

Ácido ursodesoxicólico en colangiopatías: Cuándo, cómo y por qué

Ursodeoxycholic acid in cholangiopathies: when, how and why

Marcelo G. Roma*

Recibido: 19/05/2014 Aceptado: 15/07/2014

RESUMEN

Palabras clave: ácido ursodesoxicólico, colangiopatías, apoptosis, transportadores hepatocelulares, inmunomodulación.

El ácido ursodesoxicólico (AUDC) es el agente terapéutico más ampliamente utilizado para el tratamiento de colangiopatías crónicas de diferente etiología, tales como cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, fibrosis quística, colestasis familiar intrahepática progresiva tipo 3 (PFIC-3) y la enfermedad veno-oclusiva hepática secundaria al trasplante hematopoyético, entre otras. Tal versatilidad obedece a sus múltiples mecanismos de acción. El AUDC evita la activación de vías de muerte hepatocelular y colangiocelular por apoptosis previniendo el reclutamiento de receptores de muerte celular (Fas, TRAIL-2) a membrana plasmática (vía extrínseca de apoptosis) y la formación de poros que afectan la permeabilidad mitocondrial (vía intrínseca de apoptosis). Tiene además efectos inmunomoduladores, contrarrestando tanto la respuesta inmunológica exacerbada (efecto inmunosupresor) como la sobre-expresión de antígenos de histocompatibilidad mayor de tipo I (en hepatocitos) y de tipo II (en colangiocitos) involucrados en la activación de linfocitos T citotóxicos responsables del ataque inmunológico en colangiopatías autoinmunes e inflamatorias. El AUDC induce además cambios en la expresión de transportadores y enzimas metabolizadoras hepatocelulares que mejoran la detoxificación de ácidos biliares re-direccionándolos del hepatocito a sangre, para posibilitar su excreción renal. Finalmente, su efecto hipercolerético e hipersecretor de fosfolípidos biliares reduce, por dilución y miscelización, la toxicidad a nivel ductular de la bilis altamente concentrada en ácidos biliares existente en colangiopatías. Sobre la base de esta multifuncionalidad, resulta difícil imaginar sustitutos al AUDC que sumen tantos efectos hepatoprotectores con tal alta eficacia.

ABSTRACT

Key words: ursodeoxycholic acid, cholangiopathies, apoptosis, hepatocellular transporters, immunomodulation.

Ursodeoxycholic acid (UDCA) is the therapeutic agent most widely used for the treatment of chronic cholangiopathies of different etiology, such as primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, cystic fibrosis, progressive familial intrahepatic cholestasis type 3, and veno-occlusive hepatic disease secondary to bone marrow transplantation, among others. Such a versatility is due to its multiple mechanisms of action. UDCA prevents hepatocyte and cholangiocyte apoptosis by blocking the recruitment of cell death receptors (Fas, TRAIL-2) to the plasma membrane (extrinsic pathway of apoptosis), and the changes in mitochondrial permeability induced by pore formation (intrinsic pathway of apoptosis). It has also immunomodulatory effects, both by counteracting the exacerbated immune response (immunosuppressive effect) and by inhibiting the over-expression of the major histocompatibility antigens type I (in hepatocytes) and type II (cholangiocytes), involved in the activation of cytotoxic T lymphocytes responsible for the immunological attack in autoimmune and inflammatory cholangiopathies. UDCA also induces changes in the expression of hepatocellular metabolizing enzymes and transporters that enhance bile acid detoxification by re-directing them to blood, thus enabling their renal excretion. Finally, its hypercholeric properties and stimulatory effect on phospholipid excretion attenuates, by dilution and micellization, the ductular toxicity of the bile highly concentrated in deleterious bile acids occurring in cholangiopathies. On the basis of this multifunctionality, it is difficult to imagine alternatives to UDCA that achieve such a variety of hepatoprotective effects with such a high efficacy.

*Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET). Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.

DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA

Dr. Marcelo G. Roma. Suijacha 570. S2002LRL Rosario. Santa Fe. Teléfonos: +54-341-4305799. Fax: +54-341-4399473.

E-mail: mroma@fbioyf.unr.edu.ar

1. Introducción

El ácido ursodesoxicólico (AUDC) es, en la actualidad, el agente terapéutico más ampliamente utilizado y eficaz para el tratamiento de enfermedades colestásicas en general, y en colangiopatías adquiridas o hereditarias en particular. El sostenido avance en el entendimiento de sus propiedades beneficiosas, posibilitado en parte por el conocimiento con que hoy contamos sobre la fisiopatología de las enfermedades en las que se lo utiliza, nos da la posibilidad de comprender la relación existente entre su uso terapéutico y sus mecanismos de acción. Esta relación era virtualmente desconocida hasta no hace mucho tiempo atrás, cuando su uso era mayoritariamente empírico.

El AUDC ha sido usado ancestralmente por la medicina tradicional china, la cual prescribía bilis de oso, rica en AUDC, para la cura de afecciones hepáticas (de allí su denominación "urso", o sea "oso" en latín). Su empleo terapéutico en colangiopatías fue "redescubierto" mucho tiempo después por la medicina occidental moderna, cuando en 1989 se publicó el primer estudio controlado en pacientes con cirrosis biliar primaria (CBP) (1).

2. "¿Cuándo y cómo?": aplicaciones y uso terapéutico del AUDC en colangiopatías

El AUDC es la droga de elección primaria para el tratamiento de la CBP, y similares efectos beneficiosos han sido reportados en virtualmente todas las colangiopatías. Realizaremos a continuación una revisión crítica de su uso y efectividad en las principales colangiopatías donde su uso está indicado.

2.1. Cirrosis biliar primaria (CBP)

Esta patología es iniciada por una respuesta inmunológica mediada por linfocitos T y B contra el autoantígeno mitocondrial *componente E2 del complejo piruvato deshidrogenasa* (PDC-E2) (2). Cursa con destrucción progresiva de los conductos biliares interlobulares y septales tanto pequeños como medianos, ocasionando fibrosis y, finalmente, cirrosis (2). Varios estudios controlados a doble ciego [revisados en ref. (3)] han mostrado efectos beneficiosos del AUDC en marcadores de daño hepático, incluyendo los niveles séricos de bilirrubina, un marcador pronóstico de la enfermedad. Corpechot et al. (4) demostraron una reducción de 5 veces la tasa de progresión de fibrosis hepática, de modo que, luego de 4 años de tratamiento, la probabilidad de permanecer en estadios tempranos de la enfermedad fue del 76 %, comparado con solo 29 % en el grupo placebo. Otro estudio reportó que, luego de 2 años de tratamiento, el AUDC produjo una reducción de las lesiones periportales necroinflamatorias y de la proliferación ductular, así como un retardo en la progresión histológica de la enfermedad cuando se admi-

nistró en estadios iniciales de la enfermedad (I y II); sin embargo, el AUDC no revirtió la fibrosis cuando se administró en estadios avanzados (5).

A pesar de estos efectos beneficiosos, es debatible si el tratamiento con AUDC impacta en el tiempo de supervivencia sin trasplante hepático. Un meta-análisis reciente combinando 16 estudios aleatorizados (1.447 pacientes) no encontró ninguna diferencia en ese parámetro (6). Sin embargo, este meta-análisis incluyó estudios con tiempos de seguimiento demasiado cortos (algunos de solo 2 años) para una patología cuya historia natural se expande en décadas, y con dosis variables de AUDC, algunas de ellas subóptimas (<13-15 mg/kg/día). Otro meta-análisis que incluyó solamente estudios de más de 4 años de tratamiento a dosis eficaces reportó una reducción del 32 % en el riesgo de muerte o indicación de trasplante (7). Un factor crucial es el momento al que se inicia el tratamiento. Si se inicia en las primeras etapas (I-II) de la enfermedad, aproximadamente un 60 % de los pacientes con CBP alcanzan una supervivencia comparable a la de la población general (4,8).

Basados en estos estudios clínicos, la recomendación general actual es tratar con AUDC a los pacientes con CBP tan pronto como sea posible, a una dosis no menor de 13-15 mg/Kg/día. En caso de pacientes poco o no respondedores al AUDC, se sugiere la suplementación con otros agentes terapéuticos con mecanismos de acción complementarios, tales como fibratos (9), rifampicina (10) o ácido obeticólico (AKA: ácido 6-etilquenodesoxicólico, INT-747) (11). El uso coadyuvante de inmunosupresores, incluyendo prednisolona (12), metotrexate (13) o busonemide (14), está particularmente indicado en pacientes con síndrome de solapamiento con otras enfermedades autoinmunes (15).

2.2. Colangitis esclerosante primaria (CEP)

Aunque también de naturaleza autoinmune, la CEP es de etiología desconocida. Se caracteriza por inflamación difusa, fibrosis obliterativa concéntrica y progresiva constrictura y dilatación de los conductos biliares tanto intra como extrahepáticos, conduciendo a largo plazo a cirrosis (16). Existe la tradición de tratar esta patología con AUDC, pero su beneficio clínico es controversial. Dado que en los primeros ensayos clínicos se obtuvieron resultados cada vez más positivos a dosis mayores de la inicial subóptima (10-15 mg/Kg/día), se realizó recientemente un ensayo multicéntrico a una dosis alta de 28-30 mg/Kg/día. El estudio debió suspenderse, ya que, si bien el AUDC mejoró las pruebas hepáticas séricas, no mejoró la supervivencia, y se asoció con 2,3 veces más probabilidad de alcanzar los criterios de corte predefinidos para el estudio (muerte, trasplante hepático, desarrollo de várices) (17).

Los pacientes con CEP y colitis ulcerosa tienen un alto riesgo de displasia de colon y cáncer. El AUDC, debi-

do a sus propiedades antiproliferativas (ver ítem 3.6.), podría contribuir a prevenir su aparición. Sin embargo, esta presunción es también controversial. Dos ensayos a pequeña escala con una dosis de AUCD de 13-15 mg/Kg/día mostraron una menor frecuencia de displasia colorrectal (18), pero la frecuencia de esa patología y de carcinoma de colon fue incluso mayor cuando el AUCD se administró a dosis más altas (28-30 mg/Kg/día) (19,20). Un estudio reciente de seguimiento a largo plazo de pacientes tratados con una dosis algo menor (17-23 mg/Kg/día) no reveló reducción del riesgo de carcinoma de colon (21), y los datos disponibles sobre la prevención por AUCD del carcinoma colangiocelular, otra patología frecuentemente asociada a la CEP, son igualmente inconsistentes (22).

