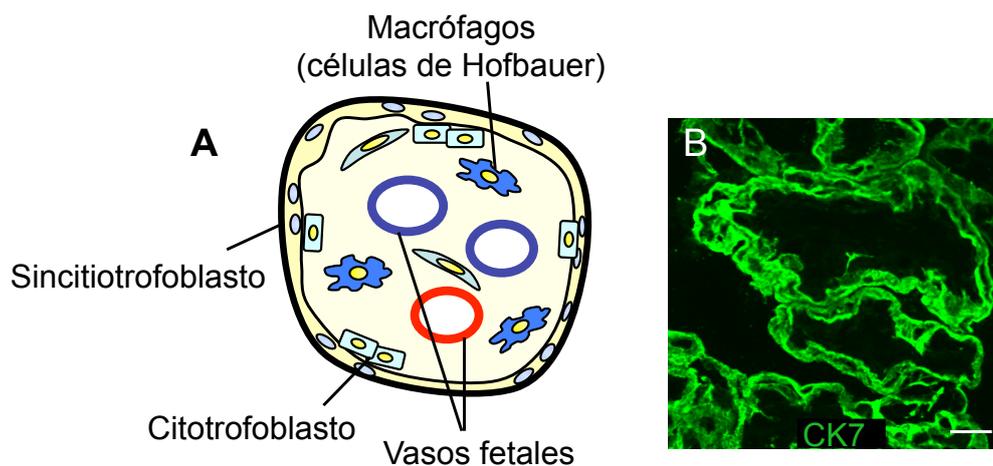
Los valores son media  $\pm$  EEM ( $n \geq 6$  analizados en triplicado) expresados como abundancia relativa respecto al Control. Los resultados se normalizaron con los niveles de GAPDH. <sup>a</sup>  $P < 0.05$ , comparado con las placentas Control mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Ct, ciclo umbral.

La expresión de *ABCG2* y *ABCB1* estaba significativamente aumentada en ambos grupos de pacientes con colestasis, es decir, pacientes con CIG con y sin tratamiento con UDCA. Respecto a *ABCC1*, *ABCC2* y *ABCC3*, aunque se observó una tendencia a aumentar, no se produjo sobre-expresión significativa ni con la colestasis, ni con el tratamiento con UDCA.

Puesto que se cree que BCRP, pero no MDR1, juega un papel en el transporte de ácidos biliares a través de la placenta (Blazquez et al., 2012), decidimos enfocar nuestro interés en esta bomba exportadora. Para analizar la expresión de la proteína utilizamos la técnica de inmunofluorescencia acoplada a microscopía confocal en cortes de criostato de placenta humana.

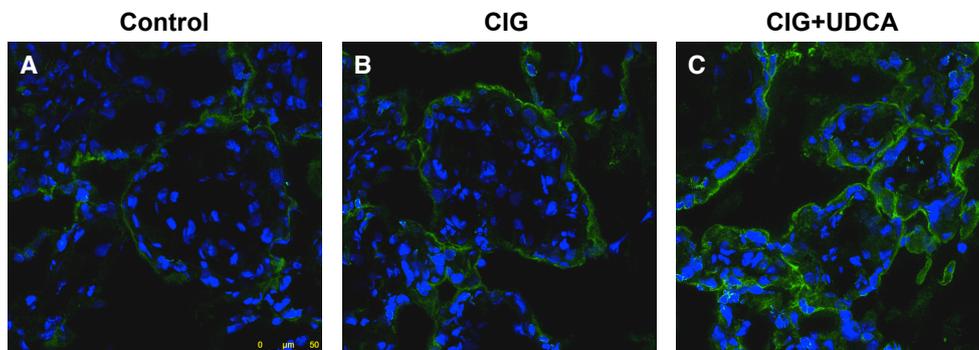
La figura 21A muestra un dibujo esquemático de un corte de vellosidad coriónica en el que se representa la estructura de la placenta y se indican los distintos tipos celulares presentes, con objeto de facilitar la interpretación de las imágenes de inmunohistoquímica que se presentan a continuación.

Para comprobar la viabilidad del tejido placentario para su utilización para esta técnica, elegimos un anticuerpo frente a la citokeratina-7 (CK-7) específico para las células trofoblásticas o trofocitos, en las que se ha descrito que está localizada la proteína BCRP (Serrano et al., 2007; Azzarolli et al., 2007; Blazquez et al., 2012). La figura 21B muestra el marcaje característico del trofoblasto humano (en verde). Se observan cortes de vellosidades de distintos tamaños, cuyo interior se encuentra en contacto con los tejidos fetales mientras que el exterior está rodeado de sangre materna.



**Figura 21.** Dibujo de un corte de vellosidad coriónica mostrando la organización de los distintos tipos celulares en la placenta humana (A). Localización por inmunofluorescencia en cortes de placenta humana control de citokeratina-7 (CK-7) como marcador de trofoblasto (B). Barra de escala = 20  $\mu$ m.

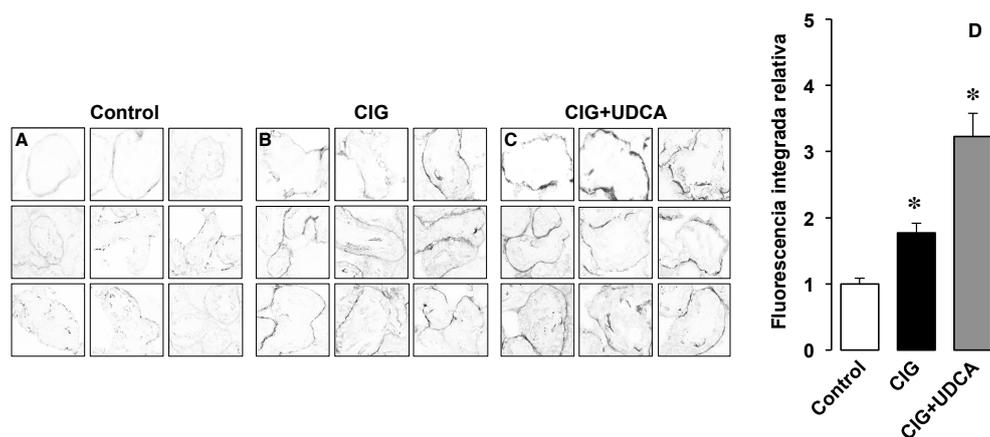
La figura 22A-22C muestra imágenes representativas de la localización de BCRP en placentas control, CIG y CIG+UDCA, respectivamente. Como se había descrito previamente, esta proteína se localiza en la membrana apical del trofoblasto (Serrano et al., 2007).



**Figura 22.** Imágenes representativas de la localización por inmunofluorescencia de BCRP (en color verde) en cortes de placenta humana control (A), del grupo CIG (B) y del grupo CIG+UDCA (C). Los núcleos se marcaron con Dapi.

Nuestros resultados parecían indicar que la inmuno-reactividad estaba aumentada en las placentas de pacientes con CIG y aún más cuando éstas eran tratadas con UDCA (grupo CIG+UDCA).

