

# XXXII CONGRESO NACIONAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DEL HÍGADO

## Cirrosis biliar primaria: nuevos mecanismos patogénicos

J.F. Medina

División de Terapia Génica y Hepatología. Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) y Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Pamplona. España.

### INTRODUCCIÓN

La cirrosis biliar primaria (CBP) es una enfermedad colestásica crónica de origen desconocido que afecta sobre todo a mujeres (90%), generalmente entre los 40 y los 70 años de edad<sup>1,2</sup>. La enfermedad se inicia con una inflamación de los espacios porta, seguida de un daño de los conductos biliares intrahepáticos de pequeño y mediano tamaño, y tiende a progresar crónicamente hacia la cirrosis. El cuadro se asocia además con fenómenos de autoinmunidad y otras anomalías de la homeostasis inmunológica. Aunque la enfermedad afecta a todas las razas con una incidencia global de unos 25 casos por millón de habitantes/año, y una prevalencia de algo más de 400 casos por millón, estas cifras varían notablemente entre las distintas zonas geográficas analizadas. Así, por ejemplo, la incidencia en Europa es especialmente alta en los países escandinavos, Inglaterra, Alemania e Italia.

La CBP es una enfermedad multifactorial. Uno de los factores que sin duda contribuye a la aparición de la enfermedad es la predisposición genética. Un estudio realizado en pacientes con CBP que tenían hermanos gemelos monocigotos, indicaba que un 63% de los gemelos padecía también la enfermedad. Asimismo, estudios realizados en familiares de pacientes con CBP sugieren que el riesgo relativo de padecer la enfermedad se incrementa 10,5 veces si se tiene un hermano con CBP. Por otra parte, se ha podido demostrar una cierta asociación de la CBP con moléculas HLA de tipo II, concretamente con *DRB1\*0801* en la población caucásica y con *DRB1\*0803* en la población japonesa.

Además de la predisposición genética, debe haber otros factores ambientales de tipo tóxico y/o infeccioso que contribuyan al desencadenamiento de la enfermedad. Por otra parte, nuestro grupo ha postulado el posible papel

etiopatogénico de las anomalías en los mecanismos de secreción biliar de bicarbonato en los pacientes con CBP. Más adelante se considerará de qué manera dichas anomalías, ya sean primarias o incluso secundarias a factores ambientales, podrían en cualquier caso contribuir a la patogenia de la enfermedad.

### SÍNTOMAS Y SIGNOS DE LA ENFERMEDAD

Más de la mitad de los pacientes con CBP se encuentran asintomáticos en el momento del diagnóstico. En estos casos, la detección ocasional de altas concentraciones de fosfatasa alcalina en el suero suele ser el hallazgo inicial de la enfermedad. Bioquímicamente, este hallazgo se acompaña de una elevación de los otros marcadores séricos de colestasis, como la gamma-glutamiltranspeptidasa. Además, los valores séricos de inmunoglobulinas (Ig) suelen estar elevados, particularmente los de IgM, pero también los de IgA e IgG<sub>3</sub>. Asimismo, es frecuente encontrar una cierta dislipemia (caracterizada sobre todo por hipercolesterolemia), así como hiperbilirrubinemia y elevación de las transaminasas hepáticas en los estadios más avanzados. En cualquier caso, el parámetro serológico más característico de la CBP es la presencia en el 95% de los pacientes de autoanticuerpos antimitocondriales (AMA) específicos. Como se verá más adelante, estos AMA reconocen ciertos epítopes de los complejos mitocondriales de las deshidrogenasas de alfa-cetoácidos, como PDC (*pyruvate dehydrogenase complex*), OGDC (*oxoglutarate dehydrogenase complex*) y BCOADC (*branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex*).