Sobre la base de estas evidencias conflictivas, la *American Association for the Study of Liver Diseases* (AASLD) se opone al uso del AUCD en la CEP, mientras que la *European Association for the Study of the Liver* (EASL), en su *Clinical Practice Guidelines*, recomienda administrar AUCD a una dosis de 15-20 mg/Kg/día solo si el paciente tiene una neoplasia colorrectal diagnosticada previamente, una enfermedad inflamatoria intestinal crónica de larga data o una historia familiar positiva de carcinoma colorrectal (23). Simultáneamente, las principales constricturas del árbol biliar deben ser dilatadas regularmente por endoscopistas experimentados, dado el riesgo de administrar este agente colerético a pacientes obstruidos.

2.3. Fibrosis quística (FQ)

Es un trastorno autosómico recesivo causado por mutaciones del canal de cloruro (Cl⁻) *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR). Debido al papel crucial de este canal en la formación de bilis ductular, esta alteración resulta en la secreción de una bilis viscosa, formación de tapones mucosos obstructivos en los conductos biliares pequeños y, en última instancia, cirrosis biliar (24). Un 25-30 % de los pacientes desarrolla enfermedad hepática manifiesta, caracterizada por cirrosis biliar focal clínicamente asintomática en la mayoría de los casos (25). La hepatopatía es además una de las razones de la sobrevida limitada de estos pacientes (26) y la segunda causa más frecuente de mortalidad (27).

Estudios preliminares no controlados mostraron que el AUCD mejora significativamente el laboratorio y el estado nutricional de pacientes con enfermedad hepática manifiesta (28,29) e, incluso, se ha sugerido su uso preventivo (30). Un ensayo aleatorio controlado con placebo en un grupo pequeño de pacientes con FQ tratados durante 1 año mostró mejoría clínica, bioquímica y nutricional (31); un estudio posterior extendió estas conclusiones a 2 años (32). Por lo tanto, el tratamiento con AUCD, a una dosis de 20 mg/Kg/día (33,34), puede ser considerado eficaz en pacientes con FQ que desarrollan enfermedad hepática. Sin embargo, resulta aún incierta la capacidad del fármaco para afectar la historia na-

tural de la enfermedad hepática, aunque estudios recientes de 10 años (33) y 16 años (25) de seguimiento parecerían así indicarlo, dada la significativa menor recurrencia de enfermedad hepática y la normalización sostenida de las enzimas hepáticas séricas en el grupo bajo tratamiento.

2.4. Colestasis familiar intrahepática progresiva tipo 3 (PFIC-3)

Es ocasionada por una mutación homocigota del translocador canalicular de fosfolípidos *multidrug resistance protein 3* (MDR3), que conduce a una disminución marcada del contenido de fosfolípidos en bilis (1-15 % de los lípidos totales, vs. 19-24 % en sujetos normales) (35). Estos pacientes presentan, en la infancia o adolescencia, fibrosis (progresando a cirrosis) y marcada proliferación ductular, caracterizada por elevaciones séricas de GGT derivadas de los colangiocitos afectados (36). La patología se explica por la ausencia del efecto protector de los fosfolípidos sobre los efectos deletéreos de los ácidos biliares monoméricos en el lumen biliar, debido a sus propiedades detergentes (37-39).

Más de la mitad de los pacientes con PFIC-3 responden al AUCD con mejoras en el hepatograma y el prurito, de acuerdo a un estudio a una dosis diaria de 600 mg/m² de área corporal (40). Aquellos pacientes con mutaciones de MDR3 que permiten que el transportador conserve cierta función residual presentan una mejor respuesta al AUCD que aquellos con mutaciones que bloquean completamente la función de transporte, volviéndose la terapia de elección para los primeros (40).

Los fosfolípidos miscelizan y estabilizan al colesterol en bilis, por lo que los pacientes con PFIC-3 tienen alta tendencia a la formación de barro biliar y colestiasis (41). Las reconocidas propiedades del AUCD para solubilizar el colesterol en bilis tienen, por lo tanto, un efecto beneficioso adicional en estos pacientes (41). En sujetos con mutaciones heterocigotas de MDR3, y por ende más benignas en términos funcionales, la recurrencia de colestiasis es usualmente la única manifestación de colestiasis (*síndrome de colestiasis asociada a bajo fosfolípidos*). A una dosis de 7-10 mg/Kg/día, el AUCD previene la aparición recurrente de signos y síntomas en estos pacientes (cólicos biliares, ictericia, elevaciones de enzimas de colestiasis) (41).

2.5. Enfermedad veno-oclusiva hepática secundaria al trasplante hematopoyético

La enfermedad veno-oclusiva hepática es una causa frecuente de morbo-mortalidad secundaria al trasplante de médula ósea. Se asocia generalmente a hipertensión portal y colestiasis atribuible a daño de los pequeños conductos biliares. Varios estudios clínicos, aunque reducidos en número de pacientes, sugirieron que el AUCD, a una dosis de 10-15 mg/Kg/día, sería eficaz en su tratamiento (42,43). El

AUDC también fue estudiado como agente profiláctico de esta enfermedad. Un meta-análisis de estos estudios confirmó una menor incidencia de la patología hepática en los pacientes tratados con AUDC (44). Más aún, un estudio de 1 año de seguimiento post-transplante indicó que el tratamiento profiláctico con AUDC a una dosis de 12 mg/Kg/día mejoró la supervivencia y redujo la mortalidad sin recidiva, sin causar efectos adversos (45). Aunque estudios más amplios son sin duda necesarios, el AUDC debería ser considerado como una opción para la profilaxis y el tratamiento de esta patología.

3. "¿Por qué?": Mecanismos de acción del AUDC en colangiopatías

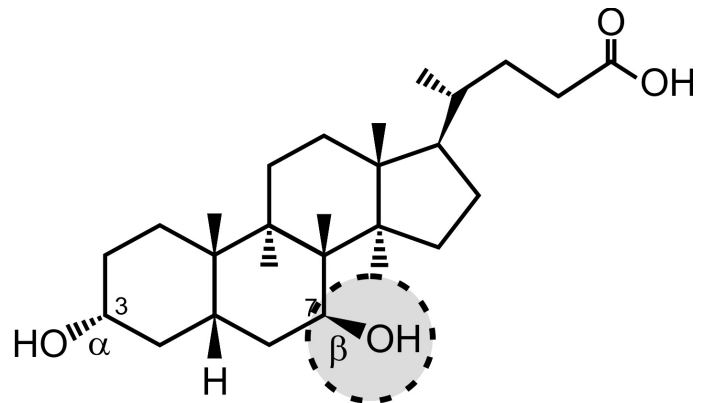
3.1. Estructura química y propiedades fisicoquímicas del AUDC.

Desde el punto de vista químico-estructural, el AUDC es el ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-5 β -colanoico, un ácido biliar hidrofílico con 2 grupos hidroxilos (-OH) ubicados en posición 3 y 7 de su núcleo esteroideo, orientados en posición α y β , respectivamente (Figura 1). La orientación β de su -OH en posición 7 le confiere a la molécula mucha mayor hidrofiliidad comparado con su análogo estructural, el ácido quenodesoxicólico (AQDC), que tiene el -OH 7 con orientación α . Es por eso que el AUDC tiene mucha menor capacidad que el AQDC para interactuar con membranas y producir daño por acción detergente. A su vez, conserva muchas de las propiedades regulatorias beneficiosas de los ácidos biliares endógenos, tales como efecto anti-inflamatorio, capacidad para activar vías regulatorias de señalización intracelular y capacidad para evocar una respuesta hepática adaptativa a la sobrecarga de ácidos biliares (46-48). A esto se suman otras propiedades beneficiosas propias de él, tales como sus efectos antioxidantes (49), antiapoptóticos (50) e inmunomoduladores (51), entre muchos otros.

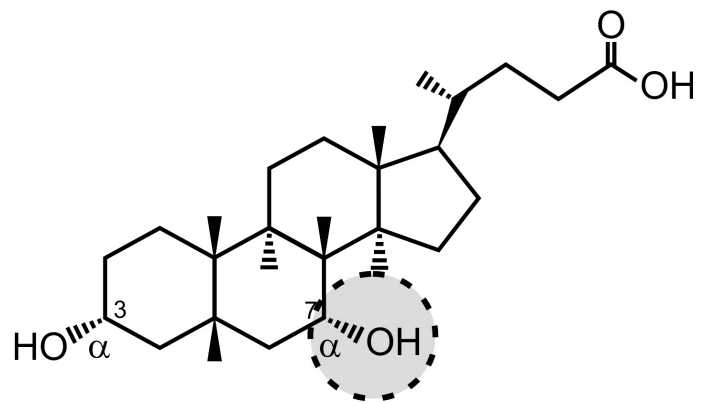
3.2. Propiedades antiapoptóticas del AUDC

El árbol biliar mantiene su homeostasis por muerte y renovación de colangiocitos; dicha muerte se produce principalmente a través de un proceso fisiológico de apoptosis (52). Este proceso se encuentra frecuentemente exacerbado en pacientes con CBP, y en mucha menor magnitud en colangitis esclerosante primaria (CEP). La muerte celular sería secundaria a la invasión de células inflamatorias (53).

La apoptosis involucra la activación de 2 vías de muerte interrelacionadas, a saber: 1) la *vía intrínseca o mitocondrial*, iniciada por la liberación de factores proapoptóticos mitocondriales vía formación de poros en sus membranas, y 2) la *vía extrínseca*, iniciada por la activación de receptores de muerte localizados en la superficie de la membrana plasmática celular que envían



Ácido ursodesoxicólico



Ácido quenodesoxicólico

Figura 1. Estructuras químicas del ácido ursodesoxicólico (ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-5 β -colanoico) y de su isómero estructural, el ácido quenodesoxicólico (ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-5 β -colanoico). El círculo punteado denota la diferente orientación del grupo hidroxilo (-OH) ubicado en posición 7 (β para el ácido ursodesoxicólico y α para el ácido quenodesoxicólico), la cual es la responsable de las diferencias marcadas en la hidrofobicidad y, por ende, la toxicidad de ambos ácidos biliares.

señales que afectan la integridad mitocondrial, acoplándose así con la vía intrínseca. El AUDC es un potente agente antiapoptótico capaz de inhibir ambas vías de apoptosis (Figura 2).

