

Transportadores de lípidos biliares: una revisión actualizada

Autores Ibrahim Castro,¹ Mariano Martínez¹

Afiliación ¹Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México, D.F. México.

Revista GEN (Gastroenterología Nacional) 2013;67(1):49-57. Sociedad Venezolana de Gastroenterología, Caracas, Venezuela. ISSN 0016-3503.

Autor correspondiente: Ibrahim Castro. Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México, D.F. México.

Correo-e: ibrahim1002@hotmail.com

Resumen

Las sales biliares, colesterol y fosfatidilcolina son los lípidos más importantes de la bilis; su transporte está regulado por una red compleja de proteínas de las familias Casete de Unión a ATP y transportadora de solutos. Los transportadores de lípidos biliares son proteínas que intervienen en la fisiopatología de numerosas enfermedades del sistema gastrointestinal, por lo tanto, son importantes moléculas de estudio y en un futuro pueden ser nuevas dianas terapéuticas que eviten la prevalencia de enfermedades como hipercolesterolemia, cálculos biliares, colestasis, trastornos de la bilirrubina, entre otras. La presente revisión hace una evaluación actualizada sobre la función específica de los transportadores de lípidos biliares, su regulación genética e implicación fisiopatológica.

Palabras clave: lípidos biliares, transportadores, sistema gastrointestinal, diana terapéutica.

BILIARY LIPIDS TRANSPORTERS: AN UPDATE REVIEW

Summary

Bile salts, cholesterol and phosphatidylcholine are the major lipids of bile; its secretion is regulated by an elaborate network of family proteins such as ATP Binding Cassette and the Solute Carrier. Biliary lipids transporters are proteins involved in physiopathology of many diseases of gastrointestinal system, therefore it are important molecules of study and the future it may be new therapeutic targets to prevent the prevalence of diseases, such as hypercholesterolemia, gallstones, cholestasis, bilirubin disorders among other. This review makes a current evaluation on the specific role of biliary lipids transporters, its genetic regulation and physiopathological implications.

Key words: biliary lipids, transporters, gastrointestinal system, therapeutic target.

Introducción

En la bilis existen tres lípidos muy importantes: sales biliares, fosfatidilcolina (lecitina) y colesterol, que en su mayoría llevan a cabo su biosíntesis en el hepatocito; las sales biliares son producto de la conjugación que experimentan los ácidos biliares, la lecitina es un derivado de etanolamina y el colesterol se sintetiza a partir del acetyl-CoA.¹ Estos tres lípidos llevan a cabo interacciones hidrofóbicas para formar micelas mixtas, que pueden transportar y emulsificar las grasas, facilitando su absorción intestinal.² El transporte de lípidos se efectúa mediante proteínas denominadas ABC (del inglés ATP-Binding Cassette), las cuales se han conservado evolutivamente; dentro de las más destacadas encontramos las ABCB11, ABCB4, ABCG5 y ABCG8. Otras proteínas con funciones similares, pertenecen a la familia transportadores de solutos, (del inglés Solute Carriers, SLC), de los cuales SLC10A1 y SLC10A2 son los más importantes.^{3,4} Estas proteínas transportadoras pueden localizarse en hígado, intestino delgado y riñón; su regulación genética es función preferente de receptores nucleares, como el Farnesoid X (Farnesoid X Receptor, FXR), receptores hepáticos X (Liver X Receptors, LXR) con sus isoformas LXR α y LXR β y los receptores de oxisteroles.^{5,6} Los transportadores y sus reguladores genéticos están implicados en la fisiopatología de numerosas enfermedades, tales como, colestasis, litiasis biliar pigmentaria y de colesterol, enfermedad de Wilson, sitosterolemia, enfermedad de Dubin-Johnson, fibrosis cística, hipercolesterolemia, entre otras. Las investigaciones básica y clínica sobre estas proteínas transportadoras, son continuas y complejas, además surgen complementadas con la investigación sobre los receptores nucleares que integran su medio celular, con el objetivo de hallar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades asociadas al sistema gastrointestinal.

Lípidos biliares

La bilis es una solución alcalina constituida por agua en su mayoría, hormonas, pigmentos, electrolitos (Na⁺, K⁺, Ca⁺, Cl⁻, HCO₃⁻) y lípidos; de estos últimos, los más importantes y de acuerdo a su abundancia son: sales biliares (6-10%), fosfolípidos (95% fosfatidilcolina) y colesterol (0.5-5%), los cuales interactúan hidrofóbicamente para formar micelas mixtas y emulsificar las grasas. La secreción de estos tres lípidos se realiza de manera concomitante, por lo que si se presentan desajustes en la secreción de uno de los lípidos, será causa para llegar a un desequilibrio general.⁷ Actualmente, la secreción biliar es un mecanismo que no se explican con precisión.

Los ácidos biliares se sintetizan a partir del colesterol, una vez formados dentro del hepatocito, se conjugan con glicina o taurina para generar ácidos biliares conjugados, los cuales se encuentran fisiológicamente ionizados y posteriormente por acción de los iones Na⁺ y K⁺ de las bombas en el hepatocito, generan las sales sódicas o potásicas de ácidos conjugados, o bien denominadas sales biliares.⁸ Estas moléculas son secretadas en la membrana canalicular del hepatocito y emulsifican las grasas de la bilis y las provenientes de la dieta, facilitando la acción de enzimas lipasas en el proceso digestivo. A nivel intestinal, las sales pueden ser deconjugadas por la flora bacteriana y una vez finalizada su actividad, en su mayoría se reciclan volviendo al hígado, en el transporte conocido como circulación enterohepática.⁹

De los fosfolípidos biliares, el más abundante (95%) es la fosfatidilcolina o lecitina, sintetizada principalmente en el hígado, aunque existen pruebas de que cierta cantidad procede de moléculas de los fosfolípidos que contienen las lipoproteínas de alta densidad o HDL (High Density Lipoprotein). La principal vía metabólica que regula la síntesis de fosfatidilcolina es la de Kennedy, llevada a cabo dentro del hepatocito. La lecitina es transportada a la membrana canalicular y posteriormente secretada en la bilis, en donde forma micelas mixtas con sales biliares.¹⁰

El colesterol se sintetiza en el hepatocito a partir de acetato (del que se deriva la acetyl-CoA); las fuentes de colesterol biliar provienen en su mayoría de las lipoproteínas (principalmente HDL) y en menor cantidad de la síntesis de novo (alrededor de 5%). En su tránsito hacia la bilis, este lípido llega a la membrana canalicular del hepatocito y cuando es secretado interactúa con lecitina y sales biliares para poder transportarse en micelas mixtas, con ello se mantiene estable en un medio acuoso. El colesterol también puede formar vesículas con fosfolípidos, con la escasa participación de sales biliares; estos complejos se denominan liposomas o vesículas biliares y tienen la capacidad de fusionarse para generar multiliposomas, efecto que puede producir la cristalización o nucleación del colesterol.¹¹

Sitios de transporte

Para analizar estas proteínas, es importante considerar los sitios específicos donde se expresan, pues durante su traslado por los hepatocitos, colangiocitos, conductos biliares, intestino, circulación enterohepática y vías de excreción renal, están implicadas diferentes moléculas por cada sitio y en su contraparte, también pueden ser las mismas proteínas localizadas en diferentes áreas.