Para confirmarlo se tomaron imágenes de distintas placentas de cada grupo, y de 3-4 zonas del tejido de cada una de ellas. En la figura 23A-23C se muestran imágenes representativas de la intensidad de la señal de inmunofluorescencia para BCRP en formato inverso (escala de gris) en placentas de mujeres control, CIG y CIG+UDCA, respectivamente. Utilizando el software ImageJ se midió la intensidad de fluorescencia y se corrigió por el área de tejido trofoblástico analizada. En la figura 23D se muestran los valores de fluorescencia integrada relativa en los tres grupos de placentas, que confirman la mayor presencia de esta proteína transportadora en placentas con CIG y, sobretodo, tras el tratamiento con UDCA.



**Figura 23.** Tinción de BCRP en placentas de mujeres control (A), con CIG (B) y con CIG+UDCA (C) en escala de grises para facilitar la cuantificación de la intensidad de señal. Fluorescencia integrada relativa en el tejido trofoblástico (D).

Estos resultados sugieren que el tratamiento con UDCA potencia la expresión de BCRP, la principal bomba exportadora responsable de la transferencia placentaria de ácidos biliares en el sentido feto-a-madre. Esto implica una mayor capacidad defensiva de la barrera protectora de la placenta, reduciendo así la exposición de los tejidos fetales en desarrollo a los niveles de ácidos biliares incrementados en las gestantes con CIG.

En resumen, en pacientes con CIG, el tratamiento con UDCA reduce la acumulación de ácidos biliares en los compartimentos materno y fetal, y también en la placenta. Esto se debe, probablemente, a un efecto beneficioso del UDCA sobre la función hepatobiliar materna, pero no a la reducción de la producción o a una mayor eliminación de estrógenos y metabolitos de progesterona colestáticos. Además, el UDCA refuerza la protección de la barrera placentaria para ácidos biliares y PMS, que ya está estimulada en situaciones de CIG, debido en parte a la sobre-expresión de BCRP, una de las principales proteínas responsables del transporte activo de estos compuestos en la dirección feto-a-madre.

## 5. CONCLUSIONES



#### **CONCLUSIÓN PRIMERA:**

Aunque la colestasis intrahepática gestacional es una patología relativamente frecuente en Argentina, tanto entre la población autóctona como en mujeres oriundas de países limítrofes, con incidencias superiores a las encontradas en la mayoría de los países de Europa, América del Norte y Asia, ni las características clínicas de las pacientes, ni las complicaciones del embarazo observadas en este estudio fueron diferentes a las descritas en otras series de gestantes con esta patología de similar o diferente procedencia geográfica.

#### **CONCLUSIÓN SEGUNDA:**

En gestaciones que cursan con colestasis intrahepática gestacional severa, la presencia de meconio en líquido amniótico se relaciona con un significativo aumento del riesgo perinatal, como lo demuestra su asociación con nacimiento muy prematuro (antes de la semana 32) y alteración de la vitalidad fetal. Una estrecha monitorización de estas pacientes permite actuar a tiempo y reducir la mortalidad perinatal, que fue nula en el presente estudio.

#### **CONCLUSIÓN TERCERA:**

Existe un mayor riesgo de aparición de meconio en líquido amniótico, y por tanto de que se produzcan efectos adversos para el feto, cuando en el momento del diagnóstico de la colestasis intrahepática gestacional se superan los valores de corte de determinados parámetros del perfil sérico (ácidos biliares  $\geq 40$   $\mu\text{M}$ , transaminasa glutámico pirúvica  $\geq 80$  UI/L, gamma-glutamil transpeptidasa  $\geq 40$  UI/L y bilirrubina  $\geq 0.3$  mg/dL). El tratamiento con ácido ursodesoxicólico no parece prevenir la aparición de tinción meconial.

#### **CONCLUSIÓN CUARTA:**

En gestaciones con colestasis intrahepática gestacional, el tratamiento con ácido ursodesoxicólico reduce la acumulación en el trinomio suero materno-placenta-suero fetal de ácidos biliares, pero no la de metabolitos sulfatados de progesterona. Este efecto se debe probablemente a una mejora de la función hepatobiliar materna, y no a

una reducción de la producción de estrógenos o de metabolitos de progesterona coléstaticos, ni a un aumento de su eliminación.

**CONCLUSIÓN QUINTA:**

La protección de la barrera placentaria para ácidos biliares y metabolitos sulfatados de progesterona se encuentra aumentada en situaciones de colestasis intrahepática gestacional debido, en parte, a la sobre-expresión de la bomba exportadora BCRP, una de las principales proteínas responsables del transporte activo de estos compuestos en la dirección feto-a-madre. La administración de ácido ursodesoxicólico potencia la expresión de BCRP y refuerza la barrera placentaria.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**



- Abdul Kadir SH, Miragoli M, Abu-Hayyeh S, Moshkov AV, Xie Q, Keitel V, Nikolaev VO, Williamson C, Gorelik J. 2010. Bile acid-induced arrhythmia is mediated by muscarinic M2 receptors in neonatal rat cardiomyocytes. *PLoS* 5: e9689.
- Abu-Hayyeh S, Papacleovoulou G, Lövgren-Sandblom A, Tahir M, Oduwole O, Jamaludin NA, Ravat S, Nikolova V, Chambers J, Selden C, Rees M, Marschall HU, Parker MG, Williamson C. 2013. Intrahepatic cholestasis of pregnancy levels of sulfated progesterone metabolites inhibit farnesoid X receptor resulting in a cholestatic phenotype. *Hepatology* 57: 716-26.
- Aguirre Unceta-Barrenechea A, Aguirre Conde A, Pérez Legórburu A, Echániz Urcelay I. 2008. Recién nacido de peso elevado. Asociación Española de Pediatría. Protocolos actualizados en 2008. [http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/10\\_1.pdf](http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/10_1.pdf).
- Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. 1998. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* 58: 5337-9.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. 2008. ACOG Practice Bulletin No. 97: Fetal lung maturity. *Obstet Gynecol* 112: 717-26.
- Angelin B, Einarsson K, Hellstrom K. 1976. Evidence for the absorption of bile acids in the proximal small intestine of normo- and hyperlipidaemic subjects. *Gut* 17: 420-5.
- Arrese M, Macias RI, Briz O, Perez MJ, Marin JJ. 2008. Molecular pathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Expert Rev Mol Med* 10: e9.
- Arrese M, Reyes H. 2006. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: a past and present riddle. *Ann Hepatol* 5: 202-5.
- Azzaroli F, Mennone A, Feletti V, Simoni P, Baglivo E, Montagnani M, Rizzo N, Pelusi G, DE Aloysio D, Lodato F, Festi D, Colecchia A, Roda E, Boyer JL, Mazzella G. 2007. Clinical trial: modulation of human placental multidrug resistance proteins in cholestasis of pregnancy by ursodeoxycholic acid. *Aliment Pharmacol Ther* 26: 1139-46.
- Bacq Y. Liver diseases unique to pregnancy: A 2010 update. 2011. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 35: 182-93.
- Bacq Y, Sapey T, Bréchet MC, Pierre F, Fignon A, Dubois F. 1997. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: a French prospective study. *Hepatology* 26: 358-64.
- Bacq Y, Sentilhes L, Reyes HB, Glantz A, Kondrackiene J, Binder T, Nicastri PL, Locatelli A, Floreani A, Hernandez I, Di Martino V. 2012. Efficacy of ursodeoxycholic acid in treating intrahepatic cholestasis of pregnancy: a meta-analysis. *Gastroenterology* 143: 1492-501.
- Back P, Walter K. 1980. Developmental pattern of bile acid metabolism as revealed by bile acid analysis of meconium. *Gastroenterology* 78: 671-6.
- Balistreri WF, HH AK, Setchell KD, Gremse D, Ryckman FC, Schroeder TJ. 1992. New methods for assessing liver function in infants and children. *Ann Clin Lab Sci* 22: 162-74.
- Ballatori N. 2005. Biology of a novel organic solute and steroid transporter, OSTalpha-OSTbeta. *Exp Biol Med (Maywood)* 230: 689-98.