3.2.1. Vía intrínseca o mitocondrial.

Involucra la disrupción de la integridad mitocondrial por: 1) la formación de poros de transición de permeabilidad de membrana mitocondrial (PTPMs) y 2) la movilización desde citosol e inserción en la membrana externa mitocondrial de proteínas proapoptóticas formadoras de poros de la familia Bcl-2, tales como Bax o Bad (54). La generación de cualquiera de estas dos clases de poros mitocondriales produce liberación al citosol de *citocromo c*, el cual promueve la unión del *apoptosis protease-activating factor-1* (APAF-1) a pro-caspasa 9, su subsiguiente activación por autocatálisis y, finalmente, el reclutamiento y activación de las caspasas 3, 6 y 7, ejecutoras de la apoptosis (55).

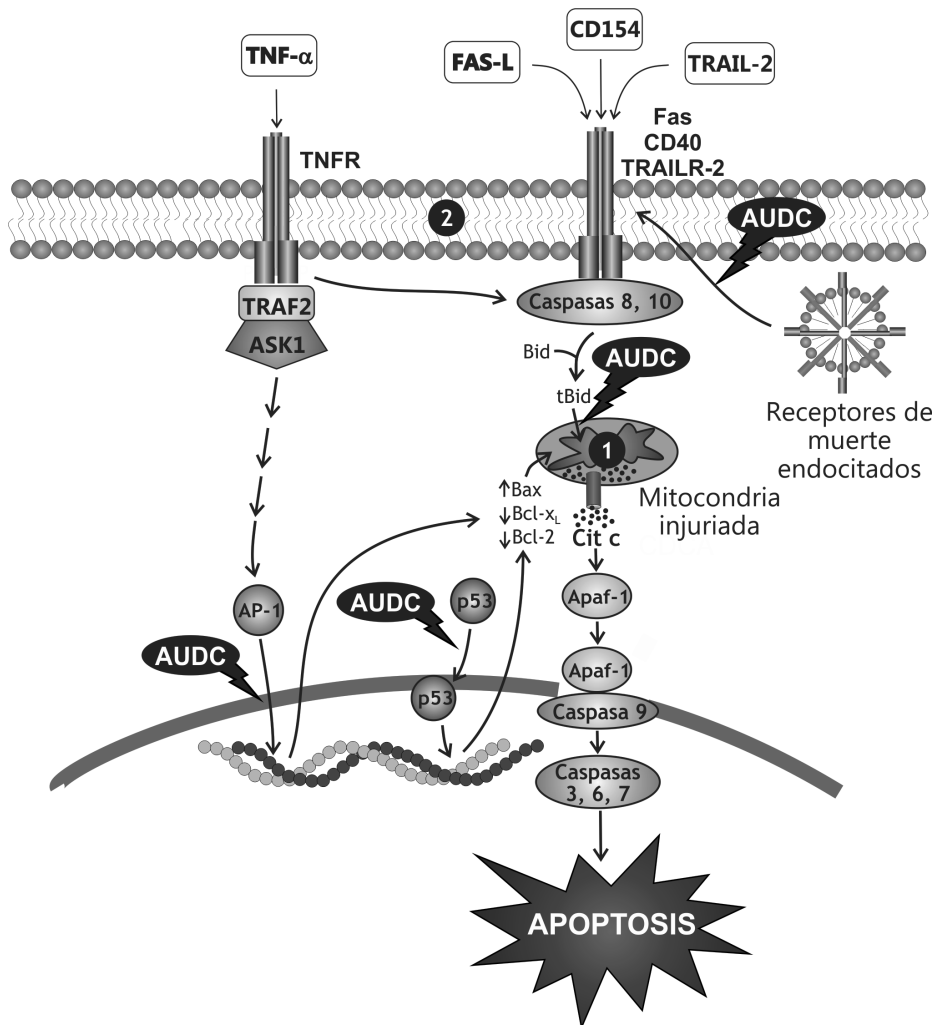


Figura 2. Mecanismos de producción de muerte celular por apoptosis, y su protección por el ácido ursodesoxicólico (AUDC). En colestasis, se activan dos vías de apoptosis, a saber: 1) la vía intrínseca o mitocondrial, dependiente del balance en la expresión/actividad de proteínas mitocondriales proapoptóticas formadoras de poros mitocondriales (por ej., Bax), y antiapoptóticas, con capacidad de secuestrar a las anteriores (por ej., Bcl-2, Bcl-XL), y 2) la vía extrínseca, mediada por receptores de muerte celular (TNFR, Fas, CD40, TRAILR-2), activados por citoquinas proapoptóticas respectivas (TNF- α , Fas-L, CD154 y TRAIL-2, respectivamente). El AUDC previene la activación de todas estas vías, actuando como un represor de procesos claves involucrados en su generación. Estas incluyen, por ejemplo, la injuria mitocondrial ocasionada por la inserción de bid truncado (tBid) a la membrana externa mitocondrial y la represión de la activación del factor de transcripción proapoptótico AP-1 ocasionada por TNF- α , así como la translocación de p53 al núcleo, otro factor de transcripción que, al igual que AP-1, induce proteínas de la familia Bcl2 proapoptóticas y reprime las antiapoptóticas. El AUDC también bloquea el reclutamiento a membrana de receptores de muerte celular que se encuentran endocitados a la espera de demanda. Para más detalles, ver sección 3.2.

El AUDC tiene efectos protectores sobre la mitocondria, en parte, previniendo la formación de PTPMs inducidos tanto por ácidos biliares (56,57) como por citoquinas proinflamatorias, tales como el *transforming growth factor* (TGF- β 1) (58), el *tumour necrosis factor- α* (TNF- α) (59) y el FAS-ligando (60). Al menos para TGF- β 1, estos efectos son debidos a la activación por AUDC del receptor de glucocorticoides (61). Más aún, la unión del AUDC a este receptor suprime la activación inducida por citoquinas del *nuclear factor- κ B* (NF- κ B), un factor de transcripción que media fenómenos pro-inflamatorios y pro-apoptóticos (48).

El AUDC también contrarresta la formación de poros mitocondriales mediada por proteínas de la familia Bcl-2 reduciendo la expresión constitutiva de aquellas que son proapoptóticas (Bad, Bax) y sobreexpresando las antiapoptóticas (Bcl-2 y Bcl-XL). Estos efectos son en parte debidos a su capacidad para inhibir el factor de transcripción pro-apoptótico p53 (62).

3.2.2. Vía extrínseca.

Esta vía de apoptosis se activa por procesos inflamatorios o infecciosos que llevan a la liberación, por células inmunocompetentes, de ligandos solubles promotores de muerte celular que se unen a sus respectivos receptores en la membrana plasmática de los hepatocitos y colangiocitos. Por ej., citoquinas tales como el *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), el *Fas ligando*, el *CD154* y el *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand 2* (TRAIL2) se unen, respectivamente, a sus receptores *tumor necrosis factor receptor 1* (TNFR1), *Fas*, *CD40* y *TRAILR-2*. Al producirse esta unión, los receptores oligomerizan y activan caspasas 8 y 10, las cuales producen proteólisis de *Bcl-2 interacting domain* (Bid); el *Bid truncado* (tBid) resultante es transportado a mitocondria, produciendo la apertura de poros mitocondriales (63). Por su parte, la activación de TNFR1 por TNF- α lleva al reclutamiento de *TNF receptor-associated factor 2* (TRAF2) y de *apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1), lo cual conduce a la activación por fosforilación del factor de transcripción pro-apoptótico AP-1 (64).

Alternativamente, la activación de estos receptores puede ocurrir de manera independiente de ligando, como ocurre en hepatocitos expuestos a ácidos biliares hidrofóbicos. Estos últimos estimulan el reclutamiento a membrana de receptores de muerte tales como Fas (65) y TRAILR-2 (66), así como su posterior activación.

Hay evidencias que estos receptores de muerte estarían involucrados en procesos apoptóticos colangiulares. Por ejemplo, la expresión de TRAILR-2 aumenta en el epitelio biliar en CBP y CEP, y su activación induce apoptosis y subsecuente colangitis en roedores (67). Además, la expresión

de CD40 aumenta en CBP (68), y su activación conduce a apoptosis en colangiocitos *in vitro*, de una manera dependiente de Fas (68).

El AUDC inhibe la vía extrínseca de la apoptosis impidiendo la acción de tBid sobre la mitocondria (60) y la sobre-expresión de AP-1 (69).

3.3. Propiedades inmunomoduladoras del AUDC

Muchas colangiopatías crónicas, como CBP y CEP, tienen un origen etiológico autoinmune. En estas colangiopatías, existe un marcado ataque a los hepatocitos y colangiocitos por linfocitos T citotóxicos (CD8⁺), estos últimos activados por citoquinas producidas por linfocitos T *helper* (CD4⁺), tales como interferón- γ (IFN- γ) e interleuquinas (IL) 1, 2, 4 y 6 (70,71). Esto obedece a: 1) la existencia de una respuesta inmunológica exacerbada debida a la pérdida de tolerancia a autoantígenos y 2) la expresi

ión aberrante de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), tanto de clase I (en hepatocitos) (72) como de clase II (en colangiocitos) (73).

El AUDC tiene efecto inmunomodulador tanto sobre la exacerbada respuesta inmune (efecto inmunosupresor) como sobre la sobre-expresión de MHCs (Figura 3). Estas propiedades pueden ser especialmente efectivas en las inmediaciones de los colangiocitos, donde el AUDC es selectivamente concentrado por recirculación cole-hepática.

