

Fisiopatología de la litiasis biliar

Cálculos de colesterol

Jaime Campos

INTRODUCCION

Es conocido que la colelitiasis constituye un problema de salud pública tratado hasta hace pocos años exclusivamente por la cirugía. En el mundo occidental, en 80 al 90% de los pacientes, los cálculos están compuestos predominantemente por colesterol, secundarios a un disturbio en su metabolismo, en el de las lipoproteínas y en el de las sales biliares. En las dos últimas décadas son evidentes los progresos en el tratamiento médico y en la litotripsia tanto intra como extracorpórea de los cálculos de colesterol. Los principales factores de riesgo son la obesidad, la pérdida brusca de peso, el sexo femenino, el embarazo, la diabetes, la hipertrigliceridemia, los estrógenos, las drogas hipolipemiantes como el clofibrato y las gastrectomías con vaguectomía.

Lípidos y bilis

Las sales biliares derivadas del catabolismo del colesterol son esteróles hidrosolubles saturados, con propiedades fisico-químicas diferentes de los ácidos biliares. Como estructura tienen un núcleo esteroideo, compuesto por cuatro anillos de hidrocarburos fusionados y ligados con glicina o taurina. Son anfófilas por tener superficies ionizadas hidrofílicas y superficies hidrofóbicas compuestas por los anillos.

Por predominar las regiones hidrofílicas, las sales biliares se denominan como anfófilas solubles. Las primarias se sintetizan en el hígado (colato y quenodeoxicolato). Las secundarias (deoxicolato y litocolato) se derivan de las primarias por acción bacteriana sobre los grupos esteroideos, en el íleon distal y en colon. Las sales terciarias (ursodeoxicolato y sulfolitocolato) resultan de modificaciones bacterianas o hepáticas de las secundarias.

Las lecitinas constituyen la mayoría de los fosfolípidos, difieren en tamaño y número por las insaturaciones de sus cadenas grasas; son moléculas anfófilas insolubles en el agua, lo cual incrementa la capacidad solvente del colesterol en las sales biliares.

El colesterol es el esteral predominante en la bilis, su molécula es anfófila insoluble con una función

polar hidroxil mínima y una superficie hidrofóbica amplia, compuesta por los núcleos esteroideos. Se convierte en soluble por la presencia de las sales biliares y de la lecitina.

Agregados lipídicos biliares. Los monómeros de las sales biliares solubilizan pequeñas cantidades de colesterol biliar y cuando se incrementan aparecen las micelas simples, constituidas por sales biliares y escasas moléculas de colesterol. Las micelas mixtas son de mayor tamaño y contienen además lecitina. El colesterol se solubiliza cuando las moléculas exteriores de las sales biliares mantienen su hidrosolubilidad. Las vesículas unilamelares están compuestas por moléculas de colesterol y de lecitina con trazas de sales biliares. Los liposomas o vesículas multilamelares también llamados cristales biliares líquidos, aparecen por la fusión de las vesículas unilamelares.

Las micelas y las vesículas, además de coexistir, se interconvierten en la bilis, constante y espontáneamente, debido a excesos relativos de colesterol, de agua o de los dos en las soluciones micelares. Durante la digestión, el colesterol es transportado principalmente en las micelas y en el ayuno es solubilizado principalmente en las vesículas.

Las vesículas ricas en colesterol se presentan cuando se excede la capacidad de solubilización por las micelas. Las vesículas se incrementan de lecitina cuando con el agua entran en dilución con las micelas para mantener su concentración crítica. Cuando son ricas en colesterol, se producen cristales sólidos de monohidrato de colesterol, y cuando lo son en lecitina se producen otras estructuras de aspecto tubular. La nucleación ocurre cuando el colesterol deja de ser soluble en las micelas o en las vesículas y se precipita en forma de cristales de monohidrato.