Los pacientes que han sido diagnosticados en ausencia de sintomatología pueden continuar asintomáticos durante años. Tras la aparición de los primeros síntomas, con frecuencia prurito y/o fatiga, la velocidad de evolución de la enfermedad es muy variable. Si la enfermedad colestásica continúa progresando –una situación cada vez menos frecuente gracias a la difusión del tratamiento con ácido ursodeoxicólico (UDCA)–, se instaura un cuadro de ictericia, reflejo de una hiperbilirrubinemia progresiva, así como esteatorrea y síntomas relacionados con el déficit de vitaminas liposolubles. La dislipemia/hipercolesterolemia

Correspondencia: Dr. J.F. Medina.

División de Terapia Génica y Hepatología. Centro de Investigación Médica Aplicada y Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Avda. Pío XII, 55. 31008 Pamplona. España. Correo electrónico: jfmedina@unav.es

mía se puede manifestar como depósito de lípidos en la piel en forma de xantelasmas y xantomas. También pueden presentarse molestias y dolor de tipo esquelético relacionados con osteoporosis. Si la enfermedad ha continuado avanzando hacia la cirrosis, los pacientes manifiestan además el cuadro de síntomas y signos que acompaña a la cirrosis hepática en general.

Un porcentaje significativo de pacientes con CBP presenta además alguna enfermedad autoinmune no hepática, especialmente el síndrome *sicca* o el síndrome de Sjögren (23%), la tiroiditis de Hashimoto (23%), la artritis reumatoide (17%) y, con menos frecuencia, otras como el síndrome de Raynaud, la enfermedad celiaca o la esclerodermia. Por otra parte, alrededor de un 10% de los pacientes con CBP presenta en algún momento de su evolución un cuadro de hepatitis autoinmune sobreañadido que se manifiesta en el denominado *overlap syndrome*<sup>3</sup>. La detección precoz de este cuadro es muy importante, ya que suele responder al tratamiento con inmunosupresores.

Aunque en muchos casos la biopsia hepática no es estrictamente necesaria para el diagnóstico, suele ser muy recomendable. Ciertamente, en la actualidad se dispone de metodologías menos invasivas, como la elastografía<sup>4</sup>, que permiten evaluar el grado de fibrosis/cirrosis y su evolución; sin embargo, al menos una biopsia inicial sigue estando justificada aún para confirmar el diagnóstico de CBP y establecer el estadio de la enfermedad, además de descartar cualquier indicio del *overlap syndrome*.

La clasificación histopatológica tradicional de la CBP establece 4 estadios. El estadio I se caracteriza por la presencia en los espacios porta de un infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear que rodea los conductos biliares pequeños y medianos, muchos de los cuales se encuentran en fase de daño y destrucción. Cuando además se observa una proliferación de los conductillos biliares, se considera como estadio II de la enfermedad. En el estadio III, el hecho dominante es la fibrosis, que se extiende como septos entre los espacios porta. En este estadio, el componente inflamatorio portal es menor debido a la destrucción de conductos biliares (ductopenia), aunque todavía pueden apreciarse lesiones floridas aisladas alrededor de algunos conductos. El estadio final de la CBP (estadio IV) se caracteriza por la presencia de cirrosis. El diagnóstico diferencial con otros tipos de cirrosis puede ser difícil en este estadio, sobre todo en los casos de anticuerpos antimitocondriales (AMA) negativos, pero la ductopenia o el infiltrado mononuclear portal y la presencia residual de algunas lesiones ductulares floridas orientan hacia la CBP. En esta fase avanzada de la enfermedad, los pacientes entran generalmente en una situación terminal en la que se desarrollan las complicaciones de la cirrosis hepática descompensada.