3.3.1. Propiedades inmunosupresoras del AUDC

El AUDC inhibe la respuesta inmunológica humoral, suprimiendo la producción de IgM, IgG y IgA por linfocitos B (51). El AUDC también inhibe la liberación de ciertas citoquinas producidas por células mononucleares sanguíneas, tales como IL-2, IL-4 e IFN- γ (74). Estas citoquinas participan en la destrucción de hepatocitos y colangiocitos al inducir

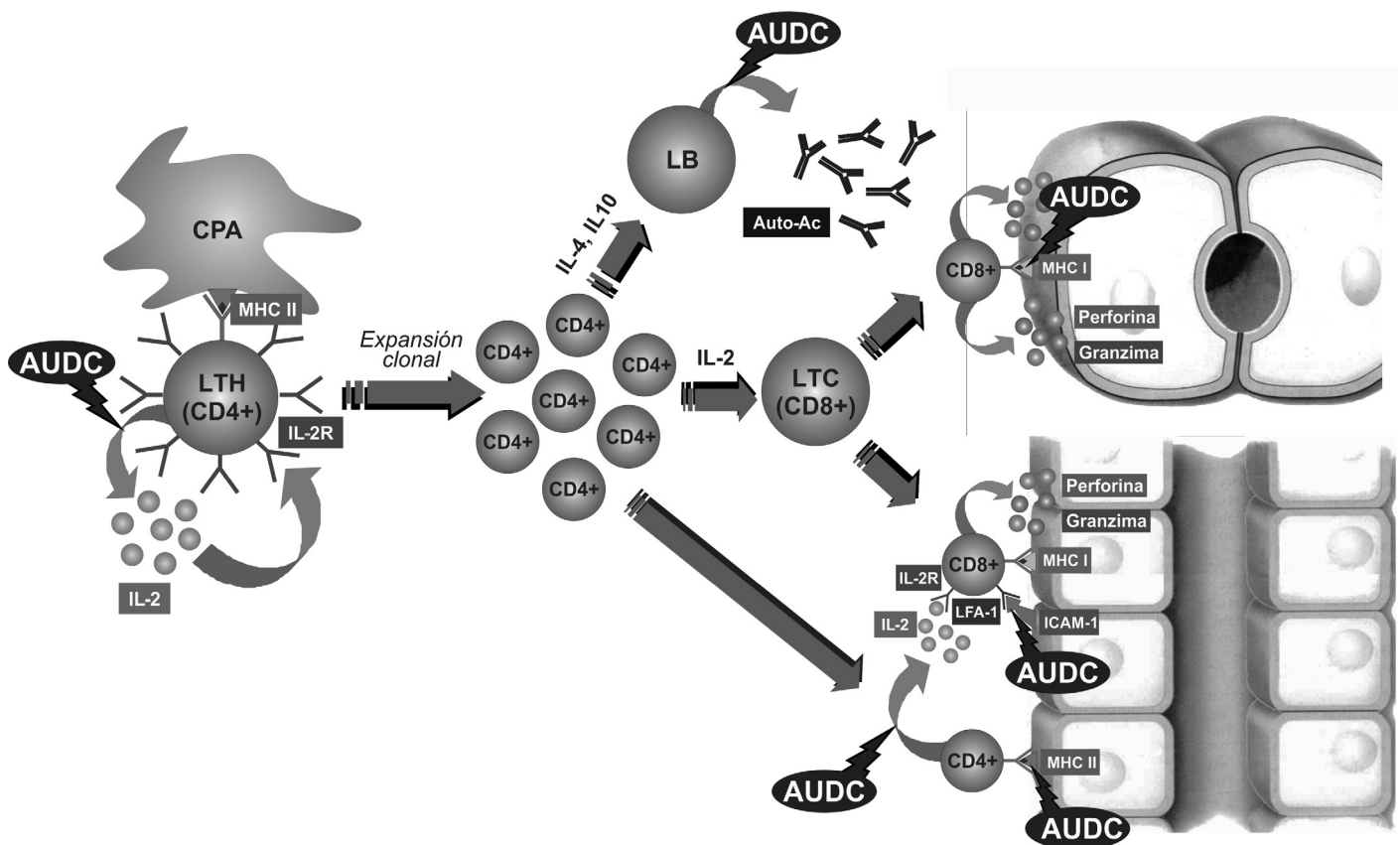


Figura 3. Inhibición inducida por el AUDC de la exacerbada respuesta inmunológica en colangiopatías autoinmunes. Las células presentadoras de auto-antígenos (CPA) gatillan la autoactivación de linfocitos T *helper* (LTH; CD4⁺) vía liberación de IL-2, seguida de la proliferación clonal de los LT *helper* activados. Éstos, a su vez, activan a los linfocitos B (LB) para la producción de auto-anticuerpos (respuesta humoral) y a los linfocitos T citotóxicos (LTC; CD8⁺) (respuesta celular). Estos últimos atacan a los colangiocitos y hepatocitos a través de la liberación de perforina y granzima, ocasionando la muerte celular por necro-apoptosis. La unión de LTC a hepatocitos es facilitada por la sobre-expresión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I). En el colangiocito, ocurre sobre-expresión de MHC II, lo cual activa localmente a los LTH (CD4⁺) y, a través de la ellos, a los LTC (CD8⁺), ocasionando la destrucción del colangio. El AUDC contrarresta la producción de auto-anticuerpos por los LB, e inhibe la producción de IL-2 por los LTH, impidiéndose la activación tanto de LB como de LTC. Además, reprime la sobre-expresión de MHC I y de MHC II en hepatocitos y colangiocitos, respectivamente, así como la de la molécula de adhesión ICAM-1 en colangiocitos. Para más detalles, ver la sección 3.3.

la proliferación y activación de linfocitos T citotóxicos y células *natural killer* (51,75) y, para el caso del $\text{IFN-}\gamma$, provocando la destrucción directa de colangiocitos (76).

Otras citoquinas proinflamatorias negativamente moduladas por el AUDC son $\text{TNF-}\alpha$ y el $\text{TGF-1}\beta$ (60). La capacidad de $\text{TNF-}\alpha$ para activar el factor nuclear proinflamatorio $\text{NF-}\kappa\text{B}$ es también atenuada por el AUDC, vía su unión al receptor de glucocorticoides (48). La capacidad del AUDC para unirse y activar el receptor de glucocorticoides convierte a esta droga en un agente antiinflamatorio pleiotrópico que podría reemplazar con cierta eficacia y alta inocuidad a los corticoides. Los efectos antiinflamatorios del AUDC podrían explicar su uso, con mayor o menor éxito, en hepatopatías inflamatorias no colestásicas, como la hepatitis viral C (77), la hepatitis inducida por drogas (78,79), y la esteatosis/esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica (80,81).

3.3.2. Reversión de la sobre-expresión de MHCs y de ICAM-1 por el AUDC

Los MHCs permiten el reconocimiento de los autoantígenos por linfocitos involucrados en la respuesta inmunológica celular y humoral. Cuando se expone junto con el epítopo antigénico, MHC-I activa linfocitos T citotóxicos (CD8^+) mientras que MHC-II activa linfocitos T *helper* (CD4^+). Por lo tanto, la sobre-expresión de estas proteínas conlleva a una exacerbada respuesta inmunológica contra las células que lo sobre-expresan. El AUDC inhibe la expresión aberrante de MHC I en hepatocitos (82) y de MHC II en colangiocitos (83) que ocurre en la CBP, un efecto mediado por los ácidos biliares endógenos. La activación del receptor de glucocorticoides por el AUDC jugaría un papel central en este efecto benéfico (84).

La destrucción inmunológica de los conductos interlobulares biliares en la CBP requiere la penetración de linfocitos y otras células inflamatorias al plexo vascular peribiliar y vénulas portales, seguida de su migración a los conductos biliares. En este proceso, es esencial la sobreexpresión de *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), una molécula adherente para las células inflamatorias a nivel vascular y colangiolar, así como de *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1) a nivel linfocitario. En la CPB, ICAM-1 se sobre-expresa en la membrana luminal de los colangiocitos, mientras que LFA-1 se detectó en los linfocitos alrededor y entre las células dañadas del epitelio biliar (85). La terapia con AUDC contrarresta esta expresión aberrante (86), y este efecto anti-inflamatorio es aditivo con corticoides (87).

3.4. Modulación de la capacidad detoxificadora de compuestos hepatotóxicos

El AUDC reduce los niveles hepatocelulares y biliares de los ácidos biliares tanto inhibiendo su captación hepatocelular como estimulando su reflujo a sangre sinusoidal, favoreciendo así la excreción renal como vía alternativa de depuración (Figura 4). En efecto, pacientes sanos que recibieron AUDC mostraron un aumento de los niveles de *bile salt export pump* (Bsep, Abcb11), el transportador cana-

