

# Fisiopatología de cálculos biliares de colesterol: la búsqueda de una diana terapéutica

Ibrahim Guillermo Castro-Torres <sup>1</sup>, Isis Beatriz Bermúdez-Camps <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Colegio de Ciencias y Humanidades, Plantel Sur (CCH sur), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) D.F., México <sup>2</sup> Área Académica de Farmacia, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca de Soto, Hidalgo, México

## RESUMEN

En la fisiopatología de los cálculos biliares de colesterol se involucran diferentes desajustes tales como, la alteración en la secreción de lípidos biliares, la cristalización o nucleación del colesterol, la sobreproducción de proteínas mucinas que modifican la motilidad de la vesícula biliar y la alteración en el transporte intestinal de colesterol. En estas fases intervienen numerosas moléculas por ejemplo, los transportadores ABCG5, ABCG8, ABCB11 y ABCB4, los genes MUC que se encargan de expresar las proteínas mucinas, la colecistocinina (CCK) y su receptor tipo 1 y la proteína de Niemann-Pick C1L1 intestinal (NPC1L1). En esta revisión, discutimos los resultados de estudios sobre estas moléculas que tienen una participación específica dentro de la formación de los cálculos biliares de colesterol. La modulación de la expresión de estas proteínas, puede ser una importante pauta de investigación para el hallazgo de una diana terapéutica para la prevención y el tratamiento de esta enfermedad de la vesícula biliar.

**Palabras clave:** fisiopatología, cálculos biliares, colesterol, diana terapéutica

## ABSTRACT

**Physiopathology of cholesterol gallstones: the**

## search for a therapeutic target

In the physiopathology of cholesterol gallstones different imbalances are involved, among them are alterations in the secretion of biliary lipids, in the crystallization/nucleation of cholesterol, in the overproduction of mucins, which modify motility of gallbladder, and in the intestinal cholesterol transport. In all these processes many molecules are involved, for example ABCG5, ABCG8, ABCB11 and ABCB4 transporters, MUC genes, which are responsible for expressing mucin, cholecystokinin (CCK), cholecystokinin receptor 1 and Niemann-Pick C1L1 protein (NPC1L1). In this review, we discuss the findings of the studies of these molecules, which have a specific role in the formation of cholesterol gallstones. The modulation of the expression of these proteins can be an important guideline to find out a new therapeutic target for prevention and treatment and of this gallbladder disease.

**Key Words:** physiopathology, gallstones, cholesterol, therapeutic target

## INTRODUCCIÓN

Los cálculos biliares constituyen una enfermedad de la vesícula biliar y son considerados un problema de salud pública; más del 80% de los

**Autor para correspondencia:** Q.F.B. Ibrahim Guillermo Castro-Torres, CCH sur, UNAM, Cataratas y Llanura S/N, Colonia Jardines del Pedregal, C.P. 04500, Delegación Coyoacán, D.F., México **E-mail:** : ibrahim1002@hotmail.com

**Recibido:** el 30 de octubre de 2014. **Aceptado para publicación:** el 20 de marzo de 2015

Este documento está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb152624.pdf>

cálculos biliares, están formados por colesterol (1). La litiasis biliar prevalece en 10-15% de la sociedad occidental. En Estados Unidos, más de 20 millones de personas padecen esta enfermedad generando costos elevados cada año; América Latina, México, Chile y Argentina son los países más afectados por cálculos biliares; las comunidades del este de Asia y de África Subsahariana son las de menor prevalencia por litiasis (1). Existen muchos factores de riesgo para desarrollar cálculos biliares, entre los más importantes se destacan: sedentarismo, obesidad, edad avanzada e hipercolesterolemia (2,3). La búsqueda de terapias farmacológicas para este padecimiento, se enfrenta a la complejidad de su fisiopatología, en donde están involucrados desajustes en la secreción de colesterol biliar; en este proceso intervienen los transportadores del tipo *cassette* de unión a ATP (ABC), tales como ABCG5, ABCG8, ABCB4 y ABCB11; otros procesos involucrados en la fisiopatología de litiasis, son la cristalización/nucleación del colesterol, reacciones de inflamación en la vesícula biliar, alteración en la secreción de mucinas (genes *MUC*), cambios en la motilidad biliar (colecistocinina y su receptor tipo 1), alteración en el transporte intestinal de colesterol (ABCG5/8 y la proteína NPC1L1) y, algunos autores también sostienen la importancia de la motilidad intestinal (4,5). La secreción de colesterol biliar es muy importante, y está mediada por proteínas expresadas en la membrana canalicular del hepatocito, pero existen otras moléculas que influyen en el metabolismo y transporte del colesterol, expresadas en el hígado y en el intestino (6). El cambio de fase del colesterol, desde un medio líquido a un sólido en forma de cristales, se debe a las importantes reacciones bioquímicas del epitelio biliar, más la producción de agentes pronucleantes que facilitan el cambio de estado del colesterol (7). Cuando los cálculos biliares ya están formados, alteran la motilidad de la vesícula biliar, favoreciendo su crecimiento (8). En la motilidad biliar también se encuentran hormonas y sus respectivos receptores, quienes

pueden controlar los adecuados movimientos de la vesícula para vaciar su contenido biliar e intervenir en la digestión (9). En todas las moléculas que participan en la formación de cálculos biliares, puede estar un enfoque de investigación para su prevención y para su tratamiento.