Diagrama y saturación del colesterol

Experimentalmente se ha diseñado un diagrama triangular cuyos ejes representan porcentajes molares de colesterol, lecitina y sales biliares en una concentración determinada de lípidos totales (Figura 1). Los modelos se preparan en el laboratorio, variando sus componentes, pero manteniendo constante los lípidos totales. Con esta información se determinan el número

Dr. Jaime Campos: Profesor Asociado de Medicina Interna y Gastroenterología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá.

y el tipo de las fases observados en el equilibrio de estas bilis modelos. Las micelas se presentan en la zona en que el colesterol está ligado a ellas en la solución. La zona micelar es aproximadamente tres veces superior en la bilis vesicular que en la hepática.

En la Figura 2 se representan las composiciones de la bilis en individuos normales y en pacientes con litiasis. La bilis que por su composición se encuentra en la zona metaestable requiere de un tiempo considerable para encontrar su equilibrio y volverse estable. El exceso de colesterol es transportado en la zona metaestable por vesículas unilamelares. Las fronteras fisiológicas de esta zona son aproximadas. El grado de sobresaturación se cuantifica por el índice de saturación del colesterol.

Causas de la litogénesis

Existen tres condiciones fundamentales que favorecen la formación de la litiasis, a saber: supersaturación con colesterol, defectos en la nucleación e hipomotilidad vesicular. Adicionalmente, pueden concurrir otros factores genéticos relacionados con la lecitina, las prostaglandinas y el moco; las alteraciones en el fluido y transporte de los electrolitos también han sido incriminados.

Supersaturación de colesterol

El colesterol y la lecitina secretados por los hepatocitos irrumpen en la bilis en forma de vesículas. El movimiento de las sales biliares en el espacio canalicular es parcialmente independiente del fenómeno anterior y su secreción obedece a un gradiente electroquímico relacionado con el transporte de las proteínas. La supersaturación de colesterol en la bilis ocurre cuando hay hipersecreción de colesterol en normalidad de secreción de las sales biliares o normalidad del colesterol con hiposecreción de las sales.

Mecanismos de regulación del colesterol en el hepatocito

Existen tres fuentes de colesterol: el de la dieta, que llega al hígado en forma de quilomicrones; el derivado de tejidos extrahepáticos, que llega en lipoproteínas de baja densidad y el sintetizado en el hepatocito bajo el control de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima-A reductasa. A pesar de las variaciones de las tres fuentes el colesterol de las membranas hepatocitarias permanece constante, debido a tres mecanismos de regulación. El primero es su esterificación bajo el control de la coenzima acyl-A-colesterol-acyl-transferasa y su movilización ocurre en forma de lipoproteínas de baja densidad. El segundo es su conversión a ácidos biliares bajo el control de la 7-alfa-

hidroxilasa y el tercero es la secreción de colesterol libre en la bilis. Las dos últimas son los mecanismos prioritarios en el hombre. Los mayores defectos son la hipersecreción de colesterol con sales biliares normales y la normosecreción de colesterol con hiposecreción de las sales.

Causas de hipersecreción biliar del colesterol asociadas epidemiológicamente con la litiasis

- Aumento en la actividad de los receptores de lipoproteínas y exceso de colesterol dietario con su elevación plasmática. Con los estrógenos se incrementa la captación del colesterol por las lipoproteínas, observado en el embarazo, con los anoluvatorios o con la terapia hormonal para el carcinoma prostático.

- Aumento de la síntesis endógena del colesterol por aumento de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductasa, observado en la obesidad y en la hipertrigliceridemia.

- Hiposecreción de las sales biliares por disminución de la conversión del colesterol debido a la disminución de la actividad de la 7-alfa-hidroxilasa, observado en los ancianos y en realidad menos frecuente de lo creído anteriormente.

- Disminución de la conversión del colesterol a sus esteres por inhibición de la acyl-coenzimas-A colesterol-acyl-transferasa en el hepatocito, observada con los clofibratos y con los progestágenos endógenos y exógenos.