A largo plazo y sin tratamiento, la CBP tiene un mal pronóstico, ya que no se ha documentado ninguna remisión espontánea. Por otra parte, todavía no hay ninguna terapia que conduzca a una resolución definitiva de la enfermedad. Ello se debe, al menos en parte, al desconocimiento del origen y de los mecanismos fisiopatológicos de la

CBP. La presencia tan llamativa de los fenómenos de autoinmunidad parecía sugerir que el tratamiento de elección podía consistir en la administración de fármacos inmunosupresores. Sin embargo, todos los inmunosupresores utilizados hasta el momento (azatioprina, ciclosporina, tacrolimus, prednisolona, metotrexato, etc.) han resultado poco eficaces. En cambio, la administración diaria de dosis altas de UDCA (13-15 mg/kg/día) se asocia, en la mayoría de los pacientes, con una mejoría de los marcadores bioquímicos de colestasis. Este tratamiento con UDCA mejora también la histología hepática y retraza la progresión de la enfermedad en un elevado porcentaje de pacientes (60%), lo que disminuye la necesidad de trasplante hepático. Además, algunos estudios recientes han demostrado que la instauración del tratamiento con UDCA en estadios iniciales (I-II) no sólo disminuye la progresión de la enfermedad sino que mejora la supervivencia de los pacientes hasta los niveles esperados en la población control<sup>5,6</sup>. Si bien aún se desconocen los mecanismos moleculares de su acción beneficiosa en la CBP, se sabe que el UDCA produce una coleresis rica en bicarbonato, además de ejercer ciertos efectos citoprotectores e inmunomoduladores. En el grupo de pacientes que no terminan de responder adecuadamente a la monoterapia con UDCA, la combinación de UDCA con budesonida (un glucocorticoide no halogenado) parece conllevar alguna ventaja y mejora la histología del hígado<sup>7</sup>.

Cuando la enfermedad continúa progresando y se ha llegado a una situación de fallo hepático generalizado con riesgo para la vida del paciente, debe considerarse la opción del trasplante hepático. También cabe considerar esta opción cuando el prurito resulta muy difícil de sobrevenir y no se consigue controlar con tratamiento farmacológico.

## FENÓMENOS DE AUTOINMUNIDAD Y ETIOPATOGENIA

En la mayoría de los pacientes con CBP se detectan reacciones de autoinmunidad tanto humoral como celular, que van dirigidas contra autoantígenos mitocondriales. No sólo se detectan AMA (generalmente de isótipos IgG<sub>3</sub> e IgM), en el suero del 95% de los pacientes con CBP, sino que también se han podido detectar AMA (del isótipo IgA) en la bilis de más del 70% de los pacientes analizados<sup>8</sup>. Entre los autoantígenos de los complejos mitocondriales de deshidrogenasas de alfa-cetoácidos, reconocidos por los AMA, destacan dos componentes del PDC, la dihidro-lipoamida-acetil-transferasa (componente E2 o PDC-E2) y la proteína unida al componente E3 (*E3 binding protein*, E3BP), así como los componentes E2 de los otros complejos (OGDC-E2 y BCOADC-E2). Por otra parte, el infiltrado de células mononucleares que rodea a los conductos biliares dañados en los espacios porta es rico en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, que presentan autorreactividad frente a los mismos autoantígenos que los AMA<sup>2</sup>.

