

Alteración de la función secretora biliar en esteatosis hepática experimental

Juan Pablo Arab V.¹, Andrea Farah S.¹, Margarita Pizarro R.¹, Nancy Solís L.¹, Rodrigo Tejos S.¹, Arnoldo Riquelme P.¹ y Marco Arrese J.¹

¹Departamento de Gastroenterología, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

Este trabajo se financió parcialmente gracias al aporte del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (Fondecyt #1110455 a MA.).

Recibido: 07 de julio de 2011

Aceptado: 15 de agosto de 2011

Correspondencia a:

Dr. Marco Arrese J.
Departamento de Gastroenterología
Facultad de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile.
Marcoleta #367
Código Postal: 833-0024
Santiago, Chile.
Tel/Fax: 56-2-6397780.
E-mail: marrese@med.puc.cl

Altered bile secretory function in experimental non-alcoholic fatty liver disease

Non-alcoholic fatty liver (NAFLD) is a clinical entity whose importance has been increasing, because of its potential progression to chronic liver disease. The alteration of bile secretory function may be a relevant factor of hepatic injury in NAFLD. **Objectives:** To assess basal bile secretory function and protein mass of three major hepatobiliary transporters in an experimental NAFLD model. **Materials and Methods:** The bile secretory function was determined by conventional techniques in Sprague-Dawley control rats fed with a choline-deficient diet (CDD) for 8 weeks. Protein mass of Ntcp, Bsep and Mrp2 was measured by western blot. **Results:** An impaired bile secretory function was observed in rats fed with DDC (reduction of bile flow and secretion of bile acids and organic anions). In addition, DDC fed rats showed higher levels of serum aminotransferases. Ntcp protein mass decreased in rats with DDC, while Bsep and Mrp2 did not show quantitative variations in this experimental model. **Conclusions:** In this experimental model of NAFLD an impaired bile secretory function was observed, determining a cholestatic pattern. The decrease in Ntcp protein mass with unaltered Bsep and Mrp2 protein mass, associated with a significant decrease in bile secretion suggests a functional impairment of these transporters in rats fed with DDC diet.

Key words: Non-alcoholic fatty liver disease, hepatic steatosis, bile secretion, cholestasis.

Introducción

El hígado graso no alcohólico (HGNA) es una entidad que comprende un amplio espectro clínico-patológico, desde la esteatosis simple hasta la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), cuya importancia radica en su potencial progresión a cirrosis hepática. El HGNA se caracteriza por la acumulación de grasa en el hígado (esteatosis $\geq 5\%$ de los hepatocitos), en ausencia de consumo significativo de alcohol (menos 20-30 g de alcohol al día), infección viral hepática o drogas¹⁻⁵. El HGNA es actualmente considerado como la enfermedad hepática más común en países occidentales^{6,7} y se reconoce en la práctica clínica habitual como la causa más frecuente de alteración de las pruebas de laboratorio hepático⁸, por lo que comprender su fisiopatología y plantear terapias que apunten a ello es de primera importancia.

La presencia de esteatosis hepática determina una serie de cambios celulares que resultan en una susceptibilidad aumentada al daño por toxas como la endotoxina⁹, la isquemia/reperfusión¹⁰ y otras. Ello puede contribuir a la progresión del daño hepático en casos seleccionados¹¹, ya que el daño o lesión hepática desencadena un proceso inflamatorio que finalmente

conduce a una respuesta fibrogénica con depósito significativo de colágeno¹². Entre los factores que explican la mayor susceptibilidad del HGNA al daño se cuentan, entre otras, la depleción celular de antioxidantes, alteraciones de la función mitocondrial y alteración de la composición de membranas celulares¹³. En trabajos previos¹⁴, nuestro grupo ha planteado que la alteración de la función secretora biliar puede también ser un factor contribuyente, dado que la secreción biliar tiene un rol fisiológico fundamental como ruta excretora para endo y xenobióticos¹⁵. De esta manera, durante la insuficiencia secretora biliar o colestasia, las sustancias que normalmente se excretan en la bilis, se acumulan al interior de la célula, promoviendo el daño hepático, que finalmente conduce a necrosis y apoptosis.