Los hepatocitos son células que contienen una membrana basolateral (sinusoidal) y una canalicular (apical) que juegan un papel importante en el transporte de sustancias endógenas y exógenas, entre las cuales se destacan los lípidos biliares.¹² En las membranas del hepatocito se encuentran transportadores específicos para cada tipo de lípido, entre los más importantes de la membrana basolateral, se encuentran: polipéptido contrtransportador taurocolato sódico, NTCP (*Sodium-Taurocholate Contrtransporting Polypeptide*); proteínas transportadoras de aniones orgánicos, OATPs (*Organic Anion Transporting Proteins*) y proteína de múltiple resistencia a fármacos tipo 3, MRP3 (*Multidrug Resistance Protein 3*). En la membrana canalicular se encuentran: proteínas de múltiple resistencia 1 y 3, MDR1/3 (*Multidrug Resistance*), transportador de múltiple resistencia asociado a la proteína 2, MRP2 (*Multidrug Resistance-Associated Protein 2*) y bomba exportadora de sales biliares, BSEP (*Bile Salt Export Pump*). En los colangiocitos se encuentran el transportador apical de sales biliares dependientes de sodio, ISBT (*Ileal Sodium Dependent Bile Salt Transporter*); el regulador transmembranal de la fibrosis cística, CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) y MRP3. El intestino delgado expresa los transportadores ASBT (*Apical sodium bile acid transporter*), que en su mayoría se asocia a ISBT, OATP3 y MRP3. Las proteínas ISBT y MRP2 también son expresadas en las células intersticiales peritubulares del riñón.¹³

Casos de Unión a ATP (ABC)

La presente revisión está enfocada a los transportadores de los principales lípidos de la bilis, anteriormente mencionados. La pro-

teína BSEP es la principal vía de secreción de sales biliares, su nomenclatura genética correcta es ABCB11; los fosfolípidos se transportan a través de la molécula MDR3 (ABCB4) y el colesterol por medio de las proteínas ABCG5 y ABCG8;¹ en relación a este último lípido, es necesario mencionar a la proteína de Niemann-Pick C11L1 (NPC11L1), que aunque no pertenece a la familia ABC, es otro importante transportador en el hepatocito y enterocito.¹⁴

BSEP (ABCB11)

La bomba exportadora de sales biliares es el principal transportador de estos lípidos, así como de ácidos biliares; se localiza en la membrana canalicular de los hepatocitos;¹⁵ formalmente esta proteína pertenece a la familia ABC, subfamilia B, miembro 11, de ahí la denominación del gen, ABCB11.¹⁶ La expresión de BSEP es variable en los seres humanos y no se ha determinado que estos cambios estén implicados en la alteración metabólica de lípidos.¹⁷ BSEP puede transportar ácidos biliares no conjugados, así como una amplia variedad de ácidos conjugados, aunque fisiológicamente (pH de la bilis), la mayoría de ácidos biliares se encuentran ionizados y conjugados con glicina o taurina.¹⁸ BSEP contiene 1321 aminoácidos y un peso aproximado de 160 kDa, presenta 6 dominios transmembrana y 1 dominio orientado al citoplasma, que sirve de unión a nucleótidos.¹⁹ En su parte extracelular, BSEP se mantiene estable gracias a sus dominios N-glicosilados, quienes también permiten su expresión membranar; el transportador cuenta con una región enlazadora de aproximadamente 75 aminoácidos que interactúa con diferentes proteínas para confinar la acción secretora, efectuada con gasto de energía, sea para ácidos o sales biliares.²⁰ Se ha reportado la afinidad de BSEP por las sales biliares, bajo el siguiente orden: tauroquenodesoxicolato, taurocolato, taurodesoxicolato, taurodesoxicolato y glicocolato; estas sales pueden a su vez activar la ATPasa de BSEP y esta propiedad tiene implicaciones farmacológicas.²⁰

En ratones transgénicos, la sobreexpresión de BSEP produce un aumento en la secreción de ácidos biliares, pero la expresión de otros transportadores canaliculares no se afecta, lo que indica la influencia de este transportador para la secreción de otras especies de lípidos biliares.²¹

MDR3 (ABCB4)

El gen que expresa este transportador, ABCB4, indica que pertenece al tipo casete de unión a ATP, subfamilia B miembro 4, predominantemente encontrado en la membrana canalicular del hepatocito y su principal función es el transporte de fosfolípidos; esta proteína también se denomina MDR3 (glicoproteína-P) porque pertenece al miembro 3 de la familia de proteínas de múltiple resistencia a fármacos.²² De los fosfolípidos secretados en la bilis, la mayor concentración corresponde a fosfatidilcolina y otros fosfolípidos secretados son fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina.¹⁰ En su composición química, MDR3 se integra por 179 aminoácidos, tiene un peso aproximado de 140 kDa y cuenta con 2 dominios ABC transmembrana (tipo 1) y 2 dominios ABC transportadores. Esta molécula es una flipasa que transloca fosfolípidos hacia la cara externa de la membrana canalicular;²³ el transporte es un mecanismo específico, contra un gradiente de concentración y de protección celular, porque los fosfolípidos incluyen a las sales biliares dentro de micelas

mixtas, transportándolas y sobre todo evitando que ejerzan sus funciones emulsificantes en las membranas celulares.²⁴ Existe otra proteína muy importante en el transporte de fosfolípidos, denominada ATP8B1, una flipasa de fosfatidilserina que se expresa en la membrana canalicular.²⁵ Esta proteína mantiene la estructura rígida y compacta de la membrana, en la parte exterior canalicular, por medio de la translocación de fosfolípidos a la parte interna de la membrana.²⁶

ABCG5/8

Corresponden a los transportadores del colesterol de la subfamilia B, miembros 5 y 8, expresados en la membrana canalicular del hepatocito y enterocito.²⁷ Estas proteínas funcionan como un heterodímero y tienen una amplia relación con la proteína NPC11L1 en el transporte de colesterol.²⁸ ABCG5/8 tienen un peso aproximado de 70-2 kDa y una conformación de 651 aminoácidos para G5 y 673 aminoácidos para G8; ambas proteínas tienen dominios N-terminales orientados al citosol y dominios C-terminales transmembrana.²⁷ Es trascendental su papel en el intestino y en el hígado.