Los cálculos pigmentados asociados con la enfermedad de Crohn ocurren por reducción de la secreción de las sales biliares debido a su pérdida intestinal excesiva. Defectos combinados de hiposecreción de sales biliares e hipersecreción de colesterol han sido detectadas en indígenas americanos. En hombres chilenos se han postulado defectos en la secreción de lecitina aún sin confirmación.

Defecto en la nucleación

La supersaturación de colesterol es importante en la formación de los cálculos; sin embargo, individuos normales tienen con frecuencia bilis vesicular supersaturada. En paciente con cálculos la nucleación ocurre en pocos días en tanto que en los controles tarda de una a dos semanas o no aparece. En esta diferencia están involucrados mecanismos moleculares que explican este proceso quínético importante.

Mecanismos moleculares de la nucleación

El descubrimiento de las vesículas transportadoras de colesterol en bilis metaestables saturadas es clave para entender la nucleación, la cual se inicia de dos a

cuatro horas después de detectarlas al agregarse en forma de vesículas multilamerales con posterior precipitación de cristales de monohidrato de colesterol.

Promotores e inhibidores de la nucleación

Estos factores no han sido aún bien caracterizados. Observaciones iniciales sugieren que la vesícula desempeña una función importante en su aparición al producir un factor determinante de la misma. Igualmente, las glicoproteínas del moco, al secretarse en exceso, acelerarían la nucleación. Sin embargo, la composición de la bilis en pacientes con cálculos antiguos no refleja lo que pudo ocurrir en la fase inicial de la litogénesis.

Las apolipoproteínas A1 y A2 han sido propuestas como un factor inhibidor. Los pacientes con cálculos tienen mayores concentraciones de proteínas en la bilis vesicular pero no en la bilis hepática, lo cual sugeriría en los individuos normales una mejor absorción o degradación de las proteínas. Los promotores e inhibidores se producirían en el hígado y se modificarían en la vesícula pero su modo de acción permanece aún incierto.

Hipomotilidad vesicular

Esta hipótesis, propuesta desde 1856, ha necesitado de más de una centuria para poder ser valorada. En los animales de experimentación se acepta como uno de los defectos importantes en la génesis de los cálculos de colesterol. Los mecanismos de la alteración en la contractilidad vesicular no han sido completamente elucidados y se mencionan defectos en el receptor de la colecistoquinina, cambios en la excitación de la membrana y variación en el contenido total de la proteína contráctil. En humanos con coleditiasis la hipomotilidad se demostró gracias a la colecintigrafía con tecnecio 99, al estímulo con comida, pero no siempre al estímulo con colecistoquinina exógena. Un grupo de pacientes tendrían un vaciamiento retardado debido a una disminución de la producción de la colecistoquinina endógena. La disminución de la contractilidad no parece existir en la vesícula con cálculos pigmentados. En los diabéticos, grupo de mayor riesgo de litiasis, se ha demostrado hipomotilidad. Aunque aparece como un factor importante en la litogénesis, ella es inconstante y su comprensión fisiopatológica no está aún bien establecida.

Moco, prostaglandinas y lecitina araquidónica

En animales, la hipersecreción de moco está mediada por las prostaglandinas. En observaciones clínicas, los antiinflamatorios previenen la recurrencia de cálculos en individuos ya tratados con ácidos biliares orales.

Respecto a la lecitina los estudios en humanos son contradictorios. Parecería que la lecitina araquidónica fuese elevada sólo al comienzo de los procesos litogénicos. La hipersecreción de moco constituiría un gel adherente propicio para la nucleación.

Alteraciones en el fluido y en el transporte de los electrolitos

Un aumento en la concentración del calcio biliar se ha observado en pacientes con cálculos de colesterol comparándolos con controles con obesidad mórbida. Se requieren estudios adicionales para descubrir la llave molecular que explique los defectos en el transporte iónico para atender la existencia de vesículas litogénicas.