Gracias a la identificación de proteínas específicas de transporte de los componentes biliares, tanto en membranas apicales como basolaterales de los hepatocitos y del epitelio biliar, se ha podido entender con mayor claridad los mecanismos moleculares de la formación de bilis, así como los cambios adaptativos que ocurren durante la colestasia^{16,17}. El mal funcionamiento o ausencia de estas proteínas de transporte hepatobiliar se asocia a enfermedades colestásicas y, por lo tanto, a daño hepático¹⁸.

Los objetivos del presente trabajo fueron estudiar la secreción biliar basal en un modelo animal conocido de HGNA, inducido por una dieta deficiente en colina (DDC); y evaluar la expresión de los principales transportadores hepatobiliares en dicho modelo experimental.

Material y Métodos

Animales

Se utilizaron ratas machos Sprague-Dawley (entre 170-190 g de peso corporal), las que fueron mantenidas por 8 semanas en jaulas de policarbonato con chip de madera, con ciclos de 12 h luz/oscuridad, con una temperatura de 21°C, una humedad relativa de 50%, con consumo *ad libitum* de agua y dietas colino-suficiente (DSC) o deficiente (DDC) según correspondía. Las dietas fueron obtenidas de Dyets Inc (Bethlehem, Pennsylvania). Estos experimentos animales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Después de 8 semanas de tratamiento, las ratas fueron anestesiadas con una dosis única de pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso corporal intraperitonealmente) y la recolección de bilis fue realizada en dos períodos de 10 min, después de canular el conducto biliar común proximal, con un tubo de polietileno PE-10 (Clay Adams, Division de Becton, Dickinson & Co., Parsippany, NJ, EE.UU.) en la zona proximal a la bifurcación. Las muestras de sangre arterial fueron tomadas al final del período de recolección de bilis y los hígados fueron removidos, sometidos a congelación instantánea en nitrógeno líquido y almacenados a -70°C hasta el análisis.

Procedimientos analíticos

El flujo biliar fue medido gravimétricamente y la totalidad de ácidos biliares fueron cuantificados por el método de la deshidrogenasa alfa-hidroxiesteroideal^{19,20}. Los fosfolípidos biliares fueron medidos por el método de Baginski y cols²¹. El colesterol biliar fue cuantificado por el método enzimático de Allain y cols²². Aspartatoaminotransferasa (AST), alaninoaminotransferasa (ALT) sérica, triglicéridos, glucosa y colesterol fueron medidos usando un *kit* Human Gesselheit (Wiesbaden, Alemania). Los ácidos biliares séricos fueron medidos usando un *kit* Merk Diagnostica (E. Merck, Darmstadt, Alemania). El glutatión en el hígado y la bilis fueron determinados tal como lo describe Anderson ME²³.

Histología

Secciones de 5 mm de grosor del lóbulo derecho del hígado de la rata fueron fijadas en formalina al 10% y sumergidas en parafina. Secciones de 4 micro-

nes de grosor fueron teñidas con hematoxilina eosina y 0,1% de solución de rojo picrosirius.

Un investigador independiente, ciego al grupo al que pertenecían las muestras, evaluó las histologías y asignó un *score* para esteatosis, inflamación y fibrosis según lo descrito. Para esteatosis: grado 0, ausente; grado 1, esteatosis de < 25% del parénquima; grado 2, esteatosis de 26-50% del parénquima; grado 4, esteatosis de > 76% del parénquima. Para inflamación: grado 0, sin inflamación; grado 1, < 5 focos de inflamación por campo de alto aumento microscópico (CAAM); grado 2, > 5 focos inflamatorios/CAAM. Para fibrosis: grado 0, sin fibrosis; grado 1, fibrosis pericelular; grado 2, puentes fibróticos; grado 3, presencia de nódulos²⁴⁻²⁶.

Expresión de proteínas transportadoras hepáticas

Los niveles de expresión proteica de los transportadores hepatobiliares de ratas alimentadas con dieta DSC y DDC fueron medidos usando fracciones ricas en membrana para evaluar la expresión proteica de la proteína cotransportadora de sodio y taurocolato (Ntcp, Slc10a1), la bomba exportadora de sales biliares (Bsep, Abcb11) y la proteína exportadora canalicular de aniones orgánicos (Mrp2, Abcc2).