### **Alteración en la secreción de lípidos biliares.**

Este es el primer evento considerado en la fisiopatología de litiasis biliar; sin embargo, aunque el colesterol es el principal componente de los cálculos biliares (más del 80%), su transporte a través de la membrana canalicular del hepatocito está asociado con el transporte de los otros lípidos biliares (fosfolípidos y sales biliares) (10). Los tres principales lípidos biliares son transportados a través de proteínas específicas de la familia ABC, tales como ABCB11 o bomba exportadora de sales biliares (BSEP), ABCB4, que transporta fosfolípidos y que también es conocido como transportador de múltiple resistencia a fármacos (MDR3) y las proteínas ABCG5 y ABCG8 que transportan el colesterol (11). Estas proteínas son las más estudiadas en su asociación con litiasis biliar; sin embargo, la secreción biliar que puede generar sobresaturación de colesterol, es un evento que no sólo se asocia a los transportadores ABC, sino también a receptores nucleares y otras proteínas, tales como el receptor farnesoide X (FXR), los receptores hepáticos X (LXR $\alpha$  y LXR $\beta$ ), el receptor de pregnano (PXR), proteínas de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP-1 y SREBP-2) y la proteína de Niemann-Pick C1L1 (NPC1L1). Además, en el hepatocito hay importantes enzimas que controlan el metabolismo del colesterol, tales como la HMGCoA reductasa (limitante en la biosíntesis del colesterol) y la colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa (limitante en la biosíntesis de ácidos biliares), las cuales pueden influir en la alteración del transporte biliar del colesterol, así como la lipoproteína de alta densidad (HDL) y su receptor depurador SRB-1 (12,13). Cada una de estas moléculas puede influir en la formación de cálculos biliares y, por ello, son

## Dianas terapéuticas para cálculos biliares de colesterol

factores a considerar en la búsqueda de una diana terapéutica.

**Transportador ABCB11.** Es la principal proteína transportadora de sales biliares en la membrana canalicular del hepatocito, por lo que ha sido estudiada en modelos experimentales para litiasis biliar. Dentro de las primeras investigaciones, se encuentra aquella que evaluó la expresión de esta proteína en dos cepas de ratón, una de ellas susceptible al desarrollo de cálculos biliares (C57L/J) y la otra resistente (AKR). El desarrollo de cálculos biliares en el ratón C57L/J produjo la sobreexpresión de BSEP; sin embargo, al realizar cultivos de las membranas canaliculares de los hepatocitos y al analizar el transporte de sales biliares, los autores comprobaron que, a pesar de incrementar la expresión de BSEP, redujo la secreción de taurocolato (14), que es importante para formar micelas mixtas y transportar el colesterol. En esta investigación no se determinó la causa por la cual se modificó el transporte de un tipo específico de sal biliar (taurocolato). En el año 2006, se realizó un estudio a partir de biopsias hepáticas de pacientes con litiasis biliar, en el cual se cuantificaron los niveles de ARN mensajero de BSEP por la técnica de PCR en tiempo real. Los resultados demostraron que los niveles de ARN mensajero disminuyeron significativamente en las biopsias analizadas (15), por lo que se puede concluir que existen bajos niveles de BSEP y la concentración de sales biliares puede disminuir en la bilis; estos resultados se pueden comparar con un reciente estudio realizado en 2014, en el que se indujo la formación de cálculos biliares en ratones C57L/J mediante una dieta litogénica. En el estudio emplearon técnicas inmunohistoquímicas y de *Western Blot* para ubicar la proteína BSEP y analizar sus niveles de expresión. Se encontró que la presencia de cálculos biliares se asocia con una reducción en la expresión de BSEP, por lo que en la bilis baja la concentración de sales biliares (16). En estos últimos experimentos se demostró que la baja expresión de BSEP reduce

la concentración de sales biliares en la bilis, lo que conduce a la precipitación del colesterol y a la formación de cálculos biliares. La proteína BSEP puede ser considerada como una futura diana terapéutica para el tratamiento de cálculos biliares, debido a que el incremento en su expresión favorece el transporte de sales biliares y estas moléculas permiten la formación de micelas mixtas, en las que el colesterol se transporta y evita su precipitación. La elevada concentración de colesterol biliar, puede producir reacciones en el epitelio biliar, como sobreproducción de mucinas y la cristalización del colesterol, que anteceden a la formación del cálculo biliar.

**Transportador ABCB4.** Esta proteína, que también recibe el nombre de MDR3, se encarga de transportar fosfolípidos en la bilis y desde el año 2004 se ha investigado su influencia en la enfermedad por cálculos biliares. Los primeros experimentos se realizaron en ratones *knockout* del gen de esta proteína, que son incapaces de expresar el transportador (para el caso de roedores MDR3 es equivalente a MDR2). La administración de una dieta litogénica durante 12 semanas provocó el desarrollo de litiasis en los ratones y los análisis de bilis demostraron una baja concentración de fosfolípidos, debido a la ausencia de su principal transportador (17); aunado a esto, hubo un incremento significativo en la incidencia de litiasis biliar a las 15 semanas de tratamiento con la dieta, con la consecuente aparición de litiasis intrahepática. Por lo anterior, los autores concluyeron que la deficiencia de MDR2 en los ratones es un factor para acelerar el desarrollo de litiasis. Estos resultados demuestran que los fosfolípidos son necesarios para la formación de micelas mixtas y liposomas, sin los cuales el colesterol tiene una mayor probabilidad de cristalizarse en la bilis. Podría especularse que el incremento en la expresión de MDR3 puede ser una pauta de investigación para prevenir la formación de cálculos biliares. Otro tema de investigación ha estado asociado con el análisis de

mutaciones de MDR3 en seres humanos, en donde no se ha determinado que los cambios estructurales en esta proteína estén asociados con la formación de litiasis biliar (18,19).