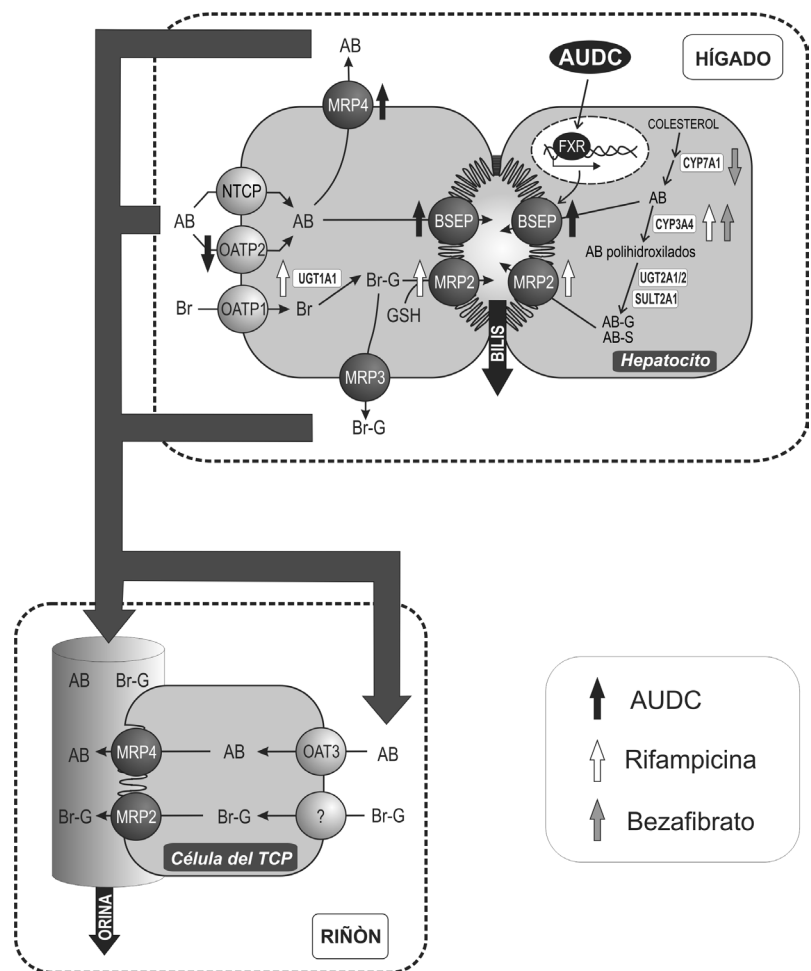


Figura 4. Efectos del AUDC y de otros agentes anticoléstáticos utilizados para el tratamiento de colangiopatías crónicas (rifampicina, bezofibrato) sobre la expresión de transportadores y de sistemas de metabolización hepáticos. El AUDC estimula la expresión de BSEP, el transportador canalicular de ácidos biliares (ABs), actuando como ligando del receptor nuclear *farsenoid X receptor* (FXR). Además, inhibe la captación de ABs por el transportador basolateral OATP2 y estimula su reflujo de citosol a sangre sinusoidal por la bomba exportadora basolateral MRP4, facilitando la vía alternativa de depuración renal, ya sea por filtración glomerular como por secreción tubular. La rifampicina y el bezofibrato actúan complementariamente estimulando la polihidroxilación de los ABs mediada por CYP3A4, lo cual reduce su toxicidad y facilita la formación de ABs sulfatados (AB-S) y glucuronizados (AB-G), y por ende, su excreción vía MRP2. La glucuronidación de bilirrubina mediada por UGT1A1 y la expresión de MRP2, el transportador de bilirrubina glucuronizada (Br-G), son, a su vez, estimuladas por rifampicina, mientras que el bezafibrato reprime la síntesis de ABs endógenos a partir de colesterol. Estos efectos complementarios explican las propiedades coadyuvantes de la rifampicina y el bezofibrato en pacientes con PBC poco o no respondedores al UDCA. Para más detalles, ver sección 3.4.

licular activo primario de ácidos biliares conjugados con taurina y glicina y de la bomba exportadora basolateral de ácidos biliares *multidrug resistance-associated protein 4* (MRP4; Abcc4) (88). Por su parte, el transportador responsable de la capacidad basolateral de ácidos biliares *organic anion-transporting polypeptide 2* (OATP2; Slco2) mostró una reducción de su expresión en pacientes con CBP que correlacionó positivamente con el enriquecimiento hepático en AUDC (89).

Es interesante señalar que otros fármacos que se están ensayando con éxito en la CBP para adicionar efectos a los del AUDC en pacientes poco o no respondedores, tales como rifampicina o fibratos, presentan efectos complementarios sobre la expresión de transportadores y enzimas de biotransformación a los que ejerce el AUDC (Figura 4). La rifampicina, administrada a sujetos normales durante 1 semana a una dosis de 600 mg/día, mejora la depuración de ácidos biliares, así como la conjugación y excreción de bilirrubina, aumentando la expresión constitutiva de 1) *Multidrug resistance-associated protein 2* (MRP2), el transportador canalicular de bilirrubina glucuronizada y de ácidos biliares sulfatados y glucuronizados, 2) CYP3A4, la isoforma 3A4 del citocromo P450 encargada de la polihidroxilación de ácidos biliares, lo cual reduce su toxicidad y facilita su sulfatación y glucuronidación, convirtiéndolos en sustratos de Mrp2, y 3) UGT1A1, la isoforma 1A1 de la *UDP-glucuronosil transferasa*, enzima encargada de la glucuronidación de la bilirrubina (88). Por su parte, el bezafibrato (400 mg/día) redujo la síntesis endógena de ácidos biliares y aumentó la actividad CYP3A4 en pacientes con CBP no respondedores al AUDC (90).

La regulación de la expresión génica ejercida por el AUDC parece involucrar, en parte, su papel como ligando de activación del receptor nuclear *pregnane-X receptor* (PXR) (91). El AUDC es además ligando, aunque relativamente débil, del *farnesoid-X receptor* (FXR) (92), otro regulador importante de transportadores y enzimas de detoxificación hepáticos, que podría estar mediando sus efectos inductores a nivel de BSEP (93). La administración de ligandos fuertes de FXR a pacientes con CBP no respondedores al AUDC, como el ácido obeticolico (11), se ha mostrado muy promisorio, ya que refuerza esta vía de regulación.

3.5. Reducción de la toxicidad de los ácidos biliares sobre el árbol biliar

La bilis contiene altas concentraciones de ácidos biliares tensioactivos con potencial capacidad de producir muerte hepatocelular y colangiocelular por apoptosis (37). Su toxicidad es sin embargo considerablemente reducida por la presencia en bilis de fosfolípidos, los cuales forman miscelas mixtas con colesterol y monómeros de ácidos biliares, reduciendo la toxicidad de estos últimos (38,39). Es por eso que las alteraciones secretoras de fosfolípidos,

que ocurren en la PFIC-3 debida a mutaciones del translocador canalicular de fosfolípidos *human multidrug re-sistance protein 3* (MDR3; Abcb4) (94,95), pueden resultar en daños ductulares severos (96). En otras colangiopatías, como por ejemplo la CBP, la FQ y el síndrome de los conductillos biliares evanescentes de origen tóxico, lo que se altera predominantemente es la producción de bilis ductular rica en anión bicarbonato (HCO_3^-), concentrándose aún más los ácidos biliares tóxicos (96). En el caso de la CBP, la colestasis de origen ductular ocurre, en parte, por disminución de la expresión del intercambiador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ductular *anion exchanger 2 AE2* (97), mientras que la FQ es un trastorno autosómico recesivo causado por mutaciones del canal generador de gradiente de Cl^- para dicho intercambiador, el *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) (24).

El AUDC presenta efectos protectores contra estas alteraciones. Un posible mecanismo está vinculado a la sustitución en bilis de los ácidos biliares endógenos de alta toxicidad por este ácido biliar inocuo (98). En efecto, dependiendo de la dosis, el AUDC representa el 19-64 % del total de ácidos biliares en la bilis de pacientes con CBP bajo tratamiento (99), mientras que es solo el 0,6 % en pacientes no tratados (100). A su vez, la capacidad peculiar del AUDC de estimular el flujo biliar en exceso de lo que se espera de sus propiedades osmóticas (hipercoleresis) contribuye a diluir los ácidos biliares endógenos remanentes. Para hacerlo, el AUDC estimula el flujo biliar ductular asociado a la excreción de HCO_3^- (101), debido en parte a su capacidad distintiva de sufrir recirculación colehepática (Figura 5). Este fenómeno se produce cuando el AUDC es reabsorbido pasivamente desde bilis por el colangiocito en su forma protonada (sin carga). La eliminación de un protón de la bilis genera una molécula de HCO_3^- en la luz ductular. El AUDC reabsorbido vuelve a los hepatocitos a través del plexo capilar periductular, y es varias veces resecretado al canalículo biliar, lo cual genera más flujo de bilis canalicular y enriquece aún más los conductos biliares en HCO_3^- . Actuando a través de este mecanismo, el AUDC redujo la inflamación portal, la proliferación de los conductos biliares y la fibrosis en ratones *knock-out* que carecen del translocador canalicular de fosfolípidos murino *multidrug resistance protein 2* (Mdr2; Abcb4), un modelo experimental de colangitis esclerosante (102). Sin embargo, este efecto beneficioso solo se observa en las primeras etapas de la colangiopatía, pero no cuando hay fibroobliteraciones regionales de los conductos biliares (91). El ácido 24-nor-ursodesoxicólico (24-nor-AUDC), un homólogo del AUDC que tiene un grupo metilo menos en su cadena lateral, es aún más eficaz que el AUDC para generar hipercoleresis y preservar la integridad de los conductos biliares en ratones *knock-out* de Mdr2 (103). Dicha hipercoleresis se debe a una mayor recirculación colehepática debida a su baja capacidad para conjugarse con amidas y a un potenciado efecto osmótico debido a su

