



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO “DR. EDUARDO LICEAGA”

TESIS

**“CAMBIOS DEL LÍQUIDO BILIAR Y UNIONES ESTRECHAS EN LA
MUCOSA DE LA VESICULAR BILIAR EN PACIENTES CON
COLECISTITIS LITIÁSICA”**

TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN CIRUGÍA GENERAL

PRESENTA:

SANDRA HAYDEE GUTIÉRREZ ROMÁN

PRESIDENTE DE TESIS EN CIRUGÍA GENERAL:

DR. ABRAHAM PULIDO CEJUDO

ASESOR DE TESIS:

DR. ABEL JALIFE MONTAÑO

MÉDICO ADSCRITO DEL SERVICIO DE CIRUGÍA GENERAL

CIUDAD DE MÉXICO. 1 DICIEMBRE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACIÓN DE TESIS

Dr. Abraham Pulido Cejudo

Presidente de Tesis en Cirugía general

Dr. Abel Jalife Montaña

Asesor de tesis

Médico Adscrito del Servicio de Cirugía General

Dra. Sandra Haydee Gutiérrez Román

Autor

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme tener y disfrutar a mi familia, gracias a mi familia por apoyarme en cada decisión y proyecto, gracias a la vida por darme la oportunidad de estar en el maravilloso Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, que me ha formado no solo como cirujana, sino también como ser humano, he crecido como persona y no puedo estar más agradecida con esta honorable institución.

A mis profesores y maestros, gracias por decidir compartir su conocimiento y sabiduría con alguien más, por instruirme con excelencia y disposición, gracias por creer en la educación y el desarrollo de la sociedad a través de esta misma, por actuar con cabalidad y paciencia, siempre los llevaré en mi mente y corazón, pues inevitablemente se convirtieron en parte de mí.

A mis compañeros y amigos de generación, pues en ellos encontré una nueva familia, un pilar más en mi vida, se convirtieron en los hermanos y compañeros de vida que nunca pensé tener.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo	Página
Índice de figuras	i
Índice de tablas	i
Abreviaturas	ii
Resumen	iii
Abstract	iv
I. Introducción	1
1. Epidemiología	1
2. Factores predisponentes	2
3. Anatomía y fisiología de la vesícula biliar	3
3.1 Formación y composición de la bilis	4
3.2 Determinantes de la secreción biliar	6
3.3 Mecanismos de formación de bilis	10
3.4 Circulación entero hepática de los ácidos biliares	11
3.5 Función de la bilis	11
3.6 Composición alterada de la bilis	12
3.7 Uniones intercelulares	14
3.8 Citoesqueleto	19
3.9 Respuesta inflamatoria vesicular	23
II. Antecedentes	26
Planteamiento	
III. del problema	27
IV. Justificación	27
V. Hipótesis	28
VI. Objetivos	28
Objetivo general	28
Objetivos específicos	28
VII. Materiales y métodos	29
Diseño de estudio	29
Universo de estudio	29
Criterios de selección	
• Grupo de estudio	
• Casos control	
Variables a estudiar	29
Metodología	30
Estadística	31
Consideraciones éticas	36
VIII. Resultados	36
1. Recolección de muestras y hoja de datos	37

2. Análisis Morfológico	39
3. Determinación en la integridad de las uniones estrechas	
4. Características del líquido biliar	
5. Correlación entre la integridad de las uniones estrechas y las características del líquido biliar	
IX. Discusión	
X. Conclusiones	
XI. Perspectivas	
XII. Referencias	43

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura	1 Anatomía de vesícula y vías biliares.	3
Figura	2 Fotomicrografía del corte histológico de la vesícula biliar, teñido con hematoxilina y eosina.	4
Figura	3 Componentes principales de la bilis.	5
Figura	4 Uniones celulares y complejos de unión.	15
Figura	5 Componentes estructurales básicos de las uniones adherentes.	15
Figura	6 Uniones gap.	16
Figura	7 Componentes estructurales básicos transmembrana de uniones estrechas.	17
Figura	8 Ciclo GTPasa tubulina.	20
Figura	9 Filamentos intermedios.	21
Figura	10 Vimentina Rho GTPasa.	23
Figura	11 Tren de tinción.	34
Figura	12 Género de la población	37
Figura	13 Factores de riesgo presentes en el grupo de estudio.	37
Figura	14 Descripción macroscópica de los litos presentes en coleditiasis	38
Figura	15 Criterios Morfológicos.	39
Figura	16 Histología de vesícula biliar. Grupo control y estudio	40
Figura	17 Histología de vesícula biliar humana.	41
Figura	18 Cortes histológicos de vesícula biliar humana.	42
Figura	19 Análisis morfológico.	43
Figura	20 Inmunofluorescencia en vesícula biliar, Claudina-1	44
Figura	21 Inmunofluorescencia en vesícula biliar, Claudina-2	45
Figura	22 Inmunofluorescencia en vesícula biliar, Claudina-3	46
Figura	23 Inmunofluorescencia en vesícula biliar, Claudina-5	46
Figura	24 Imagen comparativa, hematoxilina-eosina e inmunofluorescencia	47
Figura	25 Expresión de proteínas de unión	49
Figura	26 Integridad de proteínas de unión	49

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla	1 Característica de las hormonas principales en la vesícula biliar	9
Tabla	2 Importancia de la citocinas en las neoplasias	25
Tabla	3 Riesgo a desarrollar litos de colesterol según los factores de predisponentes	39
Tabla	4 Características de líquido biliar en pacientes con litiasis biliar y controles	44

ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
ATP	Trifosfato de adenosina
BEC	Células epiteliales biliares
BVES	Sustancia epicárdica de vasos sanguíneos
CA6	Anhidrasa carbónica VI
CAR	Receptor constitutivo de androstano o NR1I3
CAMK	Cinasa 2 dependiente de calmodulina
CCA	Colangiocarcinoma
CCL-28	Sinónimo de quimioquinas epitelial asociada a mucosas (MEC)
EMT	Epitelio mesenquimal de transición
GTP	Guanosín trifosfato
GDP	Guanosín difosfato
Ig	Inmunoglobulina
IF	Filamentos intermedios
IFAPs	Proteínas de filamentos intermedios asociados a multidominio
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferón γ
LPS	Lipopolisacáridos
MAP	Proteínas asociadas a microtúbulos
MT	Microtúbulos
MTOC	Centro organizacional de microtúbulos
MF	Microfilamentos de actina
MMP-2	Matriz metaloproteínasa-2
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PIB-tubulina	β -tubulina
PKC	Protein cinasa C
PKA	Protein cinasa A
PAK	p21 quinasa activada
ROK α	RhoA vinculante cinasa- α
RRP	Receptores de reconocimiento de patrones
STAT-3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta 1, TGF- β 1 ó TGFB1
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TRPV4	Receptor de potencial transitorio del canal catiónico, subfamilia V, miembro 4
VEGF- α	Factor de crecimiento vascular endotelial
ZO	Zona ocludens

RESUMEN

La colecistitis es un proceso inflamatorio de la vesícula biliar, ocasionada principalmente por la formación de litos biliares y su consecuente obstrucción (colecistitis litiásica). La presencia de colecistitis litiásica es común y causa frecuente de consulta, se estima que la prevalencia a nivel mundial en adulto es de 5.9%-21.9%. En México durante el 2007 ocupó el primer lugar como causa de consulta en cirugía general, siendo la colecistectomía la intervención quirúrgica más frecuentemente realizada.

La colecistitis crónica litiásica es la primera causa de consulta en el servicio de cirugía general en nuestro país y tiene gran impacto en diferentes áreas, por lo que, es de gran interés entender su fisiopatología e identificar los factores de riesgo que favorezcan el proceso inflamatorio vesicular, para poder implementar medidas preventivas o tratamientos que reduzcan la incidencia, prevalencia y morbi-mortalidad de dicha enfermedad. Por otro lado, es de suma importancia para el sustento económico y desarrollo de sistema de salud de nuestro país, pues se calcula que el costo por cada paciente que es sometido a colecistectomía oscila entre 30 000 y 40 000 pesos, representando una gran derrama económica.

El objetivo de este trabajo es determinar el papel de las uniones estrechas y del líquido biliar en la colecistitis litiásica, en el que proponemos que la pérdida de la integridad de las uniones estrechas favorece la formación de bilis litogénica y permite el ingreso de mediadores inflamatorios en la colecistitis litiásica.

Para este fin se realizó un estudio de 25 pacientes del servicio de cirugía general del HGM, de la SSA con diagnóstico de colecistitis litiásica y que vayan a ser sometidos a colecistectomía, sin importar género, entre 20 y 70 años, en un periodo entre el 1° de marzo del 2016 al 30 de diciembre del 2018. Se les realizara un cuestionario dirigido a aquellos antecedentes de importancia para el desarrollo de la patología. En el evento quirúrgico se extraerá una muestra de 10 ml de líquido biliar al que se le realizara cromatografía para determinar colesterol, fosfolípidos y ácidos biliares. Además se tomarán muestras de tejido vesicular de 1 cm³ y se realizará: estudio histopatológico, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, para analizar morfología, presencia de citocinas e integridad de las uniones estrechas respectivamente.

Conclusiones

Se determinó que las uniones estrechas juegan un papel importante en el transporte paracelular determinando la composición del líquido biliar. Comprobamos que la pérdida de la integridad en las uniones estrechas favorece la formación de bilis litogénica en humanos, permitiendo el ingreso de mediadores inflamatorios que desencadenan la enfermedad.

I. INTRODUCCIÓN

La colecistitis es un proceso inflamatorio de la vesícula biliar, ocasionada principalmente por la formación de litos biliares y su consecuente obstrucción, así como por la presencia de lodo biliar. En raras ocasiones la colecistitis no depende de ninguna de estas condiciones y cualquiera de éstas puede presentar infección bacteriana (Montoro y García, 2010).

La formación de litos en la vesícula se debe a la alteración en la composición del líquido biliar y de la motilidad que ocasionan dificultad para su transportación, favoreciendo así la precipitación de sales biliares y la formación de litos. Este proceso es responsable de la mayor parte de la patología asociada a la vesícula y vía biliar (Tejedor y Albillos, 2012).

Alrededor de dos tercios de los pacientes con afección litiásica biliar, presentan colecistitis crónica que se caracteriza por ataques recurrentes de dolor. El dolor aparece cuando el cálculo obstruye el conducto cístico resultando en un incremento progresivo de la tensión en la pared de la vesícula biliar.

1. EPIDEMIOLOGÍA

La presencia de cálculos en la vesícula biliar es común y es causa frecuente de consulta, con una prevalencia en el occidente que oscila entre 5-15 %, siendo más frecuente en mujeres que en hombres (Tejedor y Albillos, 2012).

Se estima una prevalencia a nivel mundial en adultos de 5.9%-21.9%, con grandes variaciones geográficas y regionales (Gómez, 2009).

En México el último estudio epidemiológico registrado, reportó que en 2007 se otorgaron 218,490 consultas por colecistitis, ocupando el primer lugar como causa de consulta en cirugía general, siendo la colecistectomía la intervención quirúrgica que se realiza con más frecuencia en este mismo servicio. En ese mismo año el IMSS reportó 69,675 colecistectomías de las cuales 47,147 se realizaron con técnica abierta y 22,528 por laparoscopia. La relación mujer/hombre fue de 4:1 (Guía de Práctica Clínica, IMSS 2009). Se calcula que solo el 10% de los pacientes con dicha enfermedad son sintomáticos. De

aquellos pacientes asintomáticos al cabo de 5 años el 5 % requerirá cirugía, mientras que aquellos que presentan síntomas requerirán cirugía en un 50 %, de los casos. La mortalidad perioperatoria es del 0.3% y la tasa de complicaciones postquirúrgicas del 5%, ante la presencia de complicaciones la tasa de mortalidad aumenta de 4.8% hasta 18.7% (Dooley, 2011).

2. FACTORES PREDISPONENTES

Existen diferentes factores que predisponen a la presencia de colelitiasis, entre ellos se encuentran (Ponce, 2011):

- Edad: más frecuente a partir de los 40 años
- Género: femenino
- Embarazo: sobre todo para el desarrollo de cálculos de colesterol.
- Anticonceptivos orales y terapia hormonal sustitutiva con estrógenos, en este caso con mayor riesgo en mujeres menores de 40 años.
- Otros fármacos como los fibratos y la ceftriaxona.
- Antecedentes familiares de litiasis biliar.
- Obesidad.
- Pérdida rápida de peso.
- Nutrición parenteral.
- *Diabetes mellitus.*
- Cirrosis hepática.
- Enfermedades del íleon.
- Enfermedades hepáticas y metabólicas.

3. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DE LA VESÍCULA BILIAR

La vesícula biliar es una bolsa en forma de triángulo isósceles de 7-10 cm de longitud x 3-5 cm de ancho, adherida por el peritoneo al parénquima hepático y se divide en cuatro porciones anatómicas; fondo, cuerpo, infundíbulo y cuello (figura 1). Histológicamente, se caracteriza por carecer de submucosa, presenta de afuera hacia adentro las capas serosa, muscular (músculo liso) y una mucosa formada por epitelio simple cilíndrico (presenta pseudomicrovillosidades) que se dispone en pliegues (figura 2).

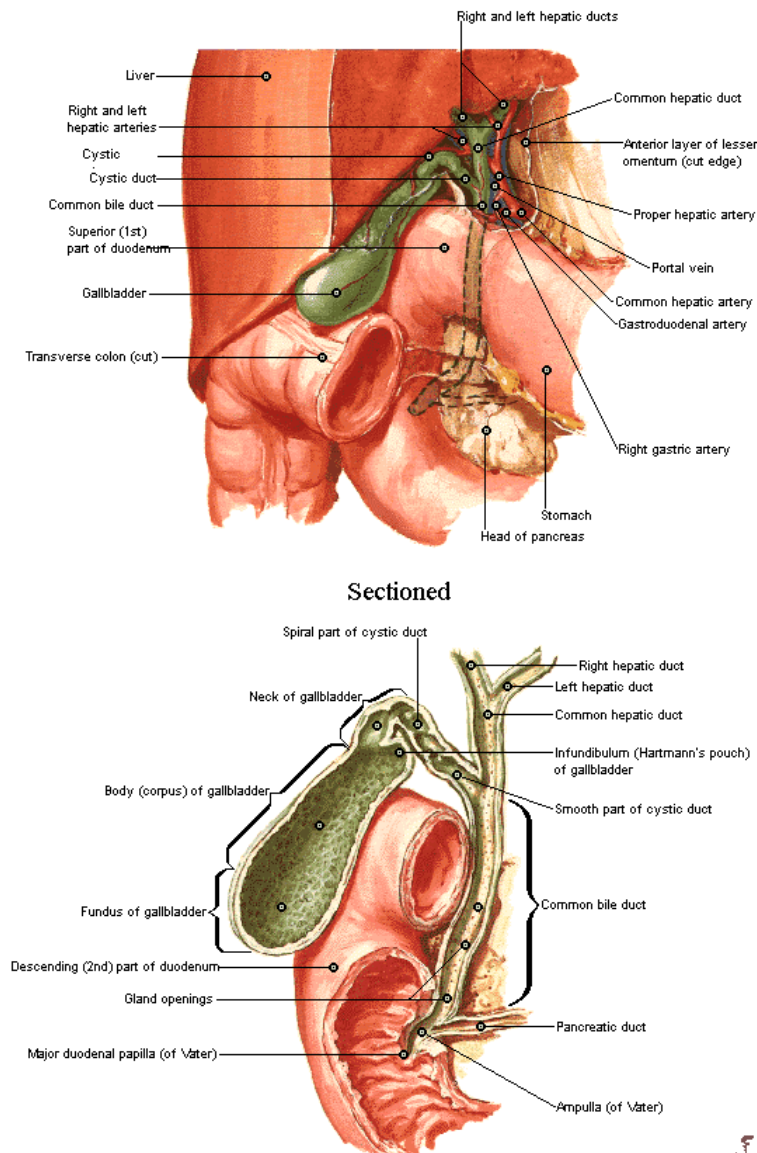


Figura 1. Anatomía de vesícula y vías biliares (Trelease, 2010).

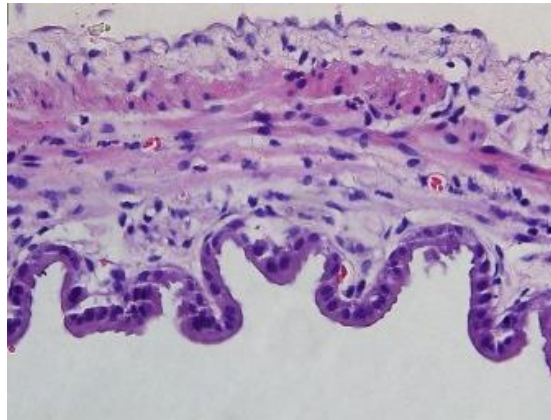


Figura 2. Fotomicrografía del corte histológico de la vesícula biliar, teñido con hematoxilina y eosina (Zhang, 2013).

Es irrigada por la arteria cística que es una rama de la arteria hepática, el drenaje venoso se lleva a través de la vena cística hasta la vena porta derecha (Torres, 2004).