**Transportadores ABCG5 y ABCG8.** Estas proteínas transportan al colesterol desde dos sitios importantes, la membrana canalicular del hepatocito y las células que forman el ribete en cepillo del enterocito; funcionan como un heterodímero y tienen una amplia relación con la proteína NPC1L1 en el transporte del colesterol (20). Estos transportadores son los principales determinantes genéticos de los cálculos biliares en humanos (21) y son las más estudiadas en el tema de litiasis biliar en los niveles clínico y experimental, por lo tanto, se resumirán los principales experimentos que las proponen como futuras dianas terapéuticas.

En cepas de ratones susceptibles a la formación de cálculos biliares, se ha comprobado que cuando se desarrolla la enfermedad, se incrementa la expresión de los transportadores ABCG5/8 intestinales, esto debido al constante flujo del colesterol que proviene de las dietas litogénicas (22). Estos resultados pueden implicar que al disminuir la expresión de los ABCG5/8 en el enterocito, se absorba un menor contenido de colesterol y así, disminuya su concentración plasmática y biliar; de esta manera el lípido se eliminará por las heces fecales.

Los estudios clínicos de las proteínas ABCG5/8 hepáticas han explicado cómo algunos polimorfismos aparecen asociados con la presencia de litiasis biliar. Un experimento evaluó alteraciones genéticas y su asociación con litiasis biliar y con los niveles elevados de lípidos en sangre; lo que se determinó fue que algunos alelos de estos transportadores presentes en sujetos con litiasis (*Q604E* para ABCG5 y *D19H* para ABCG8), están asociados con un incremento en los niveles de lípidos plasmáticos (colesterol y triglicéridos) así como, con una disminución del colesterol HDL (23). En otro importante estudio, se analizó

el ADN de muestras hepáticas que provinieron de grupos poblacionales donde prevalece la enfermedad: China, India, Dinamarca, Alemania y Chile. En estos dos últimos países, el mapeo genético detectó segmentos de aproximadamente 250 kilobases, que pueden definirse para el locus de ABCG5/8, ABCG5-R50C ( $p=4.94 \times 10^{-9}$ ) y ABCG8-D19H ( $p=1.74 \times 10^{-10}$ ). El estudio no identificó polimorfismos de un solo nucleótido, pero sí realizaron un ensayo para analizar el transporte de colesterol biliar, empleando células transfectadas (HEK293), marcadores genéticos y análisis para evaluar la expresión de proteínas. Las variantes alélicas de ABCG5/8 halladas, se asociaron con un incremento en la actividad del transporte del colesterol biliar, que es el que produce sobresaturación de colesterol en la vesícula biliar (24).

La mayor parte de los estudios de ABCG5/8 han dejado manifiestos importantes determinantes genéticos para la formación de litiasis biliar de colesterol; sin embargo, con base en estos hallazgos, aún no se han llegado a discutir los posibles criterios para que ABCG5/8 sean consideradas futuras dianas terapéuticas que prevengan del desarrollo de la enfermedad. Asimismo, las investigaciones genéticas han dado prioridad a los transportadores hepáticos y a la secreción de colesterol biliar, pero también los ABCG5/8 se expresan en los enterocitos y juegan un rol importante en el transporte del colesterol. En el intestino delgado sí puede considerarse que la baja expresión de los ABCG5/8 evita la absorción del colesterol y su transporte en la circulación portal, pero en este tema también es importante considerar el rol de la proteína NPC1L1.

**Cristalización o nucleación del colesterol.** Algunos autores consideran que la cristalización del colesterol es el evento limitante dentro de la fisiopatología de cálculos biliares postulando que, si existe una alteración en la secreción de colesterol sin que este llegue a la fase de nucleación, no habrá formación de un cálculo biliar. La cristalización

## Dianas terapéuticas para cálculos biliares de colesterol

o nucleación del colesterol es hasta el momento un tema poco analizado, dado que no se conocen con detalle los mecanismos moleculares que desencadenan este cambio físico. En la bilis, el colesterol puede transportarse en micelas mixtas (compuestas de sales biliares y fosfolípidos) o liposomas/vesículas (compuestos en su mayoría de fosfolípidos y escasas sales biliares) y en condiciones de cálculos biliares se ha observado que el colesterol se transporta en su mayoría en vesículas, denominadas unilamelares, porque están formadas por una bicapa de fosfolípidos de diámetro amplio y que incluyen un compartimento acuoso (25). Estas vesículas tienen la capacidad de fusionarse para convertirse en vesículas multilamelares las que, a su vez, disminuyen de diámetro por las múltiples capas de fosfolípidos, logrando una concentración elevada de colesterol en el interior. Las moléculas de este lípido colisionan sobre sí mismas, generando núcleos cristalinos; dichos núcleos pueden irse fusionando hasta incrementar su superficie, lo que produce reacciones bioquímicas importantes en el epitelio de la vesícula biliar. Una de estas reacciones y quizás la más importante, es la sobreproducción de mucina, proteína que interviene en la formación del lodo biliar y en las matrices en las que el colesterol cristalizado se va depositando para formar el cálculo biliar (26,27). Además de las mucinas existen otras moléculas que favorecen la nucleación/cristalización del colesterol y se denominan agentes pronucleantes. También existen agentes antinucleantes, que pueden evitar la cristalización del colesterol, en este tipo de moléculas las investigaciones se pueden enfocar para la búsqueda de un tratamiento que evite al cambio de estado del colesterol. En un experimento se reportaron importantes efectos de la osteopontina y de su receptor, integrina  $\alpha v$  en la formación de litiasis de colesterol. La osteopontina, es una fosfoproteína que se une al calcio y se ha demostrado en un modelo *in vitro* con bilis humana, que retarda la velocidad de

nucleación e inhibe el efecto pronucleante del calcio (28). En técnicas de inmunohistoquímica se corroboró que la osteopontina y su receptor, muestran una mayor expresión en epitelios vesiculares sin daños por litiasis a diferencia de los epitelios dañados por esta enfermedad, lo que indica con claridad que una abundancia de esta proteína y su receptor puede ser una pauta de investigación para inhibir una de las fases clave en la fisiopatología de litiasis biliar, la cristalización/nucleación del colesterol (29).