- Ballatori N, Christian WV, Lee JY, Dawson PA, Soroka CJ, Boyer JL, Madejczyk MS, Li N. 2005. OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology* 42: 1270-9.
- Baticón D. 1999. Fisiología de la fecundación, embarazo, parto y lactancia. In Fisiología Humana. Tresguerres JAF, editor. MacGraw-Hill-Interamericana, Madrid.
- Beaconsfield P, Birdwood G, Beaconsfield R. 1980. The placenta. *Sci Am* 243: 94-102.
- Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Harris Requejo J, Rubens C, Menon R, Van Look PFA. 2010. Incidencia mundial de parto prematuro: revisión sistemática de la morbilidad y mortalidad maternas. *Boletín de la OMS- <http://www.who.int/bulletin/volumes/88/1/08-062554-ab/es/>*.
- Behrman RE KR, Nelson WE and Vaughan III VC. 1992. In Tratado de pediatría. MacGraw-Hill-Interamericana, Madrid.
- Benz C, Angermuller S, Tox U, Kloters-Plachky P, Riedel HD, Sauer P, Stremmel W, Stiehl A. 1998. Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile-acid-induced apoptosis and cytolysis in rat hepatocytes. *J Hepatol* 28: 99-106.
- Berg B, Helm G, Petersohn L, Tryding N. 1986. Cholestasis of pregnancy. Clinical and laboratory studies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 65: 107-13.
- Beuers U, Pusch T. 2006. Intrahepatic cholestasis of pregnancy--a heterogeneous group of pregnancy-related disorders? *Hepatology* 43: 647-9.
- Bjorkhem I. 1992. Mechanism of degradation of the steroid side chain in the formation of bile acids. *J Lipid Res* 33: 455-71.
- Blazquez AG, Briz O, Romero MR, Rosales R, Monte MJ, Vaquero J, Macias RI, Cassio D, Marin JJ. 2012. Characterization of the role of ABCG2 as a bile acid transporter in liver and placenta. *Mol Pharmacol* 81: 273-83.
- Bolier R, Oude Elferink RP, Beuers U. 2013. Advances in pathogenesis and treatment of pruritus. *Clin Liver Dis* 17: 319-29.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. 1999. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* 1461: 347-57.
- Bosch I, Croop J. 1996. P-glycoprotein multidrug resistance and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1288: F37-54.
- Brites D. 2002. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: changes in maternal-fetal bile acid balance and improvement by ursodeoxycholic acid. *Ann Hepatol* 1: 20-8.
- Brites D, Poeiras J, Rodrigues C. 1994. Intrahepatic cholestasis in pregnancy. Its etiopathogenesis, prognosis and therapy. *Acta Med Port* 7: 181-8.
- Brites D, Rodrigues CM. 1998. Elevated levels of bile acids in colostrum of patients with cholestasis of pregnancy are decreased following ursodeoxycholic acid therapy. *J Hepatol* 29: 743-51.
- Brites D, Rodrigues CM, Oliveira N, Cardoso M, Graça LM. 1998. Correction of maternal serum bile acid profile during ursodeoxycholic acid therapy in cholestasis of pregnancy. *J Hepatol* 28: 91-8.

- Briz O, Romero MR, Martinez-Becerra P, Macias RI, Perez MJ, Jimenez F, San Martin FG, Marin JJ. 2006. OATP8/1B3-mediated cotransport of bile acids and glutathione: an export pathway for organic anions from hepatocytes? *J Biol Chem* 281: 30326-35.
- Briz O, Serrano MA, Maclas RI, Gonzalez-Gallego J, Marin JJ. 2003. Role of organic anion-transporting polypeptides, OATP-A, OATP-C and OATP-8, in the human placenta-maternal liver tandem excretory pathway for foetal bilirubin. *Biochem J* 371: 897-905.
- Burton GJ, Jauniaux E. 2001. Maternal vascularisation of the human placenta: does the embryo develop in a hypoxic environment? *Gynecol Obstet Fertil* 29: 503-8.
- Burton GJ, Jauniaux E. 2004. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 11: 342-52.
- Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. 2002. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2954-9.
- Bhutani VK. 2008. Developing a systems approach to prevent meconium aspiration syndrome: lessons learned from multinational studies. *J Perinatol* 28: S30-5.
- Byrne JA, Strautnieks SS, Mieli-Vergani G, Higgins CF, Linton KJ, Thompson RJ. 2002. The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* 123: 1649-58.
- Cabral DJ, Small DM, Lilly HS, Hamilton JA. 1987. Transbilayer movement of bile acids in model membranes. *Biochemistry* 26: 1801-4.
- Carbonne B, Rosenblatt J. 2005. Prevention of recurrent preterm birth: a comeback for progesterone?. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 34: S127-36.
- Carter J. 1991. Serum bile acids in normal pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 98: 540-3.
- Castaño G, Lucangioli S, Sookoian S, Mesquida M, Lemberg A, Di Scala M, Franchi P, Carducci C, Tripodi V. 2006. Bile acid profiles by capillary electrophoresis in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Clin Sci (Lond)* 110: 459-65.
- Cleary GM, Wiswell TE. 1998. Meconium-stained amniotic fluid and the meconium aspiration syndrome. An update. *Pediatr Clin North Am* 45: 511-29.
- Colombo C, Roda A, Roda E, Buscaglia M, dell'Agnola CA, Filippetti P, Ronchi M, Sereni F. 1985. Correlation between fetal and maternal serum bile acid concentrations. *Pediatr Res* 19: 227-31.
- Colombo C, Zuliani G, Ronchi M, Breidenstein J, Setchell KD. 1987. Biliary bile acid composition of the human fetus in early gestation. *Pediatr Res* 21: 197-200.
- Combettes L, Berthon B, Claret M. 1992. Tauroolithocholate-induced Ca<sup>2+</sup> release is inhibited by phorbol esters in isolated hepatocytes. *Biochem J* 287: 891-6.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. 1990. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 38: 1277-87.

- Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH, Dawson PA. 1998. Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol* 274: G157-69.
- Cui Y, König J, Leier I, Buchholz U, Keppler D. 2001. Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *J Biol Chem* 276: 9626-30.
- Cutié Bressler ML, Figueroa Mendoza M, Segura Fernández AB, Lestayo Dorta C. 2002. *Rev Cubana Obstet Ginecol* [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-600X2002000100006](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2002000100006).
- Dargaville PA. 2012. Respiratory support in meconium aspiration syndrome: a practical guide. *Int J Pediatr* 965159.
- Dargaville PA, Copnell B; Australian and New Zealand Neonatal Network. 2006. The epidemiology of meconium aspiration syndrome: incidence, risk factors, therapies, and outcome. *Pediatrics* 117: 1712-21.
- Dargaville PA, Mills JF. 2005. Surfactant therapy for meconium aspiration syndrome: current status. *Drugs* 65: 2569-91.
- Davies MH, da Silva RC, Jones SR, Weaver JB, Elias E. 1995. Fetal mortality associated with cholestasis of pregnancy and the potential benefit of therapy with ursodeoxycholic acid. *Gut* 37: 580-4.
- Davies MH, Ngong JM, Yucesoy M, Acharya SK, Mills CO, Weaver JB, Waring RH, Elias E. 1994. The adverse influence of pregnancy upon sulphation: a clue to the pathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy? *J Hepatol* 21: 1127-34.
- Dawson PA. 2011. Sulfate in fetal development. *Semin Cell Dev Biol* 22: 653-9.
- Dawson PA, Hubbert M, Haywood J, Craddock AL, Zerangue N, Christian WV, Ballatori N. 2005. The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter. *J Biol Chem* 280: 6960-8.
- Dean M, Annilo T. 2005. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6: 123-42.
- De Luca D, Minucci A, Zecca E, Piastra M, Pietrini D, Carnielli VP, Zuppi C, Tridente A, Conti G, Capoluongo ED. 2009. Bile acids cause secretory phospholipase A2 activity enhancement, revertible by exogenous surfactant administration. *Intensive Care Med* 35: 321-6.
- Deleze G, Paumgartner G, Karlaganis G, Giger W, Reinhard M, Sidiropoulos D. 1978. Bile acid pattern in human amniotic fluid. *Eur J Clin Invest* 8: 41-5.
- DeSanty KP, Amabile CM. 2007. Antidepressant-induced liver injury. *Ann Pharmacother* 41: 1201-11.
- Donner MG, Keppler D. 2001. Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology* 34: 351-9.
- EASL. 2009. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* 51: 237-67.

- El-Mir MY, Badia MD, Luengo N, Monte MJ, Marin JJ. 2001. Increased levels of typically fetal bile acid species in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Sci (Lond)* 100: 499-508.
- El Shahed AI, Dargaville P, Ohlsson A, Soll RF. 2007. Surfactant for meconium aspiration syndrome in full term/near term infants. *Cochrane Database Syst Rev* CD002054.
- Espinheira MC, Grilo M, Rocha G, Guedes B, Guimarães H. 2011. Meconium aspiration syndrome - the experience of a tertiary center. *Rev Port Pneumol* 17: 71-6.
- Erlinger S. 1996. Review article: new insights into the mechanisms of hepatic transport and bile secretion. *J Gastroenterol Hepatol* 11: 575-9.
- Estiú MC, Frailuna MA, Dericco M, Repetto J. 2011. Colestasis intrahepática gestacional. [http://www.sarda.org.ar/Profesionales/Guias\\_y\\_Trabajos/Guias\\_de\\_Practica\\_Clinica/Colestasis\\_Intrahepatica\\_Gestacional](http://www.sarda.org.ar/Profesionales/Guias_y_Trabajos/Guias_de_Practica_Clinica/Colestasis_Intrahepatica_Gestacional).
- Fanaroff AA. 2008. Meconium aspiration syndrome: historical aspects. *J Perinatol* 28: S3-7.
- Fisk NM, Storey GN. 1988. Fetal outcome in obstetric cholestasis. *Br J Obstet Gynaecol* 95: 1137-43.
- Frohling W, Stiehl A. 1976. Bile salt glucuronides: identification and quantitative analysis in the urine of patients with cholestasis. *Eur J Clin Invest* 6: 67-74.
- Ganchimeg T, Ota E, Morisaki N, Laopaiboon M, Lumbiganon P, Zhang J, Yamdamsuren B, Temmerman M, Say L, Tunçalp Ö, Vogel JP, Souza JP, Mori R; WHO Multicountry Survey on Maternal Newborn Health Research Network. 2014. Pregnancy and childbirth outcomes among adolescent mothers: a World Health Organization multicountry study. *BJOG* 121: 40-8.
- Gatmaitan ZC, Arias IM. 1995. ATP-dependent transport systems in the canalicular membrane of the hepatocyte. *Physiol Rev* 75: 261-75.
- Geenes V, Chappell LC, Seed PT, Steer PJ, Knight M, Williamson C. 2014b. Association of severe intrahepatic cholestasis of pregnancy with adverse pregnancy outcomes: a prospective population-based case-control study. *Hepatology* 59: 1482-91.
- Geenes V, Lövgren-Sandblom A, Benthin L, Lawrance D, Chambers J, Gurung V, Thornton J, Chappell L, Khan E, Dixon P, Marschall HU, Williamson C. 2014a. The reversed fetomaternal bile acid gradient in intrahepatic cholestasis of pregnancy is corrected by ursodeoxycholic acid. *PLoS One* 9: e83828
- Geenes V, Williamson C. 2009. Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *World J Gastroenterology* 15: 2049-66.
- Geese WJ, Raftogianis RB. 2001. Biochemical characterization and tissue distribution of human SULT2B1. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 280-9.
- Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ. 1998. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 273: 10046-50.
- Glantz A, Marschall HU, Mattsson LA. 2004. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Relationships between bile acid levels and fetal complication rates. *Hepatology* 40: 467-74.