La función básica de la vesícula biliar es almacenar y concentrar la bilis en su interior, por lo que es necesario una actividad motora vesicular adecuada y coordinada para lograr el paso de la bilis hacia el duodeno así como la relajación del esfínter de Oddi. Su innervación tiene origen en el plexo celíaco que está localizada a lo largo de la arteria hepática: i) los nervios motores están conformados por fibras vágales y fibras posganglionares del ganglio celíaco, ii) los estímulos sensoriales provienen de fibras de los nervios simpáticos que llegan al plexo celíaco (Torres, 2004).

3.1 Formación y composición normal de la bilis

La bilis es la secreción exócrina del hígado con un volumen de aproximadamente 500 - 1000 mL día que se almacena en la vesícula biliar con una capacidad de 50 mL en el adulto. La estimulación vagal aumenta la secreción de bilis y la estimulación de nervios esplácnicos disminuyen el flujo biliar. El ácido clorhídrico, las proteínas digeridas de forma

parcial y los ácidos grasos en el duodeno, estimulan la liberación de colecistocinina y secretina, que a su vez incrementa la producción y el flujo de bilis. Esta fluye desde el hígado a través de los conductos hepáticos hacia el conducto hepático común, a través del conducto cístico llega a la vesícula, después sale al colédoco y por último al duodeno (Brunicardi, 2010).

La bilis se compone sobre todo de agua, electrolitos (sodio, potasio, calcio, cloro), sales biliares, proteínas, lípidos y pigmentos biliares. El pH de la bilis suele ser neutro o ligeramente alcalino, pero varía con la dieta. En la figura 3 se representan los tres principales componentes de la bilis (1 % moles de colesterol, 2 % moles de sales biliares, 3 % moles de lecitina) y su capacidad de solubilizar o precipitar cristales de colesterol (Brunicardi, 2010).

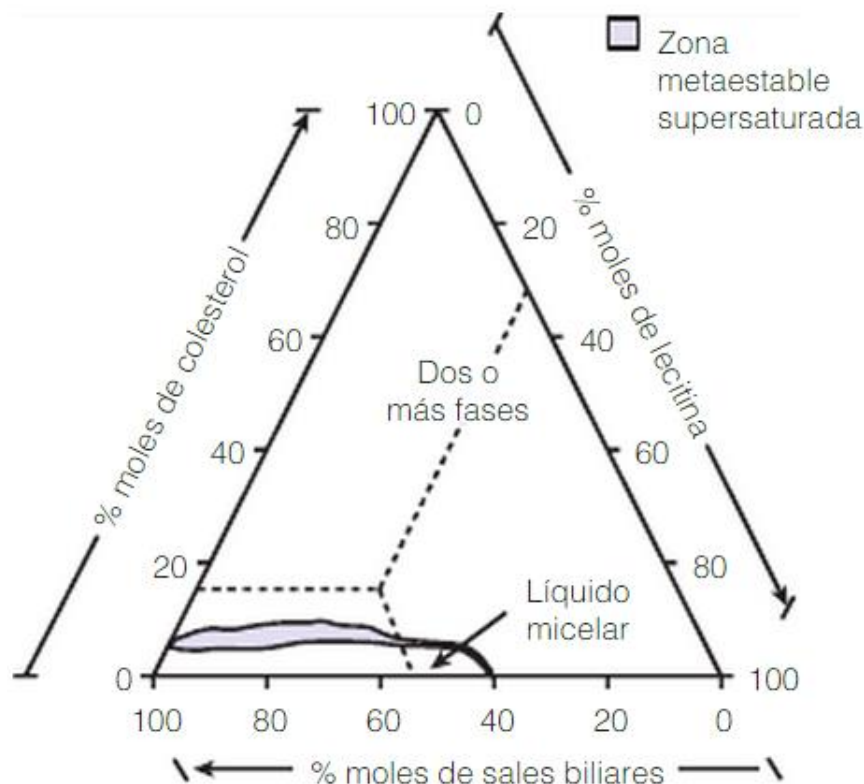


Figura 3. Los tres componentes principales de la bilis graficados en coordenadas triangulares. Un punto determinado representa las relaciones molares relativas de sales

biliares, lecitina y colesterol. El área marcada como “líquido micelar” muestra la gama de concentraciones consistentes con una solución micelar clara (Fase única), en la que se solubiliza por completo el colesterol. El área sombreada arriba de esta región corresponde a una zona metaestable, supersaturada con colesterol. La bilis con una composición situada arriba del área sombreada excedió la capacidad de solubilizar el colesterol y tiene lugar la precipitación de cristales de colesterol (Brunicardi, 2010).

La formación de bilis es una función única del hígado que es vital para la supervivencia del organismo, en los seres humanos, la síntesis de ácidos biliares exhibe un ritmo diurno con dos picos alrededor de las 15:00 y las 21:00 h, se origina en los hepatocitos y se modifica distalmente por los sistemas de absorción y de transporte secretor en el epitelio del conducto biliar. Su circulación es entero hepática con un transporte secuencial de sustratos endógenos y exógenos a través de tres compartimentos el espacio vascular, celular y el biliar (Boyer, 2013).

3.2 Determinantes de la secreción biliar

El hepatocito es una célula altamente polarizada, su membrana celular consta de; membrana basal (se encuentra frente a los sinusoides sanguíneos y contiene muchas microvellosidades), y membrana lateral lisa (recubre el espacio intercelular). Los canalículos biliares son pequeños y se forman entre dos hepatocitos adyacentes cuyas membranas apicales están selladas por uniones estrechas (zona ocludens). Esta es la única barrera física entre la sangre y la luz canalicular por lo que determina la "permeabilidad paracelular" entre la sangre y la bilis. La estructura de la unión estrecha se compone principalmente, de proteínas globulares conocidas como ocludinas y claudinas. Las uniones estrechas mantienen juntos los hepatocitos y proporcionan una barrera de los ácidos biliares que impide la difusión de otros solutos grandes de la bilis, permitiendo el paso de iones pequeños. Las claudinas y ocludinas están conectadas a las proteínas del citoesqueleto ZO-1 y ZO-2, en el lado citoplásmico de la membrana como parte del complejo de unión. Esta barrera intercelular está cargada negativamente y facilita el paso de pequeños iones,

particularmente de sodio, pero es impermeable a moléculas del tamaño de las proteínas (García, 2009).

La superficie de la membrana apical canalicular tiene microvellosidades en las que una serie de proteínas de transporte exportan diversos constituyentes del hepatocito a la bilis. Muchas de estas bombas de exportación son ATP dependiente.

Los hepatocitos se encuentran dentro de una unidad funcional del lóbulo hepático en los que la bilis se forma en contracorriente a la dirección del flujo sanguíneo. Los hepatocitos que están presentes en las zonas peri portal del lóbulo están expuestos a las mayores concentraciones de sales biliares y también, son las células primarias que intervienen en la formación de bilis dependiente de sales biliares. En contraste, las células más distales en el lóbulo secretan bilis de forma independiente. Esto se traduce en diámetros más pequeños de la luz canalicular en las zonas centrales del lóbulo, que aumentan de tamaño a medida que se acercan a los espacios porta (García, 2009).

La secreción de la bilis de los hepatocitos tiene una filtración trans-hepatocelular pasiva de agua y electrolitos (Na^+ , K^+ y Cl^-) en la cavidad canalicular biliar, que es causada por el gradiente osmótico entre la bilis y la sangre, que resulta del transporte activo de aniones orgánicos e inorgánicos de la sangre y los hepatocitos a los canalículos biliares. Los sistemas de transporte iónicos que gobiernan los gradientes iónicos y eléctricos en la superficie de la membrana (Na^+/K^+ , Na^+/H^+ , $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) son la base para el mecanismo de secreción de la bilis (Floch, et al., 2006).

Los mecanismos moleculares de la función de la membrana canalicular del hepatocito garantizan la transferencia transmembrana de los ácidos biliares, proteínas, cationes y aniones en la cavidad canalicular biliar.

Una vez secretada la bilis al árbol biliar, se expone a colangiocitos (células epiteliales, heterogéneas en estructura y función) que forman el revestimiento del epitelio del conducto biliar. El árbol biliar contiene 12 ramas desde el conducto biliar común para formar los conductos hepáticos derecho e izquierdo, que se ramifican para formar las

segmentarias, la zona de los conductos y, finalmente, los pequeños conductos septales (> 100 μm / L de diámetro), el conducto interlobular más pequeño (15-100 μm / L), los conductillos (<15 μm / L), y los canales de Hering que drenan la bilis de los canalículos biliares. Las proteínas de transporte en la membrana apical del colangiocito secretan un líquido enriquecido con bicarbonato y reabsorben fluido y otros solutos de la secreción de los hepatocitos primarios. El producto final fluye a la vesícula biliar y el intestino (García, 2009).

Como se ha mencionado antes la bilis es secretada principalmente, por los hepatocitos (bilis canalicular) y posteriormente, entregado a los conductos intrahepáticos biliares (la bilis ductal) (Floch et al., 2006).

Fases de la formación de la bilis canalicular.

- Fase 0; mecanismos de captación hepática situados en la membrana basolateral del hepatocito que determinan cómo los solutos orgánicos entran en el hígado.
- Fase I; principalmente por el citocromo P450 enzima intracelular que metabolizan los sustratos solubles de lípidos y facilitan las reacciones de fase II
- Fase II; consisten en enzimas que conjugan muchos compuestos orgánicos con sulfato, glucurónidos, grupos de glutatión o acetilo para aumentar su solubilidad en agua y permiten que estas sustancias sean sustratos para los transportadores de fase III.
- Fase III; bombas de exportación canalicular (dominio basolateral del hepatocito) que funcionan para excluir estos solutos fuera de los hepatocitos en la bilis o en la circulación sistémica.

Colangiocitos

Forman el epitelio del árbol biliar intrahepático, su función primaria es fluidificar y alcalinizar la bilis canalicular, un proceso que implica una serie de funciones secretoras y de absorción de estas células.

El árbol biliar que inicia en los canales de Hering y continúan de forma interlobular hacia los conductos de área, conductos segmentarios, hepáticos y principales (Ludwig) que entregan bilis a la vesícula biliar e intestino.

Los Colangiocitos tienen cilios (expresan proteínas específicas; policistina-1, policistina-2, fibrocistina, TRPV4, P2Y12, y CA6) que activan vías de señalización intracelulares, que modulan las tasas de flujo de bilis y la osmolaridad, así como otros constituyentes moleculares.

La secreción de aniones, fluidos y bicarbonato de células de los conductos biliares se produce como una respuesta fisiológica a las comidas. Específicamente el pH ácido, los ácidos grasos y sales biliares, estimulan el duodeno para liberar la secretina y colecistocinina en la circulación portal. La secretina estimula la secreción de fluidos y bicarbonato, mientras que la colecistocinina estimula la contracción de la vesícula biliar (Tabla.1). En contraste, la somatostatina, gastrina, y la insulina tienen efectos inhibidores sobre la secreción de los colangiocitos.

Tabla.1 Característica de las hormonas principales en la vesícula biliar (García, 2009).

COLECISTOCININA	SECRETINA
El nombre de esta hormona describe su efecto sobre el sistema biliar colecisto = vesícula biliar y cinina = movimiento. El estímulo más potente para la liberación de colecistocinina es la presencia de grasa en el duodeno. Una vez liberado, estimula las contracciones de la vesícula biliar y el conducto biliar común, lo que resulta en la entrega de la bilis en el intestino.	Esta hormona se secreta en respuesta al ácido en el duodeno. Su efecto sobre el sistema biliar es similar a la observada en el páncreas: estimula las células de los conductos biliares para secretar HCO_3^- y agua, aumentando el volumen de la bilis y aumenta su flujo hacia el intestino.

Una vez que la bilis fue secretada por los hepatocitos y transportada hasta los colangiocitos ésta es almacenada en la vesícula biliar absorbiéndose de forma selectiva sodio, cloro y agua, en tanto que la absorción del potasio y calcio es menos completa y la concentración de bicarbonato en la bilis vesicular es dos veces mayor a la concentración en el plasma. Al absorberse el agua y electrolitos da lugar a una concentración 10 veces mayor de sales biliares, pigmentos biliares y colesterol que las correspondientes en la bilis hepática. El paso de elementos orgánicos e inorgánicos a través del epitelio vesicular depende de la barrera celular y la integridad de sus uniones intercelulares. La barrera celular tiene la función de regular el paso de iones, agua, diversas macromoléculas y células inflamatorias a través de los espacios paracelulares y es por lo tanto relevante para los trastornos de permeabilidad. Las principales proteínas integrales de membrana están formadas por uniones intercelulares continuas con ocludina, claudinas, y moléculas de unión. Las principales proteínas estructurales citoplasmáticas asociadas con las uniones estrechas son las de la zona ocludens ZO-1, ZO-2 y ZO-3, las cuales se unen a las colas citoplasmáticas de ocludina y claudinas. Estas proteínas juntas se cree que mantienen la integridad de las uniones intercelulares y su expresión y localización tienen un papel importante en la regulación de la permeabilidad paracelular (Jouko, et al., 2007).

En pacientes que presentan enfermedades, trastornos en la formación o función de las uniones intercelulares, representan factores que conducen a trastornos de la permeabilidad y finalmente, a la disfunción del órgano (Jouko, et al., 2007).

3.3 Mecanismos de formación de bilis

La bilis se forma por filtración en respuesta a gradientes osmóticos creados por el transporte de solutos osmóticamente activos en la luz canalicular biliar. El agua y solutos pequeños entran en el espacio biliar pasivamente, a través de arrastrar disolvente. Este proceso requiere energía en forma de ATP, y no se ve afectada por la presión hidrostática de la sangre que provienen de los sinusoides hepáticos de perfusión.

3.4 Circulación Enterohepática de los ácidos biliares

Algunos ácidos biliares secretados en el conducto biliar se reabsorben en los colangiocitos y son reciclados de nuevo a los hepatocitos (la derivación colangiohepática). La mayor parte de los ácidos biliares secretados se almacenan en la vesícula biliar. Después de cada comida, la contracción de la vesícula biliar vacía los ácidos biliares en el tracto intestinal, en el intestino delgado son absorbidos por los enterocitos como complejos lipoides. Estos complejos se desintegran en los enterocitos en monoglicéridos y ácidos grasos libres, estos son utilizados por las células como materiales de construcción o de energía y se transportan a la membrana basolateral de los enterocitos, para entrar en el sistema venoso portal y regresar por esta vía a los hepatocitos. Los ácidos biliares pueden regresar al intestino y continuar participando en el metabolismo y la absorción de las vitaminas y grasas (Floch, 2006).

La arteria hepática es el principal suministro de sangre al conducto biliar y rodea las ramas biliares con un plexo de anastomosis. La vena porta proporciona la fuente primaria de la sangre para las células parenquimatosas hepáticas, a través de los sinusoides hepáticos. Esta disposición estructural se piensa para proporcionar una circulación "cole-hepática", que puede permitir que los solutos que se retiran de la bilis por el epitelio biliar vuelvan a la circulación portal para la re-captación por el hepatocito para su uso metabólico o re-excreción en la bilis (Torres, 2004).

Más tarde, este ciclo enterohepático se repite. La circulación enterohepática es una importante ruta fisiológica para el reciclaje de los ácidos biliares y absorción de nutrientes, así como la regulación del metabolismo de los lípidos en todo el cuerpo (Floch, 2006).

3.5 Función de la bilis

La bilis tiene como funciones importantes (Monte et al., 2009);

1. La excreción de sustancias lipofílicas exógenas potencialmente dañinos, así como de otros sustratos endógenos tales como bilirrubina y sales biliares cuyos pesos moleculares son de 300 a 500 daltons.
2. La emulsificación de grasas.
3. La eliminación de colesterol.
4. La excreción de inmunoglobulina A (IgA), citocinas inflamatorias, y la estimulación del sistema inmune innato en el intestino.

3.6 Composición alterada de la bilis

El desequilibrio en la composición del líquido biliar con mayor frecuencia es debido a la sobresaturación de colesterol. La solubilización del colesterol ante un exceso del mismo, defecto de sales biliares o fosfolípidos tienen como resultado la formación de vesículas multilamelares sobre las que se produce la nucleación de los cristales de colesterol que darán lugar al lodo y litiasis biliar. Es importante recordar que las sales biliares provienen de la síntesis hepática y por la circulación enterohepática de aquellas secretadas al intestino, por lo que cualquier situación que altere dicha circulación enterohepática, como la resección ileal o la colectomía, condicionará una bilis más litogénica.

La principal causa de colecistitis crónica es la presencia de litos en la vesícula, la formación de los mismo están relacionados a 3 condiciones fundamentales; la supersaturación con colesterol, los defectos en la nucleación y la hipomotilidad vesicular. El desequilibrio entre la concentración de colesterol y sales biliares más fosfolípidos que tratan de mantenerlo en solución es básicamente, lo que predispone a la formación de cálculos (Ivanovich, 2013).

Nucleación de cristales de colesterol: en la bilis existen componentes que facilitan la formación de cálculos (factores litogénicos), como la mucina y la inmunoglobulina G, y otros que la inhiben (factores inhibidores), como ciertas apolipoproteínas y glucoproteínas (Turumin, et al., 2013).