Efectos del deoxicolato

El incremento de las sales biliares secundarias por la conjugación de los deoxicolatos puede ser importante en la litogénesis de colesterol. Los factores de riesgo como edad, sexo e hipertrigliceridemia se asocian con su aumento, lo cual favorece la hipersaturación de colesterol y posiblemente intervenga en la nucleación, en la hipersecreción mucosa mediada por las prostaglandinas y aun en la hipomotilidad vesicular.

CONCLUSIONES

La biogénesis vesicular de colesterol es un proceso multifactorial. La supersaturación de la bilis por colesterol es un requerimiento para su aparición, seguido de un defecto en la nucleación que permite la precipitación de los cristales de monohidratos de colesterol. El riesgo de litiasis se incrementa por la hipersecreción mucosa y por la hipomotilidad vesiculares mediadas por las prostaglandinas y variaciones de estas últimas pueden alterar las lecitinas biliares hepáticas. Alteraciones en el transporte iónico y cambios en el total de deoxicolato conjugado pueden ser importantes sin que esté completamente demostrado. Aunque se ha progresado rápidamente en la comprensión de la fisiopatología biliar, algunas reacciones moleculares y la interrelación de varios defectos permanecen aún sin aclarar.

Cálculos pigmentados. Composición química

Los cálculos de pigmento marrón son ricos en sales cálcicas de ácidos grasos y no contienen prácticamente ni fosfato ni carbonato de calcio. El bilirrubinato de calcio es significativo tanto en los cálculos marrones como en los negros con presencia similar de colesterol, sales biliares, glicoproteínas y otras proteínas. En los cálculos de pigmento negro las sales cálcicas de ácidos grasos son casi inexistentes.

La formación de las sales cálcicas a través de los

procesos corporales de biomineralización permiten su depósito en una matriz proteica en los cálculos pigmentados, recuerda la génesis de otros cálculos, la de los dientes y la de los huesos. Su presencia en el núcleo del cálculo facilita la nucleación del colesterol pero las condiciones para que se precipiten concomitantemente son desconocidas. Los iones de calcio serían mediadores para la fusión del colesterol metaestable de las vesículas. El hallazgo en las vesículas biliares de grupos de cálculos de tamaños similares indica que las condiciones favorables para la aparición de la biogénesis ocurre sólo en determinados momentos y que una vez constituidos sus núcleos e iniciado su crecimiento no aparecen nuevos núcleos inmediatamente. Además, en las vesículas se desarrollan aisladamente cálculos bien sea de colesterol, de pigmento negro y/o de pigmento marrón. La composición, la epidemiología, su localización y aun la clínica de los diferentes tipos de cálculos son diferentes y excluyentes. Los cálculos de pigmento negro son escasos en poblaciones de origen hispánico y escandinavo radicados en USA, y no aparecieron en una serie de 243 colecistectomías en individuos jóvenes estudiada en La Paz (Bolivia). Sus factores de riesgo son la edad, la anemia hemolítica, la cirrosis, la alimentación parenteral que se prolongue más de cuatro a seis semanas y la colangitis esclerosante primaria. Previamente a la cirugía son indistinguibles de los de colesterol, habitualmente son pequeños y pueden permanecer mucho tiempo en el colédoco luego de una colecistectomía. En los de pigmento marrón alternan capas de sales cálcicas de ácidos grasos, y representan en el mundo la mayoría de las *coledocolitiasis* primarias debido a la hipomotilidad biliar que facilitaría por estasis la infección biliar, generando su aparición en 10 a 15% de los colecistectomizados de Occidente. En el Japón, en la década del 40, representaban 70% de las colelitiasis, contra sólo 20% de cálculos de colesterol; treinta años después, la proporción de los de colesterol pasó a 70% y la de los de pigmento marrón descendió al 20% en la población urbana. El *Ascaris lumbricoides* fue causa importante de litiasis en el Japón antes de su erradicación en 1975 y el *Clonochis sinensis* ha sido incriminado en Taiwán. En algunas regiones de la China llegan a representar el 90% de la litiasis biliares en tanto que en algunas regiones de Mongolia con consumo elevado de carne y lácteos, la mayoría de los cálculos son de colesterol. En Oriente se desarrollan en todo el árbol biliar y están en relación estrecha con infecciones por *Escherichia coli*, recurren con facilidad y frecuentemente ocasionan cirrosis, hipertensión portal y falla hepática. Para su tratamiento se recurre a coledoscopia percutánea, hepatoyeyunostomía, colangiografía retrógrada endoscópica, resecciones hepáticas