Las fracciones de membrana total hepática (plasmáticas y fracciones microsomales) se prepararon de acuerdo a lo descrito previamente²⁷. En breve, el tejido hepático (0,5 a 1g) se secciona en trozos pequeños en *buffer* que contiene 0,25 mol/L de sacarosa, 10 mmol/L Tris-HCl [pH 7,6] más inhibidores de proteasas para luego homogeneizarse con un homogeneizador de teflón (Thomas Scientific, Filadelfia, Pensilvania, EE.UU.). Luego se procede a una centrifugación breve a 3.000 rpm que permite precipitar los núcleos y posteriormente el sobrenadante postnuclear se centrifuga a 100.000 rpm durante 1 hora a 4°C. El *pellet* resultante se re-suspendió en un *buffer* que contiene 0,3mol/L sacarosa, 10 mmol/L HEPES [pH 7,5], y 40 mg/ml fenilmetilsulfonilo fluoruro con una aguja de calibre 23 y una jeringa. Los *western blots* fueron realizados con técnicas estándar usando el *kit Renaissance Western blotting* (New England Nuclear, Boston, Massachusetts, EE.UU.). En las fracciones de membrana, las proteínas fueron medidas por el método de Markwell²⁸ y cargándose igual cantidad de proteínas en el gel. Además, para estimar la cantidad relativa de proteínas en el gel se utilizó tinción de rojo Ponceau antes de la incubación con los respectivos anticuerpos. Las fracciones de membrana fueron analizadas con una proteína de fusión anti-Ntcp IgG, un anticuerpo policlonal anti-Bsep contra la secuencia 13 aminoacídica del terminal C y con un anti-Mrp2 policlonal de conejo (anticuerpo EAG15). Las bandas inmunorreactivas fueron cuantificadas por densitometría láser.

Artículo Original

Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar. Se usó la prueba de *t* de Student para muestras no pareadas para comparar diferencias entre grupos. Los valores se consideraron significativamente diferentes cuando el valor de *p* fue igual o menor de 0,05.

Resultados

Peso corporal y hepático, serología e histología de hígado

Después de ocho semanas de tratamiento, las ratas con dieta DDC tuvieron peso corporal, relación peso corporal/peso hígado, colesterol sérico y concentración de triglicéridos significativamente menores comparados con ratas alimentadas con DSC (Tabla 1). Por el contrario, las ratas con DDC tuvieron un peso de hígado mayor y mostraron niveles más altos de aminotransferasas séricas y de sales biliares comparados con el control. La glucosa plasmática no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Tabla 1). Estos hallazgos se correlacionan con la presencia de una marcada esteatosis hepática en el examen histológico de animales con DDC (*score* > 3); en contraste, el hígado de las ratas controles fue histológicamente normal (Figura 1).

Evaluación de la función secretora biliar

La Tabla 2 muestra los valores obtenidos después de determinar el flujo biliar, secreción de sales biliares, colesterol, fosfolípidos y glutatión biliar, así como también el contenido de glutatión hepático. La función secretora biliar se observa afectada en ratas con DDC, la cual se caracterizó principalmente por una significativa reducción del flujo biliar y la excreción de sales biliares, ambos indicadores de colestasia. Además, la secreción de lípidos y glutatión biliares, como también

el contenido de glutatión hepático se redujo en ratas con DDC comparada con los controles.

Expresión proteica de los principales transportadores hepatobiliares en HGNA experimental

Se realizaron análisis de *western blot* de Bsep, Mrp2 y Ntcp en fracciones de membranas hepáticas de ambos grupos de ratas con el fin de determinar si el deterioro de la función secretora biliar observada en ratas alimentadas con DDC se correlacionaba con los cambios en los niveles de expresión proteica de estos transportadores. Los hígados de ratas alimentadas con DDC tuvieron una reducción significativa en los niveles de proteína Ntcp en comparación con

Tabla 1. Peso corporal, peso de hígado y mediciones de parámetros séricos en modelo experimental de hígado graso no alcohólico

	Ratas con DSC (n = 5)	Ratas con DDC (n = 5)
Peso corporal (g)	376 \pm 13	302 \pm 13,5*
Peso hígado (g)	10 \pm 0,19	15,3 \pm 1,0*
Peso corporal/hígado	37,4 \pm 1,1	19,8 \pm 0,8*
Glucosa (mg/dL)	108,5 \pm 6,6	116,2 \pm 5,9
AST (U/L)	83 \pm 5,8	400 \pm 144*
ALT (U/L)	36 \pm 1,6	260 \pm 86,9*
Colesterol (mg/dL)	76 \pm 3,7	48,3 \pm 5,9*
Sales biliares (μ M)	6,6 \pm 3,6	31,2 \pm 10,5*
Triglicéridos (mg/dL)	74 \pm 13,3	36,8 \pm 5,4*