El intestino delgado es el sitio principal donde se absorbe el colesterol, particularmente en el yeyuno proximal, donde los heterodímeros G5 y G8 tienen una importante relación con la enzima Acil-Coenzima A, Colesterol-Acil-Transferasa tipo 2 (ACAT2) y con la proteína NPC11L1.^{29,30} El colesterol llega a la membrana canalicular de los enterocitos en micelas mixtas o vesículas de fosfolípidos (liposomas); estos complejos de transporte deben liberarlo para que pueda ser captado por los dominios específicos de las proteínas ABCG5/8 y NPC11L1, si viene esterificado, lo hidroliza una lipasa pancreática para que pueda ser absorbido.³¹ Después de que el colesterol atraviesa la membrana del enterocito, se dirige al retículo endoplásmico, donde es esterificado por la ACAT2, posteriormente es empaquetado en los quilomicrones, que circulan en el sistema linfático del intestino, el conducto torácico y la sangre de la vena cava para llegar al hígado.³² En este último órgano, los transportadores ABCG5/8 también representan un importante sistema para controlar la homeostasis del colesterol, al regular su secreción biliar. El mecanismo molecular exacto, desde la síntesis de colesterol y el transporte a través del hepatocito para llegar al canaliculo biliar, aún no es descrito, pero están involucrados factores de transcripción como los LXR α , LXR β , la lipoproteína HDL, su receptor depurador SRB-1, las proteínas NPC11L1, NPC1, NPC2 y se estima que también se involucren los transportadores de fosfolípidos, sales biliares y sus reguladores genéticos.¹⁰

NPC11L1

La proteína NPC11L1 se expresa en el yeyuno proximal de diferentes especies, solo el humano y los monos la expresan en el hígado.³³ La función de esta proteína en el hígado aún no es descrita en su totalidad; sin embargo, a nivel intestinal interviene en regular la concentración y transporte de colesterol.³⁴ La proteína NPC11L1 intestinal se localiza en las células que forman el borde en cepillo de los enterocitos; su región de mayor expresión es el yeyuno proximal, sitio de absorción del colesterol.³⁵ En los humanos, NPC11L1 contiene 1332 aminoácidos y 13 dominios transmembrana, 5 de los cuales son sitios de detección para esteroides.³⁶ El transporte a través de esta proteína es muy selectivo a diferencia

de otros esteroides y se realiza por medio de endocitosis vesicular mediado por la proteína clatrina;³⁷ dentro de su estructura contiene un dominio N-terminal conservado y otro dominio glicosilado rico en cisteína, homólogo a un dominio de la proteína NPC1, que sirve para la detección de esteroides.³⁸ En ratones transgénicos deficientes de la expresión ACAT2 y ABCG5/8, de manera individual y conjunta ACAT2(-/-), G5G8(-/-) y ACAT2(-/-)/G5G8(-/-) se investigó el efecto sobre la absorción intestinal de colesterol, después de ser alimentados con dietas ricas en este lípido (2 %) y en aceite de palma. Los datos revelaron que hubo una disminución en la esterificación intestinal de colesterol y una reducción en la eficiencia de su transporte, debido a la falta de expresión de ABCG5/8; asimismo, la ausencia de estas proteínas limita la absorción de los fitosteroides. La falta de expresión de ACAT2 limita la absorción intestinal, porque evita que el colesterol libre entre a los quilomicrones.³⁰ La absorción de esteroides a nivel intestinal, implica a las proteínas ABCG5/8 y ACAT2, pero existe un factor clave relacionado a este proceso, la proteína NPC1L1.

La proteína NPC1L1 hepática también se expresa en la membrana canalicular del hepatocito. Dentro de su participación en la homeostasis, regula la expresión de la proteína NPC2 e involucra la participación de muchos factores de transcripción.³⁹ La proteína NPC1L1 hepática tiene microdominios específicos en donde se puede llevar a cabo la interacción lípido-proteína, en este tipo de transporte intervienen las proteínas flotilinas 1 y 2 y por un mecanismo conocido como balsas de lípidos.⁴⁰ Actualmente existe un fármaco llamado ezetimiba, que inhibe la absorción intestinal de colesterol, su blanco terapéutico es la proteína NPC1L1 que se encuentra en el intestino,⁴¹ aún no se ha determinado qué efecto puede tener el fármaco en la proteína hepática, pues las condiciones del medio celular y la regulación genética son específicas de cada sitio de expresión.

Transportadores de Solutos (SLC)

Estos transportadores reciben la carga de los lípidos biliares que provienen de la circulación enterohepática; el transporte de lípidos es altamente específico porque se efectúa contra gradientes electroquímicos, que requieren la intervención de cationes sodio y también de OH⁻/HCO₃⁻ que se encargan de llevar a cabo el intercambio aniónico.⁷

NTCP (SLC10A1)

Este transportador se expresa en la membrana basolateral (sinusoidal) del hepatocito y es el más importante asociado al transporte de sales y ácidos biliares, que provienen de la circulación enterohepática.⁴² La proteína está conformada por 349 aminoácidos, tiene un peso aproximado de 56 kDa y funciona como un polipéptido cotransportador de 2 o más iones sodio por cada molécula de soluto. Los sustratos principales del NTCP son las sales biliares conjugadas con glicina y taurina, contiene extremos C-terminales intracelulares, N-terminales extracelulares y 7 dominios transmembrana. Otras sustancias que transporta el NTCP son compuestos sulfatados, hormonas tiroideas, toxinas y algunos fármacos.⁴³ Asociado al transporte de sales y ácidos biliares, NTCP cuenta con residuos de cisteína que funcionan como sitios de unión a estos lípidos, particularmente los residuos 96, 98 y 250; asimismo, tiene regiones denominadas "loops" o bucles

extracelulares, de los cuales en el 1 y 3 se encuentran cargas negativas de aspartato y glutamato, importantes para controlar el transporte dependiente de sodio, el cual es pasivo (no requiere ATP) y depende del potencial electroquímico de las sales y ácidos en su estado ionizado.⁴³ En la actualidad, la investigación sobre NTCP no es comparada a los datos obtenidos de la investigación de otros transportadores de lípidos biliares.

ASBT (SLC10A2)

Este transportador es el homólogo intestinal del NTCP hepático, por lo tanto sus funciones están orientadas al transporte de sales y ácidos biliares que llegan al enterocito y que dependen de sodio⁴⁴; en algunas referencias, este transportador también es considerado como ISBT, que es el transportador ileal de sales biliares dependientes de sodio, pero se ha investigado que el sitio de expresión es diferente. En el túbulo proximal de las células renales, también se expresa el ASBT y es una de las proteínas más importantes que permite la circulación enterohepática de ácidos y sales biliares, a través de la reabsorción intestinal⁴⁵. La proteína se conforma por 348 aminoácidos, tiene un peso de 39 kDa, una región N-terminal extracelular, otra C-terminal orientada al citoplasma y un número impar (7 o 9) de hélices transmembrana.⁴⁶ El transporte que efectúa es electrogénico y lo hace en razón de 2:1 ion Na⁺/sal o ácido biliar. ASBT está asociado con otra molécula llamada proteína ileal de unión a lípidos, ILBP (Ileal Lipid-Binding Protein), que es el principal sitio de unión a sales biliares en los enterocitos del íleon⁴⁵. El mecanismo del transporte y la composición química del transportador ASBT son similares al del NTCP.