segmentarias e inclusive el trasplante hepático. Las poblaciones asiáticas desplazadas a Australia, Hawai y/o California continúan desarrollando cálculos de pigmento marrón, pero sus descendientes adquieren el comportamiento de la litiasis de la población que los acoge.

Patogénesis

El calcio es secretado a la bilis por el hígado y su forma ionizada es dos y media veces menor en la vesícula que en el suero. Su principal vehículo parece ser las micelas de sales biliares y las proteínas. De todas formas lo más importante es el contenido de bilirrubina en la bilis, siendo sus principales componentes el diglucurónidos de bilirrubina y dos isómeros de monoglucurónidos de bilirrubina. Las sales de bilirrubina no conjugada predominan en los cálculos pigmentados. Los dos aniones inorgánicos presentes en los cálculos como sales insolubles de calcio son el carbonato y el fosfato. Con el pH alcalino se incrementa la precipitación con el calcio. La inclusión de palmitato y estearato depende de la presencia de la *Escherichia coli* en la bilis por la acción de sus fosfolipasas, lo cual hace susceptible su precipitación con el calcio.

Las proteínas y las glicoproteínas desempeñan una función en el crecimiento del cálculo por tres mecanismos: interacción en los enlaces, diferencias de potencial en sus superficies y formación de áreas físicamente determinando como el gel de moco en donde la difusión puede alterarse. La prevalencia de diferentes tipos de sales cálcicas, como fosfatos, bilirrubinato, carbonato y palmitato plantea mecanismos comparativos entre la litogénesis y otros sistemas biomineralizantes relacionados con los iones cálcicos. Las proteínas se consideran parte del sistema biológicamente controlado. Parecería que el genoma humano no tuviese información estructural para aquellas proteínas que tienen como único propósito iniciar la formación del cálculo y un analogía entre osteogénesis y litogénesis podría existir. La osteogénesis es una mineralización biológicamente controlada en tanto que la litogénesis sería una mineralización biológicamente inducida. La completa patogénesis requiere de la comprensión exacta de todas las acciones e interacciones moleculares físico-químicas, tanto en su interior como en su superficie.

ABSTRACT

Biliary stones constitute an important issue in public health, until recently treated exclusively by surgical means. In the western world 80-90% of stones are composed of cholesterol, secondary to abnormalities in cholesterol and lipoprotein metabolism. In the last two decades significant advances in the treatment of this problem have been made, such as medical dissolu-