**Expresión de mucinas: lodo biliar.** La formación del lodo biliar es multifactorial, dentro de los componentes mayoritarios que influyen en este proceso, se encuentran los genes *MUC*, responsables de expresar a las mucinas. Entre los genes que inducen la expresión de estas moléculas se encuentran: *MUC1*, *MUC2*, *MUC3*, *MUC4*, *MUC5B*, *MUC5AC* y *MUC6*, de los cuales *MUC5B* y *MUC5AC* son los que comúnmente participan en el desarrollo de cálculos (29). Cuando la bilis se encuentra sobresaturada y con cristales de colesterol, los daños ocasionados al epitelio vesicular ocasionan que las mucinas se produzcan en exceso, estas proteínas pueden acelerar el crecimiento del cálculo biliar, porque tienen la capacidad de unir lípidos y pigmentos biliares en matrices glucoproteicas (30). En cultivos de colangiocitos, los genes de mucina son regulados por moléculas mediadoras de inflamación como el factor de necrosis tumoral alfa y el factor de crecimiento epidérmico, ambos con sus respectivos receptores; asimismo, se ha identificado que el incremento de estas proteínas pronucleantes es mediado por la enzima ciclooxigenasa y la síntesis de prostaglandina E2 (31) y que produce cambios histopatológicos al epitelio vesicular, como edema, producción de células inflamatorias y especies reactivas de oxígeno, consideradas factores pronucleantes (7). Debido a que la acelerada expresión de las proteínas mucinas representa una consecuencia

de todas las alteraciones biliares encaminadas a la formación de cálculos, hasta el momento no se tienen estudios en donde se controle la expresión de alguno de los genes *MUC* para prevenir o tratar la enfermedad.

### **Alteración en la motilidad de la vesícula biliar.**

La presencia de cálculos biliares en la vesícula, produce cambios en la motilidad de este órgano, disminuyéndola y favoreciendo el crecimiento de los cálculos, por esta razón, la motilidad es otro enfoque de investigación sobre un futuro tratamiento de esta enfermedad (32). La motilidad de la vesícula biliar facilita el transporte de la bilis, desde el hígado a la vesícula (llenado) y desde ésta hacia el duodeno (vaciado); estos movimientos están controlados por la colecistocinina, hormona constituida por 115 aminoácidos, que es sintetizada en el intestino delgado (duodeno y yeyuno) y su principal ligando es el receptor tipo 1 (CCK-1), quien también interviene en la motilidad biliar (9). Un estudio demostró que los efectos de la colecistocinina son importantes para evitar el desarrollo de cálculos biliares; se utilizaron ratones modificados genéticamente, que no expresan el receptor para la colecistocinina, CCK-1R (-/-). Estos ratones fueron tratados con una dieta litogénica (1% de colesterol y 0.5% de ácido cólico) y se observó que debido a la baja motilidad de la vesícula biliar, el desarrollo de cálculos biliares fue acelerado en el 75% de los ratones, con la aparición de cristales de colesterol de diferentes formas y la producción de lodo biliar. Los ratones controles que expresan de manera normal el receptor de colecistocinina, no desarrollaron cálculos biliares (33). Estas investigaciones se complementan con otro experimento realizado en el año 2011, donde también se usaron ratones que no expresan el CCK-1R y que son susceptibles a la formación de litiasis; los ratones fueron tratados con sales del ácido ursodesoxicólico (un ácido biliar utilizado para el tratamiento de litiasis de colesterol), adicionado 10% de estos componentes a su dieta litogénica durante 8

meses. Al finalizar el tratamiento se demostró que la baja motilidad biliar, produjo la formación de cálculos, aun cuando los ratones fueron tratados con ursodesoxicolato, que es un agente indicado para el tratamiento de litiasis y que se deriva de un ácido biliar que no es tóxico (34). En este trabajo, es evidente que el efecto del fármaco se vio interrumpido por la inadecuada motilidad biliar, que provoca la deficiencia del principal receptor de colecistocinina. Recientemente se investigó el rol de la caveolina-3 y el receptor para la colecistocinina A en la formación de cálculos biliares en ratones C57BL/6. Los ratones fueron tratados con una dieta litogénica (1.25% de colesterol, 1% de ácido cólico y 15% de grasa) para el desarrollo de la enfermedad. Después esto, se analizaron los niveles de lípidos biliares y plasmáticos así como estudios moleculares para medir la expresión y los niveles de ARNm de la caveolina-3 y el receptor de la colecistocinina. Se encontró que los cálculos biliares producen un incremento en los niveles de colesterol plasmático y biliar, así como una disminución en la expresión de la caveolina-3 y el receptor de colecistocinina, lo que deja en evidencia que los cálculos alteran la motilidad de la vesícula biliar y dañan las células endoteliales de los tejidos biliares (caveolina-3) (9). En todos estos experimentos está demostrado que la falta de colecistocinina provoca hipomotilidad de la vesícula biliar, prolongando el tiempo de residencia del colesterol, el cual puede acelerar su cristalización. Un enfoque de estudio para evitar la formación de los cálculos biliares puede ser el incrementar la expresión de esta hormona, para mantener una adecuada motilidad biliar.