Otros transportadores

NPC1

Esta proteína se expresa en el hepatocito, participa de manera importante en la distribución del colesterol intracelular que se obtiene de las lipoproteínas por endocitosis, jugando un papel importante en el control de colesterol biliar, cuyo desajuste genera cálculos de colesterol.⁴⁷ Esta proteína está asociada al funcionamiento de las proteínas NPC1L1 y NPC2.

NPC2

Es la proteína de unión que regula el transporte de colesterol en los hepatocitos, fuertemente asociada a la proteína NPC1L1, quien se encarga de regular negativamente su expresión e influir en la secreción de colesterol biliar.²⁸

ABCG2

Esta proteína de 72 kDa y 655 aminoácidos, se expresa en la membrana basolateral del hepatocito, también recibe el nombre de BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) y transporta una gran variedad de productos sulfatados de esteroides y xenobióticos⁴⁸. Se ha identificado que esta proteína transporta ácidos biliares que provienen de la circulación enterohepática.

MRPs

Pertenecen a la familia de proteínas de resistencia a fármacos y las más destacadas son las del tipo 1, 2, 3 y 6. Para efectuar el transporte de lípidos biliares, emplean el ATP como fuente de energía y son de la familia ABC. La proteína MRP3 (ABCC3)

y MRP4 (ABCC4) se expresan en la membrana basolateral y contribuyen al transporte de ácidos biliares.⁷ La proteína MRP2 (ABCC2) se expresa en la membrana canalicular del hepatocito y puede transportar ácidos biliares, sales biliares y conjugados de bilirrubina.⁴⁹

OATPs

Esta familia es de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (Organic Anions Transporter Polypeptide) y pertenecen a aquellas moléculas que no dependen de sodio para llevar a cabo sus funciones, se expresan en su mayoría en las membranas del enterocito y los más destacados son: OATP-C, OATP-A y OATP-8. Dentro del transporte de lípidos, sólo las sales biliares son competencia de estas proteínas,⁵⁰ pero el sistema no es de gran rendimiento y las investigaciones no les dan prioridad.

OST α y OST β

Estas proteínas son un importante sistema de transporte de ácidos biliares a nivel intestinal; aunque su expresión sea baja, transportan de manera pasiva a los ácidos biliares, una vez que atravesaron las células que forman el ribete en cepillo de los enterocitos (membrana basolateral).⁷

Regulación genética

La proteína BSEP es ampliamente regulada para mantener bajos los niveles de ácidos biliares intracelulares, sobre todo cuando se presentan condiciones fisiopatológicas que pueden ocasionar daños a los lípidos que integran a las membranas celulares.¹⁸ FXR pertenece a la familia de receptores nucleares NR1H4 y juega un papel trascendental en la regulación de la homeostasis de ácidos biliares y fosfolípidos (MDR3), modulando genes claves que intervienen en su síntesis, metabolismo y transporte.⁵¹ Cuando las concentraciones de ácidos biliares son elevadas, FXR puede inducir a la detoxificación de los mismos, acelerar el transporte basolateral, así como incrementar la salida canalicular.⁵² El sistema de regulación de este receptor nuclear es muy específico

gracias a su expresión en hígado e intestino;⁵³ ácidos biliares, como el quenodesoxicólico y cólico, son ligandos naturales de FXR. Una de sus efectos principales que produce su activación, es la supresión de la enzima limitante en la ruta de biosíntesis de los ácidos biliares, la colesterol-7 α -hidroxilasa (CYP7A1). FXR induce la expresión de la proteína SHP (Small Heterodimer Partner) y este efecto inhibe la transcripción del gen CYP7A1, importante efecto para el tratamiento de la colestasis.⁵⁴ Otro de los receptores nucleares es el de pregnano, PXR (Pregnane X Receptor) o NR112, quien tiene al ácido litocólico como ligando natural y de manera selectiva, evita la alta toxicidad de este ácido biliar, controlando las dos vías de detoxificación hepática: la hidroxilación de los miembros de la subfamilia del citocromo P450 y la conjugación con glutatión S-transferasas, UDP-glucuroniltransferasas y sulfottransferasas.⁵² Estos efectos vuelven a los ácidos biliares más hidrofílicos, facilitando su transporte. Otra de las consecuencias de activar FXR es el incremento en la expresión de MDR3 y MDR2, proteínas que transportan los fosfolípidos en la membrana canalicular, favoreciendo su excreción biliar.⁵² Los receptores LXR inducen la expresión de ABCG5/8, principales moléculas que transportan el colesterol biliar.⁵⁵ Los LXR son receptores nucleares que pueden activarse por oxisteroles para regular la homeostasis del colesterol,⁵⁶ cuando este lípido se encuentra en altas concentraciones, los LXR favorecen su eliminación, sobreexpresando las proteínas ABCG5/8 y la colesterol 7 α -hidroxilasa, que participa activamente en la conversión de colesterol en ácidos biliares.⁵⁷ La actividad de los LXR puede depender de la actividad de FXR. Este último factor de transcripción, regula a la proteína SHP (quien también es receptor nuclear), controlando la secreción de sales biliares y fosfolípidos, que son la principal fuerza impulsora de la secreción de colesterol.

Implicaciones fisiopatológicas

El **Cuadro 1** resume los transportadores de lípidos biliares más importantes en el humano, su nomenclatura genética correcta, sitio de expresión y función.