DSC (dieta suficiente en colina); DDC (dieta deficiente en colina); AST (aspartatoaminotransferasa, U/L); ALT (alanoaminotransferasa, U/L). Datos presentados como promedio \pm desviación estándar; **p* < 0,05 comparado con control.

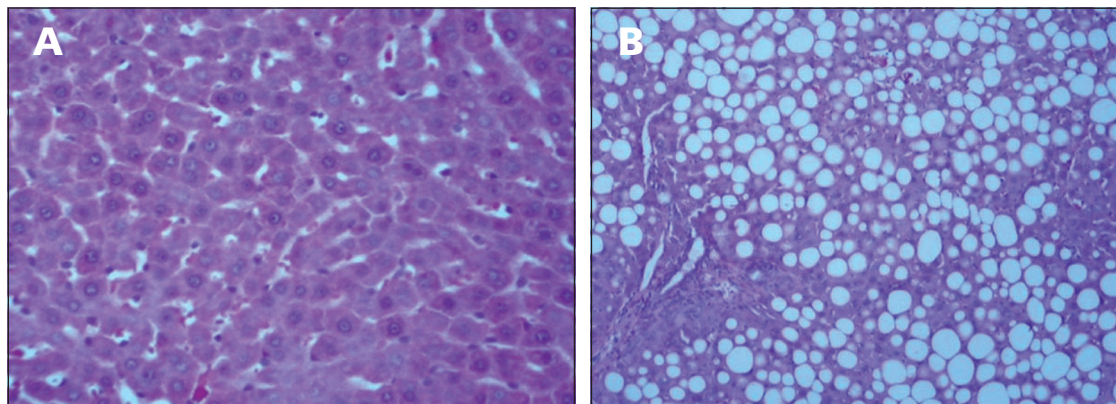


Figura 1. Histología hepática. Secciones de tejido hepático de rata teñidos con hematoxilina y eosina. **(A)** Hígado de animales alimentados con dieta suficiente en colina (DSC) y **(B)** dieta deficiente en colina (DDC).