### **Transporte del colesterol en el intestino delgado.**

En el intestino delgado se han producido numerosos efectos terapéuticos para controlar la homeostasis del colesterol (35). En el ribete en cepillo de los enterocitos se expresan las proteínas NPC1L1, ABCG5 y ABCG8, las cuales participan en el transporte del colesterol, quien proviene en su mayoría de la dieta, por lo que cuando existe una

## Dianas terapéuticas para cálculos biliares de colesterol

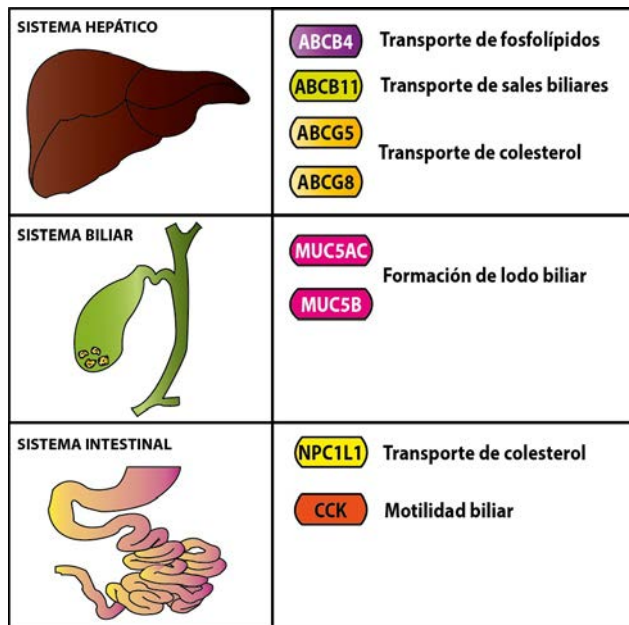
alta ingesta de grasas, puede incrementar el riesgo a desarrollar hipercolesterolemia y litiasis biliar (36). La inhibición de la expresión de NPC1L1, inhibe la absorción intestinal de colesterol, previniendo el desarrollo de cálculos biliares y reduciendo los niveles de colesterol plasmático (37); el fármaco ezetimiba es un molécula de la familia de las azetidionas que tiene la capacidad de inhibir la expresión de la proteína NPC1L1 y esta vía es de especial interés en litiasis biliar (38). En la absorción intestinal, son importantes las enzimas que permiten el transporte del colesterol, de acuerdo a su estructura química: la hidrolasa de colesterilo y la acil-coenzima A colesterol acil-transferasa, ACAT2. La primera enzima hidroliza al colesterol para que pueda atravesar el enterocito y la segunda lo esterifica para que pueda ser transportado en los quilomicrones hacia el hígado (39). Estas dos proteínas también pueden ser futuros blancos terapéuticos que prevengan la formación de cálculos biliares de colesterol.

**Proteína NPC1L1 intestinal.** Esta proteína contiene 1332 aminoácidos y 13 dominios transmembrana, se expresa en las células que forman el ribete en cepillo de los enterocitos, siendo el yeyuno proximal su sitio de mayor abundancia (39). Esta proteína y el heterodímero ABCG5/8 son los principales transportadores del colesterol en el intestino delgado; el fármaco ezetimiba tiene como diana terapéutica a la proteína NPC1L1 a quien se encarga de inhibirla, teniendo como resultado una disminución en la absorción intestinal de colesterol. El transporte de colesterol a través de la proteína NPC1L1 es altamente selectivo a diferencia de otros esteroides, se realiza por medio de endocitosis vesicular mediado por la proteína clatrina; se ha identificado a otra molécula necesaria para la absorción intestinal de colesterol y es llamada caveolina-1 (10,40).

Importantes estudios básicos y clínicos han estudiado la expresión de la proteína NPC1L1 en la prevención de cálculos biliares, escasos estudios se enfocan al tratamiento de litiasis

porque se toma en cuenta el costo-beneficio que se produce durante el desarrollo de la enfermedad. Los ratones C57L/J alimentados con una dieta litogénica (1% colesterol y 0.1% de ácido cólico) desarrollan litiasis biliar en menos de un mes; en estos modelos, la administración de ezetimiba a dosis de 8 mg/kg/día disminuye la expresión de la proteína NPC1L1 intestinal. Este efecto produce una disminución de la absorción intestinal de colesterol ( $5.0 \pm 1.4\%$ ) en comparación con ratones afectados por litiasis biliar y que no son tratados ( $62.5 \pm 4.6\%$ ); asimismo, disminuye la secreción de colesterol biliar, mejora la motilidad de la vesícula biliar y el contenido de sales biliares no se altera (80.70 molar) (41,42). La disminución en la expresión de la proteína NPC1L1 intestinal genera efectos hipocolesterolémicos, que pueden evitar la constante secreción de colesterol hacia la bilis, en este caso podemos considerar estos efectos como una estrategia de prevención de litiasis; por otro lado, la regulación negativa en la expresión de NPC1L1 no altera el contenido de sales biliares en presencia de cálculos, lo que puede permitir a estos solutos, transportar no sólo los excesos de colesterol en la bilis, sino también el colesterol que integra a los cálculos biliares, facilitando la disminución de su tamaño o su posible desintegración.

En un estudio clínico que incluyó a 12 pacientes chinos con litiasis y a 31 pacientes sanos, se reportaron incrementos en los niveles de ARNm de las proteínas NPC1L1 y ACAT2, produciendo su sobreexpresión, mientras que en los transportadores ABCG5/8 no se observaron cambios. Estos resultados se obtuvieron a partir del análisis proteico en biopsias de yeyuno (43). Los datos indican que la litiasis biliar produce una alta concentración de colesterol intestinal y como el lípido en gran medida circula al hígado, primero debe ser transportado (sobreexpresión de NPC1L1) y luego esterificado para introducirse a los quilomicrones (sobreexpresión de ACAT2), por lo tanto, ante los niveles elevados de colesterol en el intestino, una estrategia de tratamiento es



**Figura 1.** En la fisiopatología de litiasis biliar de colesterol se encuentran proteínas que transportan lípidos biliares (ABCB4, ABCB11, ABCG5/8), aceleran la cristalización del colesterol (mucinas), intervienen en la motilidad biliar (colecistocinina y su receptor tipo 1) y que transportan el colesterol en el intestino (ABCG5/8 y proteína NPC1L1); la modulación en la expresión de estas proteínas puede ser una pauta de investigación para el encuentro de una diana terapéutica, misma que puede favorecer al tratamiento y a la prevención.

disminuir la expresión de NPC1L1 intestinal.