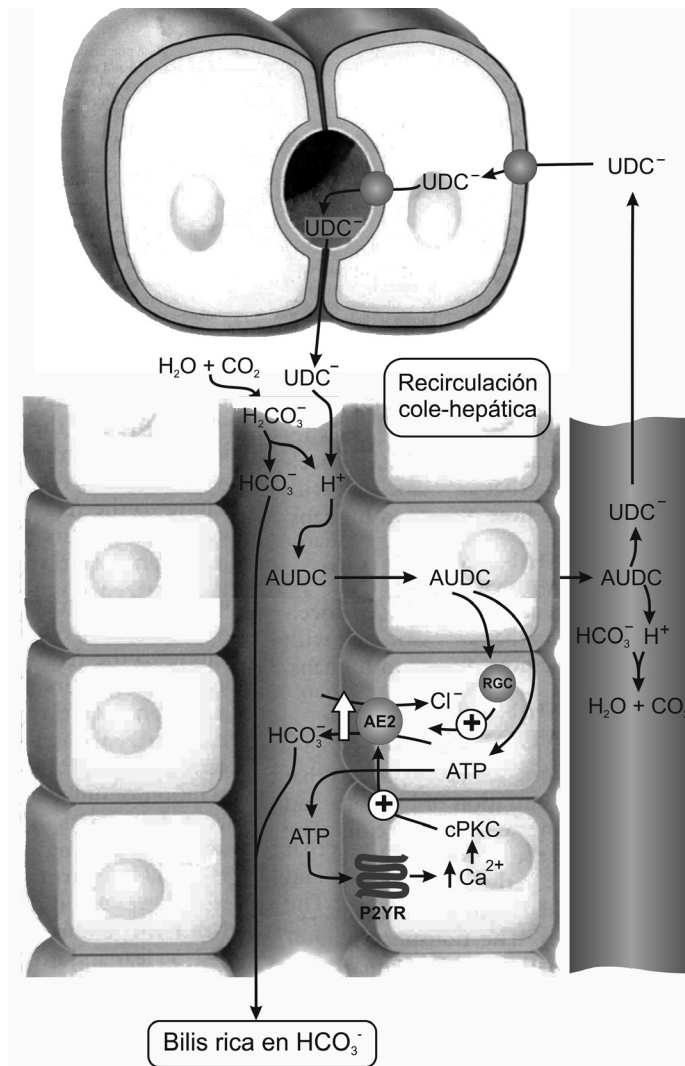


Figura 5. Generación de la hipercolesterolemia rica en bicarbonato (HCO_3^-) inducida por el AUDC. El AUDC estimula la secreción de HCO_3^- y la concomitante formación de flujo de la bilis ductular rico en HCO_3^- , tanto por su capacidad para sufrir recirculación colehepática como por estimulación directa de la secreción de HCO_3^- colangiocelular. La recirculación colehepática del AUDC involucra la absorción pasiva del ácido biliar en su forma protonada (sin carga) por el colangiocito, su desprotonación en sangre pasando a ursodesoxicolato (UDC) y su retorno a los sinusoides hepáticos a través del plexo peribiliar, para ser recaptado y excretado a bilis por los hepatocitos. La nueva protonación del UDC a partir del CO_2 en bilis hace que se libere una molécula de HCO_3^- adicional en el lumen biliar cada vez que el AUDC sufre un evento recirculatorio, lo cual actúa como una fuerza impulsora osmótica para la formación de la bilis ductular. Además, el AUDC activa al anion exchanger 2 (AE2), el contrantransportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ implicado en la secreción de HCO_3^- ductular, tanto a través de mecanismos de señalización transcripcional como postranscripcional. El último proceso consiste en la estimulación de la secreción a bilis de ATP, lo cual posibilita la activación de AE2 por receptores purinérgicos 2Y (P2YR) a través de un aumento de Ca^{2+} citosólico y la consecuente activación de isoformas de proteína quinasa C (PKC) dependientes de Ca^{2+} (cPKC). cPKC activa una variedad de canales de Cl^- presentes en el dominio apical del colangiocito, lo cual estimula el intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ mediado por AE2. Para más detalles, ver la sección 3.5.

baja capacidad para sufrir agregación micelar (104). Esto hace del 24-nor-AUDC uno de las más promisorias alternativas terapéuticas en colangiopatías actualmente en estudio (105).

El AUDC es también capaz de modular la expresión de transportadores involucrados en la generación del flujo biliar ductular, tal como el contra-transportador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ anion exchanger 2 (AE2). En pacientes con CBP, el AUDC mejoró la expresión reducida de AE2 (106). El AUDC junto con glucocorticoides, una combinación terapéutica usada en pacientes con CBP (12), induce la expresión de AE2 y mejora su actividad de transporte en colangiocitos y hepatocitos humanos (107). Esto se produce mediante la unión tanto del AUDC como del glucocorticoide al receptor de glucocorticoides (107). El AUDC también activa la función de AE2 a través de procesos postranscripcionales de señalización. En efecto, el AUDC estimula la liberación a la bilis de ATP por los hepatocitos (108) y los colangiocitos (109), y el ATP luminal activa receptores purinérgicos 2Y de los colangiocitos. Estos últimos estimulan AE2 induciendo un aumento del Ca^{2+} libre citosólico y la consiguiente activación de isoformas de proteína quinasa C (PKC) dependientes de Ca^{2+} (cPKC), las cuales activan una variedad de canales de Cl^- presentes en el dominio apical del colangiocito necesarios para el intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (109).

3.6. Quimioprotección de neoplasias

Estudios experimentales tanto *in vivo* como *in vitro* indican que el AUDC puede suprimir el crecimiento celular y la señalización mitogénica en diversas líneas celulares, lo que sugiere que podría ser un efectivo agente anti-proliferativo. Un ejemplo prototípico de esta propiedad antitumoral se manifiesta en el cáncer colorectal. La administración oral del AUDC a ratas tratadas con un promotor de esa neoplasia redujo el número de ratas portadoras de tumores y suprimió el desarrollo de carcinoma (110). Similarmente, el AUDC disminuyó el desarrollo de adenomas en un modelo murino de poliposis adenomatosa familiar (111) y previno la neoplasia de colon en un modelo de ratón con colitis inflamatoria (CD-1) (112). Finalmente, varios estudios prospectivos y retrospectivos han sugerido un efecto beneficioso del AUDC en poblaciones de alto riesgo, como por ejemplo pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal o con antecedentes de adenoma o cáncer colorectal (113).

Los mecanismos por los cuales el AUDC ejerce su efecto anti-neoplásico se encuentran bajo activa investigación. El AUDC antagoniza la activación de la vía de señalización proliferativa de las MAPKs de tipo Erk inducida por el ácido desoxicólico, un ácido biliar endógeno involucrado en la tumorigénesis colorectal (114). Inhibiendo Erk, el AUDC disminuye además los niveles de ciclina D1, un regulador positivo clave del ciclo celular. El AUDC también suprime la inducción mediada por Erk de COX-2, la enzima limitante de la biosíntesis de prostaglandinas íntimamente involucrada en la carcinogénesis de colon. Finalmente, el AUDC tiene efectos pro-apoptóticos en células tumorales, a diferencia de las normales. Bajas dosis del AUDC indujeron apoptosis en una línea celular de hepatocarcinoma (115), un efec-

to que podría explicar la protección por AUCD de la generación de hepatocarcinoma en pacientes cirróticos (116).

Conclusiones

Se han registrado, en pocos años, extraordinarios avances en el conocimiento de los mecanismos hepatoprotectores y anticoléstásicos del AUCD. A su vez, numerosos estudios experimentales y clínicos han confirmado y extendido sus efectos benéficos a prácticamente todas las hepatopatías colestásicas conocidas, a pesar de tener éstas una alta diversidad etiológica.

La versatilidad del AUCD obedece a sus múltiples mecanismos de acción. Estos incluyen efectos anti-apoptóticos, anti-cancerígenos, inmunomoduladores y reguladores de la expresión y lo-

calización de transportadores y enzimas metabolizadoras hepáticas y, finalmente, efectos hipercoleréticos que, a nivel ductular, contrarrestan la generación de una bilis tóxica.

Resultará pues difícil encontrar sustitutos tan versátiles como el AUCD, aún cuando sean más efectivos en un aspecto terapéutico particular. La multifuncionalidad terapéutica del AUCD es un factor crucial para ejercer efecto curativo en enfermedades complejas, como lo son las colangiopatías. El AUCD es hoy, además, tomado como modelo molecular para el desarrollo de nuevos medicamentos que refuerzan su eficacia en ciertos aspectos en los que es menos eficiente, conservando aquellos en los que es robusto. Daría la impresión que este medicamento ancestral se reinventa a sí mismo para vivir en una "eterna juventud", y seguir sorprendiéndonos con más virtudes secretas.

AH

Bibliografía

1. Leuschner U, Fischer H, Kurtz W, Guldutuna S, Hubner K, Hellstern A, et al. Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a controlled double-blind trial. *Gastroenterology* 1989;97:1268-1274.
2. Harada K, Nakanuma Y. Molecular mechanisms of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *Med Mol Morphol* 2006;39:55-61.
3. Puhl T, Beuers U. Ursodeoxycholic Acid treatment of vanishing bile duct syndromes. *World J Gastroenterol* 2006;12:3487-3495.
4. Corpechot C, Carrat F, Bonnard Am, Poupon RE, Poupon R. The effect of ursodeoxycholic acid therapy on liver fibrosis progression in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2000;32:1196-1199.
5. Poupon R, Chazouilleres O, Balkau B, Poupon RE. Clinical and biochemical expression of the histopathological lesions of primary biliary cirrhosis. UDCA-PBC Group. *J Hepatol* 1999;30:408-412.
6. Gong Y, Huang ZB, Christensen E, Gluud C. Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;Cd000551.
7. Lindor KD, Poupon R, Heathcote EJ, Thorneau T. Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis. *Lancet* 2000;355:657-658.
8. Pares A, Caballeria L, Rodes J. Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 2006;130:715-720.
9. Zhang Y, Chen K, Dai W, Xia Y, Wang F, Shen M, et al. Combination therapy of bezafibrate and ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis: a meta-analysis. *Hepatol Res* 2014 (en prensa).
10. Bachs L, Pares A, Elena M, Piersa C, Rodes J. Effects of long-term rifampicin administration in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1992;102:2077-2080.
11. Lindor KD. Farnesoid X receptor agonists for primary biliary cirrhosis. *Curr Opin Gastroenterol* 2011;27:285-288.
12. Leuschner M, Guldutuna S, You T, Hubner K, Bhatti S, Leuschner U. Ursodeoxycholic acid and prednisolone versus ursodeoxycholic acid and placebo in the treatment of early stages of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1996;25:49-57.
13. Novak K, Swain MG. Role of methotrexate in the treatment of chronic cholestatic disorders. *Clin Liver Dis* 2008;12:81-96.
14. Leuschner M, Maier KP, Schlichting J, Strahl S, Herrmann G, Dahm HH, et al. Oral budesonide and ursodeoxycholic acid for treatment of primary biliary cirrhosis: results of a prospective double-blind trial. *Gastroenterology* 1999;117:918-925.
15. Zhang Y, Lu J, Dai W, Wang F, Shen M, Yang J, et al. Combination therapy of ursodeoxycholic acid and corticosteroids for primary biliary