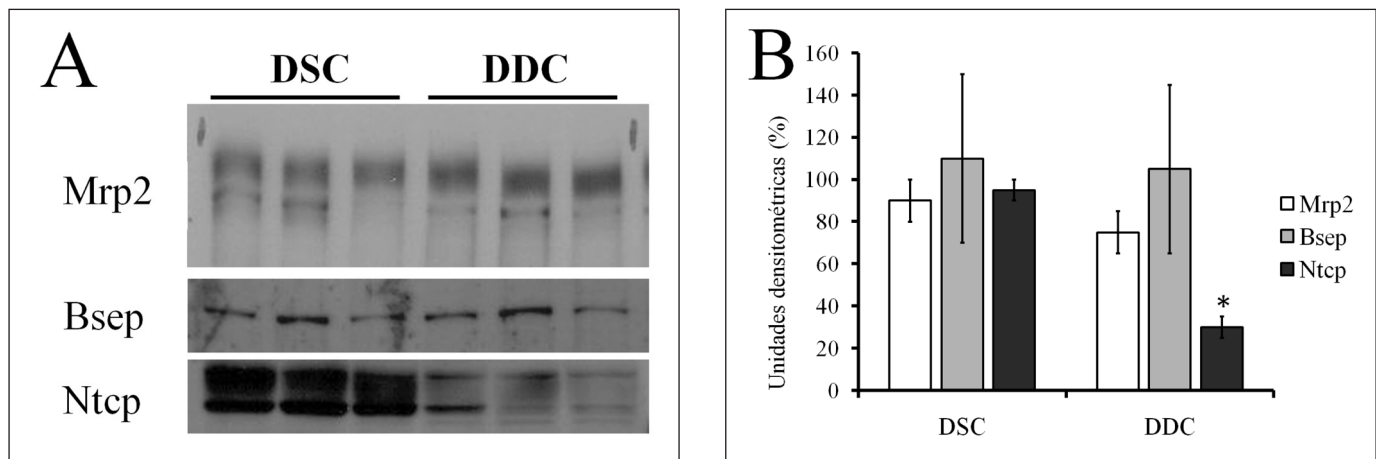


Figura 2. Expresión proteica de los principales transportadores canaliculares hepáticos en modelo experimental de hígado graso no alcohólico. **(A)** Western blot de Bsep y Mrp2 de ratas Sprague-Dawley alimentadas con dieta suficiente en colina (DSC) y dieta deficiente en colina (DDC). Muestra representativa de tres animales por grupo. **(B)** Gráfico de barras que muestra densitometría de western blot como porcentaje del control para Mrp2, Bsep y Ntcp.

los animales que recibieron DSC. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en los niveles de expresión proteica de Bsep y Mrp2 (Figura 2A). La Figura 2B muestra el análisis densitométrico de bandas expresado como control de porcentaje para la Mrp2, Bsep y la Ntcp.

Discusión

Evidencia de estudios previos con modelos genéticos de HGNA, usando ratas obesas *fa/fa* Zucker, sugieren la posibilidad de que la retención de ácidos biliares pudiese tener un rol en la patogénesis del HGNA^{14,29}. Más recientemente, otro modelo genético de HGNA con ratones *ob/ob* deficientes en Leptina, sugiere que la retención de ácidos biliares y la activación del receptor nuclear FXR tiene un potencial rol de gatillador en la patogénesis del HGNA³⁰. El presente estudio se llevó a cabo para evaluar la función secretora biliar en un modelo dietético de HGNA. Los resultados obtenidos muestran que la función secretora biliar se ve afectada con un patrón colestásico en el modelo de HGNA estudiado. Las ratas con DDC evidencian una significativa reducción del flujo biliar y excreción de ácidos biliares y niveles séricos más altos de aminotransferasas y de sales biliares en comparación con animales alimentados con DSC, lo que es indicativo de colestasia. La secreción biliar lipídica, secreción biliar de glutatión y el contenido de glutatión hepático también se redujo en ratas con DDC respecto de los animales controles. Por lo tanto, se demostró una reducción del flujo biliar total, con una reducción tanto de la secreción de ácidos biliares como de glutatión.

Tabla 2. Parámetros biliares y contenido de glutatión hepático en un modelo dietético de hígado graso no alcohólico

	Ratas con DSC (n = 5)	Ratas con DDC (n = 5)
Flujo biliar (μl/min x g de hígado)	1,7 ± 0,14	1,0 ± 0,12*
Glutatión (nmol/min x g de hígado)	3,8 ± 0,45	0,09 ± 0,04*
Sales biliares (nmol/min x g de hígado)	64,9 ± 2,6	36,4 ± 6,2*
Colesterol (nmol/min x g de hígado)	0,92 ± 0,1	0,57 ± 0,075*
Fosfolípidos (nmol/min x g de hígado)	1,7 ± 0,19	1,1 ± 0,12*
Glutatión hepático (nmol/mg de hígado)	4,5 ± 0,5	2,9 ± 0,3*

DSC (dieta suficiente en colina); DDC (dieta deficiente en colina). Datos presentados como promedio ± desviación estándar; *p < 0,05 comparado con control.

La captación de ácidos biliares conjugados en la membrana plasmática basolateral de los hepatocitos ocurre principalmente, por un mecanismo sodio-dependiente mediado por la proteína Ntcp. Estudios previos que evaluaron la expresión y la función de los transportadores de la membrana del hepatocito durante condiciones experimentales, tales como colestasia obstructiva y hepatocelular, han establecido que la expresión y función de los transportadores sinusoidales como Ntcp se reduce marcadamente durante el daño colestásico^{31,32}, gatillado por el aumento del contenido intracelular de sales biliares, las cuales a través de activar receptores nucleares, determinan una reducción de la expresión del gen. En humanos, la desregulación de NTCP es incluso más marcada donde altos niveles de expresión de mRNA se asocian a progresión de la enfermedad³³. En este trabajo se demostró una disminución significativa en la expresión de la proteína

Artículo Original

Ntcp con este modelo de HGNA, a diferencia de lo observado en otros estudios en ratas obesas Zucker, donde la expresión de proteína Ntcp se mantiene estable y la proteína Mrp2 presenta una disminución en su expresión¹⁴, sugiriendo que los mecanismos involucrados son diferentes. Lo anterior puede estar vinculado a un grado de daño o lesión metabólica más intensa, inducida por el modelo dietético respecto de modelos genéticos como el de ratas obesas. En efecto, histológicamente la DDC exhibe inflamación mientras que las ratas obesas Zucker presentan esteatosis sin inflamación al examen histológico.