Dismotilidad vesicular: la vesícula debe contraerse de manera eficaz, y así expulsar restos de microcristales o lodo biliar, que puedan desencadenar la formación de cálculos. Ciertas

situaciones asociadas con una menor contractilidad de la vesícula, como la nutrición parenteral prolongada o la exposición a altos niveles de estrógenos se relacionan con la presencia de colelitiasis (Turumin, et. al., 2013).

Esta composición alterada de la bilis predispone a tres tipos de cálculos: 1) colesterol, 2) pigmento negro, 3) pigmento marrón, los más frecuentes son los de colesterol (51 - 99%) que contiene una proporción variable de otros componentes incluyendo carbonato de calcio, fosfato, bilirrubinato y palmitato, fosfolípidos, glicoproteínas y mucopolisacáridos.

- a) Cálculos de colesterol; existen tres factores principales que determinan la formación de cálculos biliares de colesterol; la composición alterada de la bilis hepática, la nucleación de cristales de colesterol y la función alterada de la vesícula biliar (Dooley, 2011).
- b) Cálculos pigmentarios negros; constituyen el 20-30% de las colelitiasis, su incidencia suele aumentar con la edad. Se componen principalmente, de un pigmento de bilirrubina polimerizado, así como de carbonato y fosfato cálcico, por lo que su consistencia es dura. No contienen colesterol, el 60% son radioopacos y se asocian a condiciones de hemólisis crónica y a la cirrosis hepática. El mecanismo de formación no se entiende bien, pero la supersaturación de bilis con la bilirrubina no conjugada, cambios en el pH, la concentración de calcio y la sobreproducción de matriz orgánica (glicoproteína) juegan un papel importante (González et al., 2005; Dooley, 2011).
- c) Cálculos pigmentarios marrones; están compuestos por bilirrubinato cálcico, palmitato cálcico, estearato y colesterol (menos del 30%). Las piedras marrón son raras en la vesícula biliar, se forman generalmente en la vía biliar, en relación con estasis y sobreinfección de la bilis en más del 90%. Generalmente,

son radiolúcidos de consistencia blanda e intrahepáticos (González et al., 2005; Dooley, 2011).

3.7 Uniones Intercelulares

A principios del siglo XX se encontró que algunos materiales, por ejemplo, los macrófagos y el agua, podrían moverse a través del espacio paracelular, por lo que se empezó a estudiar la función de los epitelios (Anderson y Van Itallie, 2009).

Ahora se sabe bien, que los epitelios permiten el transporte selectivo de solutos y agua entre los compartimentos. Este transporte transepitelial se puede producir a través de dos rutas: 1.-transcelulares (transporte a través de la célula) atravesando la membrana plasmática apical o bien basolateral, 2.-paracelular (transporte entre las células) (Günzel and Alan, 2013). Los epitelios sirven como barreras a la difusión de solutos entre compartimentos corporales, y deben hacerlo a pesar de la frecuente pérdida de células (Hudspeth, 1975).

Las uniones celulares son puntos de contacto entre las membranas plasmáticas de las células o entre célula y matriz extracelular. La mayoría de las células epiteliales y algunas células musculares y nerviosas están estrechamente asociadas en unidades funcionales (figura 4).

La clasificación de las uniones se realiza mediante su función en tres grupos:

- Las uniones de oclusión o tight junction: sellan las células epiteliales vecinas de tal manera que evitan el tránsito libre de moléculas pequeñas de manera intercelular (figura 7).
- Las uniones de anclaje o adherentes: sujetan mecánicamente a las células y sus citoesqueletos con las células vecinas y la matriz extracelular (figura 5).
- Las uniones comunicantes: permiten el intercambio de señales químicas y eléctricas entre células adyacentes (figura 6).

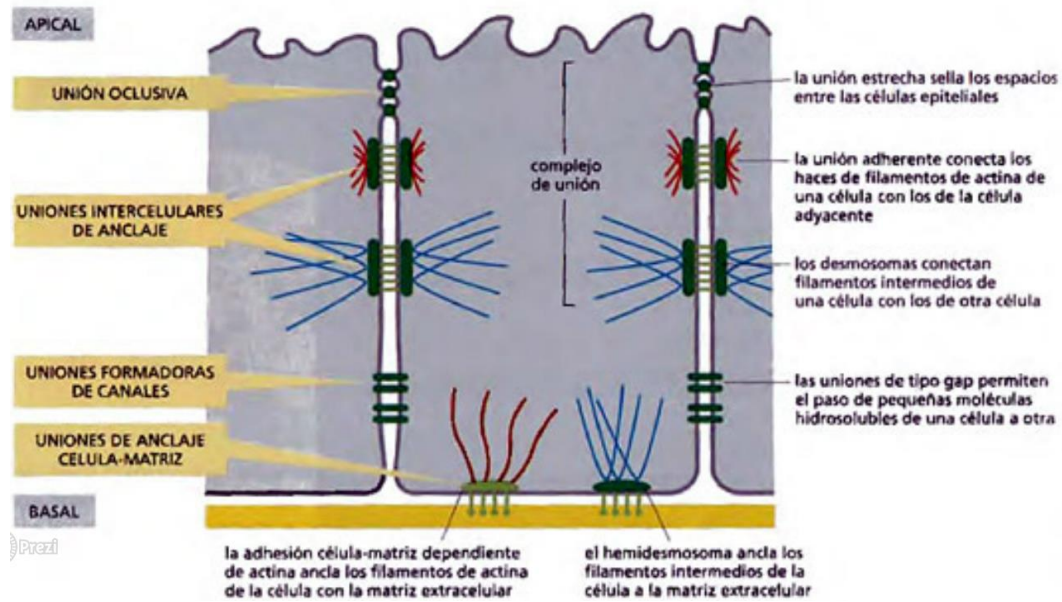


Figura 4. Uniones celulares y complejos de unión. (Reproducción de <http://www.asturnatura.com/articulos/envoltura-celular/membrana-plasmatica-uniones-intercelulares.php>).

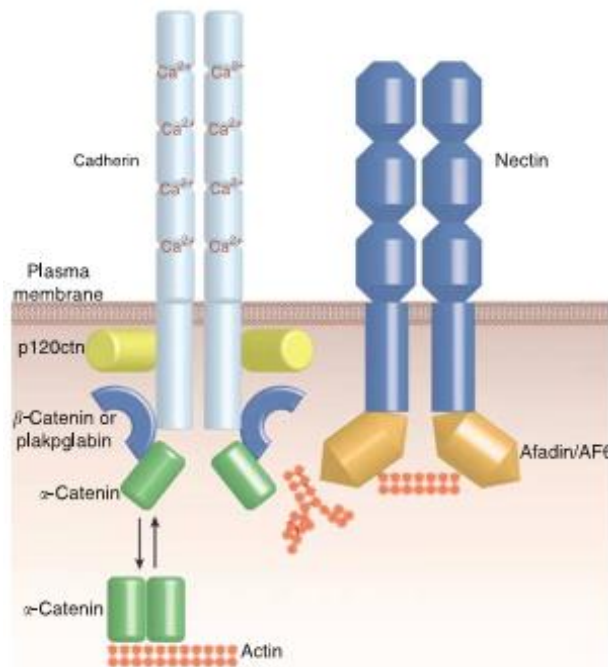


Figura 5. Componentes estructurales básicos de las uniones adherentes. Se muestran los complejos cadherina-catenina y nectina-afadina con sus posibles interacciones con la actina. (Günzel and Alan, 2013; Niessen, 2007).

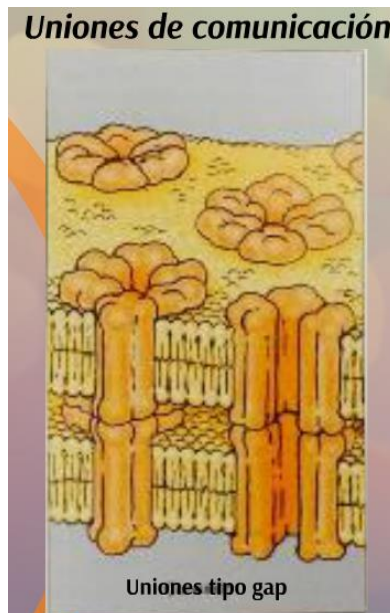


Figura 6. Uniones gap, comunican una célula con otra a través de proteínas que forman conductos, que acoplan metabólicamente y eléctricamente éstas (Cooper, 2010).

Cobran principal relevancia las uniones estrechas ya que pueden mantener los altos gradientes electroquímicos producidos por el transporte transcelular activo. Esta configuración se utiliza para producir las secreciones ya sea altamente concentrada o diluida (Anderson y Van Itallie, 2009). Estas tienen características que les permiten funcionar como barrera: 1) constituyen un precinto que previene el libre tránsito de las moléculas (incluyendo iones) entre las células de las láminas epiteliales, 2) separan los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática al impedir la libre difusión de los lípidos y de las proteínas de membrana entre ambos dominios (Cooper, 2010).

Las uniones estrechas suelen asociarse a uniones adherentes y a los desmosomas para formar un complejo de unión (figura 7).

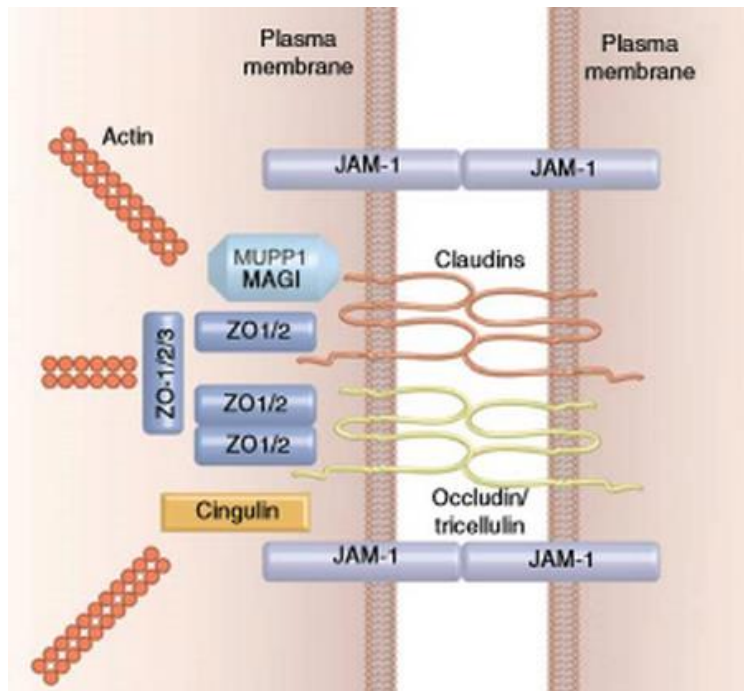


Figura 7. Componentes estructurales básicos transmembrana de uniones estrechas. ZO-1 o ZO-2 son importante para el agrupamiento de claudinas y ocludinas, lo que resulta en la formación de hebras de unión. El ZOs y Cingulin pueden proporcionar un vínculo directo con el citoesqueleto de actina. (Reproducción de Günzel and Alan, 2013; Niessen, 2007).

Las proteínas transmembrana de uniones estrechas se dividen en tres grupos:

1. proteínas transmembrana de dominio individual: JAM (molécula de adhesión de unión), CRB3 (proteína homólogo M. 3) y CAR (receptor constitutivo de androstano).
2. proteína transmembrana de triple dominio: BVES (del inglés blood vessel epicardic substance).
3. proteínas transmembrana de cuatro dominios: claudina y TAMP (proteínas de unión asociada apretados MARVEL) ocludina, tricellulin.

De éstos la evidencia sugiere que las claudinas son los principales determinantes de la permeabilidad paracelular. Las claudinas constituyen barreras tanto a nivel paracelulares como de los poros, por lo tanto juegan un papel clave en la determinación de las propiedades de permeabilidad de las células epiteliales y endoteliales (Günzel and Alan, 2013).

Además de actuar como una barrera selectiva de permeabilidad entre compartimientos acuosos, la unión estrecha epitelial tiene otra función, que es la de actuar como una valla dentro de la membrana celular, es decir, para restringir mecánicamente la difusión de proteínas y los lípidos dentro del plano de la bicapa lipídica (Günzel and Alan, 2013).

Una valla tal tendría que asegurar que los componentes lípidos y proteínas de la membrana plasmática, permanezcan separados en los dominios apical y basolateral, para asegurar la dirección en la que ocurre el transporte transepitelial (Günzel and Alan, 2013).

La célula epitelial de la vesícula biliar, cuenta con una región basal, membrana basal, región lateral, y región apical, en su región lateral permanecen sus medios de unión que le permite el contacto intercelular dando estabilidad a la membrana epitelial. Las uniones estrechas forman la barrera intercelular continua entre las células epiteliales, que se requiere para separar los espacios de los tejidos y regular el movimiento selectivo de los solutos a través del epitelio. Aunque ahora hay más de 40 proteínas identificadas dentro de la unión estrecha, las proteínas transmembrana de la familia Claudina, son claves para la definición de unión estrecha selectiva. Se ubican en las caras laterales de las células debajo de la superficie libre, con una distancia intercelular de 0.1-0.3 μm . Sus proteínas transmembrana son ocludina y claudina con funciones de estabilidad, soporte y transporte selectivo (Anderson and Van Itallie, 2009).

3.8 Citoesqueleto

El citoesqueleto es una estructura dinámica de las células eucariotas que permite mantener o cambiar la forma celular reaccionando a estímulos externos o internos. Está formada por tres tipos de filamentos de proteínas de diferente composición, función y características (filamentos de actina, filamentos intermedios y microtubulos), la interacción dinámica entre estos, regulan en gran parte la organización estructural del citoplasma de la célula animal (Cooper, 2010).

Filamentos Actina

También llamados microfilamentos, miden aproxima 7 nanómetros de diámetro y varios nanómetros de largo. Están formados por la proteína más abundante de la célula “actina”. Se caracterizan por dar el soporte mecánico, la forma celular y el movimiento celular (Guirado, 2002).

Son formados por un equilibrio entre los monómeros de actina para formar el filamento, en el cual existe un intercambio rotatorio de dicha proteína, gracias a la participación de 2 proteínas importantes, la cofilina que une ADP a la actina ADP impidiendo su reincorporación al filamento y la profilina que invierte en la función de cofilina al intercambiar ADP por ATP, permitiendo la reincorporación de actina al filamento (Guirado, 2002; Cooper, 2010).

Los filamentos de actina se organizan en dos componentes; 1) haces de actina, a su vez divididos en haces de filamentos agrupados y filamentos espaciados; 2) redes de actina, encargadas de dar forma a la célula y movimiento, mediante proteínas específicas para cada tejido. (Guirado, 2002; Cooper, 2010)

Microtúbulos

Son tubos rígidos y huecos de 25 nanómetros de diámetro. Y son importantes para dar forma y estabilidad a la célula, son GTP asa dependientes, transportar vesículas y lisosomas, al igual que los filamentos de actina, tiene polaridad por su comportamiento dinámico regulando su crecimiento o alargamiento (Howard, 2009).

Los microtubulos son formados por dímeros de alfa y beta tubulina que se polimerizan formando largos túbulos huecos. Tanto la tubulina alfa y beta contienen un sitio GTP, sin embargo el sitios GTP α -tubulina no se hidroliza ya que se encuentra unido a la β -tubulina, mientras que el sitio GTP de la β -tubulina permite la hidrólisis y por lo tanto desencadena la polimerización de los dímeros de tubulina, formando largos tubos huecos rígidos, los cuales conocemos con el nombre de microtúbulos (Figura 8). Éstos se formarán dentro del MTOC (centro organizacional de microtúbulos) el cual está constituido por centriolos (9 tripletes de tubulina, rodeados por delta y gamma tubulina que favorecen la nucleación). Su crecimiento también está mediado por proteínas motoras como cineinas que permiten el movimiento del microtúbulo hacia el extremo negativo y las cinecinas que permiten la dirección hacia el extremo positivo (Howard, 2009).

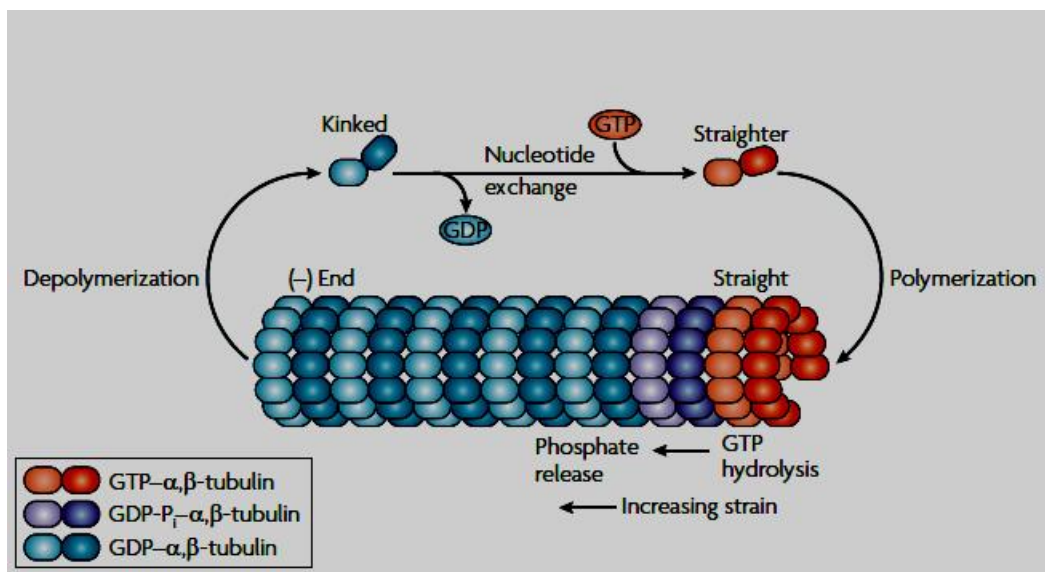


Figura 8. Ciclo GTPasa tubulina. El intercambio de GDP por GTP del heterodímero de tubulina en el citoplasma endereza parcialmente la subunidad PIB-tubulina. La subunidad GTP-tubulina endereza totalmente cuando se encuentra unida a la pared de los microtúbulos después de la polimerización. Después de la hidrólisis, el dímero PIB-tubulina es aún más firme, esto impulsa la despolimerización, completando el ciclo (Howard, 2009).