- cirrhosis with features of autoimmune hepatitis: a meta-analysis. *Gastroenterol Res Pract* 2013;2013:490731.
16. Karlsten TH, Schruppf E, Boberg KM. Primary Sclerosing Cholangitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010;24:655-666.
 17. Lindor KD, Kowdley KV, Luketic VA, Harrison ME, McCashland T, Belfer AS, et al. High-dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2009;50:808-814.
 18. Tung BY, Emond MJ, Haggitt RC, Bronner MP, Kimmey MB, Kowdley KV, et al. Ursodiol use is associated with lower prevalence of colonic neoplasia in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Ann Intern Med* 2001;134:89-95.
 19. Eaton JE, Silveira MG, Pardi DS, Sinakos E, Kowdley KV, Luketic VA, et al. High-dose ursodeoxycholic acid is associated with the development of colorectal neoplasia in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2011.
 20. Pardi DS, Loftus EV Jr., Kremers WK, Keach J, Lindor KD. Ursodeoxycholic acid as a chemopreventive agent in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2003;124:889-893.
 21. Lindstrom L, Boberg KM, Wikman O, Friis-Liby I, Hultcrantz R, Prytz H, et al. High dose ursodeoxycholic acid in primary sclerosing cholangitis does not prevent colorectal neoplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;35:451-457.
 22. Weismuller TJ, Lankisch TO. Medical and endoscopic therapy of primary sclerosing cholangitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25:741-752.
 23. Lutz H, Trautwein C, Tischendorf JW. Primary sclerosing cholangitis: diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2013;110:867-874.
 24. Herrmann U, Dockter G, Lammert F. Cystic fibrosis-associated liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010;24:585-592.
 25. Kappler M, Espach C, Schweiger-Kabesch A, Lang T, Hartl D, Hector A, et al. Ursodeoxycholic acid therapy in cystic fibrosis liver disease – a retrospective long-term follow-up case-control study. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;36:266-273.
 26. Gooding J, Dondos V, Gyi KM, Hodson M, Westaby D. Variceal hemorrhage and cystic fibrosis: outcomes and implications for liver transplantation. *Liver Transpl* 2005;11:1522-1526.
 27. Efrati O, Barak A, Modan-Moses D, Augarten A, Vilozni D, Katznelson D, et al. Liver cirrhosis and portal hypertension in cystic fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:1073-1078.
 28. Colombo C, Crosignani A, Assaisso M, Battezzati PM, Podda M, Giunta A, et al. Ursodeoxycholic acid therapy in cystic fibrosis-associated liver disease: a dose-response study. *Hepatology* 1992;16:924-930.
 29. Cotting J, Lentze MJ, Reichen J. Effects of ursodeoxycholic acid treatment on nutrition and liver function in patients with cystic fibrosis and longstanding cholestasis. *Gut* 1990;31:918-921.
 30. Siano M, De GF, Boggia B, Sepe A, Ferri P, Buonpensiero P, et al. Ursodeoxycholic acid treatment in patients with cystic fibrosis at risk for liver disease. *Dig Liver Dis* 2010;42:428-431.
 31. Colombo C, Battezzati PM, Podda M, Bettinardi N, Giunta A. Ursodeoxycholic acid for liver disease associated with cystic fibrosis: a double-blind multicenter trial. the italian group for the study of ursodeoxycholic acid in cystic fibrosis. *Hepatology* 1996;23:1484-1490.
 32. Lindblad A, Glaumann H, Strandvik B. A two-year prospective study of the effect of ursodeoxycholic acid on urinary bile acid excretion and liver morphology in cystic fibrosis-associated liver disease. *Hepatology* 1998;27:166-174.
 33. Nousia-Arvanitakis S, Fotoulaki M, Economou H, Xefteri M, Galli-Tsinopoulou A. Long-term prospective study of the effect of ursodeoxycholic acid on cystic fibrosis-related liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2001;32:324-328.
 34. Van de Meeberg PC, Houwen Rh, Sinaasappel M, Heijerman HG, Bijleveld CM, Vanberge-Henegouwen GP. Low-dose versus high-dose ursodeoxycholic acid in cystic fibrosis-related cholestatic liver disease. Results of a randomized study with 1-year follow-up. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:369-373.
 35. Gonzales E, Vit-Spraul A, Baussan C, Buffet C, Maurice M, Jacquemin E. Liver diseases related to MDR3 (Abcb4) gene deficiency. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009;14:4242-4256.
 36. De Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J, et al. Mutations In The MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:282-287.
 37. Xia X, Francis H, Glaser S, Alpini G, Lesage G. Bile acid interactions with cholangiocytes. *World J Gastroenterol* 2006;12:3553-3563.
 38. Lamireau T, Bouchard G, Yousef IM, Clouzeau-Girard H, Rosenbaum J, Desmouliere A, et al. Dietary lecithin protects against cholestatic liver disease in cholic acid-fed Abcb4- deficient mice. *Pediatr Res* 2007;61:185-190.
 39. Puglielli L, Amigo L, Arrese M, Nunez L, Rigotti A, Garrido J, et al. Protective role of biliary cholesterol and phospholipid lamellae against bile acid-induced cell damage. *Gastroenterology* 1994;107:244-254.
 40. Jacquemin E, De Vree JM, Cresteil D, Sokal EM, Sturm E, Dumont M, et al. The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology* 2001;120:1448-1458.
 41. Erlinger S. Low phospholipid-associated cholestasis and cholelithiasis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012;36 (Suppl 1):S36-S40.
 42. Fried RH, Murakami CS, Fisher LD, Willson RA, Sullivan KM, McDonald GB. Ursodeoxycholic acid treatment of refractory chronic graft-versus-host disease of the liver. *Ann Intern Med* 1992;116:624-629.
 43. Wulffraat NM, Haddad E, Benkerrou M, Spliet WG, Patey N, Fischer A, et al. Hepatic GVHD after HLA-haploidentical bone marrow transplantation in children with severe combined immunodeficiency: the effect of ursodeoxycholic acid. *Br J Haematol* 1997;96:776-780.
 44. Tay J, Tinmouth A, Fergusson D, Huebsch L, Allan DS. Systematic review of controlled clinical trials on the use of ursodeoxycholic acid for the prevention of hepatic veno-occlusive disease in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:206-217.
 45. Ruutu T, Juvonen E, Remberger M, Remes K, Volin L, Mattsson J, et al. Improved survival with ursodeoxycholic acid prophylaxis in allogeneic stem cell transplantation: long-term follow-up of a randomized study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:135-138.
 46. Scholmerich J, Becher MS, Schmidt K, Schubert R, Kremer B, Feldhaus S, et al. Influence of hydroxylation and conjugation of bile salts on their membrane-damaging properties--studies on isolated hepatocytes and lipid membrane vesicles. *Hepatology* 1984;4:661-666.
 47. Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol* 2009;15:1677-1689.
 48. Miura T, Ouchida R, Yoshikawa N, Okamoto K, Makino Y, Nakamura T, et al. Functional modulation of the glucocorticoid receptor and suppression of nf-kappab-dependent transcription by ursodeoxycholic acid. *J Biol Chem* 2001;276:47371-47378.
 49. Kawata K, Kobayashi Y, Souda K, Kawamura K, Sumiyoshi S, Takahashi Y, et al. Enhanced hepatic Nrf2 activation after ursodeoxycholic acid treatment in patients with primary biliary cirrhosis. *Antioxid Redox Signal* 2010;13:259-268.
 50. Amaral JD, Viana RJ, Ramalho RM, Steer CJ, Rodrigues CM. Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res* 2009;50:1721-1734.
 51. Yoshikawa M, Tsujii T, Matsumura K, Yamao J, Matsumura Y, Kubo R, et al. Immunomodulatory effects of ursodeoxycholic acid on immune responses. *Hepatology* 1992;16:358-364.
 52. Nakanuma Y, Tsuneyama K, Harada K. Pathology and pathogenesis of intrahepatic bile duct loss. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:303-315.
 53. Harada K, Ozaki S, Gershwin ME, Nakanuma Y. Enhanced apoptosis relates to bile duct loss in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1997;26:1399-1405.

54. Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci* 2009;122:437-441.
55. Bao Q, Shi Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* 2007;14:56-65.
56. Bofla R, Spivey JR, Aguilar H, Bronk SF, Gores GJ. Ursodeoxycholate (UDCA) Inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: a mechanism of UDCA cytoprotection. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272:930-938.
57. Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol Med* 1998;4:165-178.
58. Rodrigues CM, Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest* 1998;101:2790-2799.
59. Colell A, Coll O, Garcia-Ruiz C, Paris R, Tiribelli C, Kaplowitz N, et al. Tauroursodeoxycholic acid protects hepatocytes from ethanol-fed rats against tumor necrosis factor-induced cell death by replenishing mitochondrial glutathione. *Hepatology* 2001;34:964-971.
60. Azzaroli F, Mehal W, Soroka CJ, Wang L, Lee J, Crispe N, et al. Ursodeoxycholic acid diminishes Fas-ligand-induced apoptosis in mouse hepatocytes. *Hepatology* 2002;36:49-54.
61. Sola S, Amaral JD, Castro RE, Ramalho RM, Borralho PM, Kren BT, et al. Nuclear translocation of UDCA by the glucocorticoid receptor is required to reduce TGF- β 1-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 2005;42:925-934.
62. Amaral JD, Castro RE, Sola S, Steer CJ, Rodrigues CM. P53 is a key molecular target of ursodeoxycholic acid in regulating apoptosis. *J Biol Chem* 2007;282:34250-34259.
63. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998;254:439-459.
64. Leong KG, Karsan A. Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor alpha. *Histol Histopathol* 2000;15:1303-1325.
65. Sodeman T, Bronk SF, Roberts PJ, Miyoshi H, Gores GJ. Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278:G992-G999.
66. Higuchi H, Bronk SF, Takikawa Y, Werneburg N, Takimoto R, El-Deiry W, et al. The bile acid glycochenodeoxycholate induces trail-receptor 2/DR5 Expression and apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:38610-38618.
67. Takeda K, Kojima Y, Ikejima K, Harada K, Yamashina S, Okumura K, et al. Death receptor 5 mediated-apoptosis contributes to cholestatic liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10895-10900.
68. Afford SC, Hmed-Choudhury J, Randhawa S, Russell C, Youster J, Crosby HA, et al. CD40 activation-induced, Fas-dependent apoptosis and NF- κ B/AP-1 signaling in human intrahepatic biliary epithelial cells. *FASEB J* 2001;15:2345-2354.
69. Pustl T, Vennegeerts T, Wimmer R, Denk GU, Beuers U, Rust C. Tauroursodeoxycholic acid reduces bile acid-induced apoptosis by modulation of AP-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;367:208-212.
70. Martinez OM, Villanueva JC, Gershwin ME, Krams SM. Cytokine patterns and cytotoxic mediators in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1995;21:113-119.
71. Calmus Y, Guechot J, Podevin P, Bonnefis MT, Giboudeau J, Poupon R. Differential Effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor- α production by monocytes. *Hepatology* 1992;16:719-723.
72. Innes GK, Nagafuchi Y, Fuller BJ, Hobbs KE. Increased expression of major histocompatibility antigens in the liver as a result of cholestasis. *Transplantation* 1988;45:749-752.
73. Ballardini G, Mirakian R, Bianchi FB, Pisi E, Doniach D, Bottazzo GF. Aberrant expression of HLA-DR antigens on bile duct epithelium in primary biliary cirrhosis: relevance to pathogenesis. *Lancet* 1984;2:1009-1013.
74. Calmus Y, Weill B, Ozier Y, Chereau C, Houssin D, Poupon R. Immunosuppressive properties of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids in the mouse. *Gastroenterology* 1992;103:617-621.
75. Lacaille F, Paradis K. The immunosuppressive effect of ursodeoxycholic acid: a comparative in vitro study on human peripheral blood mononuclear cells. *Hepatology* 1993;18:165-172.
76. Hanada S, Harada M, Koga H, Kawaguchi T, Taniguchi E, Kumashiro R, et al. Tumor necrosis factor- α and interferon- α directly impair epithelial barrier function in cultured mouse cholangiocytes. *Liver Int* 2003;23:3-11.
77. Poupon R, Serfaty L. Ursodeoxycholic Acid in chronic hepatitis C. *Gut* 2007;56:1652-1653.
78. Uraz S, Tahan V, Aygun C, Eren F, Unluguzel G, Yuksel M, et al. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci* 2008;53:1071-1077.
79. Soza A, Riquelme F, Alvarez M, Duarte I, Glasinovic JC, Arrese M. Hepatotoxicidad por amoxicilina/acido clavulánico: Caso clínico. *Rev Med Chil* 1999;127:1487-1491.
80. Lukivskaya O, Zavodnik L, Knas M, Buko V. Antioxidant mechanism of hepatoprotection by ursodeoxycholic acid in experimental alcoholic steatohepatitis. *Adv Med Sci* 2006;51:54-59.
81. Balmer ML, Siegrist K, Zimmermann A, Dufour JF. Effects of ursodeoxycholic acid in combination with vitamin E on adipokines and apoptosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2009;29:1184-1188.
82. Calmus Y, Gane P, Rouger P, Poupon R. Hepatic Expression of class I and class II major histocompatibility complex molecules in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 1990;11:12-15.
83. Terasaki S, Nakanuma Y, Ogino H, Unoura M, Kobayashi K. Hepatocellular and biliary expression of HLA antigens in primary biliary cirrhosis before and after ursodeoxycholic acid therapy. *Am J Gastroenterol* 1991;86:1194-1199.
84. Tanaka H, Makino Y, Miura T, Hirano F, Okamoto K, Komura K, et al. Ligand-independent activation of the glucocorticoid receptor by ursodeoxycholic acid. repression of IFN-gamma-induced MHC Class II gene expression via a glucocorticoid receptor-dependent pathway. *J Immunol* 1996;156:1601-1608.
85. Yokomori H, Oda M, Yoshimura K, Nomura M, Ogi M, Wakabayashi G, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 protein and messenger RNA in primary biliary cirrhosis. *Intern Med* 2003;42:947-954.
86. Yokomori H, Oda M, Wakabayashi G, Kitajima M, Ishii H. Ursodeoxycholic acid therapy attenuated expression of adhesion molecule in primary biliary cirrhosis. *Intern Med* 2003;42:1259-1261.
87. Lim AG, Wolffhagen FH, Verma A, Van Buuren HR, Jazrawi RP, Levy JH, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid and immunosuppressive therapy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9:155-161.
88. Marschall HU, Wagner M, Zollner G, Fickert P, Diczfalusy U, Gumhold J, et al. Complementary stimulation of hepatobiliary transport and detoxification systems by rifampicin and ursodeoxycholic acid in humans. *Gastroenterology* 2005;129:476-485.
89. Zollner G, Fickert P, Silbert D, Fuchsichler A, Marschall HU, Zatloukal K, et al. Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003;38:717-727.
90. Honda A, Ikegami T, Nakamuta M, Miyazaki T, Iwamoto J, Hirayama T, et al. Anticholestatic effects of bezafibrate in patients with primary biliary cirrhosis treated with ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 2013;57:1931-1941.
91. Fickert P, Zollner G, Fuchsichler A, Stumptner C, Weiglein AH, Lammer F, et al. Ursodeoxycholic acid aggravates bile infarcts in bile duct-ligated and mdr2 knockout mice via disruption of cholangioles. *Gastroenterology* 2002;123:1238-1251.

92. Schuetz EG, Strom S, Yasuda K, Lecureur V, Assem M, Brimer C, et al. Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among nuclear hormone receptors, transporters, and cytochrome P450. *J Biol Chem* 2001;276:39411-39418.
93. Zollner G, Fickert P, Fuchsbichler A, Silbert D, Wagner M, Arbeiter S, et al. Role of nuclear bile acid receptor, fxr, in adaptive abc transporter regulation by cholic and ursodeoxycholic acid in mouse liver, kidney and intestine. *J Hepatol* 2003;39:480-488.
94. Gotthardt D, Runz H, Keitel V, Fischer C, Flechtenmacher C, Wirtenberger M, et al. A mutation in the canalicular phospholipid transporter gene, *Abcb4*, is associated with cholestasis, ductopenia, and cirrhosis in adults. *Hepatology* 2008;48:1157-1166.
95. Trauner M, Fickert P, Wagner M. MDR3 (*Abcb4*) defects: a paradigm for the genetics of adult cholestatic syndromes. *Semin Liver Dis* 2007;27:77-98.
96. Trauner M, Fickert P, Halilbasic E, Moustafa T. Lessons from the toxic bile concept for the pathogenesis and treatment of cholestatic liver diseases. *Wien Med Wochenschr* 2008;158:542-548.
97. Prieto J, Qian C, Garcia N, Diez J, Medina JF. Abnormal expression of anion exchanger genes in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1993;105:572-578.
98. Glaser SS, Alpini G. Activation of the cholehepatic shunt as a potential therapy for primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2009;49:1795-1797.
99. Lazaridis KN, Gores GJ, Lindor KD. Ursodeoxycholic acid 'mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders'. *J Hepatol* 2001;35:134-146.
100. Combes B, Carithers RL Jr., Maddrey WC, Munoz S, Garcia-Tsao G, Bonner GF, et al. Biliary bile acids in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 1999;29:1649-1654.
101. Knyrim K, Vakili N, Pfab R, Classen M. The effects of intraduodenal bile acid administration on biliary secretion of ionized calcium and carbonate in man. *Hepatology* 1989;10:134-142.
102. Van Nieuwkerk CM, Elferink RP, Groen AK, Ottenhoff R, Tytgat GN, Dingemans KP, et al. Effects of ursodeoxycholate and cholate feeding on liver disease in FVB mice with a disrupted *Mdr2* P-glycoprotein gene. *Gastroenterology* 1996;111:165-171.
103. Fickert P, Wagner M, Marschall HU, Fuchsbichler A, Zollner G, Tsybrowsky O, et al. 24-Norursodeoxycholic acid is superior to ursodeoxycholic acid in the treatment of sclerosing cholangitis in *Mdr2* (*Abcb4*) knockout mice. *Gastroenterology* 2006;130:465-481.
104. Hofmann AF, Zakko SF, Lira M, Clerici C, Hagey LR, Lambert KK, et al. Novel biotransformation and physiological properties of norursodeoxycholic acid in humans. *Hepatology* 2005;42:1391-1398.
105. Poupon R. Ursodeoxycholic acid and bile-acid mimetics as therapeutic agents for cholestatic liver diseases: an overview of their mechanisms of action. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012;36 (Suppl) 1:S3-12.
106. Medina JF, Martinez A, Vazquez JJ, Prieto J. Decreased anion exchanger 2 immunoreactivity in the liver of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1997;25:12-17.
107. Arenas F, Hervias I, Uriz M, Joplin R, Prieto J, Medina JF. Combination of ursodeoxycholic acid and glucocorticoids upregulates the AE2 alternate promoter in human liver cells. *J Clin Invest* 2008;118:695-709.
108. Nathanson MH, Burgstahler AD, Masyuk A, Larusso NF. Stimulation of ATP secretion in the liver by therapeutic bile acids. *Biochem J* 2001;358:1-5.
109. Fiorotto R, Spirli C, Fabris L, Cadamuro M, Okolicsanyi L, Strazzabosco M. Ursodeoxycholic acid stimulates cholangiocyte fluid secretion in mice via CFTR-dependent ATP Secretion. *Gastroenterology* 2007;133:1603-1613.
110. Earnest DL, Holubec H, Wali RK, Jolley CS, Bissonette M, Bhattacharyya AK, et al. Chemoprevention of azoxymethane-induced colonic carcinogenesis by supplemental dietary ursodeoxycholic acid. *Cancer Res* 1994;54:5071-5074.
111. Jacoby RF, Cole CE, Hawk ET, Lubet RA. Ursodeoxycholate/sulindac combination treatment effectively prevents intestinal adenomas in a mouse model of polyposis. *Gastroenterology* 2004;127:838-844.
112. Kohno H, Suzuki R, Yasui Y, Miyamoto S, Wakabayashi K, Tanaka T. Ursodeoxycholic acid versus sulfasalazine in colitis-related colon carcinogenesis in mice. *Clin Cancer Res* 2007;13:2519-2525.
113. Serfaty L, Bissonette M, Poupon R. Ursodeoxycholic acid and chemoprevention of colorectal cancer. *Gastroenterol Clin Biol* 2010;34:516-522.
114. Feldman R, Martinez JD. Growth suppression by ursodeoxycholic acid involves caveolin-1 enhanced degradation of EGFR. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:1387-1394.
115. Tsagarakis NJ, Drygiannakis I, Batistakis AG, Kolios G, Kouroumalis EA. A concentration-dependent effect of ursodeoxycholate on apoptosis and caspases activities of HEPG2 hepatocellular carcinoma cells. *Eur J Pharmacol* 2010;640:1-7.
116. Tarao K, Fujiyama S, Ohkawa S, Miyakawa K, Tamai S, Hirokawa S, et al. Ursodiol use is possibly associated with lower incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-associated liver cirrhosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:164-169.