Por otro lado, las ratas que recibieron DDC mostraron una disminución de la excreción biliar de sales biliares, aún cuando los transportadores canaliculares de sales biliares permanecieron sin cambios en su expresión (Mrp2 y Bsep). La mantención de los niveles de expresión proteica de Bsep, junto con la disminución de secreción de sales biliares sugiere una alteración funcional o cambios de localización compartamental de este transportador en ratas que recibieron la dieta DDC sin que haya una disminución en los niveles de expresión proteica expresados. En el caso de Mrp2, no observamos diferencias en los niveles de expresión proteica, pero es posible que su funcionalidad esté alterada como ocurre en el modelo de ratas Zucker obesas¹⁴. Sin embargo, la importante reducción del glutatión biliar, que es transportado por Mrp2, puede también explicarse por disminución de glutatión hepático por consumo intracelular. Es importante señalar que Bsep y Mrp2 participan en el transporte y eliminación de múltiples xenobióticos incluyendo fármacos de uso común. De hecho, alteraciones genéticas de estos transportadores incrementan la susceptibilidad al daño hepático por drogas³⁴. En el HGNA la alteración funcional de la secreción biliar puede también contribuir a afectar la depuración de drogas terapéuticas y potencialmente resultar en reacciones adversas relevantes³⁵.

En resumen, en el modelo dietético de HGNA utilizado en el presente estudio, se documentó la

existencia de alteraciones significativas del transporte hepatobiliar, lo cual puede contribuir a la progresión desde la esteatosis simple a una esteatohepatitis al aumentar la susceptibilidad al daño hepático.

Resumen

El hígado graso no alcohólico (HGNA) es una entidad clínica de importancia creciente por su potencial progresión a daño hepático crónico. La alteración de la función secretora biliar puede ser un factor relevante en el daño o lesión hepática asociada al HGNA.

Objetivos: Evaluar la función secretora biliar basal y los niveles de expresión proteica de tres de los principales transportadores hepatobiliares en un modelo de HGNA experimental. **Materiales y Métodos:** La función secretora biliar fue determinada por técnicas convencionales en ratas Sprague-Dawley control y alimentadas con una dieta deficiente en colina (DDC) durante 8 semanas. Los niveles de expresión proteica de Ntcp, Bsep y Mrp2 fueron cuantificados por *western blot*. **Resultados:** Se observó un deterioro de la función secretora biliar en las ratas alimentadas con DDC (reducción del flujo biliar y de secreción de ácidos biliares y aniones orgánicos). Además, las ratas con DDC presentaron niveles más altos de transaminasas séricas. Los niveles de expresión proteica de Ntcp disminuyeron en las ratas con DDC, mientras que Bsep y Mrp2 no presentaron variaciones cuantitativas en este modelo experimental. **Conclusiones:** En este modelo de HGNA experimental se observó una función secretora biliar alterada, determinando un patrón colestásico. La disminución de los niveles de expresión proteica de Ntcp junto con la mantención de Bsep y Mrp2, asociados a una disminución significativa de la secreción biliar, sugiere un deterioro funcional de estos transportadores en ratas alimentadas con dieta DDC.

Palabras clave: Hígado graso no alcohólico, esteatosis hepática, secreción biliar, colestasia.

Referencias

- Alba LM, Lindor K. Review article: Non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 977-86.
- Angulo P, Lindor KD. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl: S186-90.
- Sanyal AJ. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 1705-25.
- Adams LA, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med* 2005; 22: 1129-33.
- Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *Cmaj* 2005; 172: 899-905.
- Oh MK, Winn J, Poordad F. Review article: diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 503-22.
- Younossi ZM. Review article: current management of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 2-12.
- Loguercio C, De Simone T, D'Auria MV, de Sio I, Federico A, Tuccillo C, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: a multicentre clinical study by the Italian Association for the Study of the Liver. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 398-405.

