MIRIAM KARINE DE SOUZA

**Análise dos lipídios biliares no cálculo e na bile em
portadores brasileiros de litíase biliar**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Gastroenterologia Clínica

Orientador: Prof. Dr. Aytan Miranda Sipahi

SÃO PAULO

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Miriam Karine de

Análise dos lipídios biliares no cálculo e na bile em portadores brasileiros de litíase biliar / Miriam Karine de Souza. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Gastroenterologia.

Área de concentração: Gastroenterologia Clínica.

Orientador: Aytan Miranda Sipahi.

Descritores: 1.Litíase 2.Cálculos biliares 3.Lipídeos 4.Pacientes brasileiros

USP/FM/SBD-454/09

“Se queremos um mundo de paz e justiça, temos que colocar
decididamente a inteligência a serviço do amor”

Antoine de Saint-Exupéry

DEDICATÓRIA

Em especial, dedico esse trabalho ao meu marido Sergi, ao nosso lindo filho Lucca e a Deus por permitirem a realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Aytan Miranda Sipahi, orientador desta tese e a quem dedico minha mais sincera admiração. Obrigada pela interminável paciência e compreensão durante todos os anos que trabalhamos juntos.

Aos Prof. Dr. Joaquim Gama-Rodrigues e Angelita Habr-Gama por todo apoio inicial para trilhar o caminho da pós-graduação.

Ao Dr. Adérson Omar Mourão Cintra Damião pela grandeza dos seus atos, serei imensamente grata por toda minha vida.

Ao Dr. André Zonetti de Arruda Leite pelas importantes sugestões ao longo de todo o trabalho.

À Dra. Maraci Rodrigues pelo carinho e atenção que sempre me dedicou.

Às amigas Débora Dourado Poli e Marília Lage Alencar, meus exemplos de ótimas alunas e profissionais e que através do LIM07 pude conhecer e amar.

Às amigas Maria Laura Lacava Lordello e Carmen Lucia Ortiz Agostinho por terem feito esse trabalho possível. Obrigada por tudo e principalmente por todo esforço e dedicação na realização dos testes laboratoriais.

Às amigas Fabiana Maria dos Santos, Iêda Nishitokukado e Lilian Araújo; jóias preciosas do LIM07. Obrigada pelo carinho e apoio para continuar esse caminho.

Aos companheiros pós-graduandos e toda equipe do LIM07 que sempre estiveram presente com palavras de estímulo e apoio.

À Fabiana Bispo, secretária da pós-graduação, por toda ajuda principalmente nos momentos mais difíceis desse caminho.

Ao Prof. Dr. Flair José Carrilho, pela capacidade de conduzir o programa de pós-graduação com máxima eficiência e respeito pelos alunos.

À Fiorella Oncoy Carrillo, por cuidar com esmero do meu filho incontáveis horas durante meus inúmeros momentos de total ausência.

À Mirta Galaz, Maria Luisa Vargas, José Letelier e Rocio Utreras pela disposição e colaboração na análise estatística e revisão gráfica.

À Deise Bilate pela revisão gramatical do trabalho.

Ao Serviço de documentação científica da USP, especialmente Josué Moreira de Souza, pelo excelente trabalho de diagramação e impressão da tese.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização desse trabalho.

À minha irmã, Lilyan, pela dedicação e amor com que realiza suas tarefas e que me enchem de orgulho.

Finalmente, aos nossos pais, José e Antonia, obrigada por sempre incentivarem (e apoiarem) o nosso crescimento através dos estudos. Vocês são nossos maiores exemplos de amor, dedicação e honestidade; valores que de alguma maneira estão marcados nesse trabalho.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por: Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Sueli Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2º Ed. São Paulo. Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Anexo	
Resumo	
Summary	