Actualmente, el fármaco ezetimiba inhibe la absorción intestinal de colesterol, pero solo existe un estudio clínico asociado al tratamiento de cálculos biliares de colesterol, en donde la acción de una dosis del fármaco (20 mg/kg/día) reduce la secreción de colesterol biliar en los pacientes, disminuyendo el tamaño de los cálculos biliares (44); estos descubrimientos están relacionados con la investigación realizada en hámsteres sirios dorados, quienes fueron alimentados con una dieta rica en grasas y con ezetimiba a dosis de 2 mg/kg/día; los roedores redujeron la secreción de colesterol biliar a consecuencia del efecto farmacológico, es decir, la disminución en la expresión de NPC1L1 intestinal (45). Es importante mencionar que la proteína NPC1L1

también se expresa en los hepatocitos, donde juega un rol importante en el transporte del colesterol; sin embargo, los estudios asociados con litiasis biliar son escasos, debido a que esta proteína sólo se expresa en el hígado de los humanos y los modelos experimentales más empleados en el estudio de cálculos biliares, tales como ratones y hámsteres, no expresan la proteína hepática.

## DISCUSIÓN

Los resultados hasta ahora presentados, dan por hecho que la fisiopatología de cálculos biliares es un proceso complejo y poligénico, que involucra a la participación de diferentes moléculas de los sistemas hepático, biliar e intestinal. En la secreción de colesterol biliar están involucradas las proteínas ABCG5 y ABCG8, que a su vez están asociadas con la función de las proteínas que transportan fosfolípidos (ABCB4) y sales biliares (ABCB11). Modular la expresión de estas proteínas es una pauta importante de investigación para la prevención y el tratamiento de los cálculos biliares de colesterol. Disminuir la actividad del heterodímero ABCG5/8 implicará un descenso en la secreción de colesterol biliar; con este efecto se puede evitar el crecimiento de los cálculos biliares ya formados, así como el de la producción de nuevos litos. Cuando la vesícula biliar se encuentra con una baja concentración de colesterol biliar, se promueve una mayor motilidad, que puede ayudar a la desintegración parcial de los cálculos. Un efecto adicional que es trascendente, es el incremento en la actividad de la proteína ABCB11, que implicará un mayor flujo de sales biliares hacia la vesícula; las sales biliares son los solutos que pueden emulsificar los excesos de colesterol libre en la bilis y también al colesterol contenido dentro de los cálculos biliares. El transporte constante del colesterol emulsificado, a través de las micelas mixtas con sales biliares, puede representar una alternativa para que el cálculo biliar pierda tamaño y pueda desintegrarse fácilmente. Lamentablemente, la



## Dianas terapéuticas para cálculos biliares de colesterol

modulación genética de proteínas sólo puede trabajarse en modelos experimentales y no en la investigación clínica; no obstante, estos efectos constituyen una premisa para la búsqueda de efectos diferentes que puedan ocasionar en los seres humanos la disminución del colesterol biliar, o bien la alta secreción de sales biliares, mientras se continúa con el análisis de futuras moléculas que intervengan directamente sobre las proteínas citadas.

La composición química del cálculo biliar es un aspecto notable que se debe de atender. Para el caso de la enfermedad tratada, el colesterol es el componente químico más abundante. La investigación sobre moléculas que tengan la capacidad de retardar la cristalización del cálculo o lograr el transporte del lípido, incluye a las proteínas que se secretan en el epitelio biliar, como producto de una alteración en la secreción de lípidos biliares. Las mucinas producen el llamado lodo biliar; retardar la acción de estas proteínas lleva consigo evitar la formación de las matrices glucoproteicas en las que el colesterol cristalizado se va depositando para formar el cálculo; por lo tanto, la vesícula tendría colesterol cristalizado, pero no en forma de litiasis, sino en forma libre, y esto conlleva a que el lípido pueda transportarse a través de la bilis de una manera más eficaz y rápida. Hemos mencionado que se puede modular la actividad o expresión de algunas proteínas y eso puede lograrse de diferentes maneras, desde producir cepas de animales que no tengan los genes correspondientes para codificar a las proteínas o bien que los tengan en abundancia, hasta intervenir en algún proceso de su síntesis (inhibir la formación de ARN mensajero o promover su síntesis) para tener los resultados adecuados en las proteínas. En el tema sobre modular la actividad de los receptores nucleares de cada proteína, existe una complejidad funcional, debido a que al ser factores de transcripción, tienen a su cargo la regulación de varias proteínas, no sólo de las implicadas en la fisiopatología de litiasis biliar. Si

hablamos sobre un tratamiento de litiasis, nosotros proponemos que los mecanismos de acción deben de estar más asociados a nivel de la vesícula biliar, para llevar a cabo una desintegración del cálculo, desde controlar el flujo de colesterol biliar como ya lo hemos mencionado, hasta regular la motilidad de la vesícula, con el efecto de la colecistocinina, quien ha demostrado con su acelerada actividad, disminuir la velocidad de cristalización del colesterol. En el tema de la absorción intestinal de colesterol aún existe la necesidad de muchos estudios clínicos y experimentales para proponer una diana farmacológica que sea útil en el tratamiento y en la prevención de litiasis biliar. La inhibición en el transporte intestinal de colesterol, es un factor importante para evitar que grandes cantidades del lípido lleguen al hígado; con ello se podría disminuir la secreción de colesterol biliar; sin embargo, se ha demostrado que existen más efectos significativos para disminuir la hipercolesterolemia plasmática.