Además de AMA, el suero de los pacientes con CBP puede presentar otros autoanticuerpos característicos de la enfermedad. Un 25% de los pacientes AMA positivos presentan autoanticuerpos antinucleares (ANA) frente a la glucoproteína del poro nuclear gp210. Entre los pacientes AMA negativos, la incidencia de los ANA anti-gp210 es incluso más alta (el 50% de los pacientes). Por otra parte, en un 30% de los pacientes se detectan ANA frente a otra glucoproteína del poro nuclear, denominada nucleoporina p62. La presencia de cualquiera de estos dos tipos de ANA, nunca coincidentes en un mismo paciente, se ha asociado con una mayor gravedad de la CBP. En un porcentaje muy pequeño de pacientes (1%) se pueden detectar ANA frente a una proteína de la membrana interna nuclear denominada LBR (*lamin B receptor*). Además de estos 3 tipos de autoanticuerpos frente a la envuelta nuclear, se han descrito otros ANA que reaccionan frente a los autoantígenos nucleares Sp100 (*Speckled 100-KD nuclear body protein*) y PML (*promyelocytic leukemia proteins*), así como anti-centrómero y anticromatina. Estos ANA también se han asociado a una mayor progresión de estadios iniciales (I-II) hacia estadios avanzados (III-IV). La relación que pueda haber entre los innegables fenómenos de autoinmunidad que presentan los pacientes con CBP y la etiopatogenia de la enfermedad es todavía un enigma<sup>2,8</sup>. Los valores de AMA difieren enormemente entre los distintos pacientes, y no se correlacionan en absoluto con la gravedad y la progresión de la enfermedad. Hay incluso casos con valores elevados de AMA en suero que no presentan el cuadro clínico de la enfermedad. Aunque en la mayoría de los pacientes con CBP los AMA suelen detectarse antes de que se manifieste una alteración histológica o funcional del hígado, los autoanticuerpos también pueden aparecer tras el inicio del daño hepático. Por otra parte, casi todos los pacientes con CBP a los que se ha realizado un trasplante hepático mantienen valores elevados de autoanticuerpos, salvo un momentáneo descenso inicial, pero menos del 20% de estos pacientes acaba presentando signos histológicos de lesión en el hígado trasplantado.

Respecto al papel de la inmunidad celular en la etiopatogenia de la CBP, cabe reseñar que la asociación con fenotipos HLA II es más baja de lo esperado en una enfermedad supuestamente mediada por linfocitos T<sup>9</sup>. Sorprende además la mencionada ineficacia terapéutica de los inmunosupresores en esta enfermedad supuestamente autoinmune. Esta sorpresa es incluso mayor cuando dicha ineficacia se contrasta con la demostrada eficacia del UDCA en la mayoría de los casos tratados en estadios iniciales. Además, no se comprende bien de qué manera unos fenómenos de autoinmunidad, supuestamente dirigidos contra unos autoantígenos intracelulares que se encuentran en todas las células del organismo, puedan ser los únicos responsables de un daño tan selectivo como el que tiene lugar en los espacios porta frente a los conductos biliares interlobulares. Aunque los AMA y los correspondientes autoantígenos están distribuidos por todo el organismo, el daño en la CBP se circunscribe paradójicamente a los colangiocitos. Este tipo celular representa el

3% del total de células hepáticas, y la cantidad de mitocondrias en los colangiocitos es menor que en los hepatocitos. Cabría preguntarse qué tienen los colangiocitos que no tengan los otros tipos celulares, que les hace más susceptibles ante el ataque inmunológico. Cabría también preguntarse si no serán los mismos colangiocitos los responsables del desencadenamiento de una respuesta autoinmune tan generalizada y a la vez tan selectiva.

Los avances producidos en la última década han demostrado que los colangiocitos no son en absoluto células inertes, sino que desempeñan importantes funciones de transporte hidroiónico y de compuestos orgánicos. Bajo ciertas circunstancias son capaces de expresar moléculas HLA (de clase I y II), moléculas de adhesión ICAM-1 y moléculas coestimuladoras del tipo B7-2<sup>10</sup>, e incluso de secretar citocinas. Por otra parte, es muy interesante el hallazgo en la CBP de que el epitelio biliar presenta una expresión aberrante de antígenos en la membrana celular, especialmente la apical, que son reconocidos por los AMA<sup>11</sup>. Los fenómenos de autoinmunidad podrían estar desencadenados por esta expresión aberrante de moléculas en los colangiocitos. No se puede descartar que los AMA del isotipo IgA puedan penetrar en ciertas células e interferir con sus funciones. Como ya se ha mencionado, en un porcentaje elevado de pacientes con CBP, la bilis contiene AMA IgA, los cuales podrían internalizarse a través de la membrana basal del colangiocito mediante el receptor de IgA polimérica (plgR). Sin embargo, no todos los pacientes con PBC tienen valores detectables de AMA IgA en la bilis. Por otra parte, las glándulas salivares de pacientes con CBP presentan una expresión antigénica aberrante semejante a la del epitelio biliar. Así, cabe pensar también que la expresión aberrante pueda ser el resultado de alteraciones celulares más profundas en las células epiteliales (p. ej., genéticas, por factores tóxico-xenobióticos, por agentes infecciosos, etc.).