Filamentos intermedios

Están formados por una variedad de proteínas altamente conservadas, que no se sabe si tienen actividad enzimática, codificadas por un gran número de genes (aproximadamente 67 genes). Se pueden expresar en componentes complejos durante el desarrollo embrionario y durante la diferenciación celular, permitiendo distinguir una célula de otra (Chang, 2004).

Estos filamentos forman redes dentro del citoplasma, que rodean el núcleo para después dirigirse a la superficie, esta extensión en el citoesqueleto, proporciona una ventaja en éste ya que permite la coordinación y reordenamiento de la información entre la superficie celular y los compartimentos intermedios de la célula (Chang, 2004; Cooper, 2010).

Se clasifican en 5 grupos con respecto a su estructura primaria, su estructura genética, sus propiedades de ensamble y la regulación del desarrollo de tejidos específicos: I y II; son homodímeros obligatorios ubicados en células epiteliales, III, IV y V; son homodímeros o heterodímeros. El tipo III se encuentra especialmente, en sistema nervioso y esquelético, el IV está en neuronas, el V se encuentra en todos los tipos celulares ya que están constituidos por proteínas laminares A,B,C, que forman parte de la membrana nuclear (Chang, 2004).

Los filamentos intermedios intervienen en la diafonía celular, al entrar en contacto con los microtúbulos, los filamentos de actina, cinesinas y la miosina V (figura 9) (Chang, 2004).

Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP), tales como Tau y MAP2 / 4, pueden modular la actividad de los filamentos intermedios (IF) tipo III y tipo IV, al competir con los sitios de unión del microtúbulos (MT). Proteínas de filamentos intermedios asociadas a multidominio (IFAPs) como plectina también podrían regular o inhibir la motilidad de las estructuras intermedia de IF, mediante la formación de numerosos enlaces cruzados entre

los filamentos intermedios, los microtúbulos y los microfilamentos de actina (MF). (Chang, 2004).

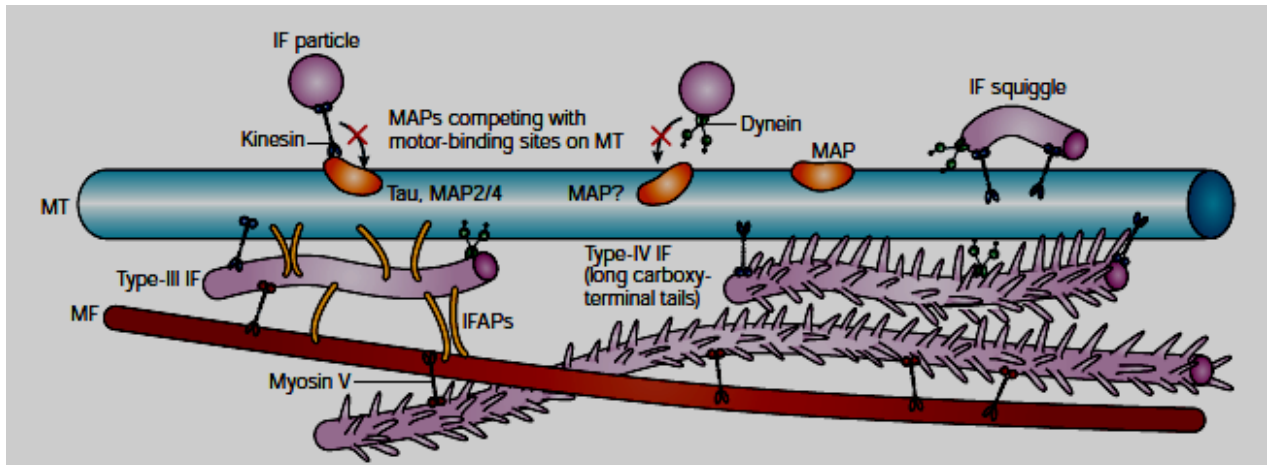


Figura 9. Filamentos intermedios.

Transducción de señales y citoesqueleto

Las funciones celulares dependen en gran medida de la adhesión celular y la organización del citoesqueleto. La unión de la mayoría de estas moléculas señalizadores y sus receptores provocan una cascada de reacciones intracelulares que son las que regulan, en gran medida los diferentes aspectos del comportamiento celular, incluyendo su metabolismo, la motilidad, la proliferación, su supervivencia y la diferenciación (Cooper, 2014).

El ensamblaje de las proteínas que constituyen los filamentos intermedios es regulado por la protein cinasa C (PKC), la protein cinasa A (PKA), la cinasa 2 dependiente de calmodulina (CAMK), vimentina Rho GTPasa, la cinasa P21 activada (PAK) y la cinasa P38, todas estas cinasas crean una red de señalización que permite el crecimiento de los 3 componentes de citoesqueleto (Figura 10) (Chang, 2004).

Además la superfamilia de proteínas Ras, dentro de las cuales se incluye la familia de proteínas Rho, resulta de particular interés. Las GTPasas-Rho participan en la regulación y

organización del citoesqueleto de actina, activan cascadas de cinasas que regulan la expresión génica, controlan la progresión del ciclo celular y la proliferación celular (Guirado, 2002).

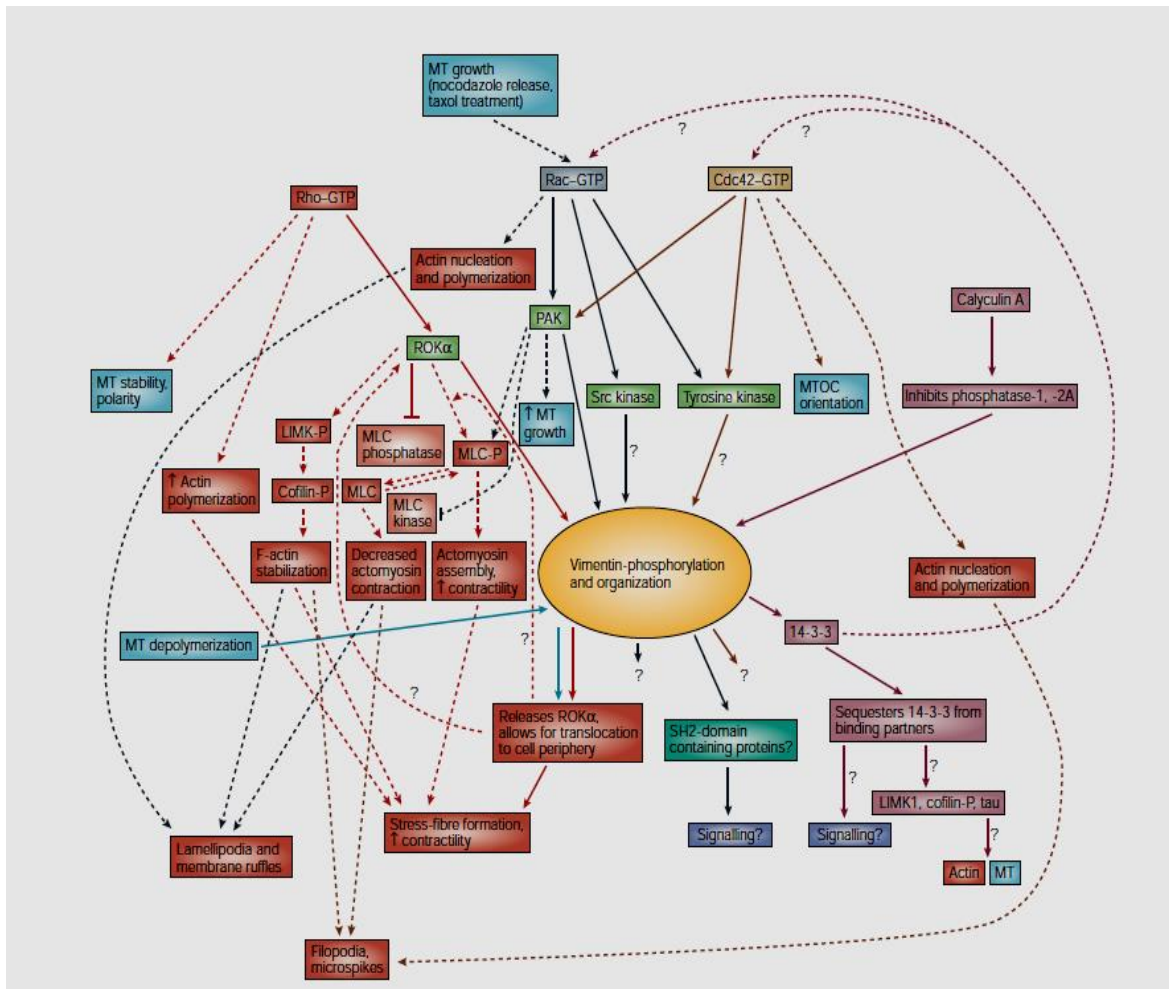


Figura 10. Vimentina Rho GTPasa, señalización del citoesqueleto. Los miembros de la familia Rho GTPasa, tales como, Rac y Cdc42 inducen la fosforilación y la reorganización de la vimentina a través de cinasas tales como Rho-cinasa de unión α (ROK α), la cinasa P21 activada (PAK), cinasa tipo Src y la tirosina cinasa (flechas en negrita). Los ROK α se asocian con la red vimentina en estado inactivo y la fosforilan. Cabe señalar que las flechas no necesariamente denotan interacciones directas (Chang, 2004).

3.9 Respuesta inflamatoria vesicular

La respuesta inflamatoria está relacionada con el proceso de reparación y es fundamental como respuesta de protección, sin embargo ésta puede ser perjudicial. La inflamación presenta dos fases bien diferenciadas, aguda y crónica (Robbins y Cotran, 2010). La inflamación aguda es una respuesta a una alteración inducida por un patógeno o un agente físico o químico que tiene por función reconocer, limitar y eliminar el daño, así como restaurar la homeostasis al tejido afectado, con evolución relativamente breve de minutos, horas y pocos días.

La inflamación crónica tiene una duración mayor y se caracteriza histológicamente, por la presencia de linfocitos y macrófagos, la proliferación de vasos sanguíneos y la fibrosis que desencadena eventos celulares que pueden promover la transformación maligna de las células y la carcinogénesis (Robbins y Cotran, 2010).

Los receptores de membrana de los macrófagos, se encargan de reconocer a los antígenos y eliminarlos mediante fagocitosis y presentación del antígeno, induciendo la expresión de proteínas pro inflamatorias como la citocinas (IL-1, IL-4, IL-6, IL-8), interferones (IFN- γ), factor de necrosis tumoral (TNF- α) que desencadenan una respuesta inflamatoria con la intención de neutralizar la agresión (Longo et al., 2012).

En la inflamación aguda una vez controlada la agresión, los macrófagos y leucocitos proceden a la reparación tisular, liberando nuevos mediadores, esta vez citocinas antiinflamatorias (IL-10, factores de crecimiento, TGFB y otros) para restaurar la homeostasis (Longo et al., 2012).

El hígado y los conductos biliares extrahepáticos están conformados por hepatocitos y células epiteliales biliares (BEC), células inmunológicamente activas, las BEC en los conductos biliares inflamados participan mediante la secreción de citocinas y la expresión de algunos receptores, además existen otras células epiteliales BEC que reconocen los microbios y sus componentes, a través de un conjunto de receptores de reconocimiento de patrones (RRP). El paso de dichas citocinas al líquido biliar vesicular depende de la integridad de las uniones intercelulares, como se sabe estas citocinas son parte de la

respuesta inflamatoria normal ante un agente patógeno, sin embargo, pueden ser dañinas al epitelio siendo capaces de desencadenar eventos celulares que pueden promover también la transformación maligna de las células y la carcinogénesis (ver tabla 2) (Landskron, et al., 2014).

Tabla 2. Importancia de la citocinas en las neoplasias (Tejedor y Albillos, 2012).

Citosinas	Referencias de colangiocarcinoma (CCA)
TNF- α	Esencial para la proliferación de las células epiteliales de las vías biliares. Altera la función de barrera del epitelio. Interrumpe las uniones intercelulares de los colangiocitos e influye en el agravamiento de la colestasis del conducto biliar.
IFN- γ	Reduce la resistencia eléctrica transepitelial. Altera las uniones intercelulares del colangiocitos, lo que lleva a colestasis.
IL-6	Los colangiocitos y CCA pueden ser activados por citocinas proinflamatorias a través de la ruta de NF-B-dependiente, que conduce a la sobreproducción del factor de crecimiento epitelio del conducto biliar, promoviendo así la iniciación y la progresión del cáncer
TGF-B	Promueve la proliferación de las células epiteliales del conducto biliar e induce la agresividad del tumor mediada por transición epitelio-mesénquima (EMT)
IL-8	Secretadas por colangiocitos en respuesta a citocinas proinflamatorias y junto con MCP-1 y CCL-28 promueve la adhesión de leucocitos y la retención en las células epiteliales biliares lesionadas.
IL-10	En el CCA puede activar macrófagos M2 a través de la vía de STAT-3, lo que lleva a la producción de IL-10, VEGF-A, TGF- β , y MMP-2.
IL-17	Un tumor infiltrado de IL-17 que se encuentran en áreas intratumorales en el

CCA se relaciona a metástasis en los ganglios linfáticos, metástasis intrahepática y a etapas avanzadas.
--

Las citocinas pueden modular una respuesta antitumoral, pero durante la inflamación crónica, también puede inducir la transformación celular y la malignidad, condicionada al balance pro y anti-citocinas inflamatorias, sus concentraciones relativas, la expresión del receptor de citocinas y el estado de activación de las células circundantes (Landskron, et al. 2014).

II. ANTECEDENTES

A pesar de la importancia y los diversos estudios que demuestran que la función de las uniones estrechas de la vesícula biliar, son relevantes para el transporte paracelular de agua y macromoléculas, existen escasos artículos que reporten el comportamiento de dichas uniones durante un proceso patológico, específicamente colelitiasis. Recientemente, se ha estudiado a claudina 2 como factor predisponente para desarrollar cálculos biliares en ratones, demostrándose que regula la concentración de iones y el flujo de agua necesaria para la adecuada composición de la bilis y su flujo. El desequilibrio de este proceso, aumenta la susceptibilidad en ratones a la enfermedad de cálculos biliares de colesterol (Matsumoto, et al., 2014). En 2007 Jouko y cols., estudiaron la expresión de proteínas de las uniones estrechas en colecistitis litiásica y alitiásica a través de inmunohistoquímica, estas se expresaron ampliamente en el epitelio de la vesícula biliar humana normal, con excepción de Claudina 2 que se encontró solo en la mitad de las células, mientras que aquellos con colecistitis litiásica aguda se encontró significativa disminución en la expresión de Claudina -2, -1,-3, -4, Ocludina y ZO-1 al compararla con aquellas vesículas normales.

Existen otros estudios en los que se investigaron las alteraciones en las proteínas transmembrana de las uniones estrecha y su relación con procesos neoplásicos como es el caso de las proteínas ZO-1 (zona ocludens-1), ocludina y E-cadherina en cáncer de las vías biliares (colangiocarcinoma intrahepáticos, extrahepáticos, y de vesícula biliar),

encontrándose que éstas disminuyen en los carcinomas (Németh y cols. 2009). Por otro lado, se encontró una expresión diferencial de claudinas-1, -2, -3, -4, -7, -8, -10 en células cancerígenas de las vías biliares (Németh, et al., 2009). De manera más reciente, se estudió la expresión de claudina1, ocludina, E-cadherina en humanos, como reguladoras de unión célula- célula, asociándolas a parámetros clínico-patológicos en procesos benignos (adenomas, pólipos y colecistitis crónica) y malignos (adenocarcinomas) de la vesícula biliar. Como resultado se obtuvo que los pacientes con patología benigna o maligna expresaron menos claudina-1, ocludina-1 y E-cadherina, a excepción del adenocarcinoma bien diferenciado en el que la expresión de las misma fue mayor (Xiong, et al., 2011).