### CONCLUSIÓN

En las etapas de la fisiopatología de cálculos biliares de colesterol, existen hallazgos que señalan hacia nuevas dianas terapéuticas que traten o prevengan la enfermedad. Sin embargo, las investigaciones son heterogéneas y aún no se consolidan en una línea de investigación que facilite dicho encuentro. Hasta el momento, el transporte del colesterol es el tema más discutido, pero se está omitiendo el importante proceso para desintegrar o disolver los cálculos biliares a nivel de la vesícula.

### REFERENCIAS

1. **Stinton LM & Shaffer EA.** Epidemiology of gallbladder disease: cholelithiasis and cancer. *Gut Liver.* 2012 Apr; 6(2): 172-87.
2. **Van Erpecum KJ.** Pathogenesis of cholesterol and pigment gallstones: an update. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2011 Apr; 35(4): 281-7.
3. **Chuang SC, Hsi E, Lee KT.** Genetics of gallstone disease. *Adv Clin Chem.* 2013 Jun; 60(5): 143-85.
4. **Castro-Torres IG, De la O-Arciniega M, Bravo-**

- Duarte GA, Gallegos-Estudillo J, Domínguez-Ortíz MA, Martínez-Vázquez M.** Intestinal and hepatic Niemann-Pick C1L1 proteins: future therapeutic targets for cholesterol gallstones disease? *Eur J Pharmacol.* 2014 Apr; 728 (1): 77-81.
5. **Castro-Torres IG.** Cholesterol gallstones formation: new scientific advances. *Rev GEN.* 2012 Jan-Mar; 66(1): 57-62.
  6. **Portincasa P & Wang DQ.** Intestinal absorption, hepatic synthesis, and biliary secretion of cholesterol: where are we for cholesterol gallstone formation? *Hepatology.* 2012 May; 55(5): 1313-16.
  7. **Dijkers A & Tietge UJ.** Biliary cholesterol secretion: more than a simple ABC. *World J Gastroenterol.* 2010 Dec; 16(47): 5936-45.
  8. **Maurer KJ, Carey MC, Fox JG.** Roles of infection, inflammation, and the immune system in cholesterol gallstone formation. *Gastroenterology.* 2009 Feb; 136(2): 425-40.
  9. **Smelt AH.** Triglycerides and gallstone formation. *Clin Chim.* 2010 Nov; 411(21-22): 1625-31.
  10. **Xu GQ, Xu CF, Chen HT, Liu S, Teng XD, Xu GY, et al.** Association of caveolin-3 and cholecystokinin A receptor with cholesterol gallstone disease in mice. *World. J. Gastroenterol.* 2014 Jul; 20(28): 9513-8.
  11. **Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G.** Cholesterol gallstone disease. *Lancet.* 2006 Jul; 368(9531): 230-9.
  12. **Stokes CS & Lammert F.** Transporters in cholelithiasis. *Biol Chem.* 2012 Jan; 393(1-2): 3-10.
  13. **Hernández-Nazará A, Curiel-López F, Martínez-López E, Hernández-Nazará Z, Panduro A.** Genetic predisposition of cholesterol gallstone disease. *Ann Hepatol.* 2006 Jul-Sep; 5(3): 140-9.
  14. **Castro-Torres IG, Martínez-Vázquez M.** Transportadores de lípidos biliares: una revisión actualizada. *GEN.* 2013 Ene-Mar; 67(1): 49-57.
  15. **Hoda F & Green RM.** Hepatic canalicular membrane transport of bile salt in C57L/J and AKR/J mice: implications for cholesterol gallstone formation. *J Membr Biol.* 2003 Nov; 196(1): 9-14.
  16. **Kong FM, Sui CY, Li YJ, Guo KJ, Guo RX.** Hepatobiliary membrane transporters involving in the formation of cholesterol calculus. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2006 May; 5(2): 286-9.
  17. **Kong J, Liu BB, Wu SD, Wang Y, Jiang QQ, Guo EL.** Enhancement of interaction of BSEP and HAX-1 on the canalicular membrane of hepatocytes in a mouse model of cholesterol cholelithiasis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Mar; 7(4): 1644-50.
  18. **Lammert F, Wang DQ, Hillebrandt S, Geier A, Fickert P, Trauner M, et al.** Spontaneous cholecysto- and hepatolithiasis in *Mdr2*<sup>-/-</sup> mice: a model for low phospholipid-associated cholelithiasis. *Hepatology.* 2004 Jan; 39(1): 117-28.
  19. **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 Jun; 44(6): 521-6.
  20. **Nakken KE, Labori KJ, Rødningen OK, Nakken S, Berge KE, Eiklid K, et al.** ABCB4 sequence variations in young adults with cholesterol gallstone disease. *Liver Int.* 2009 May; 29(5): 743-7.
  21. **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 May; 140(5): 1664-74.
  22. **Pandey S.** Genetic basis of gall stone disease. *Hepatology.* 2013 Oct; 58(4): 1519.
  23. **Wittenburg H, Lyons MA, Li R, Kurtz U, Mössner J, Churchill, G.A., et al.** Association of a lithogenic *Abcg5/Abcg8* allele on chromosome 17 (*Lith9*) with cholesterol gallstone formation in PERA/EiJ mice. *Mamm Genome.* 2005 Jul; 16(7): 495-504.
  24. **Acalovschi M, Ciocan A, Mostean O, Tirziu S, Chiorean E, Keppeler H, et al.** Are plasma lipid levels related to ABCG5/ABCG8 polymorphisms? A preliminary study in siblings with gallstones. *Eur J Intern Med.* 2006 Nov; 17(7): 490-4.
  25. **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.* 2013 Jun; 57(6): 2407-17.
  26. **Liu CL, Chang SJ, Chiang HJ.** Quantitative analysis of cholesterol nucleation with time in supersaturated model bile. *Chem Phys Lipids.* 2011 Feb; 164(2): 125-30.
  27. **Grebe A, Latz E.** Cholesterol crystals and inflammation. *Curr Rheumatol Rep.* 2013 Mar; 15(3): 313.
  28. **Chuang SC, His E, Lee KT.** Mucin genes in gallstone disease. *Clin Chim Acta.* 2012. Oct; 413(19-20): 1466-71.
  29. **Yang L, Chen JH, Cai D, Wang LY, Zha XL.** Osteopontin and integrin are involved in cholesterol gallstone formation. *Med Sci Monit.* 2012 Jan; 18(1): BR16-23.
  30. **Andrianifahanana M, Moniaux N, Batra SK.** Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006 Apr; 1765(2): 189-222.
  31. **Chuang SC, His E, Wang SN, Yu ML, Lee KT, Joo SH.** Polymorphism at the mucin-like protocadherin