Desde hace algunos años se viene postulando la hipótesis que relaciona la autoinmunidad con agentes tóxicos o infecciosos. Esta hipótesis propone la posibilidad de que un agente extraño pueda iniciar una reacción inmune generándose anticuerpos que reaccionan contra dicho agente y también, por reacción cruzada, contra determinantes propios del huésped, mediante el fenómeno denominado «mimetismo molecular». PDC-E2 es una molécula altamente conservada entre las diversas especies, especialmente el dominio de unión al ácido lipoico. Hasta el momento, se ha señalado una batería de gérmenes posiblemente implicados. Sin embargo, queda siempre la duda de que el aumento de la immunorreactividad observado en ocasiones, o incluso la mayor prevalencia de determinados patógenos en la CBP, sean una consecuencia de la enfermedad de base más que su causa. Otra hipótesis, en cierto modo paralela a la del mimetismo molecular, sugiere que el agente tóxico o infeccioso podría producir alteraciones celulares que llevarían, entre otras cosas, a la reacción inmunológica del huésped. Algunos estudios recientes sugieren que la ruptura de la tolerancia frente al PDC-E2 mitocondrial podría deberse, al menos

en parte, a modificaciones del dominio lipoil interno de este componente del PDC tras una exposición continuada a ácidos alquinoicos, y en particular al ácido 2-noninoico, una molécula que está presente en diversos productos de cosmética<sup>12</sup>. El ácido 2-noninoico podría formar una alquinamida al conjugarse con la lipoamida (el ácido lipoico unido a la lisina-259) en el PDC-E2 humano, y convertirse en una molécula inmunogénica en individuos genéticamente susceptibles. Esta hipótesis parece aún más plausible si todo ello ocurre en un contexto de baja tolerancia secundaria a una disminución en la frecuencia de las células T reguladoras (Treg) CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>. En efecto, recientemente se ha descrito que los pacientes con PBC presentan una disminución en la frecuencia de las Treg<sup>13</sup>. Hace poco se describió el caso de un niño de 5 años con deficiencia de CD25 (el receptor alfa de la IL2) que presentaba un cuadro muy semejante a la CBP, incluso con AMA frente a PDC-E2<sup>14</sup>. Además, es sumamente interesante el hecho de que el cuadro remitió tras un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas, con desaparición de los AMA<sup>14</sup>. Durante el año 2006 se han descrito 3 modelos de ratones con modificaciones genéticas que predisponen a fenómenos de autoinmunidad con producción de AMA y daño de los conductos biliares<sup>15</sup>. Dos de estos modelos inciden específicamente en la función de las células Treg, uno de ellos mediante el knockout genético del equivalente murino de CD25<sup>15</sup> y el otro que afecta al receptor II del TGFβ<sup>15</sup>. Los datos observados en estos modelos apoyan la función de las Treg en los fenómenos de autoinmunidad que tienen lugar en la CBP, aunque, indudablemente, la situación en la enfermedad humana es mucho más compleja y, en algunos aspectos, diferente a estos modelos.

En la CBP, los colangiocitos están expuestos al estrés oxidativo y a la apoptosis<sup>16</sup>. Recientemente se ha publicado que los pacientes con CBP presentan una baja expresión del represor de genes de senescencia Bmi1 en los conductos biliares pequeños, que parece relacionada con el estrés oxidativo<sup>17</sup>. Es muy sugerente el hecho de que los colangiocitos expresan la molécula antiapoptótica Bcl-2 en valores mucho más elevados que los demás tipos celulares. Es muy posible que esta alta expresión de Bcl-2 inhiba la conjugación covalente de PDC-E2 con glutatión, impidiendo la degradación de PDC-E2 durante la apoptosis, lo cual llevaría a su permanencia como molécula extracelular y con capacidad inmunogénica<sup>18</sup>.