tion and extracorporeal lithotripsy. The most significant risk factors are: obesity, rapid weight loss, female sex, pregnancy, diabetes, hypertriglyceridemia, estrogens, clofibrate and gastrectomy with vagotomy. Bile salts derived from cholesterol are hydrophylic sterols that are essential to micelle formation. The predominance of the hydrophylic domain makes them amphiphilic. Primary bile salts: cholate and deoxycholate are synthesized in the liver; secondary bile salts: deoxycholate and lithocholate derived from primary ones by bacterial transformation in the gut; tertiary bile salts: ursodeoxycholate and sulpholithocholate derived from secondary salts by bacterial action. Lecithin is the main phospholipid in bile, its main function is to solubilize cholesterol associated to bile salts. Micelles are complex structures made of cholesterol, lecithin and bile salts. Experimentally a triangular diagram has been designed representing molar concentrations of cholesterol, lecithin and bile salts. This diagram facilitates the understanding of biliary stones formation. Changing its components keeping constant total lipids, identifies several phases essential in stones formation, such as the micellar phase and the metastable phase. Supersaturated bile results from excess of cholesterol or deficiency of bile salts, and represents the initial abnormality that predispose to stone formation. However this important factor is not sufficient by itself and other factors such as nucleation defects and gallbladder dysfunction must be present. The most important factors associated to cholesterol hypersecretion in bile are: increased liver lipoprotein receptors due to diet and estrogens; increased cholesterol synthesis by the liver through increased activity of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl A reductase by obesity and hypertriglyceridemia; bile salts hyposecretion by diminution of the 7 α -hydroxylase activity as seen in the elderly; decrease of cholesterol esters by inhibition of cholesterol- acyl-transferase as seen with clofibrate and progesterone. Recently nucleating factors have been described such as glycoproteins, apoproteins A1 and A2, which are synthesized in the liver and promotes or inhibits nucleation at the gallbladder, the function of the cholesterol carrying vesicles in bile is basic for nucleation, and are detectable between two to four hours after its appearance, simple vesicles aggregates into multilamellar ones with posterior cholesterol precipitation. Other factors of questionable importance are: mucus, prostaglandins and calcium. Finally the physiopathology of pigment gallstones made mainly of bilirubinate, calcium and fatty acids included: pigment overload (hemolysis), infected bile, ascariis, clonorchis sinensis, cirrhosis, parenteral hyperalimentation and biliary tree abnormalities.

BIBLIOGRAFIA

- Behar J, Lee KY, Thompson WR, Biancani P. Gallbladder contraction in patients with pigment and cholesterol stones. *Gastroenterology* 1989; **97**: 1479-1484.
- Brown MS, Goldstein JL. A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; **232**: 34-47.
- Busch N, Aoyama N, Tokumo H et al. Isolation of a potent inhibitory glycoprotein from normal human gallbladder bile that effects both cholesterol nucleation and crystal growth (Abstract.). *Gastroenterology* 1989; **96**: A581.