## Dianas terapéuticas para cálculos biliares de colesterol

- gene influences susceptibility to gallstone disease. *Clin. Chim. Acta.* 2011 Nov; 412(23-24): 2089-93.
32. **Koppiseti S, Jenigiri B, Terron MP, Tengatiini S, Tamura H, Flores LJ, et al.** Reactive oxygen species and the hypomotility of the gall bladder as targets for the treatment of gallstones with melatonin: a review. *Dig Dis Sci.* 2008 Oct; 53(10): 2592-603.
  33. **Micucci M, Ioan P, Aldini R, Cevenini, M, Alvisi V, Ruffilli C, et al.** Castanea sativa Mill. extract contracts gallbladder and relaxes sphincter of Oddi in guinea pig: a natural approach to biliary tract motility disorders. *J Med Food.* 2014 Jul; 17(7): 795-803.
  34. **Wang HH, Portincasa P, Liu M, Tso P, Samuelson LC, Wang DQ.** Effect of gallbladder hypomotility on cholesterol crystallization and growth in CCK-deficient mice. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Feb; 1801(2): 138-46.
  35. **Nihei N, Sekime A, Miyasaka K, Kanai S, Takiguchi S, Funakoshi A.** Administration of ursodeoxycholate failed to prevent sludge and/or gallstone formation in cholecystokinin-1(A) receptor-deficient mice. *Biomed Res.* 2011 Dec; 32(6): 401-6.
  36. **Di Ciaula A, Wang DQ, Garruti G, Wang HH, Grattagliano I, de Bari O, et al.** Therapeutic reflections in cholesterol homeostasis and gallstone disease: a review. *Curr Med Chem.* 2014 Apr; 21(12): 1435-47.
  37. **Mohammadi A, Bazrafshani MR, Oshaghi EA.** Effect of garlic extract on some serum biochemical parameters and expression of npc111, abca1, abcg5 and abcg8 genes in the intestine of hypercholesterolemic mice. *Indian J Biochem Biophys.* 2013 Dec; 50(6): 500-4.
  38. **Castro-Torres IG & Bravo-Duarte GA.** Proteínas de Niemann-Pick como objetivos terapéuticos moleculares para el tratamiento de cálculos biliares de colesterol. *Revista Biomédica* 2013 May-Ago; 24(2): 65-71.
  39. **Stein A, Hermoni D, Elis A, Konikoff FM.** Effect of ezetimibe on the prevalence of cholelithiasis. *World J Gastroenterol* 2012 Oct; 18(40): 5789-92.
  40. **Navarro-Santamaría V, Zabala-Letona A, Gómez-Zorita S, Portillo-Baquedano, MP.** Metabolismo del colesterol: bases actualizadas. *Rev Esp Obes.* 2009 Nov-Dic; 7(6): 360-384.
  41. **Davis HR, Jr Altmann, SW. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter.** *Biochim. Biophys. Acta.* 2009 Jul; 1791(7): 679-83.
  42. **Park SW.** Intestinal and hepatic niemann-pick c1-like 1. *Diabetes Metab J.* 2013 Aug; 37(4): 240-8.
  43. **Morales MG, Amigo L, Balboa E, Acuña M, Castro J, Molina H, et al.** Deficiency of Niemann-Pick C1 protein expression protects against diet-induced gallstone formation in mice. *Liver Int.* 2010 Jul; 30(6): 887-97.
  44. **Jiang ZY, Jiang CY, Wang L, Wang JC, Zhang SD, Einarsson C, et al.** Increased NPC1L1 and ACAT2 expression in the jejunal mucosa from Chinese gallstone patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 Jan; 379(1): 49-54.
  45. **Méndez-Sánchez N, Zamora-Valdés D, Flores-Rangel JA, Pérez-Sosa JA, Vásquez-Fernández F, Lezama-Mora JJ, et al.** Gallstones are associated with carotid atherosclerosis. *Liver Int.* 2008 Mar; 28(3): 402-6.
  46. **Valasek MA, Repa JJ, Quan G, Dietschy JM, Turley SD.** Inhibiting intestinal NPC1L1 activity prevents diet-induced increase in biliary cholesterol in Golden Syrian hamsters. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008 Oct; 295(4): G813-22.