## ALTERACIONES EN LA EXCRECIÓN BILIAR DE BICARBONATO EN LA CIRROSIS BILIAR PRIMARIA

Ya se ha hecho mención sobre lo sorprendente que resulta el hecho de que la CBP no responda bien a los tratamientos con inmunosupresores, mientras que el tratamiento continuado con UDCA suele ser tan efectivo. Basados en este hecho y teniendo en cuenta que UDCA es una sal biliar que produce una coleresis rica en bicarbonato, nues-

tro grupo<sup>19</sup> mantiene la hipótesis de que en la etiopatogenia de la CBP puede haber alteraciones en la excreción biliar de bicarbonato y en el mecanismo de dicha excreción a través del intercambio de aniones Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Mediante la tomografía por emisión de positrones (PET) con <sup>11</sup>CO<sub>3</sub>HNa pudimos demostrar que los pacientes con CBP tienen efectivamente un déficit en la secreción biliar de bicarbonato en respuesta a la secretina, y éste se resuelve tras el tratamiento con UDCA. Por otra parte, en estudios en colangiocitos aislados de pacientes con CBP también pudimos observar un déficit en la actividad de intercambio Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en respuesta al AMP cíclico (conocido segundo mensajero en la señalización intracelular tras el estímulo con secretina)<sup>19</sup>.

También habíamos descrito que los pacientes con CBP presentan una expresión disminuida del ARN mensajero del intercambiador de aniones Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> AE2 (*anion exchanger 2*), tanto en biopsias hepáticas como en linfocitos de sangre periférica. En el hígado, la AE2 se expresa normalmente en los canalículos y en la membrana apical de los colangiocitos. Nuestros estudios indicaban una baja expresión de la proteína en el hígado de pacientes con CBP, y sugerían que la administración de UDCA tenía a mejorar dicha expresión. Tanto los hepatocitos como los colangiocitos pueden secretar bicarbonato a la bilis a través de AE2. Sin embargo, y a diferencia de los colangiocitos, los hepatocitos carecen de receptores de secretina, y la excreción biliar de bicarbonato aumentada en respuesta a esta hormona la llevan a cabo únicamente los colangiocitos<sup>20</sup>. La salida de bicarbonato a cambio de la entrada de cloruro a través del AE2 apical conlleva una acidificación del pH intracelular (pH<sub>i</sub>) del colangocito. Aquí es oportuno considerar que la regulación del pH<sub>i</sub> es una de las funciones reconocidas desde hace años para la AE2. Puesto que los colangiocitos parecen estar altamente capacitados para la secreción biliar de bicarbonato, cualquier disfunción de AE2 podría plasmarse en importantes desajustes a la hora de regular su pH<sub>i</sub>. Las alteraciones en la regulación del pH<sub>i</sub> en estas células epiteliales podrían conducir a cambios antigenicos, debidos, por ejemplo, a modificaciones en la estructura de proteínas. También podrían conducir a modificaciones en el direccionamiento de proteínas, dando lugar, por ejemplo, a la expresión aberrante del PDC-E2, tal como se observa en el epitelio biliar de pacientes con CBP.