En cuanto al estudio de la respuesta inmune como proceso inflamatorio y la producción de citocinas presentes en la colecistitis litiásica, se reportaron citocinas presentes en una fase aguda de la enfermedad IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β (Buck, et al.2009). En 2010 se encontró que la IL-8 (importante citocina de los neutrófilos, que no solo funciona como un quimio-atrayente de neutrófilos, basófilos, y algunas poblaciones de células T, sino también como un activador de los neutrófilos para la liberación de leucotrienos, oxígeno activado y neutrófilos) las BEC humanas cultivadas la expresan en respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) bacterianas incluyendo lipopolisacáridos (LPS), proponiéndose que producen daño hepático y biliar (hígado séptico) (Harada y Nakanuma, 2010)

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que el paso del líquido biliar del hepatocito a los conductos biliares y la vesícula está determinado por la permeabilidad de su membrana celular (unión célula-célula), definiendo las características de la bilis, sin embargo no existen estudios de la integridad de las uniones estrechas su relación con el líquido biliar y el proceso inflamatorio de la mucosa vesicular.

IV. JUSTIFICACIÓN

La colecistitis crónica litiásica es la primer causa de consulta en el servicio de cirugía general en nuestro país y tiene gran impacto en diferentes áreas, por lo que, es de gran interés entender su fisiopatología e identificar los factores de riesgo que favorezcan el proceso inflamatorio vesicular, para poder implementar medidas preventivas o tratamientos que eviten que el paciente llegue a quirófano reduciendo así la incidencia, prevalencia y morbi-mortalidad de dicha enfermedad. Por otro lado, es de suma importancia para el sustento económico y desarrollo de sistema de salud de nuestro país, pues se calcula que el costo por cada paciente que es sometido a colecistectomía oscila entre 30 000 y 40 000 pesos, representando una gran derrama económica. A medida que se comprenda mejor la alteración en uniones estrechas y líquido biliar así como su importancia en el proceso inflamatorio se podrá dar un mejor tratamiento, seguimiento y evolución clínica del paciente con colecistitis litiásica.

V. HIPÓTESIS

La pérdida de la integridad de las uniones estrechas favorece la formación de bilis litogénica y permite el ingreso de mediadores inflamatorios en la colecistitis litiásica.

VI. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el papel de las uniones estrechas y del líquido biliar en la colecistitis litiásica.

Objetivos Específicos

1.- Determinar en pacientes con colecistitis litiásica:

- Las características físicas de los litos.

- La concentración de colesterol, fosfolípidos y ácidos biliares del líquido biliar.
- Las características histopatológicas de la vesícula.
- La integridad de las uniones estrechas en la vesícula biliar.

2.- Establecer la relación entre las características del líquido biliar y la alteración de las uniones estrechas del epitelio vesicular.

3.- Establecer la relación entre la integridad de las uniones estrechas, las características del líquido biliar y la existencia de citocinas inflamatorias así como de los cambios histológicos en la mucosa vesicular como signos del proceso inflamatorio.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño de estudio: Cohorte prospectiva, observacional.

Universo de estudio: 25 pacientes del servicio de cirugía general del Hospital General de México, de la Secretaría de Salud con diagnóstico de colecistitis litiásica que fueron sometidos a colecistectomía, sin importar género, entre 20 y 70 años, en un periodo entre el 1° de marzo al 30 de diciembre del 2015.

Criterios de selección

Criterios de Inclusión

- Pacientes con diagnóstico de colecistitis litiásica que vayan a ser sometidos a colecistectomía.
- Pacientes que firmen el consentimiento informado.

Criterios de No inclusión.

- Pacientes que no firmen el consentimiento informado

- Pacientes Diagnosticados con Colecistitis litiásica que se encuentren en tratamiento con medicamentos anti-litos.

Criterios de exclusión.

- Pacientes que no deseen continuar en el estudio
- Pacientes diagnosticados con Colecistitis litiásica y que al momento de la cirugía no se encuentren litos.
- Pacientes con Colecistitis litiásica que durante la cirugía se perfore la vesícula o salga el contenido biliar.

Casos Control

Criterios de Inclusión.

- Personas entre 20 y 60 años que fallecieron por causas no relacionadas con el sistema digestivo.
- Quienes cuenten con la firma del consentimiento informado por el familiar responsable.

Criterios de No inclusión.

- Paciente con diagnóstico de defunción que alteren el líquido biliar y la mucosa vesicular (Ej. choque séptico, CID)
- Pacientes que en vida fueron diagnosticados con colecistitis crónica litiásica.
- Personas que tengas más de 5 h de muerte

Criterios de exclusión.

- Pacientes que durante la autopsia se encuentren con litos en la vesícula biliar.
- Pacientes que presenten o que durante el procedimiento se dañe en el tejido.

Variables

Variable independiente: uniones estrecha de la vesícula biliar, de carácter nominal

Variable dependiente: liquido biliar, de carácter continuo

Metodología

1. Se diagnosticó y canalizo a pacientes de la consulta externa y urgencias al servicio cirugía general con diagnóstico de colecistitis litiásica, se les realizo un cuestionario dirigido a aquellos antecedentes de importancia para el desarrollo de la patología.
2. Los pacientes se sometieron a colecistectomía laparoscópica donde se extrajo la vesícula biliar íntegra para nuestro estudio.
3. Se toma una muestra de 10ml de líquido biliar en una jeringa estéril, de los cuales se repartieron 5 ml en un vial y 5 ml en otro. Posteriormente ambos se congelaron a -70° , posteriormente se realizó estudio de cromatografía para determinar las características del líquido biliar (colesterol, fosfolípidos y ácidos biliares).
4. Se extrajo los litos y se describieron físicamente.
5. Se tomaron muestras de tejido vesicular de 1 cm x 1 cm y se realizó:
 - Estudio histopatológico donde se observó la morfología y la existencia de infiltrado inflamatorio, en cortes teñidos con hematoxilina eosina; el tejido se procesó en bloques de parafina fueron cortados a 4 micras, teñidos y observados al microscopio.
 - Determinación de la presencia e integridad de las uniones estrechas para proteínas transmembrana claudina 1,2,3,5, ocludina y ZO-1, por inmunofluorescencia.

Estudio de líquido biliar

El estudio del líquido biliar que se realizó se hizo por el laboratorio del Hospital General de México utilizando el kit Wako Cholesterol E y Diazyme Total Bile Acids Assay Kit.

Estadística

Se usó el software Graph pad Prism, con los test de distribución t de Student y prueba de X^2 .

Consideraciones éticas

Se trata de un estudio prospectivo, la información clínica será extraída directamente de los pacientes, expedientes clínicos y familiares, esta información será confidencial y el resultado será entregado en sobre cerrado al médico tratante, para su información al paciente. Se le informará al paciente que podrá abandonar el estudio si así lo quiere, que la toma de muestras no influirá en el tratamiento o en la evolución clínica y que esto no está condicionado al derecho a la atención ni al tratamiento.

VIII. RESULTADOS

1. Recolección de muestras y hoja de datos

Entre el 1° de marzo del 2016 al 30 de diciembre del 2018, se incluyeron a 25 pacientes del Hospital General de México que tras ser valorados mediante anamnesis, exploración física y estudios de gabinete se diagnosticaron con colelitiasis. En el grupo de estudio se encontró un mayor porcentaje en el género femenino con 98%.

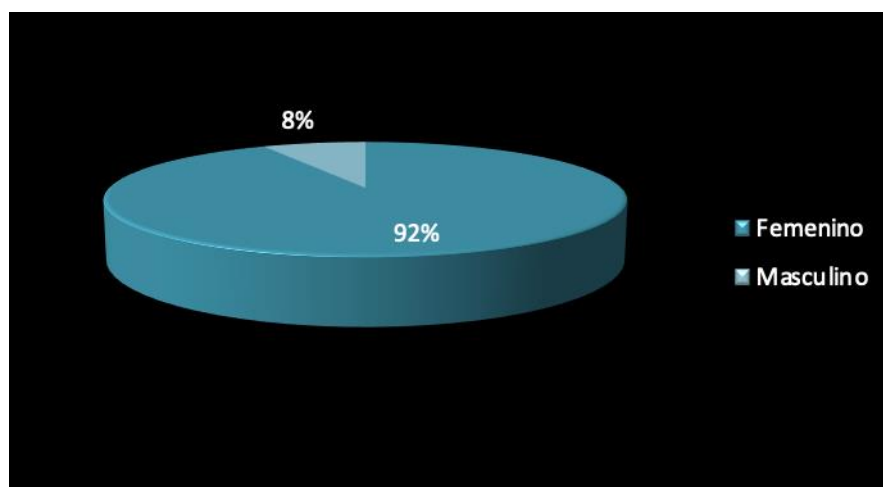


Figura 12. Género de la población

A partir de los datos obtenidos de la anamnesis se identificaron en la población factores de riesgo para desarrollar colelitiasis. (Figura 13)

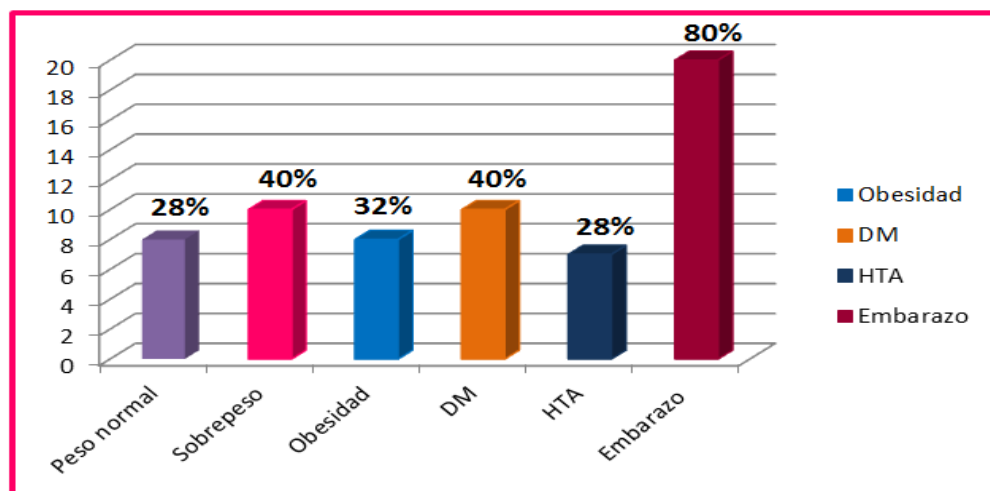


Figura 13. Factores de riesgo presentes en el grupo de estudio.

En el transoperatorio se obtuvieron los litos de la vesicula biliar y se describieron macroscopicamente, encontrando de manera mas frecuente litos de colesterol en un 48%.

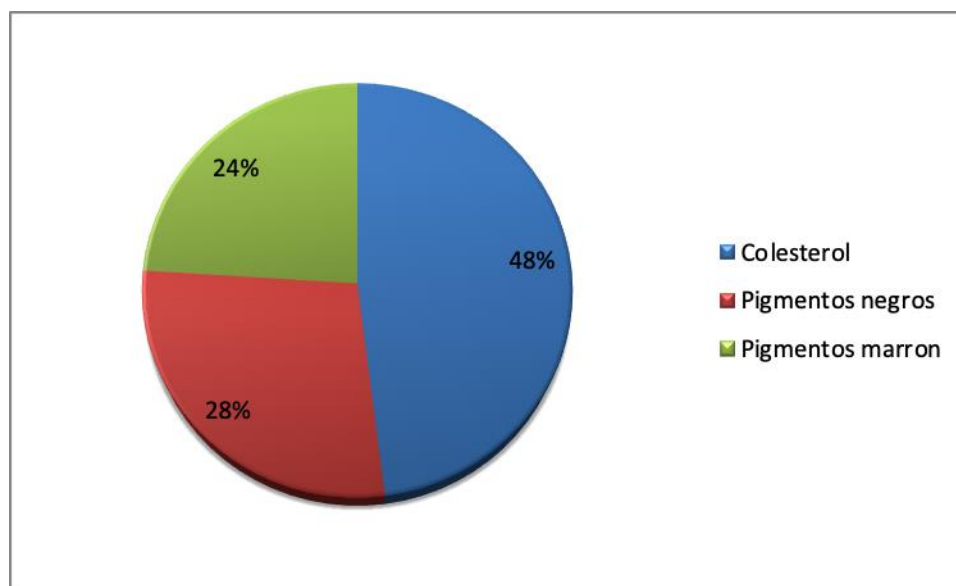


Figura 14. Descripción macroscópica de los litos presentes en colelitiasis

En la tabla 3 se muestra la fuerza con la que se relacionan los factores predisponentes y el desarrollo de litos de colesterol. Los pacientes con Colelitiasis que presentan *Diabetes Mellitus (DM)* tienen 6 veces mas probabilidad de desarrollar litiasis por colesterol, mientras que los que presentar peso corporal anormal como sobrepeso y obesidad aumentas la probabilidad de desarrollo de litos de colesterol, 1.2 y 7 veces mas frecuente que aquellos que se mantienen en Normo peso. Los datos reportados para Hipertencion arterial sistemica (HTA) y normopeso tuvieron una asociación negativa, es decir, que no existe factor de riesgo.

Tabla.3 Riesgo a desarrollar litos de colesterol según los factores de predisponentes

	DM	HTA	Normo peso	Sobrepeso	Obesidad
Riesgo relativo	RR= 6.0	RR=0.8	RR=0.5	RR=1.2	RR=7

Riesgo atribuible	RA _t =0.5	RA _t =0	RA _t =0	RA _t =0.1	RA _t =0.6
Riesgo absoluto de la población	RA=0.4	RA=0.28	RA=0.28	RA=0.5	RA=0.5

2. Análisis Morfológico

Para el análisis morfológico se tomaron en cuenta diferentes criterios y hallazgos que se podrían presentar en la colelitiasis (Figura 15).



Figura 15. Criterios Morfológicos.

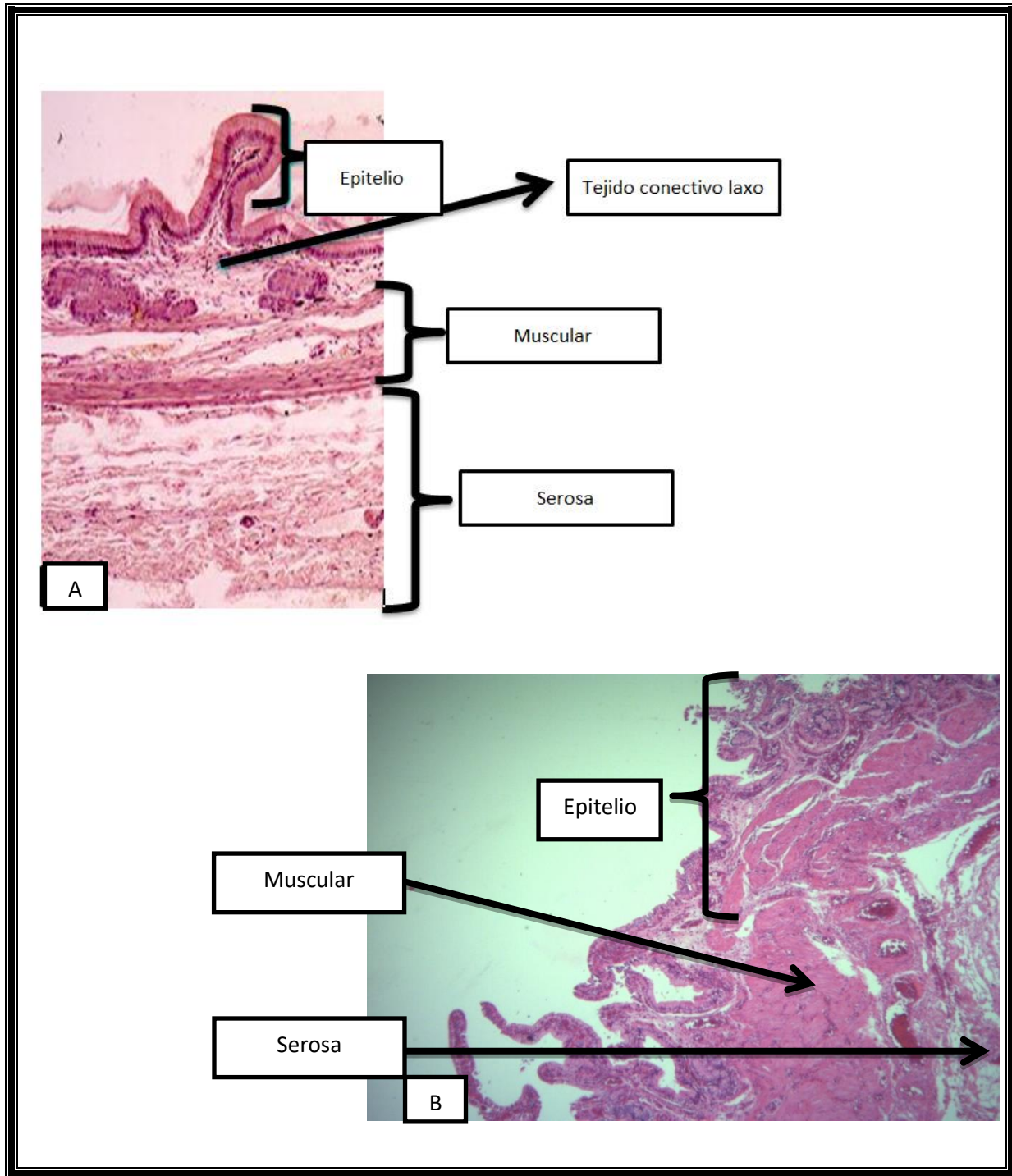


Figura 16. Histología de vesícula biliar, grupo control y estudio A) Vesícula biliar humana sin patología y con todas su capas histologicas. B) Vesicula biliar humana con colelitiasis, que presenta hipertroia leve de la mucosa e hipertrofia moderada de la muscular, edema de la muscular,asi como vasos congestivos. 40x. Técnica Hematoxilina-Eosina.