Cuadro 1 Principales transportadores de lípidos biliares

Proteína	Nombre	Aminoácidos	Ubicación	Transporte
BSEP, SPGP (ABCB11)	Bomba Exportadora de Sales Biliares	1321	Membrana canalicular del hepatocito	Ácidos biliares, sales biliares
MDR3 (ABCB4)	Transportador de Múltiple Resistencia a Fármacos miembro 3	179		Fosfolípidos (más del 90% fosfatidilcolina)
ABCG5/G8	Casetes de Unión a ATP miembros 5 y 8	651/673	Membrana canalicular del hepatocito, yeyuno proximal	Colesterol
NTCP (SLC10A1)	Polipéptido Contrtransportador Taurocolato Sódico	349	Membrana basolateral del hepatocito	Sales y ácidos biliares
ASBT (SLC10A2)	Transportador Apical de Sales Biliares dependientes de sodio	348	Colangiocitos, íleon proximal	Sales y ácidos biliares
OATP-C, (SLC21A6)	Polipéptidos Transportadores de Aniones Orgánicos	691	Membrana basolateral del hepatocito	Taurocolatos, bilirrubina,

Cont. Cuadro 1 Principales transportadores de lípidos biliares

Proteína	Nombre	Aminoácidos	Ubicación	Transporte
BSEP, SPGP (ABCB11)	Bomba Exportadora de Sales Biliares	1321	Membrana canalicular del hepatocito	Ácidos biliares, sales biliares
OATP-A (SLC21A3)		670		Sales biliares
OATP-8 (SLC21A8)		702		Colecistocinina
ABCG2	Casetes de Unión a ATP miembro 2	655		Sales biliares
NPC1L1	Proteína de Niemann Pick tipo C1 tipo 1	1332	Membrana canalicular del hepatocito	Colesterol
MRP2 (ABCC2)	Proteína de Múltiple Resistencia a Fármacos miembro 2	1545		Sales y ácidos biliares

BSEP

Las mutaciones que conllevan a la pérdida de este transportador generan repercusiones clínicas importantes, por ejemplo, el desarrollo de colestasis intrahepática familiar tipo 2, que puede evolucionar a la cirrosis y a la muerte temprana, sino se efectúa a tiempo un trasplante hepático.¹⁸ En ratones C57BL/6J knock-out capaces de expresar la proteína BSEP humana, la deficiencia del transportador ha indicado cambios importantes antes de la aparición de colestasis, por ejemplo, alteraciones metabólicas de los lípidos hepáticos, disminución en la expresión de genes claves para la oxidación de ácidos grasos, incremento en los niveles de ácidos biliares serológicos, reducción del tejido adiposo blanco y el deterioro en la cadena larga de los ácidos grasos.²¹ Estos descubrimientos son muy importantes, pues aunque precedan a la colestasis, pueden tomarse como pauta para prevenir el desarrollo de esta enfermedad.

Un estudio clínico realizado en Alemania, incluyó a 649 personas infectadas con el virus de la Hepatitis C y 413 personas sanas, en donde se determinó la presencia de un alelo de ABCB11, denominado genotipo c.1331 T > C, cuya presencia homocigótica es un factor de susceptibilidad genética para la hepatitis, pero no para la fibrosis hepática.¹⁶ Este experimento proporciona datos muy importantes, porque cuando se presentan defectos en heterocigosis, por ejemplo el alelo C, provienen de ambos progenitores y si existe una predisposición a la infección por el virus de la hepatitis C, probablemente esta enfermedad pueda causar fibrosis, pero el grado de lesión hepática no dependerá de la mutación en el alelo y el gen ABCB11, sino de la infección viral en sí.

MDR3

Las alteraciones genéticas de este transportador, están relacionadas al desarrollo de colestasis intrahepática del embarazo. Un estudio realizado en el ADN de 33 mujeres italianas no asociadas a colestasis obstétrica, reveló la presencia de mutaciones en el gen ABCB4 (p.1587DfsX603 y p.1738LfsX744) de las cuales el último fenotipo estuvo asociado a la aparición de la enfermedad colestásica.⁵⁸ Las mutaciones de MDR3 también están asociadas a otro tipo de colestasis llamada intrahepática familiar progresiva, así como a diferentes tipos de colelitiasis. En los cálculos bilia-

res de colesterol, existe un desajuste fisicoquímico en la secreción de los lípidos biliares, produciéndose una hipersecreción de colesterol, el cual se transporta en su mayoría dentro de liposomas, formados por fosfolípidos y escasas sales biliares; dentro de los complejos de transporte formados por fosfolípidos, el colesterol cristaliza y puede formar los cálculos.⁵⁹ En diferentes estudios han detectado mutaciones en ABCB4, como consecuencia de litiasis biliar, llegando a considerar que la regulación positiva de dicho gen, podría prevenir la formación de cálculos.⁶⁰ Dos nuevos casos se han informado sobre mutaciones en MDR3 asociadas a la presencia de colangiocarcinoma, que se trata de un tumor maligno en las vías biliares, con un pronóstico muy desalentador e ineficiente en el aspecto quirúrgico⁶¹; en un hombre de 53 años de edad con colangiocarcinoma y en su hija de 23 años, operada por litiasis sintomática a los 14 años, se identificaron anomalías en los transportadores MDR3. El alelo c.1469T>C del exón 13, fue detectado en análisis de tejidos hepáticos del hombre y en los leucocitos de la hija.²² Otros pacientes con problemas de colangiocarcinoma y litiasis intrahepática, con muchos efectos adversos tras estas enfermedades, también tuvieron alteraciones genéticas en el MDR3, particularmente variaciones heterocigóticas en el alelo del exón 24 (c.2932T>C).²² Aún no se ha descrito con precisión que las mutaciones en el principal transportador de fosfolípidos, sean factores genéticos que predispongan al desarrollo de colangiocarcinoma. La enfermedad de Wilson, que involucra la alteración de otros transportadores de lípidos biliares, puede ser confundida con la enfermedad del transportador ABCB4 o denominada colestasis intrahepática familiar tipo 3. Una paciente de 2 años de edad, a la cual se le detectaron niveles elevados de cobre en una biopsia hepática (248 mg/g en peso seco), así como cobre serológico de 1013 g/L, se le diagnosticó erróneamente la enfermedad de Wilson; sin embargo, en situaciones de colestasis, existe una elevada carga de cobre, el cual se está secretando en la bilis, en la misma existen ácidos biliares libres, que no están dentro de micelas mixtas y que continuamente dañan el tejido de los colangiocitos.⁶² Con estos datos, se demuestra que en un tipo de colestasis están involucradas alteraciones en el transportador ABCB4, independientes a las alteraciones de BSEP, que siempre están presentes en condiciones patológicas por el transporte de ácidos biliares.

Expertos opinan que la regulación positiva en la expresión de MDR3, puede mejorar las condiciones de patologías hepáticas en pacientes con deficiencia parcial del transportador, además de disminuir el riesgo de cálculos biliares y lograr condiciones óptimas en el transporte del colesterol.²⁴