- Cahalane MJ, Neubrand MW, Carey MC. Physical-chemical pathogenesis of pigment gallstones. *Semin Liver Dis* 1988; **8**: 317-328.
- Carey MC, Cahalane MJ. Enterohepatic circulation. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H et al (eds.): *The liver: biology and pathology*. New York Raven Press, 1988: 573-616.
- Carey MC, Cahalane MJ. Whither biliary sludge? *Gastroenterology* 1988; **95**: 508-523.
- Chow L. Epidemiology studies of clonorchiasis at Neining township in sothem Taiwan. *Formosan Sci* 1960; **75**: 696-702.
- Conter RL, Roslyn JJ, Porter-Fink V, DenBensten L. Gallbladder absorption increases during early cholesterol gallstone formation. *Am J Surg* 1986; **151**: 184-191.
- Crowther RS, Soloway RD. Pigment gallstone pathogenesis: from man to molecules. *Seminars in Liver Disease*. Vol. 10, No. 3; 1990.
- Davion T, Tossou H, Delamarre J, Capron JP. Racial differences in gallbladder motor function. *Lancet* 1989; **1**: 724-725.
- Donovan JM, Timofeyeva N, Carey MC. Cholesterol monohydrate and liquid crystal formation in model bile: effects of bile salt hydrophobicity and phosphatidylcholine contents (Abstr.). *Hepatology* 1989; **10**: 598.
- Einarsson K, Nilsell K, Leijd B, Angelin B. Influence of age on secretion of cholesterol and synthesis of bile acids by the liver. *N Engl J Med* 1985; **313**: 277-282.
- Eriksson M, Berglund L, Rudling M et al. Effects of estrogen on low density lipoprotein metabolism in males: short-term and long-term studies during hormonal treatment of prostatic carcinoma. *J Clin Invest* 1989; **84**: 802-810.
- Forgacs IC, Maisey MN, Murphy GM, Dowling RH. Influence of gallstones and ursodeoxycholic acid therapy on gallbladder emptying. *Gastroenterology* 1984; **87**: 299-307.
- Gallinger S, Harvey PRC, Petrunka CN et al. Biliary proteins and the nucleation defect in cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology* 1987; **92**: 867-875.
- Gallinger S, Taylor RD, Harvey PRC et al. Effect of mucous glycoprotein on nucleation time of human bile. *Gastroenterology* 1985; **89**: 648-658.
- Gollish SH, Burnstein MJ, Ilson RG et al. Nucleation of cholesterol monohydrate crystals from hepatic and gall-bladder bile of patients with cholesterol gallstone. *Gut* 1983; **24**: 836-844.
- Goodhart GL, Levison-ME, Trotman BW, Soloway RD. Pigment vs. cholesterol cholelithiasis. Bacteriology of gallbladder stone, bile and tissue correlated with biliary lipid analysis. *Am J Dig Dis* 1978; **23**: 877-882.
- Grandy SM, Metzger AL, Adler RD. Mechanisms of lithogenic bile formation in american indian women with cholesterol gallstone. *J Clin Invest* 1972; **51**: 3026-3043.
- Hay DW, Cahalane MJ, Timofeyeva N, Carey MC. Molecular species of lecithins in human gallbladder bile: hydrophilicity of the bile salt pool determines hydrophilicity of the lecithins (Abstr.). *Hepatology* 1989; **10**: 599.
- Hay DW, Carey MC. Pathophysiology and pathogenesis of cholesterol gallstone formation. *Seminars in Liver Disease*, 1990, No. 4, Vol. 10.
- Holan KR, Holzbach RT, Hermann RF et al. Nucleation time: a key factor in the pathogenesis of cholesterol gallstone disease. *Gastroenterology* 1979; **77**: 611-617.
- Holzbach RT. Recent progress in understanding cholesterol crystal