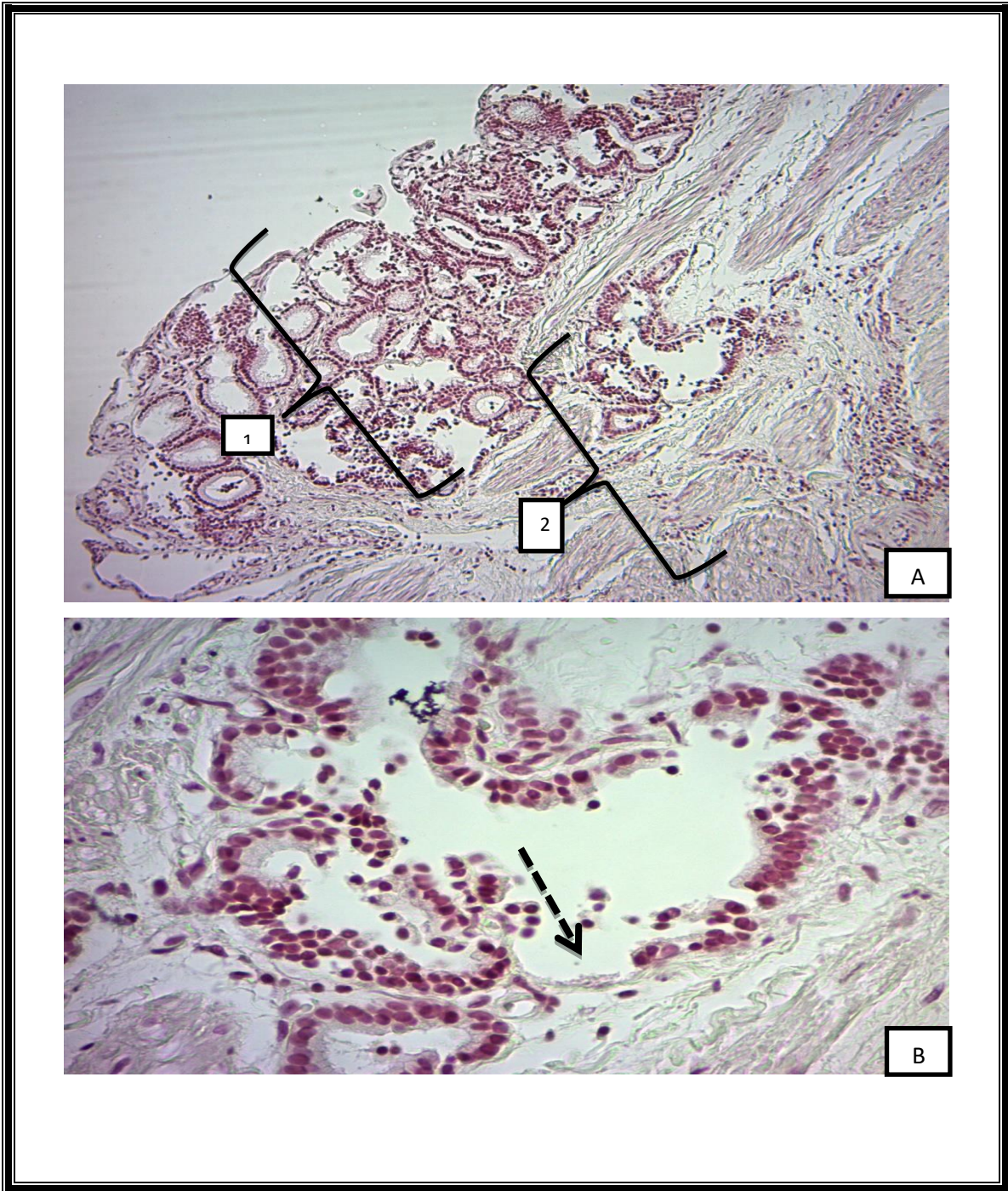


Figura 17. Histología de vesícula biliar humana. A) corte a 4 micras de vesícula biliar, 1A epitelio vesicular con hipertrofia severa, 2A Capa muscular de la vesícula biliar, con presencia de seno de Rokitansky, hipertrofia y edema importante. B) Aumento de la imagen 2A, donde se observa a el seno de rokitansky con una perdida importante del epitelio (fecha negra). 40x. Técnica Hematoxilina-Eosina.

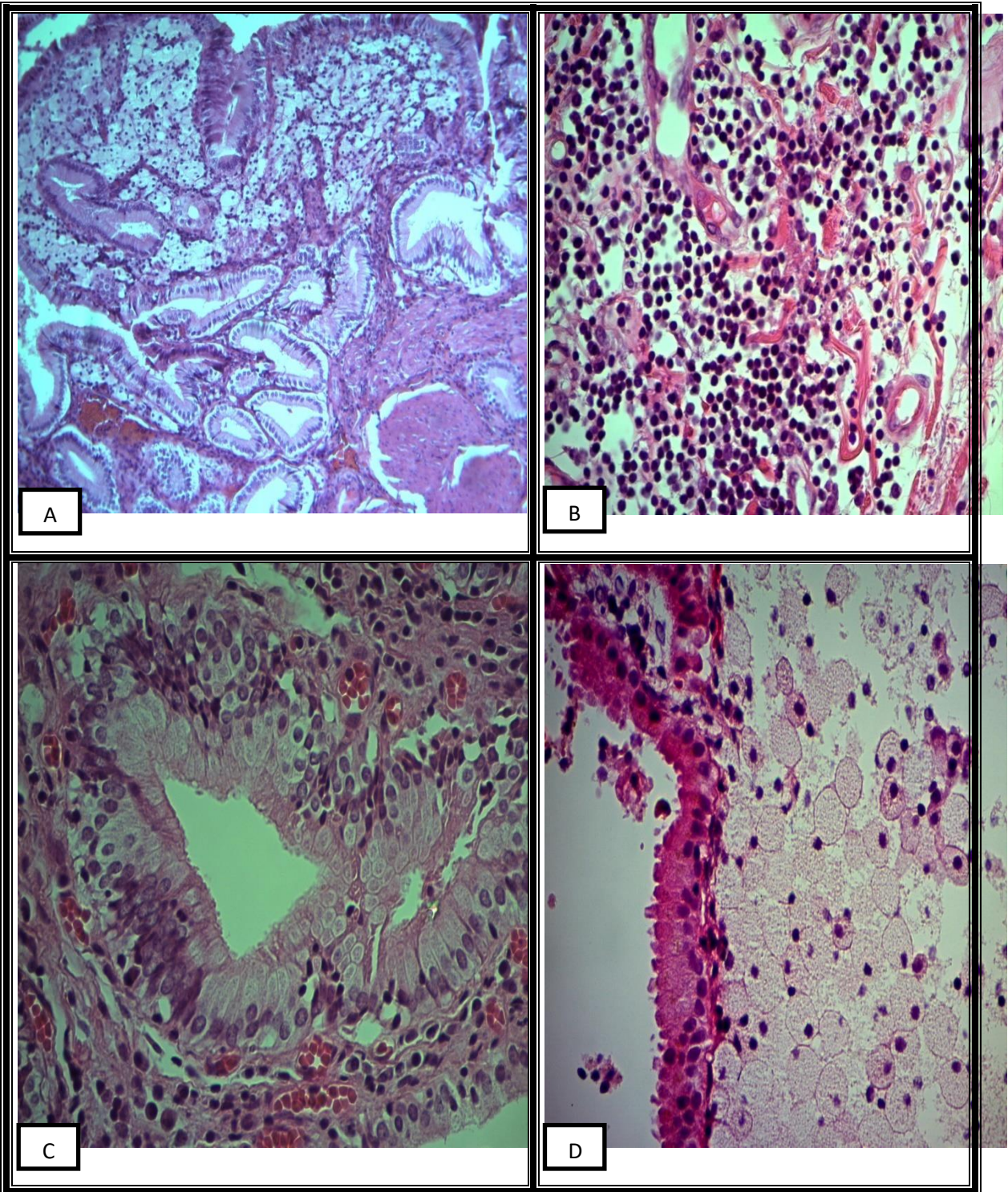


Figura 18. Cortes histológicos de vesícula biliar humana. A) Se observa hiperplasia del epitelio, así como un conglomerado de macrófagos espumosos (colesterosis), por debajo del epitelio, múltiples senos de Rokitansky, edema de la muscular y vasos congestivos. B) epitelio de la figura A, ha mayor aumento donde se observa un importante infiltrado

mononuclear. C) Seno de Rokitansky a mayor aumento donde se observa hiperplasia leve e hipertrofia moderada del epitelio, dicho seno rodeado de macrófagos espumosos, infiltrado mononuclear, edema y congestión vascular. D) Macrófagos espumosos conglomerados debajo del epitelio y presencia importante de edema.

En la figura 19 se observa graficado los resultados obtenido del análisis morfológico de los 25 pacientes estudiados.

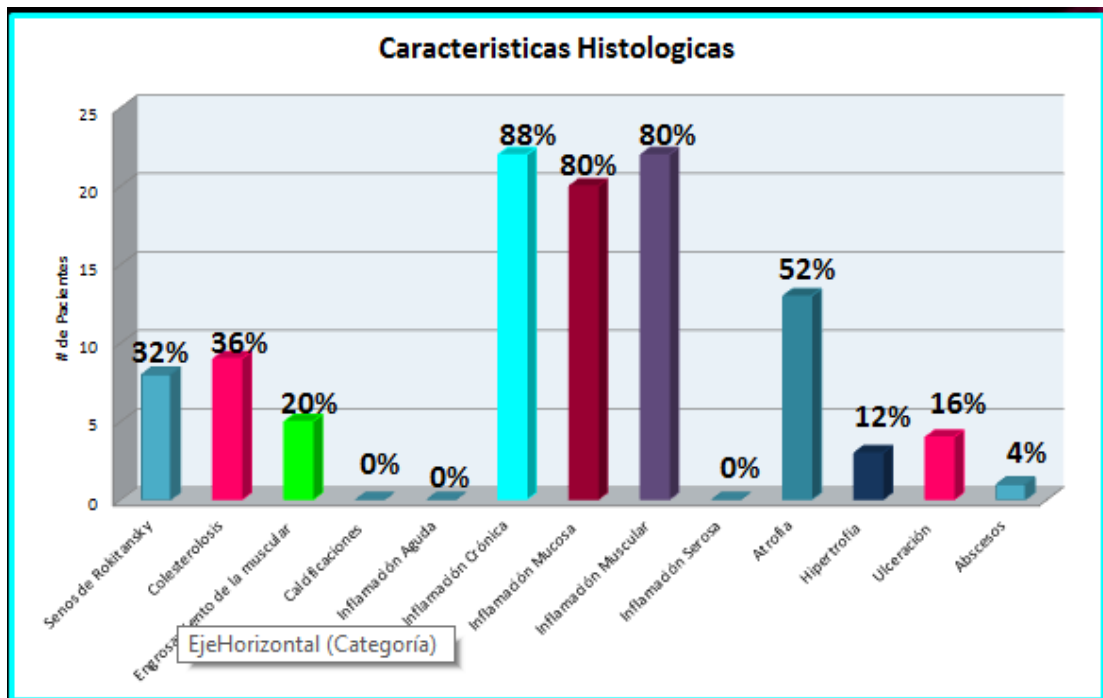


Figura 19. Análisis morfológico

3. Integridad de uniones estrechas

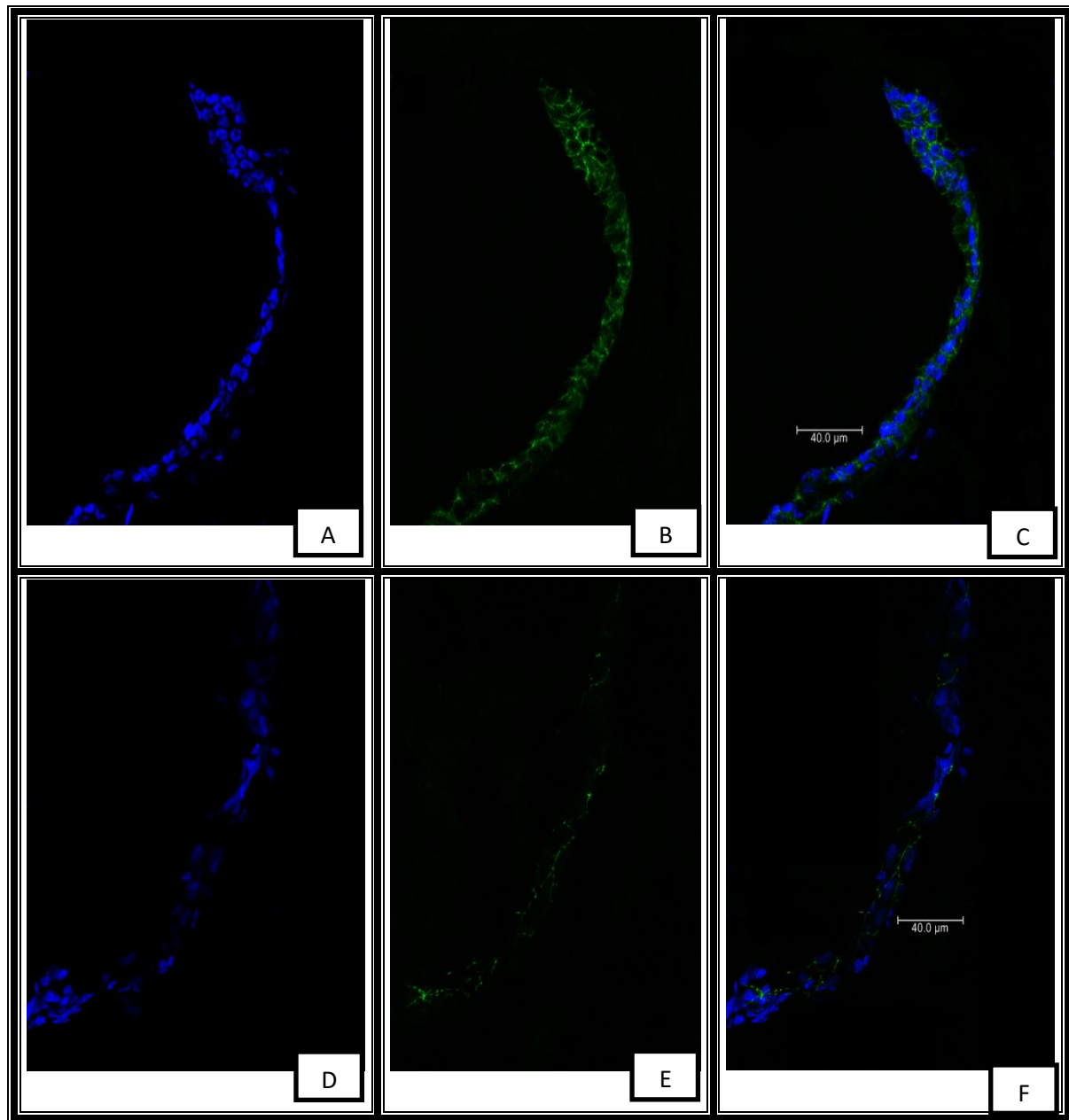


Figura 20. Imagen representativa de inmunofluorescencia en corte de vesícula biliar en presencia de Claudina-1. En verde se muestra Claudina-1, en azul los núcleos, (a, b, c) pacientes control, (d, e, f) pacientes problema. Microscopía confocal 40x.