- Glantz A, Reilly SJ, Benthin L, Lammert F, Mattsson LA, Marschall HU. 2008. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: amelioration of pruritus by UDCA is associated with decreased progesterone disulphates in urine. *Hepatology* 47: 544-51.
- Goldstein LJ. 1996. MDR1 gene expression in solid tumours. *Eur J Cancer* 32A: 1039-50.
- Goldstein LJ, Gottesman MM, Pastan I. 1991. Expression of the MDR1 gene in human cancers. *Cancer Treat Res* 57: 101-19.
- Gómez-Rodríguez L. 2013. Puesta a punto de la determinación por HPLC-MS/MS de ácidos biliares y esteroides sulfatados en suero de pacientes con colestasis intrahepática gestacional.
- Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC, Hobbs HH. 2003. ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem* 278: 48275-82.
- Grandi C, Rojas Escalante E, Solana CL, Largaña-Avellaneda M. 2012. Estadísticas NOECOSUR Hospital Materno Infantil "Ramón Sardá" 2011. *Rev Hosp Mat Inf Ramón Sardá* 31: 180.
- Grandi C, Tapia JL, Marshall G; Grupo Colaborativo NEOCOSUR. 2005. An assessment of the severity, proportionality and risk of mortality of very low birth weight infants with fetal growth restriction. A multicenter South American analysis. *J Pediatr (Rio J)* 81: 198-204.
- Hagenbuch B, Meier PJ. 2004. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 447: 653-65.
- Herraez E, Lozano E, Poli E, Keitel V, De Luca D, Williamson C, Marin JJ, Macias RI. 2014. Role of macrophages in bile acid-induced inflammatory response of fetal lung during maternal cholestasis. *J Mol Med (Berl)* 92: 359-72.
- He J, Chen L, Liang C. 2011. Clinical analysis of fetal death cases in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 46: 333-7.
- Heikkinen J, Mäentausta O, Ylöstalo P, Jänne O. 1982. Serum bile acid levels in intrahepatic cholestasis of pregnancy during treatment with phenobarbital or cholestyramine. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 14: 153-62.
- Hill M, Parizek A, Kancheva R, Jirasek J. 2011. Reduced progesterone metabolites in human late pregnancy. *Physiol Res* 60: 225-41.
- Houten SM, Watanabe M, Auwerx J. 2006. Endocrine functions of bile acids. *EMBO J* 25: 1419-25.
- Hutton EK, Thorpe J. 2014. Consequences of meconium stained amniotic fluid: What does the evidence tell us? *Early Hum Dev* 90: 333-339.
- Ikemoto S, Takahashi M, Tsunoda N, Maruyama K, Itakura H, Kawanaka K, Tabata I, Higuchi M, Tange T, Yamamoto TT, Ezaki O. 1997. Cholate inhibits high-fat diet-induced hyperglycemia and obesity with acyl-CoA synthetase mRNA decrease. *Am J Physiol* 273: E37-45.

- Imai Y, Asada S, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y. 2003. Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Mol Pharmacol* 64: 610-8.
- Izukura M, Hashimoto T, Gomez G, Uchida T, Greeley GH, Jr., Thompson JC. 1991. Intracolonic infusion of bile salt stimulates release of peptide YY and inhibits cholecystokinin-stimulated pancreatic exocrine secretion in conscious dogs. *Pancreas* 6: 427-32.
- Jamjute P, Ahmad A, Ghosh T, Banfield P. 2009. Liver function test and pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 22: 274-83.
- Janvilisri T, Shahi S, Venter H, Balakrishnan L, van Veen HW. 2005. Arginine-482 is not essential for transport of antibiotics, primary bile acids and unconjugated sterols by the human breast cancer resistance protein (ABCG2). *Biochem J* 385: 419-26.
- Jebbink J, Tabbers M, Afink G, Beuers U, Elferink RO, Ris-Stalpers C, van der Post J. 2014. HELLP syndrome preceded by intrahepatic cholestasis of pregnancy: one serious itch. *BMJ Case Rep*.
- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Burchell B, Keppler D. 1997. ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem J* 327: 305-10.
- Juliano R. 1976. Drug-resistant mutants of Chinese hamster ovary cells possess an altered cell surface carbohydrate component. *J Supramol Struct* 4: 521-6.
- Kamanu CI, Onwere S, Chigbu B, Aluka C, Okoro O, Obasi M. 2009. Fetal macrosomia in African women: a study of 249 cases. *Arch Gynecol Obstet* 279: 857-61.
- Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R, Keppler D. 1996. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 23: 1061-6.
- Kaufmann P, Bruns U, Leiser R, Luckhardt M, Winterhager E. 1985. The fetal vascularisation of term human placental villi. II. Intermediate and terminal villi. *Anat Embryol (Berl)* 173: 203-14.
- Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M. 2003. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 278: 9435-40.
- Kimura A, Mahara R, Tohma M, Ushijima K, Yuge K, Ono E, Yamashita F. 1989. Unusual 1 beta-hydroxylated bile acids in children with a paucity in interlobular bile ducts. *Clin Chim Acta* 185: 215-7.
- Kliman HJ. 2000. Uteroplacental blood flow. The story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion. *Am J Pathol* 157: 1759-68.
- Kondrackiene J, Kupcinskas L. 2008. Intrahepatic cholestasis of pregnancy-current achievements and unsolved problems. *World J Gastroenterol* 14: 5781-8.
- Kowalski A, Janosz-Gałydyś I, Olejek A, Bodzek P. 2014. Correlation between serum levels of bile acids in pregnant women with intrahepatic cholestasis of pregnancy and condition of their newborns. *Ginekol Pol* 85: 101-4.

- Kramer W, Buscher HP, Gerok W, Kurz G. 1979. Bile salt binding to serum components. Taurocholate incorporation into high-density lipoprotein revealed by photoaffinity labelling. *Eur J Biochem* 102: 1-9.
- Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP, Schuetz JD. 2004. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* 279: 24218-25.
- Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ, Hagenbuch B. 2001. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120: 525-33.
- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ. 2000. Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis* 20: 273-92.
- Kusuhara H, Sugiyama Y. 2007. ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Arch* 453: 735-44.
- Laatikainen T, Ikonen E. 1975. Fetal prognosis in obstetric hepatitis. *Ann Chir Gynaecol Fenn* 64: 155-64.
- Laatikainen T, Ikonen E. 1977. Serum bile acids in cholestasis of pregnancy. *Obstet Gynecol* 50: 313-8.
- Laatikainen T, Tulenheimo A. 1984. Maternal serum bile acid levels and fetal distress in cholestasis of pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 22: 91-4.
- Lammert F, Marschall HU, Glantz A, Matern S. 2000. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: molecular pathogenesis, diagnosis and management. *J Hepatol* 33: 1012-21.
- Lammert F, Marschall HU, Matern S. 2003. Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *Curr Treat Options Gastroenterol* 6: 123-132.
- Lazaridis KN, Pham L, Tietz P, Marinelli RA, deGroen PC, Levine S, Dawson PA, LaRusso NF. 1997. Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest* 100: 2714-21.
- Lee RH, Kwok KM, Ingles S, Wilson ML, Mullin P, Incerpi M, Pathak B, Goodwin TM. 2008. Pregnancy outcomes during an era of aggressive management for intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Am J Perinatol* 25: 341-5.
- Lester R. 1983. Introduction. Bile acid metabolism in the newborn. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2: 335-6.
- Levene MI, Sands C, Grindulis H, Moore JR. 1986. Comparison of two methods of predicting outcome in perinatal asphyxia. *Lancet* 1: 67-9.
- Li L, Meier PJ, Ballatori N. 2000. Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione. *Mol Pharmacol* 58: 335-40.
- Lomuto CC. 2008. Situación de la Salud Perinatal República Argentina 2006. *Rev Hosp Mat Inf Ramón Sardá* 27: 128.
- Lorente S, Montoro M. 2007. Colestasis gravídica. *Gastroenterol Hepatol* 30: 541-7.