1 Introdução	1
1.1 Composição do cálculo biliar	2
1.2 Composição da bile	4
1.2.1 Secreção hepática de lipídios biliares	7
1.3 Fisiopatologia da formação do cálculo de colesterol	8
2 Objetivos	13
3 Métodos	15
3.1 Casuística	16
3.2 Cálculo biliar	17
3.2.1 Dosagem de colesterol	17
3.2.2 Dosagem de bilirrubina	18
3.3 Bile vesicular	19
3.3.1 Tempo de nucleação	20
3.4 Quantificação dos lipídios biliares na bile vesicular	21
3.4.1 Dosagem de colesterol e bilirrubina direta	21
3.4.2 Dosagem de fosfolipídios	21
3.4.3 Dosagem de sais biliares totais	25
3.4.4 Dosagem de frações de sais biliares	27
3.5 Cálculo do Índice de Saturação do Colesterol (ISC)	28
3.6 Análise Estatística	29
3.7 Aspectos Éticos	29
4 Resultados	30
5 Discussão	42
6 Conclusões	48
7 Anexo	50
Anexo A - Equipamentos e Reagentes	51
8 Referências	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC – ATP Binding Cassete (transportador)
ACAT – Acetil CoA Colesterol Acetil Transferase
AINES – Antiinflamatórios não esteroidais
bG – β – glucuronidase
CA – Ácido cólico
CCK – Hormônio colecistoquinina
CDCA – Ácido chenodesoxicólico
CYP7A1 – Colesterol 7 α hidroxilase
DCA – Ácido deoxicólico
DMSO - Dimetilsulfóxido
HCl – Ácido clorídrico
HMG-CoA – 3 hidroxi –3 metilglutaril – CoA
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
ISC – Índice de Saturação do Colesterol
LCA – Ácido litocólico
PhL – Fosfolipase
TN – Tempo de nucleação
UCDA – Ácido ursodeoxicólico

LISTA DE TABELAS

MÉTODOS

Tabela 1 – Quantidade de reagentes segundo fabricante Biodiagnóstica® para curva de leitura de absorbância para dosagem de colesterol no cálculo.....	19
Tabela 2 – Quantidade de reagentes segundo fabricante Merck® para dosagem de bilirrubina no cálculo.....	19
Tabela 3 – Diluição das alíquotas de TCA em metanol	26
Tabela 4 – Curva de Calibração para cálculo de concentração de sais biliares totais	26
Tabela 5 – Reagentes utilizados para cálculo de concentração de sais biliares totais	26

RESULTADOS

Tabela 1 – Composição do cálculo	31
Tabela 2 – Características gerais dos grupos.....	33
Tabela 3 – Comparação de variáveis entre os grupos de cálculo de colesterol e controle.....	34
Tabela 4 – Correlação de ISC e TN para os grupos de cálculo de colesterol e controle.....	37
Tabela 5 – Correlação de %DCA e variáveis para os grupos de cálculo de colesterol e controle	38
Tabela 6 – Descrição dos pacientes de grupo de colesterol com %DCA maior ou menor que 50%.....	40
Tabela 7 – Correlação de %DCA com sexo, idade, ISC e tempo de nucleação entre os pacientes com cálculo de colesterol	41

LISTA DE GRÁFICOS

Grafico 1 – Composição da Bile	32
Grafico 2 – Composição dos Sais Biliares	32
Gráfico 3 – Comparação de ISC entre os grupos de colesterol e controle	35
Gráfico 4 – Comparação da frequência de ISC entre os grupos	36
Gráfico 5 – Comparação do tempo de nucleação entre os grupos controle e cálculo de colesterol.....	36
Gráfico 6 – Correlação de %DCA entre os grupos de cálculo de colesterol e controle.....	39

RESUMO

Souza MK. *Análise dos lipídios biliares no cálculo e na bile em portadores brasileiros de litíase biliar* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2009. 59p.

INTRODUÇÃO: A litíase biliar é uma doença do trato digestivo que apresenta prevalência variada em diferentes grupos étnicos e que gera altos gastos aos sistemas de saúde. A possibilidade de aplicação de tratamento não invasivo medicamentoso está direcionada a presença de cálculo de colesterol o que leva a necessidade de identificar corretamente os pacientes que podem beneficiar-se com o tratamento. No Brasil estima-se uma prevalência da doença em 9,3% da população em geral. Porém, ainda não há estudos que demonstrem a composição de cálculo de colesterol e pigmentos nos pacientes, bem como não há estudos de análise dos lipídios biliares e sua relação com os mecanismos fisiopatológicos da doença. Nossos objetivos foram analisar a composição do cálculo e da bile e compará-la com fatores pré-dispositivos da doença como tempo de nucleação e hiper saturação de colesterol em pacientes brasileiros.