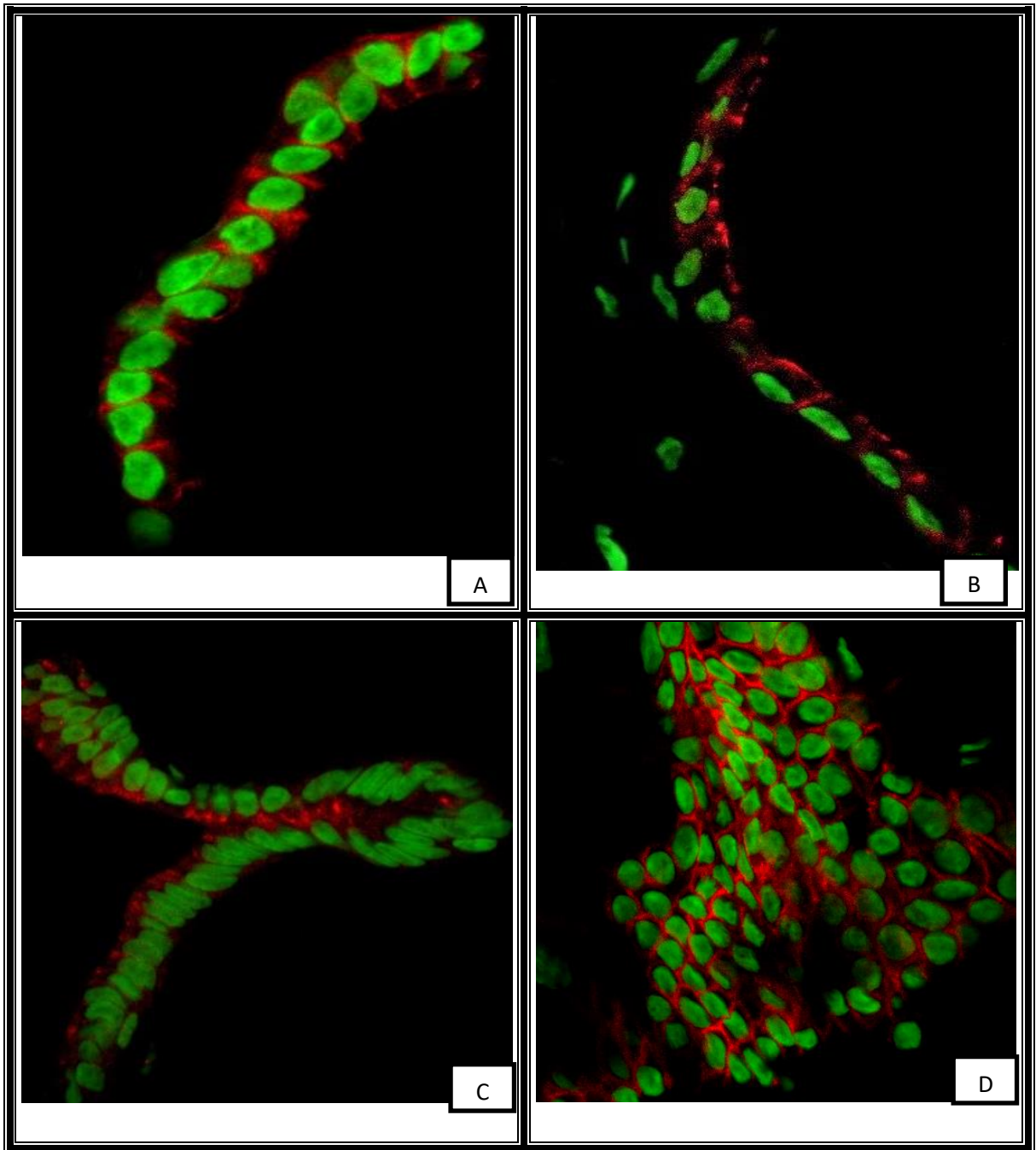


Figura 21. Imagen representativa de inmunofluorescencia en corte de vesícula biliar en presencia de Claudina-2. En verde se muestra Claudina-2, en rojo los núcleos, (a y c) pacientes control, (b y d) pacientes problema. Microscopía confocal 40x.

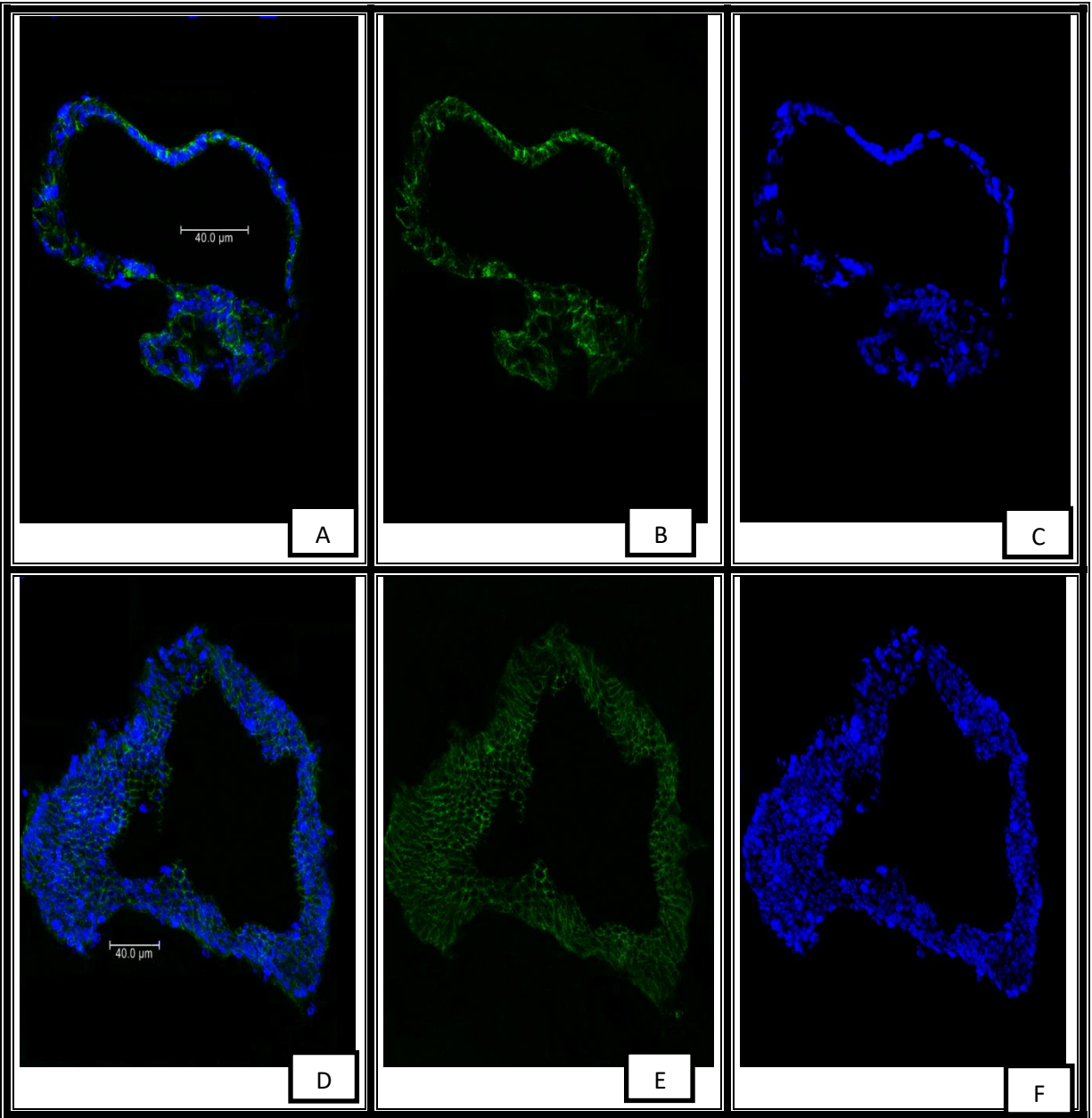


Figura 22. Imagen representativa de inmunofluorescencia en corte de vesícula biliar en presencia de Claudina-3. En verde se muestra Claudina-3, en azul los núcleos, (a, b, c) pacientes control, (d, e, f) pacientes problema. Microscopía confocal 40x.

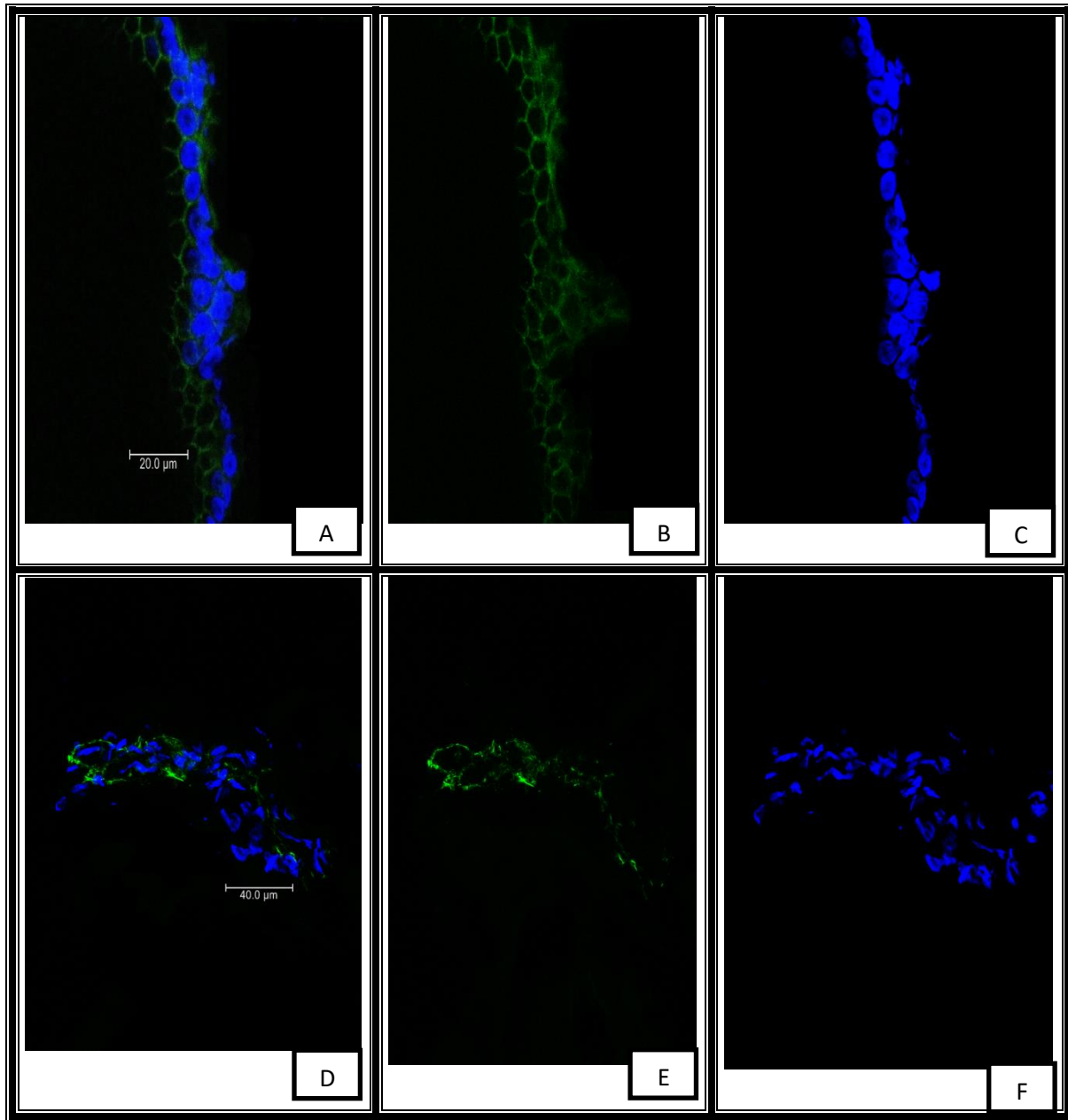


Figura 23. Imagen representativa de inmunofluorescencia en corte de vesícula biliar en presencia de Claudina-5. En verde se muestra Claudina-5, en azul los núcleos, (a, b, c) pacientes control, (d, e, f) pacientes problema. Microscopía confocal 40x.

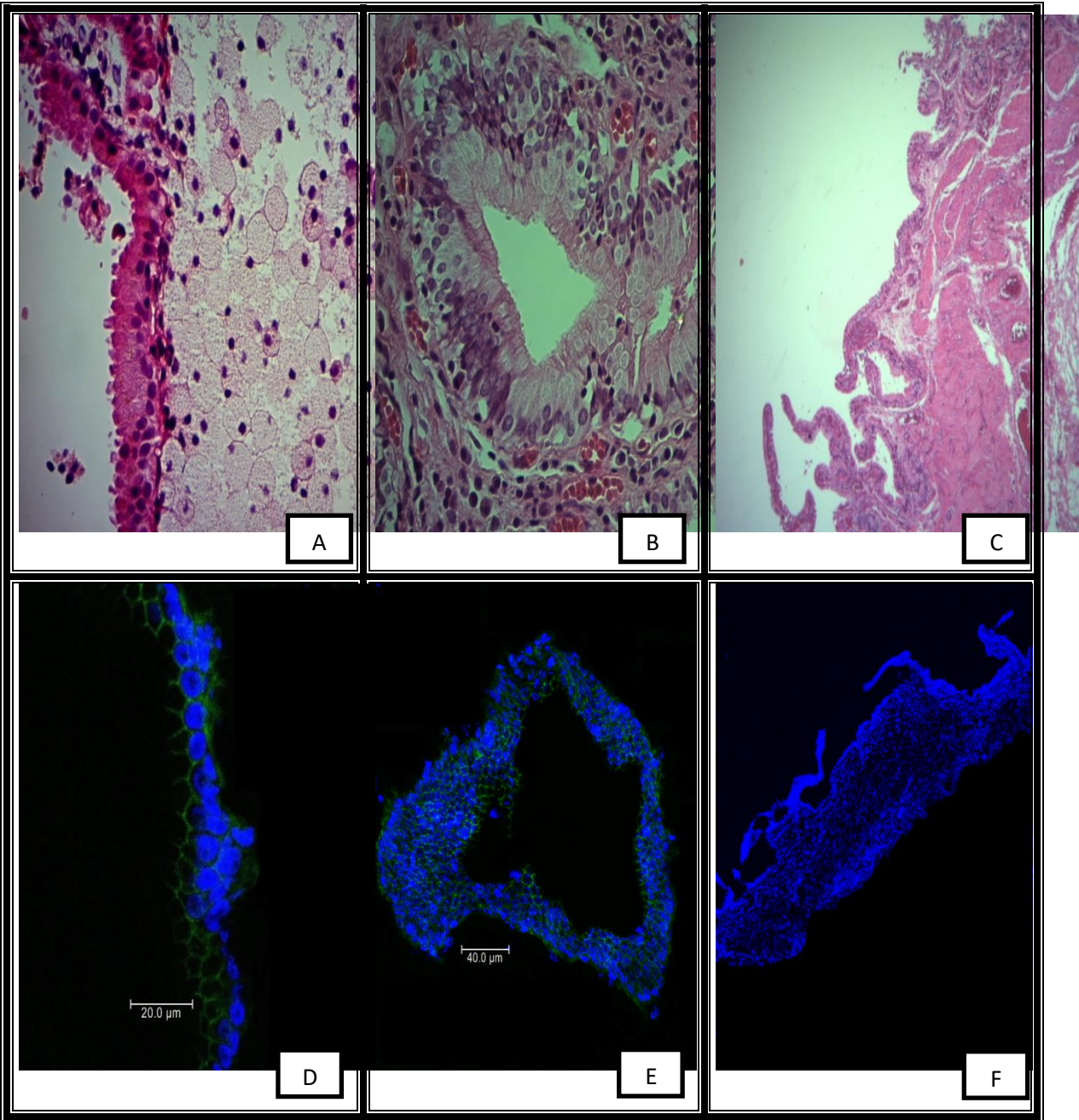


Figura 24. Imagen comparativa de corte en vesícula biliar en tinción de hematoxilina-eosina e inmunofluorescencia. Figura a, b y c con tinción en hematoxilina-eosina, d, e y f en técnico por inmunofluorescencia. A) epitelio de vesícula biliar, con presencia de macrófagos espumosos B) Seno de Rokitansky C) Capa mucosa, muscular y serosa de

vesícula biliar D) epitelio de vesícula biliar, que expresa claudina-5 E) Seno de Rokitansky, con expresión de claudina-5 F) Capa mucosa, muscular y serosa de vesícula biliar.