- Lotze A, Mitchell BR, Bulas DI, Zola EM, Shalwitz RA, Gunkel JH. 1998. Multicenter study of surfactant (beractant) use in the treatment of term infants with severe respiratory failure. *Survanta in Term Infants Study Group. J Pediatr* 132: 40-7.
- Lumbiganon P, Laopaiboon M, Intarut N, Vogel JP, Souza JP, Gülmezoglu AM, Mori R; WHO Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health Research Network. 2014. Indirect causes of severe adverse maternal outcomes: a secondary analysis of the WHO Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health. *BJOG* 121: 32-9.
- Macias RI, Jimenez S, Serrano MA, Monte MJ, Marin JJ. 2006. Effect of maternal cholestasis and treatment with ursodeoxycholic acid on the expression of genes involved in the secretion of biliary lipids by the neonatal rat liver. *Life Sci* 79: 1014-9.
- Macias RI, Pascual MJ, Bravo A, Alcalde MP, Larena MG, St-Pierre MV, Serrano MA, Marin JJ. 2000. Effect of maternal cholestasis on bile acid transfer across the rat placenta-maternal liver tandem. *Hepatology* 31: 975-83.
- Macias RI, Marin JJ, Serrano MA. 2009. Excretion of biliary compounds during intrauterine life. *World J Gastroenterol* 15: 817-28.
- Mahagita C, Grassl SM, Piyachaturawat P, Ballatori N. 2007. Human organic anion transporter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G271-8.
- Marin JJ, Barbero ER, Herrera MC, Tabernero A, Monte MJ. 1993. Bile acid-induced modifications in DNA synthesis by the regenerating perfused rat liver. *Hepatology* 18: 1182-92.
- Marin JJ, Bravo P, el-Mir MY, Serrano MA. 1995. ATP-dependent bile acid transport across microvillous membrane of human term trophoblast. *Am J Physiol* 268: G685-94.
- Marin JJ, Briz O, Serrano MA. 2004. A review on the molecular mechanisms involved in the placental barrier for drugs. *Curr Drug Deliv* 1: 275-89.
- Marin JJ, Macias RI, Serrano MA. 2003. The hepatobiliary-like excretory function of the placenta. A review. *Placenta* 24: 431-8.
- Marin JJ, Serrano MA, el-Mir MY, Eleno N, Boyd CA. 1990. Bile acid transport by basal membrane vesicles of human term placental trophoblast. *Gastroenterology* 99: 1431-8.
- Marschall HU, Stephansson O. 2014. Intrahepatic cholestasis of pregnancy and the risk of subsequent hepatobiliary disorders. *Hepatology* (en prensa)
- Martineau M, Raker C, Powrie R, Williamson C. 2014. Intrahepatic cholestasis of pregnancy is associated with an increased risk of gestational diabetes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 176: 80-5.
- Meier PJ, Stieger B. 2002. Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 64: 635-61.
- Mekhjian HS, Phillips SF, Hofmann AF. 1979. Colonic absorption of unconjugated bile acids: perfusion studies in man. *Dig Dis Sci* 24: 545-50.
- Meng LJ, Reyes H, Palma J, Hernandez I, Ribalta J, Sjövall J. 1997. Profiles of bile acids and progesterone metabolites in the urine and serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Hepatology* 127: 346-57.

- Milkiewicz P, Gallagher R, Chambers J, Eggington E, Weaver J, Elias E. 2003. Obstetric cholestasis with elevated gamma glutamyl transpeptidase: incidence, presentation and treatment. *J Gastroenterol Hepatol* 18: 1283-6.
- Miragoli M, Kadir SH, Sheppard MN, Salvarani N, Virta M, Wells S, Lab MJ, Nikolaev VO, Moshkov A, Hague WN, Rohr S, Williamson C, Gorelik J. 2011. A protective antiarrhythmic role of ursodeoxycholic acid in an in vitro rat model of the cholestatic fetal heart. *Hepatology* 54: 1282-92.
- Mistry HD, Broughton Pipkin F, Redman CW, Poston L. 2012. Selenium in reproductive health. *Am J Obstet Gynecol* 206: 21-30.
- Monte MJ, Rodriguez-Bravo T, Macias RI, Bravo P, el-Mir MY, Serrano MA, Lopez-Salva A, Marin JJ. 1995. Relationship between bile acid transplacental gradients and transport across the fetal-facing plasma membrane of the human trophoblast. *Pediatr Res* 38: 156-63.
- Morisaki N, Togoobaatar G, Vogel JP, Souza JP, Rowland Hogue CJ, Jayaratne K, Ota E, Mori R; WHO Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health Research Network. 2014. Risk factors for spontaneous and provider-initiated preterm delivery in high and low Human Development Index countries: a secondary analysis of the World Health Organization Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health. *BJOG* 121:101-9.
- Moster D, Lie RT, Irgens LM, Bjerkedal T, Markestad T. 2001. The association of Apgar score with subsequent death and cerebral palsy: A population-based study in term infants. *J Pediatr* 138: 798-803.
- Mouro I, Halleck MS, Schlegel RA, Mattei MG, Williamson P, Zachowski A, Devaux P, Cartron JP, Colin Y. 1999. Cloning, expression, and chromosomal mapping of a human ATPase II gene, member of the third subfamily of P-type ATPases and orthologous to the presumed bovine and murine aminophospholipid translocase. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 333-9.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263-73.
- Munro HN. 1980. Placenta in relation to nutrition. Introduction. *Fed Proc* 39: 236-8.
- Nagashige M, Ushigome F, Koyabu N, Hirata K, Kawabuchi M, Hirakawa T, Satoh S, Tsukimori K, Nakano H, Uchiumi T, Kuwano M, Ohtani H, Sawada Y. 2003. Basal membrane localization of MRP1 in human placental trophoblast. *Placenta* 24: 951-8.
- Nakagawa M, Setchell KD. 1990. Bile acid metabolism in early life: studies of amniotic fluid. *J Lipid Res* 31: 1089-98.
- Nies AT, Keppler D. 2007. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch* 453: 643-59.
- Ogawa K, Suzuki H, Hirohashi T, Ishikawa T, Meier PJ, Hirose K, Akizawa T, Yoshioka M, Sugiyama Y. 2000. Characterization of inducible nature of MRP3 in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278: G438-46.
- Oude Elferink RP, Kremer AE, Beuers U. 2011a. Mediators of pruritus during cholestasis. *Curr Opin Gastroenterol* 27: 289-93.