MÉTODOS: Foram analisadas 72 amostras de bile vesicular e cálculo biliar de pacientes com litíase biliar submetidos a procedimento cirúrgico laparoscópico em diferentes hospitais da grande São Paulo. Quatorze amostras de bile vesicular de pacientes que foram submetidos à laparoscopia por problemas gastrointestinais, mas que não apresentavam litíase biliar foram usadas como controle. Foram realizadas análises bioquímicas para avaliar a composição dos cálculos e da bile. Os cálculos foram analisados de acordo com a porcentagem de colesterol e bilirrubina em relação ao peso total do cálculo. A concentração dos ácidos biliares foi determinada pela técnica *HPLC*. O índice de saturação do colesterol foi calculado de acordo com a metodologia descrita por Carey. O tempo de nucleação foi avaliado através de microscopia de luz polarizada durante 21 dias. **RESULTADOS:** No grupo de pacientes com litíase biliar, 48 eram do sexo feminino (66,7%) e a média de idade foi 54,1 anos $\pm$ 13,1 (mínima de 18 anos e máxima de 75 anos). Do total de cálculos analisados (n=72) 75% foram classificados como cálculo de colesterol e 25% como cálculo de bilirrubina. A bile dos pacientes com cálculo de colesterol apresentou menor concentração de fosfolipídios ($p<0,05$), maior índice de saturação de colesterol ($p<0,001$), menor tempo de nucleação ($p<0,05$) e maior concentração de ácido deoxicólico ($p<0,05$) quando comparada com a bile de pacientes controle. **CONCLUSÕES:** Os nossos resultados mostraram que a composição dos cálculos não foi homogênea na nossa amostra. Análise da bile mostrou-se semelhante aos trabalhos encontrados na literatura, os fatores litogênicos estavam presentes na bile dos pacientes com cálculo de colesterol e mostraram-se precursores eficientes para formação do cálculo.

Descritores: 1.Litíase biliar 2.Cálculo biliar 3.Lipídios biliares 4.Pacientes brasileiros

SUMMARY

Souza MK. *Analysis of gallstones and biliar lipids in gallbladder disease of Brazilians patients* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2009. 59p.

Introduction: Gallstone disease represents a prevalent and costly health problem. The changing epidemiology and the emerging non-surgical interventions for gallstone disease necessitate the definition of target populations for future therapies. The prevalence of biliary lithiasis in Brazil is around 9,3% of the general population with more than 20 years old, however it is necessary investigative studies to determine the composition of the gallstones and the correlation between bile lipids and disease physiopathology factors. **Objectives:** This study aimed to define patterns of gallstone composition and evaluate the biliary predictor's factors of gallstone disease as nucleation time and cholesterol saturation index in Brazilian patients. **Methods:** Seventy two post- cholecystectomy gallstone specimens and gallbladder bile were obtained from different hospitals of the city of Sao Paulo. Fourteen gallbladder bile samples were obtained as control samples, from patients who underwent laparoscopic surgery due to gastrointestinal symptoms without gallbladder disease. Biochemistry analyses were performed to determine the composition of the gallstones and bile. Gallstones were classified according to their cholesterol and bilirubin content linked with their dry weight. The concentration of bile salts was evaluated by *HPLC* technique. The cholesterol saturation index (CSI) was calculated in accordance with Carey methods. The nucleation time was evaluated by polarized light microscopy during 21 days. **Results:** There were 48 women and 22 men in the Gallbladder disease patients group. The mean age of the patients were $54,1 \pm 13,1$ years old (range 18 – 75 years old). Cholesterol stones were found in 75% of the stones. The bile of the cholesterol gallstone patients presented lower concentration of phospholipids ($p < 0,05$), higher CSI ($p < 0,001$), lower nucleation time ($p < 0,05$) and higher concentration of deoxycholic acid ($p < 0,05$) when compared with control group. **Conclusions:** Our results showed the composition of gallstones in our samples was not homogeneous. The analysis of bile is in accordance with literary findings and the lithogenic factors were presented in the bile of patients with cholesterol gallstones and they seem to be effective predictors' factors for the gallstone formation in our population.