ABCG5/8

Las mutaciones en estos transportadores generan una de las enfermedades más estudiadas, la sitosterolemia, trastorno autosómico recesivo caracterizado por un incremento en los niveles de esteroides vegetales en sangre y tejidos; este desajuste se produce porque los ABCG5/8 permiten altas tasas de absorción intestinal de esteroides, pero impiden su secreción biliar, produciéndose una retención hepática.⁶³ Estas proteínas, junto con las ABCB4, ABCB11 están implicadas en la formación de cálculos biliares de colesterol.⁶⁴ Muchos estudios han comprobado de manera eficaz que las alteraciones genéticas de ABCG5/8 predisponen al desarrollo de cálculos biliares de colesterol en humanos, sin embargo estas variaciones, así como el mecanismo molecular, aún no se describen.⁶⁵ La proteína ABCG8 hepática está involucrada en el desarrollo de hipercolesterolemia, así como la proteína NPC1L1. En hámsteres tratados con una dieta rica en colesterol, se demostró el aumento en la expresión de ABCG5/8 intestinales, debido a la carga del lípido en la dieta, así como el aumento en la expresión de las mismas proteínas hepáticas; después del tratamiento con selenio disminuye la hipercolesterolemia y la expresión de ABCG8 hepático y otras proteínas importantes en el metabolismo y transporte del lípido, tales como NPC1L1 y el receptor de LDL.⁶⁶ También el transportador ABCG8 hepático es el más asociado a la enfermedad por cálculos biliares de colesterol, se ha reportado el incremento en su expresión en pacientes chilenos, alemanes, chinos, rumanos y suecos.⁶⁷ El heterodímero ABCG5/8 también está asociado a problemas con la homeostasis del colesterol intestinal. Sus polimorfismos comunes se relacionan con el incremento en la concentración de lípidos plasmáticos (principalmente colesterol total y triglicéridos) y a la disminución de HDL en pacientes con cálculos biliares.³

ASBT y NTCP

Una deficiencia en la expresión de ASBT/ISBT a nivel intestinal, ocasiona la disminución de ácidos biliares, principalmente en el colon, esto produce que circulen bajas cantidades hacia el hepatocito, reduciendo la cantidad de sales biliares para secretar a vesícula biliar e incrementando el riesgo a desarrollar cálculos biliares. En un estudio realizado en Alemania, se analizó una variante del gen SLC10A2 (ASBT) en 244 pacientes portadores de cálculos biliares y 255 controles; se encontró un polimorfismo de un solo nucleótido denominado SLC10A2 rs9514089, el cual fue más frecuente en los pacientes con obesidad, litiasis biliar y colesterol sérico elevado; por lo tanto, este transportador parece ser absoluto en su participación para limitar la cantidad de sales biliares que llegan al hígado y el responsable de mantener una concentración adecuada de ácidos biliares en el hepatocito, cuyo desajuste altera la concentración de colesterol. El transportador NTCP ve su expresión alterada en condiciones patológicas del hígado, como colestasis y cirrosis. En ratas Sprague-Dawley sometidas a 90% de hepatectomía, se tomaron muestras de hígado en diferentes tiempos (a los 0, 1, 3 y 7 días) para realizar estudios inmunohistoquímicos y de PCR de diferentes transportadores, entre los cuales se destacó el Ntcp de rata. El transportador

disminuyó significativamente su expresión durante todo el período y en los últimos días prácticamente no se detectó su presencia en la membrana basolateral.⁶⁹ Los autores concluyeron que el transportador Ntcp en rata, parece ser el responsable de elevar los niveles de ácidos biliares en el organismo después de la hepatectomía masiva.

Los transportadores de lípidos biliares son numerosos, pero las investigaciones están enfocadas al estudio de los tres principales: ABCB11 (BSEP), ABCB4 (MDR3) y ABCG5/8.

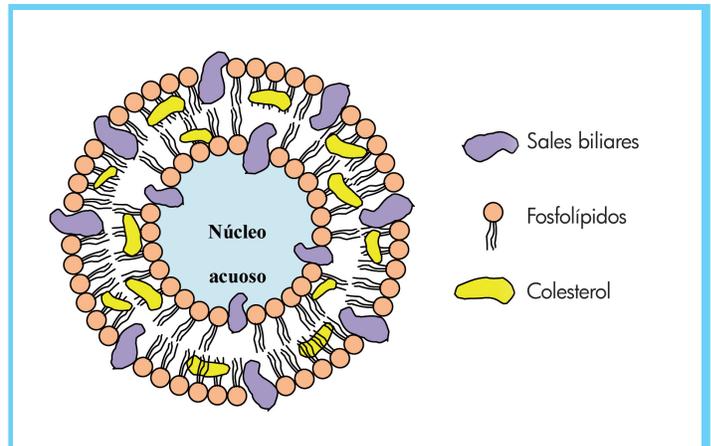


Figura 1 Estructura de una micela biliar

Las micelas mixtas que se forman en la bilis, se integran por sales biliares y fosfolípidos en concentraciones equitativas, realizando interacciones hidrofóbicas; estos complejos de transporte pueden emulsificar grasas y moléculas como la Vitamina E.

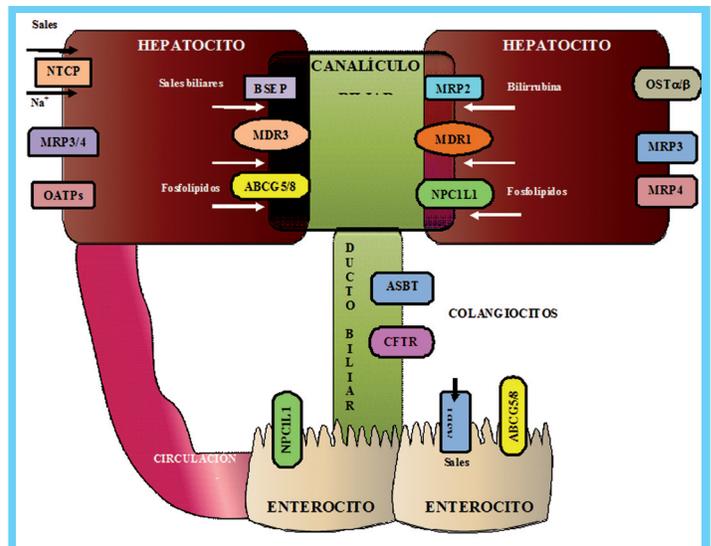


Figura 2 Principales transportadores de lípidos biliares

Las diferentes proteínas especializadas en transportar lípidos biliares se pueden expresar en las membranas basolateral y canalicular del hepatocito y enterocito, así como en los colangiocitos y en las células intersticiales peritubulares del riñón. Los transportadores más importantes para los tres lípidos biliares son: ABCB11 o BSEP para sales biliares, ABCB4 o MDR3 para fosfolípidos y los heterodímeros ABCG5 y ABCG8 para el colesterol.

Conclusión

El estudio de las proteínas que transportan lípidos biliares es de gran trascendencia en la búsqueda de dianas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades que afectan al sistema gastrointestinal; su análisis debe atender la regulación del medio celular donde se encuentran y ante ello, los receptores nucleares también surgen como importantes moléculas de investigación. Actualmente existen muchas enfermedades en donde se ven afectadas las funciones de los transportadores de lípidos biliares, estimándose que su prevalencia aumente.