- Oude Elferink RP, Kremer AE, Martens JJ, Beuers UH. 2011b. The molecular mechanism of cholestatic pruritus. *Dig Dis* 29: 66-71.
- Palma J, Reyes H, Ribalta J, Iglesias J, Gonzalez MC, Hernandez I, Alvarez C, Molina C, Danitz AM. 1992. Effects of ursodeoxycholic acid in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Hepatology* 15: 1043-7.
- Papacleovoulou G, Abu-Hayyeh S, Nikolopoulou E, Briz O, Owen BM, Nikolova V, Ovadia C, Huang X, Vaarasmaki M, Baumann M, Jansen E, Albrecht C, Jarvelin MR, Marin JJ, Knisely AS, Williamson C. 2013. Maternal cholestasis during pregnancy programs metabolic disease in offspring. *J Clin Invest* 123: 3172-81.
- Pascual MJ, Serrano MA, El-Mir MY, Macias RI, Jiménez F, Marin JJ. 2002. Relationship between asymptomatic hypercholanemia of pregnancy and progesterone metabolism. *Clin Sci (Lond)* 102: 587-93.
- Pata O, Vardareli E, Ozcan A, Serteser M, Unsal I, Saruç M, Uniu C, Tozün N. 2011. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Correlation of preterm delivery with bile acids. *Turk J Gastroenterol* 22: 602-5.
- Patel P, Weerasekera N, Hitchins M, Boyd CA, Johnston DG, Williamson C. 2003. Semi quantitative expression analysis of MDR3, FIC1, BSEP, OATP-A, OATP-C, OATP-D, OATP-E and NTCP gene transcripts in 1st and 3rd trimester human placenta. *Placenta* 24: 39-44.
- Pathak B, Sheibani L, Lee RH. 2010. Cholestasis of pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am* 37: 269-82.
- Perez MJ, Briz O. 2009. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol* 15: 1677-89.
- Perez MJ, Macias RI, Duran C, Monte MJ, Gonzalez-Buitrago JM, Marin JJ. 2005. Oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver induced by maternal cholestasis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *J Hepatol* 43: 324-32.
- Perez MJ, Macias RI, Marin JJ. 2006. Maternal cholestasis induces placental oxidative stress and apoptosis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *Placenta* 27: 34-41.
- Pusl T, Beuers U. 2007. Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Orphanet J Rare Dis* 2: 26.
- Qiao L, Han SI, Fang Y, Park JS, Gupta S, Gilfor D, Amorino G, Valerie K, Sealy L, Engelhardt JF, Grant S, Hylemon PB, Dent P. 2003. Bile acid regulation of C/EBPbeta, CREB, and c-Jun function, via the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase pathways, modulates the apoptotic response of hepatocytes. *Mol Cell Biol* 23: 3052-66.
- Reid R, Ivey KJ, Rencoret RH, Storey B. 1976. Fetal complications of obstetric cholestasis. *Br Med J* 1: 870-2.
- Reyes H. 1997. Review: intrahepatic cholestasis. A puzzling disorder of pregnancy. *J Gastroenterol Hepatol* 12: 211-6.
- Reyes H. 2014. Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy and the risk of subsequent hepatobiliary disorders. *Hepatology* (en prensa).

- Reyes H, Báez ME, González MC, Hernández I, Palma J, Ribalta J, Sandoval L, Zapata R. 2000. Selenium, zinc and copper plasma levels in intrahepatic cholestasis of pregnancy, in normal pregnancies and in healthy individuals, in Chile. *J Hepatol* 32: 542-9.
- Reyes H, Gonzalez MC, Ribalta J, Aburto H, Matus C, Schramm G, Katz R, Medina E. 1978. Prevalence of intrahepatic cholestasis of pregnancy in Chile. *Ann Intern Med* 88: 487-93.
- Reyes H, Ribalta J, Hernández I, Arrese M, Pak N, Wells M, Kirsch RE. 1995. Is dietary erucic acid hepatotoxic in pregnancy? An experimental study in rats and hamsters. *Hepatology* 21: 1373-9.
- Reyes H, Sjövall, J. 2000. Bile acids and progesterone metabolites in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Ann Med* 32: 94-106.
- Reyes H, Taboada G, Ribalta J. 1979. Prevalence of intrahepatic cholestasis of pregnancy in La Paz, Bolivia. *J Chronic Dis* 32: 499-504.
- Rioseco AJ, Ivankovic MB, Manzur A, Hamed F, Kato SR, Parer JT, Germain AM. 1994. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: a retrospective case-control study of perinatal outcome. *Am J Obstet Gynecol* 170: 890-5.
- Rius M, Hummel-Eisenbeiss J, Hofmann AF, Keppler D. 2006. Substrate specificity of human ABCC4 (MRP4)-mediated cotransport of bile acids and reduced glutathione. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G640-9.
- Rius M, Nies AT, Hummel-Eisenbeiss J, Jedlitschky G, Keppler D. 2003. Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 38: 374-84.
- Rodríguez-Rojas RR, Cantú-Esquivel MG, Benavides-de la Garza L, Benavides-de Anda L. 1996. Incidence of fetal macrosomia: maternal and fetal morbidity. *Ginecol Obstet Mex* 64: 247-50.
- Roncaglia N, Arreghini A, Locatelli A, Bellini P, Andreotti C, Ghidini A. 2002. Obstetric cholestasis: outcome with active management. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 100: 167-70.
- Roelofsen H, Muller M, Jansen PL. 1997. Regulation of organic anion transport in the liver. *Yale J Biol Med* 70: 435-45.
- Ropponen A, Sund R, Riikonen S, Ylikorkala O, Aittomäki K. 2006. Intrahepatic cholestasis of pregnancy as a indicator of liver and biliary diseases: a population-based study. *Hepatology* 43: 723-8.
- Royal College of Osbtetricians and Gynaecologists. 2011. Obstetric Cholestasis- Green-top guideline No.43. <http://www.rcog.org.uk/files/rcog-corp/GTG43obstetriccholestasis.pdf>.
- Ruetz S, Gros P. 1994. Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the mdr2 gene. *Cell* 77: 1071-81.
- San Pedro M, Grandi C, Larguía M, Solana C. 2001. Standard of birth weight for gestational age in 55706 healthy newborns in a public maternity of Buenos Aires. *Medicina (B Aires)* 61: 15-22.

- Sato K, Sugawara J, Sato T, Mizutamari H, Suzuki T, Ito A, Mikkaichi T, Onogawa T, Tanemoto M, Unno M, Abe T, Okamura K. 2003. Expression of organic anion transporting polypeptide E (OATP-E) in human placenta. *Placenta* 24: 144-8.
- Seeger MA, van Veen HW. 2009. Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochim Biophys Acta* 1794: 725-37.
- Sentilhes L, Bacq Y. La cholestase intrahépatique gravidique. 2007. *J Gynécol Obstét Biol Reprod (Paris)* 37: 118-26.
- Sentilhes L, Verspyck E, Pia P, Marpeau L. 2006. Fetal death in a patient with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Obstet Gynecol* 107: 458-60.
- Serrano MA. 2008. Papel de la placenta en el desarrollo fetal y en la salud del adulto. *In* Desarrollo perinatal: origen de patologías adultas. Pascual-Leone AM & Medina JM, editors. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid. 169-192.
- Serrano MA, Macias RI, Briz O, Monte MJ, Blazquez AG, Williamson C, Kubitz R, Marin JJ. 2007. Expression in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines, BeWo, Jeg-3 and JAr of genes involved in the hepatobiliary-like excretory function of the placenta. *Placenta* 28: 107-17.
- Serrano MA, Macias RI, Vallejo M, Briz O, Bravo A, Pascual MJ, St-Pierre MV, Stieger B, Meier PJ, Marin JJ. 2003. Effect of ursodeoxycholic acid on the impairment induced by maternal cholestasis in the rat placenta-maternal liver tandem excretory pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 515-24.
- Setchell KD, Dumaswala R, Colombo C, Ronchi M. 1988. Hepatic bile acid metabolism during early development revealed from the analysis of human fetal gallbladder bile. *J Biol Chem* 263: 16637-44.
- Shaw D, Frohlich J, Wittmann BA, Willms M. 1982. A prospective study of 18 patients with cholestasis of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 142: 621-5.
- Shoda J, Mahara R, Osuga T, Tohma M, Ohnishi S, Miyazaki H, Tanaka N, Matsuzaki Y. 1988. Similarity of unusual bile acids in human umbilical cord blood and amniotic fluid from newborns and in sera and urine from adult patients with cholestatic liver diseases. *J Lipid Res* 29: 847-58.
- Sjövall K, Sjövall J. 1966. Serum bile acid levels in pregnancy with pruritus (bile acids and steroids 158). *Clin Chim Acta* 13: 207-11.
- Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Ottenhoff R, van der Lugt NM, van Roon MA, et al. 1993. Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75: 451-62.
- Soroka CJ, Lee JM, Azzaroli F, Boyer JL. 2001. Cellular localization and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver. *Hepatology* 33: 783-91.
- St-Pierre MV, Hagenbuch B, Ugele B, Meier PJ, Stallmach T. 2002. Characterization of an organic anion-transporting polypeptide (OATP-B) in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1856-63.