- nucleation as precursor to human gallstone formation. *Hepatology* 1986; **6**: 1403-1406.
24. **Hood K, Gleeson D, Ruppig DC, Dowling RH.** Prevention of gallstone recurrence by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet* 1988; **2**: 1223-1225.
 25. **Kibe A, Holzbach RT, La Russo NF, Mao SJT.** Inhibition of cholesterol crystal formation apolipoproteins A-I and A-II in model systems of supersaturated bile: implications for-gallstone pathogenesis in man. *Science* 1984; **225**: 5143-516.
 26. **Kibe A, Holzbach RT, La Russo NF, Mao SJT.** Inhibition of cholesterol crystal formation by apolipoproteins A-I and A-II in model systems of supersaturated bile: implications for-gallstone pathogenesis in man. *Science* 1984; **225**: 514-516.
 27. **Knyrim K, Vakil N.** Gallstone calcification is-specifically related to defective bile acidifications on man. *Hepatology* 1988; **8**: 1223.
 28. **La Morte WW, Booker ML, Scott TE, Williams LF Jr.** Increases in gallbladder prostaglandin synthesis before the formation of cholesterol gallstones. *Surgery* 1985; **98**: 445-451.
 29. **Levy PE, Snith BF, La Mont JT.** Human gallbladder mucin accelerates nucleation of cholesterol in artificial bile. *Gastroenterology* 1984; **87**: 270-275.
 30. **Magnuson TH, Lillemoe KD, Pitt HA.** The relationship of clinical risk factors to gallstone composition (Abstract). *Hepatology* 1989; **10**: 738.
 31. **Malet PF, Takabayashi A, Trotman BW et al.** Black and brown pigment gallstones differ in microstructures and micro-composition. *Hepatology* 1984; **4**: 227-234.
 32. **Marcus SN, Heaton KW.** Deoxycholic acid at the pathogenesis of gladstones. *Gut* 1988; **29**: 522-533.
 33. **Miettinen T, Kesaniemi YA, Jarvinen H, Hastbacka J.** Cholesterol precursor sterols, plant sterols, and cholestanol in human bile and gallstones. *Gastroenterology* 1986; **90**: 858-864.
 34. **Moore EW.** The roles of calcium in the pathogenesis of gallstones. Ca++ electrode studies of models bile salt solutions and other biologic systems. *Hepatology* 1984; **4**: 228S-243S.
 35. **Nakayama F, Miyake H.** Changing state of gallstone disease in Japan. Composition of the stones and treatment of the condition. *Am J ISurg* 1970; **120**: 794-799.
 36. **Nakayama F, Soloway RD, Nakama T et al.** Hepatolithiasis in East Asia: retrospective study. *Dig Dis Sci* 1986; **31**: 21-26.
 37. **O'Brien CB, Berman JM, Fleming CR et al.** Total parenteral nutrition gallstones contain more calcium bilirubinate than sickle cell gallstones (Abstr.). *Gastroenterology* 1986; **90**: 1752.
 38. **O'Brien CB, Malet PF, Saul SH et al.** Mucosal and bulk phase gallbladder pH influence the calcium bilirubin composition of the surface layer of cholesterol gallstones in man. *Gastroenterology* 1986; **90**: 1752.
 39. **Pattinson NR, Chapman BA.** Distribution of biliary cholesterol between mixed micelles and nonmicelles in relation to fasting and feeding in humans. *Gastroenterology* 1986; **91**: 697-702.
 40. **Pomeranz IS, Shaffer EA.** Abnormal gallbladder emptying in a subgroup of patients with gallstones. *Gastroenterology* 1985; **88**: 787-791.
 41. **Rios-Dalenz J, Takabayashi A, Henson DE et al.** Cancer of the gallbladder in Bolivia. Suggestions concerning ethiology. *Am J Gastroenterology* 1985; **80**: 371-375.
 42. **Shiffman ML, Sugarman HJ, Lellum JM, Moore EW.** Free calcium ion (Ca⁺⁺) in increased in gallbladder bile of patients with all types of gallstones (Abstr.). *Hepatology* 1989; **10**: 601.
 43. **Soloway RD, Trotman BW, Maddrey WC, Nakayama F.** The influence of hemolysis, infection and stasis on the calcium salts in pigment gallstones. *Dig Dis Sci* 1986; **31**: 454-460.
 44. **Soloway RD, Trotman BW, Ostrow JD.** Pigment gallstones. *Gastroenterology* 1977; **72**: 167-182.
 45. **Spengler U, Sackmann M, Sauerbruch T et al.** Gallbladder motility before and after extracorporeal shock-wave lithotripsy. *Gastroenterology* 1989; **96**: 860-863.
 46. **Stewart L, Smith AL, Pellegrini CA et al.** Pigment gallstone form as a composite of bacterial microcolonies and pigment solids. *Ann Surg* 1987; **206**: 242-250.
 47. **Stone BG, Gavalier JS, Belle SH et al.** Impairment of gallbladder emptying in diabetes mellitus. *Gastroenterology* 1988; **95**: 170-176.
 48. **Strichartz SD, Abedin MZ, Abdou MS, Roslyn JJ.** Increased biliary calcium in cholesterol gallstone formation. *Am J Surg* 1988; **155**: 131-137.
 49. **Trotman BW, Morris III TA, Cheney HM et al.** Pigment gallstone composition in cirrhotic and non-cirrhotic subjects. *Am J Dig Dis* 1978; **23**: 872-876.
 50. **Trotman BW, Soloway RD.** Pigment gallstone disease: summary of the National Institute of Health-International Work Shop. *Hepatology* 1982; **2**: 879-884.
 51. **Trotman BW, Soloway RD.** Pigment vs. cholesterol cholelithiasis: clinical and epidemiological aspects. *Am J Dig Dis* 1975; **20**: 735-740.
 52. **Turley SD, Dietschy JM.** The metabolism and excretion of cholesterol by the liver. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H et al: The liver: biology and pathobiology. New York Raven Press 1988: 617-64.
 53. **Williamson BWA, Percy-Robb IW.** Contribution of biliary lipids to calcium binding in bile. *Gastroenterology* 1980; **78**: 696-702.