Referencias Bibliográficas

- Chan J, Vandeberg JL. Hepatobiliary transport in health and disease. *Clin Lipidol* 2012;7(2):189-202.
- Nawroth T, Buch P, Buch K, Langguth P, Schweins R. Liposome formation from bile salt-lipid micelles in the digestion and drug delivery model FaSSiF(mod) estimated by combined time-resolved neutron and dynamic light scattering. *Mol Pharm* 2011;8(6):2162-2172.
- Stokes CS, Lammert F. Transporters in cholelithiasis. *Biol Chem* 2011;393(1-2):3-10.
- Halilbasic E, Claudel T, Trauner M. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. *J Hepatol* 2012. PMID:22885388.
- Nicolau M, Andress EJ, Zolnerciks JK, Dixon PH, Williamson C, Linton KJ. Canalicular ABC transporters and liver disease. *J Pathol* 2012;226(2):300-315.
- Gadaleta RM, van Mil SW, Oldenburg B, Sierseman PD, Klomp LW, van Erpecum KJ. Bile acids and their nuclear receptor FXR: relevance for hepatobiliary and gastrointestinal disease. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801(7):683-692.
- Dawson PA, Lan T, Rao A. Bile acid transporters. *J Lipid Res* 2009;50(12):2340-2357.
- María J, Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol* 2009;15(14):1677-1689.
- Mukhopadhyay S, Uday M. Chemistry and biology of bile acids. *Curr Sci* 2004;87(12):1666-1683.
- Cole LK, Vance JE, Vance DE. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2011;1821(5):754-761.
- Dijkers A, Tietge UJ. Biliary cholesterol secretion: more than a simple ABC. *World J Gastroenterol* 2010;16(47):5936-5945.
- Köck K, Brouwer KL. A perspective on efflux transport proteins in the liver. *Clin Pharmacol Ther* 2012;92(5):599-612.
- Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 2003;83(2):633-671.
- Pramfalk C, Jiang ZY, Parini P. Hepatic Niemann-Pick C1-like 1. *Curr Opin Lipidol* 2011;22(3):225-230.
- Kubit R, Dröge C, Stindt J, Weissenberger K, Häussinger D. The bile salt export pump (BSEP) in health and disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012. PMID:22795478.
- Müllenbach R, Weber SN, Krawczyk M, Zimmer V, Sarrazin C, Lammert F, et al. A frequent variant in the human bile salt export pump gene ABCB11 is associated with hepatitis C virus infection, but not liver stiffness in a German population. *BMC Gastroenterol* 2012;12(1):63.
- Henkel AS, Kavesh MH, Kriss MS, Dewey AM, Rinella ME, Green RM. Hepatic overexpression of ABCB11 promotes hypercholesterolemia and obesity in mice. *Gastroenterology* 2011;141(4):1404-1411.
- Stieger B. Role of the bile salt export pump, BSEP, in acquired forms of cholestasis. *Drug Metab Rev* 2010;42(3):437-445.
- Stieger B, Beuers U. The canalicular bile salt export pump BSEP (ABCB11) as a potential therapeutic target. *Curr Drug Targets* 2011;12(5):661-670.
- Lam P, Soroka CJ, Boyer JL. The bile salt export pump: clinical and experimental aspects of genetic and acquired cholestatic liver disease. *Semin Liver Dis* 2010;30(2):125-133.
- Zhang Y, Li F, Patterson AD, Wang Y, Krausz KW, Neale G, et al. Abcb11 deficiency induces cholestasis coupled to impaired β -fatty acid oxidation in mice. *J Biol Chem* 2012;287(29):24784-24794.
- Tougeron D, Fotsing G, Barbu V, Beauchant M. ABCB4/MDR3 gene mutations and cholangiocarcinomas. *J Hepatol* 2012;57(2):467-468.
- Groen A, Romero MR, Kunne C, Hoosdally SJ, Dixon PH, Wooding C, et al. Complementary functions of the flippase ATP8B1 and the floppase ABCB4 in maintaining canalicular membrane integrity. *Gastroenterology* 2011;141(5):1927-1937.
- Oude Elferink RP, Beuers U. Targeting the ABCB4 gene to control cholesterol homeostasis. *Expert Opin Ther Targets* 2011;15(10):1173-1182.
- Groen A, Kunne C, Jongsma G, van den Oever K, Mok KS, Petruzzelli M, et al. Abcg5/8 independent biliary cholesterol excretion in Atp8b1-deficient mice. *Gastroenterology* 2008;134(7):2091-2100.
- Paulusma CC, Folmer DE, Ho-Mok KS, de Waart DR, Hilarius PM, Verhoeven AJ, et al. ATP8B1 requires an accessory protein for endoplasmic reticulum exit and plasma membrane lipid flippase activity. *Hepatology* 2008;47(1):268-278.
- Hirata T, Okabe M, Kobayashi A, Ueda K, Matsuo M. Molecular mechanisms of subcellular localization of ABCG5 and ABCG8. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009;73(3):619-626.
- Yamanashi Y, Takada T, Yoshikado T, Shoda J, Suzuki H. NPC2 regulates biliary cholesterol secretion via stimulation of ABCG5/G8-mediated cholesterol transport. *Gastroenterology* 2011;140(5):1664-1674.
- Abumrad NA, Davidson NO. Role of the gut in lipid homeostasis. *Physiol Rev* 2012;92(3):1061-1085.
- Nguyen TM, Sawyer JK, Kelley KL, Davis MA, Kent CR, Rudel LL. ACAT2 and ABCG5/G8 are both required for efficient cholesterol absorption in mice: evidence from thoracic lymph duct cannulation. *J Lipid Res* 2012;53(8):1598-1609.
- Grenier E, Garofalo C, Delvin E, Levy E. Modulatory role of PYY in transport and metabolism of cholesterol in intestinal epithelial cells. *PLoS One* 2012;7(7):e40992.
- Bettors JL, Yu L. NPC1L1 and cholesterol transport. *FEBS Lett* 2010;584(13):2740-2747.
- Deffieux MS, Pfeffer SR. Niemann-Pick type C1 function requires lumenal domain residues that mediate cholesterol-dependent NPC2 binding. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108(47):18932-18936.
- Pramfalk C, Jiang ZY, Parini P. Hepatic Niemann-Pick C1-like 1. *Curr Opin Lipidol* 2011;22(3):225-230.
- Davis HR Jr, Altmann SW. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Biochim Biophys Acta* 2009;