- St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoechli M, Lauper U, Meier PJ, Marin JJ. 2000. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R1495-503.
- St-Pierre MV, Stallmach T, Freimoser Grundschober A, Dufour JF, Serrano MA, Marin JJ, Sugiyama Y, Meier PJ. 2004. Temporal expression profiles of organic anion transport proteins in placenta and fetal liver of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R1505-16.
- Tanaka Y, Kobayashi Y, Gabazza EC, Higuchi K, Kamisako T, Kuroda M, Takeuchi K, Iwasa M, Kaito M, Adachi Y. 2002. Increased renal expression of bilirubin glucuronide transporters in a rat model of obstructive jaundice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G656-62.
- Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, Macchiarulo A, Yamamoto H, Matakaki C, Pruzanski M, Pellicciari R, Auwerx J, Schoonjans K. 2009. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab* 10: 167-77.
- Tohma M, Mahara R, Takeshita H, Kurosawa T, Ikegawa S, Nittono H. 1985. Synthesis of the 1 beta-hydroxylated bile acids and identification of 1 beta,3 alpha,7 alpha-trihydroxy- and 1 beta,3 alpha,7 alpha,12 alpha-tetrahydroxy-5 beta-cholan-24-oic acids in human meconium. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 33: 3071-3.
- Trauner M, Boyer JL. 2003. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83: 633-71.
- Vain NE, Szyld EG, Prudent LM, Wiswell TE, Aguilar AM, Vivas NI. 2004. Oropharyngeal and nasopharyngeal suctioning of meconium-stained neonates before delivery of their shoulders: multicentre, randomised controlled trial. *Lancet* 364: 597-602.
- Vallejo M, Briz O, Serrano MA, Monte MJ, Marin JJ. 2006. Potential role of trans-inhibition of the bile salt export pump by progesterone metabolites in the etiopathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Hepatol* 44:1150-7.
- Van Ierland Y, de Beaufort AJ. 2009. Why does meconium cause meconium aspiration syndrome? Current concepts of MAS pathophysiology. *Early Hum Dev* 85: 617-20.
- Vayssière C. 2002. Special management for threatened preterm delivery in multiple pregnancies. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 31: 5S114-23.
- Vega J, Sáez G, Smith M, Agurto M, Morris NM. 1993. Risk factors for low birth weight and intrauterine growth retardation in Santiago, Chile. *Rev Med Chil* 121: 1210-9.
- Vicens M, Macias RI, Briz O, Rodriguez A, El-Mir MY, Medarde M, Marin JJ. 2007. Inhibition of the intestinal absorption of bile acids using cationic derivatives: mechanism and repercussions. *Biochem Pharmacol* 73: 394-404.
- Vidyasagar D, Lukkarinen H, Kaapa P, Zagariya A. 2005. Inflammatory response and apoptosis in newborn lungs after meconium aspiration. *Biotechnol Prog* 21: 192-7.
- Vítek L, Zelenková M, Brůha R. 2010. Safe use of ursodeoxycholic acid in a breast-feeding patient with primary biliary cirrhosis. *Dig Liver Dis* 42: 911-2.
- von Versen-Hoeynck FM, Powers RW. 2007. Maternal-fetal metabolism in normal pregnancy and preeclampsia. *Front Biosci* 12: 2457-70.

- Vos TA, Hooiveld GJ, Koning H, Childs S, Meijer DK, Moshage H, Jansen PL, Muller M. 1998. Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, Mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver. *Hepatology* 28: 1637-44.
- Walker IA, Nelson-Piercy C, Williamson C. 2002. Role of bile acid measurement in pregnancy. *Ann Clin Biochem* 39: 105-13.
- Wang XD, Peng B, Yao Q, Zhang L, Ai Y, Xing AY, Liu XH, Liu SY. 2006. Perinatal outcomes of intrahepatic cholestasis of pregnancy: analysis of 1210 cases. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 86: 446-9.
- Wikström Shemer E1, Marschall HU, Ludvigsson JF, Stephansson O. 2013. Intrahepatic cholestasis of pregnancy and associated adverse pregnancy and fetal outcomes: a 12-year population-based cohort study. *BJOG* 120: 717-23.
- Wirbelauer J, Speer CP. 2009. The role of surfactant treatment in preterm infants and term newborns with acute respiratory distress syndrome. *J Perinatol* 29: S18-22.
- Xu J, Liu Y, Yang Y, Bates S, Zhang JT. 2004. Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J Biol Chem* 279: 19781-9.
- Ye L, Liu S, Wang M, Shao Y, Ding M. 2007. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 860: 10-7.
- Zapata R, Sandoval L, Palma J, Hernández I, Ribalta J, Reyes H, Sedano M, Tohá D, Silva JJ. 2005. Ursodeoxycholic acid in the treatment of intrahepatic cholestasis of pregnancy. A 12-year experience. *Liver Int* 25: 548-54.
- Zecca E, De Luca D, Baroni S, Vento G, Tiberi E, Romagnoli C. 2008. Bile acid-induced lung injury in newborn infants: a bronchoalveolar lavage fluid study. *Pediatrics* 121: e146-9.
- Zecca E, De Luca D, Marras M, Caruso A, Bernardini T, Romagnoli C. 2006. Intrahepatic cholestasis of pregnancy and neonatal respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 117: 1669-72.
- Zeng H, Liu G, Rea PA, Kruh GD. 2000. Transport of amphipathic anions by human multidrug resistance protein 3. *Cancer Res* 60: 4779-84.
- Zhou H, Hylemon PB. 2014. Bile acids are nutrient signaling hormones. *Steroids* 86: 62-8.
- Zinchuk VS, Okada T, Akimaru K, Seguchi H. 2002. Asynchronous expression and colocalization of Bsep and Mrp2 during development of rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G540-8.