- 9.- Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2557-62.
- 10.- Koneru B, Reddy MC, de la Torre AN, Patel D, Ippolito T, Ferrante RJ. Studies of hepatic warm ischemia in the obese Zucker rat. *Transplantation* 1995; 59: 942-6.
- 11.- Arrese M. Burning hepatic fat: therapeutic potential for liver-specific thymomimetics in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009; 49: 348-51.
- 12.- Friedman SL. Liver fibrosis-from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S38-53.
- 13.- Feldstein AE. Novel insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2010; 30: 391-401.
- 14.- Pizarro M, Balasubramanian N, Solís N, Solar A, Duarte I, Miquel JF, et al. Bile secretory function in the obese Zucker rat: evidence of cholestasis and altered canalicular transport function. *Gut* 2004; 53: 1837-43.
- 15.- Arrese M, Ananthanarayanan M, Suchy FJ. Hepatobiliary transport: molecular mechanisms of development and cholestasis. *Pediatr Res* 1998; 44: 141-7.
- 16.- Arrese M, Trauner M. Molecular aspects of bile formation and cholestasis. *Trends Mol Med* 2003; 9: 558-64.
- 17.- Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 2003; 83: 633-71.
- 18.- Elferink RO, Groen AK. Genetic defects in hepatobiliary transport. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1586: 129-45.
- 19.- Talalay P. Enzymic analysis of steroid hormones. *Methods Biochem Anal* 1960; 8: 119-43.
- 20.- Turley SD, Dietschy JM. Re-evaluation of the 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile. *J Lipid Res* 1978; 19: 924-8.
- 21.- Baginski ES, Foa PP, Zak B. Microdetermination of inorganic phosphate, phospholipids, and total phosphate in biologic materials. *Clin Chem* 1967; 13: 326-32.
- 22.- Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974; 20: 470-5.
- 23.- Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 1985; 113: 548-55.
- 24.- Ibáñez P, Solís N, Pizarro M, Aguayo G, Duarte I, Miquel JF, et al. Effect of losartan on early liver fibrosis development in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 846-51.
- 25.- Koppe SW, Sahai A, Malladi P, Whittington PF, Green RM. Pentoxifylline attenuates steatohepatitis induced by the methionine choline deficient diet. *J Hepatol* 2004; 41: 592-8.
- 26.- Perier C, Ronziere MC, Rattner A, Frey J. Employment of gas-liquid chromatography for the analysis of collagen amino acids in biopsy tissue. *J Chromatogr* 1980; 182: 155-62.
- 27.- Arrese M, Trauner M, Ananthanarayanan M, Boyer JL, Suchy FJ. Maternal cholestasis does not affect the ontogenic pattern of expression of the Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (ntcp) in the fetal and neonatal rat liver. *Hepatology* 1998; 28: 789-95.
- 28.- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978; 87: 206-10.
- 29.- Geier A, Dietrich CG, Voigt S, Ananthanarayanan M, Lammert F, Schmitz A, et al. Cytokine-dependent regulation of hepatic organic anion transporter gene transactivators in mouse liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G831-41.
- 30.- Martin IV, Schmitt J, Minkenberg A, Mertens JC, Stieger B, Mullhaupt B, et al. Bile acid retention and activation of endogenous hepatic farnesoid-X-receptor in the pathogenesis of fatty liver disease in ob/ob-mice. *Biol Chem* 2010; 391: 1441-9.
- 31.- Trauner M, Wagner M, Fickert P, Zollner G. Molecular regulation of hepatobiliary transport systems: clinical implications for understanding and treating cholestasis. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39 Suppl 2: S111-24.
- 32.- Wagner M, Zollner G, Trauner M. New molecular insights into the mechanisms of cholestasis. *J Hepatol* 2009; 51: 565-80.
- 33.- Kocabayoglu P, Bechmann L, Kilicarslan A, Erhard J, Kahraman A, Schlattjan M, et al. In NASH patients the bile acid transporter NTCP is upregulated and associated with fibrosis. *Hepatology* 2009; 50: 793A.
- 34.- Boyer JL. Cholestasis: genetic and acquired. *Semin Liver Dis* 2010; 30: 113-5.
- 35.- Merrell MD, Cherrington NJ. Drug metabolism alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Rev* 2011; 43: 317-34.