- 1791(7): 679-683.
36. Wang LJ, Song BL. Niemann-Pick C1-Like 1 and cholesterol uptake. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821(7):964-972.
37. Wang LJ, Wang J, Li N. Molecular characterization of the NPC1L1 variants identified from cholesterol low absorbers. *J Biol Chem* 2011;286(9):7397-7408.
38. Tang W, Jia L, Ma Y, Xie P, Haywood J, Dawson PA, et al. Ezetimibe restores biliary cholesterol excretion in mice expressing Niemann-Pick C1-like 1 only in liver. *Biochim Biophys Acta* 2011;1811(9):549-555.
39. Yamanashi Y, Takada T, Shoda JI, Suzuki Y. A novel function of NPC1L1 as a negative regulator of NPC2 protein. *Hepatology* 2011;55(3):953-964.
40. Ge L, Qi W, Wang LJ, Miao HH, Qu YX, Li BL, et al. Flotillins play an essential role in Niemann-Pick C1-like 1-mediated cholesterol uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(2):551-556.
41. De Bario O, Neuschwander-Tetri BA, Liu M, Portincasa P, Wang DQ. Ezetimibe: its novel effects on the prevention and the treatment of cholesterol gallstones and nonalcoholic fatty liver disease. *J Lipids* 2012. PMID: 22132342.
42. Alrefai WA, Gill RK. Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res* 2007;24(10):1803-1823.
43. Stieger B. The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation. *Handb Exp Pharmacol* 2011;(201):205-259.
44. Lionarons DA, Boyer JL, Cai SY. Evolution of substrate specificity for the bile salt transporter ASBT (SLC10A2). *J Lipid Res* 2012;53(8):1535-1542.
45. Hu NJ, Iwata S, Cameron AD, Drew D. Crystal structure of a bacterial homologue of the bile acid sodium symporter ASBT. *Nature* 2011;478(7369):408-411.
46. Geyer J, Wilke T, Petzinger E. The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2006;372(6):413-431.
47. Lange Y, Ye J, Steck TL. Activation mobilizes the cholesterol in the late endosomes-lysosomes of Niemann Pick type C cells. *PLoS One* 2012;7(1):e30051.
48. Blazquez AG, Briz O, Romero MR, Rosales R, Monte MJ, Vaquero J, et al. Characterization of the role of ABCG2 as a bile acid transporter in liver and placenta. *Mol Pharmacol* 2012;81(2):273-283.
49. Jemnitz K, Heredi-Szabo K, Janossy J, Iloja E, Vereczky L, Krajcsi P. ABCC2/Abcc2: a multispecific transporter with dominant excretory functions. *Drug Metab Rev* 2010;42(3):402-436.
50. Fahrmayr C, Fromm MF, König J. Hepatic OATP and OCT uptake transporters: their role for drug-drug interactions and pharmacogenetic aspects. *Drug Metab Rev* 2010;42(3):380-401.
51. Cui JY, Aleksunes LM, Tanaka Y, Fu ZD, Guo Y, Guo GL, et al. Bile acids via FXR initiate the expression of major transporters involved in the enterohepatic circulation of bile acids in newborn mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;302(9):G979-996.
52. Jonker JW, Liddle C, Downes M. FXR and PXR: potential therapeutic targets in cholestasis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2012;130(3-5):147-158.
53. Modica S, Gadaleta RM, Moschetta A. Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nucl Recept Signal* 2010;8: e005.
54. Modica S, Petruzzelli M, Bellafante E, Murzilli S, Salvatore L, Celli N, et al. Selective activation of nuclear bile acid receptor FXR in the intestine protects mice against cholestasis. *Gastroenterology* 2012;142(2):355-365.
55. Van Straten EM, Huijkman NC, Baller JF, Kuipers F, Plösch T. Pharmacological activation of LXR in utero directly influences ABC transporter expression and function in mice but does not affect adult cholesterol metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295(6):E1341-1348.
56. Matsubara T, Li F, Gonzalez FJ. FXR signaling in the enterohepatic system. *Mol Cell Endocrinol* 2012. PMID: 22609541.
57. Li T, Matozel M, Boehme S, Kong B, Nilsson LM, Guo G, et al. Overexpression of cholesterol 7 α -hydroxylase promotes hepatic bile acid synthesis and secretion and maintains cholesterol homeostasis. *Hepatology* 2011;53(3):996-1006.
58. Anzivino C, Odoardi MR, Meschiari E, Baldelli E, Facchinetti F, Neri I, et al. ABCB4 and ABCB11 mutations in intrahepatic cholestasis of pregnancy in an Italian population. *Dig Liver Dis* 2012; (In press).
59. Castro-Torres IG. Cholesterol gallstones formation: new scientific advances. *Rev GEN (Gastroenterología Nacional)* 2012;66(1):57-62.
60. Acalovschi M, Tirziu S, Chiorean E, Krawczyk M, Grünhage F, Lammert F. Common variants of ABCB4 and ABCB11 and plasma lipid levels: a study in sib pairs with gallstones, and controls. *Lipids* 2009;44(6):521-526.
61. Tyson GL, El-Serag HB. Risk factors of cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2011;54(1):173-184.
62. Shneider BL. ABCB4 Disease presenting with cirrhosis and copper overload-potential confusion with Wilson Disease. *J Clin Exp Hepatol* 2011;1:115-117.
63. Méndez-González J, Julve J, Rotllan N, Llaverias G, Blanco-Vaca F, Escolà-Gil JC. ATP-binding cassette G5/G8 deficiency causes hypertriglyceridemia by affecting multiple metabolic pathways. *Biochim Biophys Acta* 2011;1811(12):1186-1193.
64. Castro-Torres IG, Naranjo-Rodríguez EB, Domínguez-Ortiz MA, Gallegos-Estudillo MA, Saavedra-Vélez MV. Antilithiasic and hypolipidaemic effects of *Raphanus sativus* L. var *niger* in mice fed with a lithogenic diet. *J Biomed Biotechnol* 2012. PMID: 23093836.
65. Von Kampen O, Buch S, Nothnagel M, Azocar L, Molina H, Brosch M, et al. Genetic and functional identification of the likely causative variant for cholesterol gallstone disease at the ABCG5/8 lithogenic locus. *Hepatology* 2012. PMID: 22898925.
66. Poirier J, Cockell KA, Scoggan KA, Ratnayake WM, Rocheleau H, Gruber H, et al. High-dose supplemental selenite to male Syrian hamsters fed hypercholesterolaemic diets alters Ldlr, Abcg8 and Npc1l1 mRNA expression and lowers plasma cholesterol concentrations. *Br J Nutr* 2012;108(2):257-266.
67. Krawczyk M, Wang DQ, Portincasa P, Lammert F. Dissecting the genetic heterogeneity of gallbladder stone formation. *Semin Liver Dis* 2011;31(2):157-172.
68. Renner O, Harsch S, Schaeffeler E, Winter S, Schwab M, Krawczyk M, et al. A variant of the SLC10A2 gene encoding the apical sodium-dependent bile acid transporter is a risk factor for gallstone disease. *PLoS One* 2009;4:e7321.
69. Miura T, Kimura N, Yamada T, Shimizu T, Nanashima N, Yamana D, et al. Sustained repression and translocation of Ntcp and expression of Mrp4 for cholestasis after rat 90 % partial hepatectomy. *J Hepatol* 2011;55(2):407-414.