El papel de AE2 en la regulación del pH<sub>i</sub> puede también ser muy relevante en los linfocitos, y una disfunción de AE2 podría dar lugar a una alcalinización intracelular y modificaciones consiguientes en la diferenciación, la proliferación y la actividad de las diferentes poblaciones linfocitarias. Estos linfocitos alterados podrían ser más propensos a una respuesta inmunogénica frente a unos colangiocitos también alterados hipotéticamente. Por todo ello, es posible que las disfunciones en los mecanismos del transporte de bicarbonato observadas en el hígado y en los linfocitos de los pacientes con CBP desempeñen un papel fisiopatológico relevante en el desarrollo de la enfermedad.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Talwalkar JA, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis. *Lancet*. 2003;362:53-61.
2. Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med*. 2005;353:1261-73.
3. Beuers U, Rust C. Overlap syndromes. *Semin Liver Dis*. 2005;25:311-20.
4. Corpechot C, El Naggar A, Poujol-Robert A, Zioli M, Wendum D, Chazouilleres O, et al. Assessment of biliary fibrosis by transient elastography in patients with PBC and PSC. *Hepatology*. 2006;43:1118-24.
5. Pares A, Caballeria L, Rodes J. Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic Acid. *Gastroenterology*. 2006;130:715-20.
6. Poupon RE, Lindor KD, Pares A, Chazouilleres O, Poupon R, Heathcote EJ. Combined analysis of the effect of treatment with ursodeoxycholic acid on histologic progression in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 2003;39:12-6.
7. Rautiainen H, Karkkainen P, Karvonen AL, Nurmi H, Pikkarainen P, Nuutilainen H, et al. Budesonide combined with UDCA to improve liver histology in primary biliary cirrhosis: a three-year randomized trial. *Hepatology*. 2005;41:747-52.
8. Neuberger J, Thomson R. PBC and AMA: what is the connection? *Hepatology*. 1999;29:271-6.
9. Donaldson PT, Baragiotta A, Heneghan MA, Floreani A, Venturi C, Underhill JA, et al. HLA class II alleles, genotypes, haplotypes, and amino acids in primary biliary cirrhosis: a large-scale study. *Hepatology*. 2006;44:667-74.
10. Tsuneyama K, Van de Water J, Leung PS, Cha S, Nakanuma Y, Kaplan M, et al. Abnormal expression of the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex on the luminal surface of biliary epithelium occurs before major histocompatibility complex class II and BB1/B7 expression. *Hepatology*. 1995;21:1031-7.
11. Joplin R, Gershwin ME. Ductular expression of autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis*. 1997;17:97-103.
12. Rieger R, Leung PS, Jeddelloh MR, Kurth MJ, Nantz MH, Lam KS, et al. Identification of 2-nonyoic acid, a cosmetic component, as a potential trigger of primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*. 2006;27:7-16.
13. Lan RY, Cheng C, Lian ZX, Tsuneyama K, Yang GX, Moritoki Y, et al. Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2006;43:729-37.
14. Aoki CA, Roifman CM, Lian ZX, Bowlus CL, Norman GL, Shoenfeld Y, et al. IL-2 receptor alpha deficiency and features of primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*. 2006;27:50-3.
15. Wakabayashi K, Lian ZX, Moritoki Y, Lan RY, Tsuneyama K, Chuang YH, et al. IL-2 receptor alpha(-/-) mice and the development of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2006;44:1240-9.
16. Harada K, Nakanuma Y. Molecular mechanisms of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *Med Mol Morphol*. 2006;39:55-61.
17. Sasaki M, Ikeda H, Sato Y, Nakanuma Y. Decreased expression of Bmi1 is closely associated with cellular senescence in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Am J Pathol*. 2006;169:831-45.
18. Odin JA, Huebert RC, Casciola-Rosen L, LaRusso NF, Rosen A. Bcl-2-dependent oxidation of pyruvate dehydrogenase-E2, a primary biliary cirrhosis autoantigen, during apoptosis. *J Clin Invest*. 2001;108:223-32.
19. Medina JF. Pathophysiology of biliary epithelium in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterol Hepatol*. 2000;23 Suppl 1:4-9.
20. Banales JM, Prieto J, Medina JF. Cholangiocyte anion exchange and biliary bicarbonate excretion. *World J Gastroenterol*. 2006;12:3496-511.