Descriptors: 1.Biliary lithiasis 2. Gallbladder disease 3. Gallstones composition 4.Brazilian patients

1 Introdução

O papel que os lipídios biliares desempenham na litíase biliar é objeto de estudo pela importante relação com a complexa patogenia da doença. A litíase biliar é um distúrbio do trato digestivo, multifatorial que atinge a população mundial de maneira freqüente e em variadas proporções sendo considerada uma das patologias que mais gastos geram aos sistemas de saúde no mundo ⁽¹⁻⁹⁾. No Brasil estudos foram realizados para determinar a prevalência de colelitíase, porém esses estudos são escassos e limitados. Coelho *et al.* sugerem uma prevalência da doença em 9,3% da população em geral maior de 20 anos^(10;11), o que representaria 18 milhões de habitantes. Contudo, não encontramos na literatura estudos que demonstrem a composição de cálculo de colesterol e pigmentos nos pacientes, bem como não há estudos de análise dos lipídios biliares e sua relação com os mecanismos fisiopatológicos da doença.

1.1 Composição do cálculo biliar

Mais de 90% dos cálculos são compostos principalmente de colesterol e se formam no interior da vesícula biliar. A formação do cálculo de colesterol está diretamente relacionada com os fatores fisiopatológicos da litíase biliar que envolve hiper saturação hepática de colesterol e tempo de

nucleação, além de fatores adicionais como hipomotilidade vesicular e trânsito intestinal lento que permitem que micro cristais de colesterol sejam retidos e se transformem em cálculos⁽¹²⁾. O restante dos cálculos está composto principalmente por cálculos pigmentados de bilirrubinato de cálcio polimerizado que precipitam, se o produto iônico do cálcio e da bilirrubina não conjugada exceder a capacidade de solubilização da micela formada por sais biliares e fosfolipídios. A formação do cálculo pigmentar obedece a mecanismos patogênicos muito diferentes aos do cálculo de colesterol. Postula-se que sua formação ocorre na presença de bactérias que colonizam a via biliar e que através da enzima β -glucuronidase (bG) converte bilirrubina conjugada em não conjugada. A bilirrubina não conjugada é menos solúvel em meio aquoso e precipita formando complexos de cálcio⁽¹³⁾. O importante papel que as bactérias desempenham na formação do cálculo pigmentar foi por primeira vez documentado por Maki, em 1966, que demonstrou que a enzima bG conduz a precipitação do bilirrubinato de Cálcio⁽¹⁴⁾. Outros estudos mostraram a importância da enzima bacteriana fosfolipase (PhL) na condução da formação de palmitato de cálcio^(15;16). A secreção biliar possui propriedades antibacterianas e anticorpos que normalmente conduzem a eliminação das bactérias junto com as células epiteliais. Essa remoção natural se perde quando as bactérias estão aderidas a um corpo estranho, portanto, as propriedades de adesão são importantes fatores facilitadores de colonização bacteriana na vesícula biliar⁽¹⁷⁾. A classificação dos cálculos biliares é importante para compreender sua patogenia e tratamento. Dividem-se em cálculos de

colesterol, mistos e pigmentados (marrons e negros)⁽¹⁸⁾. Os cálculos amarelos ou pardos são ricos em colesterol e predominam nas sociedades industrializadas (80-90%). Os cálculos de pigmento negro são mais raros (<5%) e associam-se a transtornos hemolíticos crônicos, cirrose hepática, doença de Crohn e fibrose cística. Os cálculos de pigmento marrom como de terra associam-se com infecção biliar bacteriana e anatomia anormal da vesícula biliar^(19;20). Os cálculos também possuem porcentagens variadas de cálcio. A partir de exame de superfície de corte se observa que o cálculo normalmente tem um centro escuro ou pigmentado, um interior cristalino (cristais de colesterol) que com frequência apresenta irradiação e de acordo com o tamanho do cálculo, possui uma capa superficial que contém sais de cálcio.