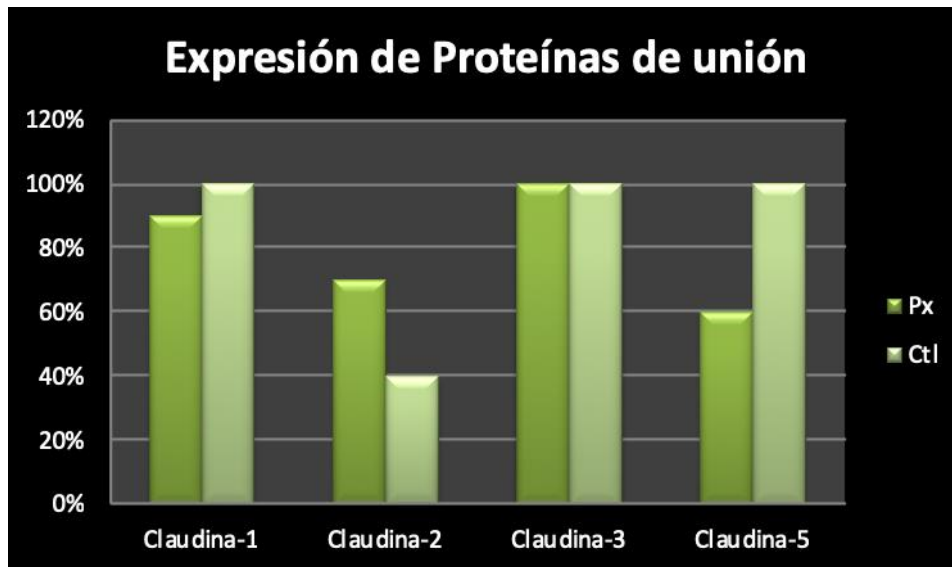


Figura 25. Expresión de proteínas de unión

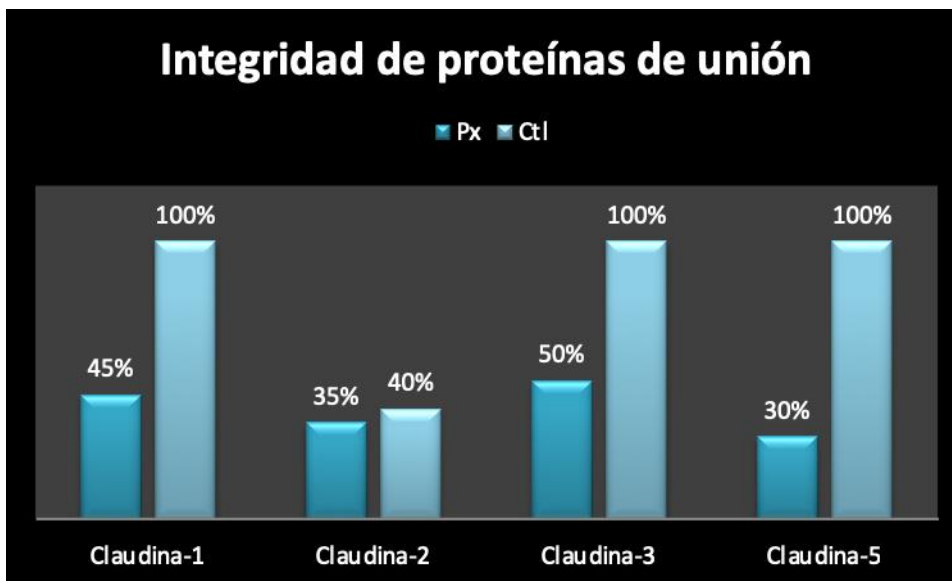


Figura 26. Integridad de proteínas de unión

4. Características del líquido biliar

Para el análisis de las características del líquido biliar se usó el programa estadístico SigmaPlot 12.0, se aplicó la prueba de Kolmogorov- Smirnov y equal variance test, para la prueba de normalidad y homocedasticidad respectivamente, aplicando las pruebas de ANOVA y la prueba U de Mann Whitney para establecer significancia entre los valores medidos de cada una de las variables estudiadas en líquido biliar (sodio, potasio, calcio, DHL, FA, colesterol, bilirrubinas totales). Las comparaciones múltiples de medias (post-Anova) se realizaron mediante test de Tukey. Para todas las inferencias se estipuló una $p < 0.05$.

Tabla 4. Características de líquido biliar en pacientes con litiasis biliar y controles

	Problema		Controles	
	Media + IC		Media + IC	p
Na+	141.04 ± 3.146		144.2 ± 14.570	0.454
k+	5.35 ± 0.563		4.08 ± 1.102	0.0141 *
Ca+	9.54 ± 1.344		3.98 ± 0.906	0.002 *
DHL	284.5 ± 208.809		12.4 ± 9.481	0.002 *
FA	220 ± 178.033		59 ± 24.646	0.043 *
COLESTEROL	510 ± 179.87		181.2 ± 121.83	0.016 *
BT	3.36 ± 0.943		1.156 ± 0.231	0.003 *

IC intervalo de confianza. * Diferencia significativa $P < 0.05$

La tabla 4 muestra las características del líquido biliar en pacientes sanos y pacientes con colecistitis crónica litiasica, se observa a los pacientes problema con elevación en los niveles de potasio ($P < 0.050$), Calcio ($P < 0.05$), DHL ($P < 0.05$), FA ($P = 0.043$), colesterol ($P < 0.050$), bilirrubinas ($P < 0.050$), comparados con los controles, esto es de gran importancia ya que las concentraciones elevadas de colesterol y bilirrubinas favorecen la formación de litos.

IX. DISCUSION

Las proteínas de unión estrecha son esenciales para mantener la integridad de las uniones intercelulares, fundamentales en la función celular, permitiendo un transporte selectivo de solutos y agua, proporcionan polaridad a la célula, permitiendo un adecuado funcionamiento de la barrera celular. Jouko J y Cols., reportaron una disminución de claudina-2, -1, -3, -4, Ocludina y ZO-1 en pacientes con colelitiasis a diferencia de aquellas vesículas con colecistitis litiasica y las sanas. Nuestros resultados mostraron disminución en la expresión e integridad de Claudina 1, 2, 3, 5, en aquellos pacientes con colelitiasis, estos hallazgos sugieren que durante el proceso inflamatorio de la colecistitis litiasica existe un daño a la barrera celular, específicamente en las uniones estrechas, que permiten el transporte paracelular de colesterol y ácidos biliares, propiciando a una bilis litogenica Al realizar el estudio molecular del líquido biliar encontramos que aquellos pacientes que presentaron disminución en la integridad de las proteínas de unión presentan una bilis con mayor concentración de colesterol y bilirrubina total, no obstante se encontró el aumento de diversos electrolitos (Na^+ , K y Ca), esenciales para la homeostasis celular, el encontrarlos elevados pueden hablar de manera indirecta de una discusión celular que favorezca la formación de litos o bien apoptosis celular.

Kengo Matsumoto y cols., 2014 estudiaron a Claudina 2 como factor predisponente para desarrollar cálculos biliares en ratones. Se encontró que ésta regula el paso de iones y de agua de forma paracelular y su alteración aumenta la susceptibilidad para la formación de cálculos biliares de colesterol. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, del análisis de líquido biliar en aquellos pacientes con colecistitis litiasica, mostraron elevación en las concentraciones de colesterol con una diferencia significativa de $P < 0.05$, aunado a lo anterior la disminución en la expresión de proteínas de unión celular, nos hace pensar que el daño producido por la respuesta inflamatoria al epitelio de la vesícula biliar provoca alteración en la expresión de proteínas de unión estrecha, condicionando así la disfunción de la barrera celular, que permiten la entrada de solutos como el colesterol y las sales biliares que condicionan la formación de bilis litogenica.

La integridad de las uniones estrechas se ha estudiado en otras patologías propias de la vesícula biliar, Németh y cols. Publicaron en 2009 la presencia de alteraciones en las proteínas transmembrana de las uniones estrecha y su relación con procesos neoplásicos, reportando disminución en la expresión de ZO-1, Ocludina y E-cadherina y expresiones diferentes en Claudina-1, -2, -3, -4, -7, -8, -10, lo importante en este artículo de Németh y cols., en relación a nuestro estudio, es la forma en la que estos investigadores determinaron la integridad de una unión estrecha, utilizaron más de una proteína de este grupo, lo que ayuda a determinar con mayor seguridad que la unión esta integra o no, sin embargo el

método de detección fue a través de inmunohistoquímica y realizaron un corte por cada proteína, ya que por su técnica no permite se analicen múltiples proteínas en un solo corte, pero proporciona una buena opción de estudio.

En cuanto al estudio histopatológico utilizamos diferentes criterios morfológicos entre los que se encuentran los senos de Rokitansky, colesterosis, engrosamiento de la muscular, calcificaciones, atrofia o hipertrofia, ulceración o abscesos, para clasificarles como inflamación aguda y crónica. Barcia Juan, 2003, estudio 10 vesículas de autopsias en las que se reportara colelitiasis y clasifíco a la inflamación crónica en leve, moderada y severa dependiendo de los datos de fibrosis o de regeneración que presentara el epitelio al momento de su estudio, tanto sus resultados como los mostrados en nuestro estudio revela un predominio del proceso crónico al agudo. En su trabajo Barcia propone un sistema de interpretación para evitar malas interpretaciones entre médicos o patólogos, sin embargo su grupo de estudio es pequeña y al realizarse muestras de autopsia sin criterios de inclusión o exclusión y desconociendo diagnóstico de defunción, existen múltiples factores que podrían modificar significativamente sus resultados, es por ello que decidimos realizar el estudio histopatológico con los criterios antes mencionados.

Pareciera que los factores predisponentes a la colecistitis litiasica son múltiples, como lo expreso Ponce, 2011; edad género, número de gestas, fármacos, antecedentes familiares, obesidad, etc. En nuestro estudio también se mostraron resultados similares, se encontró el desarrollo de la enfermedad de forma más frecuente en el género femenino, además relacionamos el peso y diversas enfermedades con la predisposición a la formación de colelitiasis encontrando que los pacientes con colecistitis litiasica que presentan Diabetes mellitus tienen 6 veces mayor probabilidad de desarrollo de litiasis por colesterol, mientras quienes presentan sobrepeso y obesidad presentan 1.2 y 7 veces mayor probabilidad que aquellos que con normo peso.

Es muy conocido que la colecistitis litiasica es multifactorial, y a la fecha no se dilucidado de forma concluyente la fisiopatología de esta enfermedad, es justo por ello que nuestro estudio resulta de vital importancia, pues buscó dar explicación y dilucidar una pequeña fracción de la fisiopatología de esta enfermedad, pues debemos tener claro la importancia que tiene esta en la rama de la medicina y del conocimiento en general, pues la fisiología por si misma es generadora de nuevas inquietudes y fomenta a nueva investigaciones, pues no es hasta que sabes el porqué de las enfermedades, para preguntarnos en cómo evitarles o como curarles, sin embargo sabemos será necesario nuevas investigaciones para descifrar y entender esta patología en su totalidad.

Conclusiones

Se determinó que las uniones estrechas juegan un papel importante en el transporte paracelular determinando la composición del líquido biliar. Comprobamos que la pérdida de la integridad en las uniones estrechas favorece la formación de bilis litogénica en humanos, permitiendo el ingreso de mediadores inflamatorios que desencadenan la enfermedad.

Perspectivas

Continuar línea de investigación médico quirúrgica, puesto que el área quirúrgica no está peleada con la bioquímica o biología molecular, sino todo lo contrario, puesto que ser cirujano implica la excelencia en la medicina, un cirujano debe dominar los conocimientos anatómicos, fisiológicos, bioquímicos de cada patología, para luego entonces planear un tratamiento quirúrgico y por último ya con todo este conocimiento en su ser, entonces es cuando sigue proponer o poner en duda un paradigma científico.

XII. REFERENCIAS

1. Anderson James M. and Van Itallie Christina M. Physiology and Function of the Tight Junction, Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009 Aug; 1(2): 1-12.
2. Barcia Juan Jose, Histologic Analysis of Chronic Inflammatory Patterns in the Gallbladder: Diagnostic Criteria for Reporting Cholecystitis, MD, Annals of Diagnostic Pathology, 2003, 7 (3): 147-153.
3. Boyer James L., Bile Formation and Secretion, Compr Physiol. 2013 July; 3(3): 1035–1078.
4. Buck Lauren, et al., Tissue Cytokines Reveal Gender Difference in Acute Cholecystitis, Gastroenterology, 2009, 136 (5): 889.
5. Brunicaudi F.C, Anderson D.K, Billiar T.R, Dunn D.L, Hunter J.G, Matthews J.B, Pollock R.E, Schwartz Principios de cirugía, McGraw-Hill, Ed. IX, 2010
6. Cooper Geoffrey M., La Célula. Sunderland Massachusetts: Marbán Libros. Ed.5, 2010.
7. Chang L, Goldman R, Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk, Nature Reviews, Molecular cell biology, August 2004, 5: 601-613.
8. Dooley James, Gallstones and Benign Biliary Diseases, University College London Medical School and the Royal Free Hampstead NHS Trust, London, Ed.12, 2011. 257-293.
9. Floch MH, Kowdley K., Pitchumoni C.S, Floch N.R, Rosenthal R., y Scolapio J., Gastroenterología, Netter, Elsevier 1ª ed. Barcelona: Masson: 2006.
10. García Compeán Diego, Gastroenterología y hepatología, objetivos y su desarrollo, Manual Moderno, 1º Ed. 2009.
11. Gómez J. David, Clasificación y Fisiopatología de los cálculos biliares, Univ. Med. Bogotá (Colombia), 2009, 50 (1): 91-97.
12. González Hita Mercedes, Bastidas Ramírez Blanca E., Panduro Cerda Arturo, Factores de riesgo en la génesis de la Litiasis Vesicular, Medigraphic, 2005, 7: 71-78
13. Guirado O, Solanas M, Costa I, Escrich E, El citoesqueleto de actina: una perspectiva desde la biología molecular del cáncer, Rev Cubana Invest Bioméd Ciudad de la Habana abr.-jun. 2002, 21 (2): 115-122.
14. Günzel Dorothee and Alan S. L. Y, Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability, Physiol Rev. 2013 Apr; 93(2): 525–569.
15. Gregory G. Martin, cols., Ablating L-FABP in SCP-2/SCP-x null mice impairs bile acid metabolism and biliary HDL-cholesterol secretion, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2014 Dec 1; 307(11): G1130–G1143.
16. Harada Kenichi and Nakanuma Yasuni, Biliary Innate Immunity: Function and Modulation, Mediators of Inflammation, 2010:1-9.

17. Howard J, Hyman A, Growth, fluctuation and switching at microtubule plus ends, *Nature Reviews, Molecular cell Biology*, August 2009, 10: 569-574.
18. Hudspeth A. J., Establishment of tight junctions between epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Jul; 72(7): 2711–2713.
19. Ivanovich Reshetnyak Vasilii, Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation, *World J Gastroenterol* 2013 November 14; 19(42): 7341-7360.
20. Jouko J. Laurila, Tuomo Karttunen, Vesa Koivukangas, Päivi A. Laurila, Hannu Syrjälä, Juha Saarnio, Ylermi Soini, and Tero I. Ala-Kokko, Tight Junction Proteins in Gallbladder Epithelium: Different Expression in Acute Acalculous and Calculous Cholecystitis, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2007, 55(6): 567–573.
21. Kengo Matsumoto, Mitsunobu Imasato, Yuji Yamazaki, Hiroo Tanaka, Mitsuhiro watanabe, Hidetoshi Eguchi, Hiroaki Nagano, Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara, Atsushi Tamura and Sachiko Tsukita, Claudin 2 Deficiency Reduces Bile Flow and Increases Susceptibility to Cholesterol Gallstone Disease in Mice, *Gastroenterology* 2014; 147:1134–1145.
22. Landskron Glauen, De la Fuente M., Thuwajit P., Thuwajit C. and Hermoso M., Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment, *Journal of Immunology Research*, Volume 2014, Article ID 149185, 1-19.
23. Longo Dan L., Kasper D., Fauci A., Hauser S., Jameson J., Loscalzo J., *Harrison Principios de Medicina Interna*, McGraw-Hill, 2012, 18 (1): 2615-2628.
24. Matyja Andrzej, Gil Krzysztof, Pasternak A., Sztefko K., Gajda M., Tomaszewski K., Matyja M., Walocha J., Kulig J., Thor P., Telocytes: new insight into the pathogenesis of gallstone disease, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2013, 17 (6): 734–742.
25. Monte Maria J, Marin Jose JG, Antelo Alvaro, Vazquez Jose, Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology, *World J Gastroenterol* 2009 February 21; 15(7): 804-816.
26. Montoro Huguet Miguel, García Pagán Juan Carlos, *Manual de Emergencias en Gastroenterología y Hepatología*, Asociación Española de Gastroenterología, Barcelona 2010.
27. Németh Z, Szász A, Somorác A, Tátrai P, Németh J, Gyorffy H, Szijártó P, Kiss A., Schaff Z , Zonula Occludens-1, Occludin, and E-cadherin Protein Expression in Biliary Tract Cancers, *Pathol Oncol Res*. 2009 septiembre; 15 (3): 533-9.
28. Németh Z, Szász A, Somorác A, Tátrai P, Németh J, Gyorffy H, Szijártó P, Kiss A., Schaff Z, Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 protein expression in biliary tract cancers, *J Histochem Cytochem*. 2009 Feb; 57(2):113-21.
29. Niessen C.M., Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function, *Journal of Investigative Dermatology*, 2007, 127 (11):2525-32.
30. Ponce García Julio, *Tratamiento de las enfermedades gastroenterológicas*, Manual de Gastroenterología, Elsevier Instituciones, 3º Ed. Sección IV, 2011.
31. Robbins y Cotran, *Patología estructural y funcional*, Elsevier España, 2010.

32. Tejedor Bravo y Albillos Martínez, Enfermedad litiásica biliar, *Medicine*, 2012; 11(8); 481-8.
33. Torres C. Juan Roberto, *Enfermedades de la Vesícula y de la Vía Biliar*, McGraw-Hill, Ed. 1ª, 2004.
34. Turumin J, Shanturov V, Turumina H, El papel de la Vesícula biliar en los Humanos, *Revista de Gastroenterología de México*, 2013; 78(3): 177-187.
35. Trelease R.B, *Netter's Surgical Anatomy Review*, 2010.
36. Valdés y Valenzuela J. Egea, Colelitiasis, *Medicine*. 2008; 10(8):508-17.
37. Xiong L, Wen Y, Miao X, Yang Z, Expressions of cell junction regulatory proteins and their association with clinicopathologic parameters in benign and malignant gallbladder lesions, *Am J Med Sci*. 2011 Nov; 342(5):388-94.
38. Zhang, et.al., Enhanced Expression of Cystathionine β -Synthase and Cystathionine γ -Lyase During Acute Cholecystitis-Induced Gallbladder Inflammation, *PLoS One*. 2013; 8(12): e82711.