1.2 Composição da bile

Colesterol, fosfolipídios e sais biliares correspondem a 97% do total de componentes da bile, sendo o restante composto por bilirrubina e proteínas. O desequilíbrio na concentração desses componentes favorece a cristalização do colesterol e formação do cálculo⁽²¹⁾. Apesar de que os mecanismos que originam tal desequilíbrio ainda não foram bem esclarecidos, estudos mostram que cristais de colesterol ocorrem na presença de baixa relação fosfolipídio/colesterol e também baixa concentração de fosfolipídios e alta concentração de sais biliares^(21;22).

O colesterol encontra-se presente em todas as membranas celulares e constitui um precursor de sais biliares, hormônios esteroidais e vitamina D. É insolúvel em água e está presente quase exclusivamente como colesterol não esterificado na bile. No metabolismo hepático do colesterol três principais enzimas - HMG-CoA redutase (síntese de colesterol livre), CYP7A1 (síntese de ácido biliar) e ACAT (formação de colesterol esterificado) – poderiam estar envolvidas na hipersecreção de colesterol⁽²³⁾, porém, alguns autores avaliaram essas enzimas em pacientes obesos com e sem cálculo biliar e não identificaram defeito metabólico para hiper secreção de colesterol^(24;25).

A maior parte dos fosfolipídios encontrados na bile está formada por diacilfosfatidilcolina ou lecitina. São insolúveis e também formam parte das membranas celulares. Devido à insolubilidade do colesterol em meio aquoso, micelas formadas por sais biliares, vesículas unilamelares de colesterol e lecitina atuam para mantê-lo em solução aquosa. A micela está presente na bile, particularmente dentro da vesícula biliar⁽²¹⁾.

Os sais biliares formam-se a partir do colesterol e sua síntese ocorre no fígado. Constituem os principais solutos da bile e os principais metabólitos do colesterol. Consistem em um núcleo esteroideal hidrofóbico e quatro anéis de hidrocarbono fusionados que formam a cadeia lateral alifática. No homem a maioria deles possui 24 átomos de carbono. São derivados estruturalmente do ácido cólico, formado por 24 átomos de carbono e que se caracteriza por ter na posição C-17 uma cadeia alifática ramificada com cinco átomos de carbono. Os sais biliares possuem número

variado de grupo hidróxido que podem estar no núcleo esteróide ou na cadeia lateral alifática. A posição onde ocorre a hidroxilação define o tipo de ácido biliar. Antes de serem excretados na bile, os ácidos biliares são conjugados com os aminoácidos taurina e glicina e a partir daí são conhecidos como sais biliares⁽²⁶⁾.

Os principais ácidos biliares são o ácido cólico - CA (hidroxilação na posição C-3 α , C-7 α e C-12 α), ácido litocólico - LCA (hidroxilação na posição C-3 α e C-24 α), ácido deoxicólico - DCA (hidroxilação na posição C-3 α , C-7 α e C-12 α), ácido ursodeoxicólico - UDCA (hidroxilação na posição C-3 α , C-7 α e C-24 α) e ácido chenodeoxicólico - CDCA (hidroxilação na posição C-3 α e C-7 α). Os ácidos biliares fazem parte da circulação entero hepática e o local onde o grupo hidróxido é catalisado define os ácidos biliares em primários, secundários e terciários. CA é primário por ser sintetizado diretamente no fígado. Os ácidos secundários DCA e LCA são resultado das modificações de CA realizadas por bactérias anaeróbicas intestinais especializadas. Os ácidos biliares terciários, como UDCA, surgem mediante oxidurreductases bacterianas intestinais e hepáticas. CDCA também é sintetizado no fígado e, portanto é considerado um ácido biliar primário⁽²⁶⁾. CDCA e DCA formam micelas em concentrações baixas e podem solubilizar o colesterol de maneira eficiente na bile e também no processo de absorção de gorduras no intestino delgado. Estudos clínicos e experimentais mostraram que aumento da concentração de DCA e diminuição da motilidade intestinal parecem estar associados à formação de bile litogênica^(27;28). Trânsito intestinal lento propicia o aumento de bactérias anaeróbicas gram positivas e ação

prolongada da enzima CYP7A1⁽²⁹⁾. UDCA amplifica a fase cristalina o que diminui a quantidade de mono hidrato de colesterol cristalino na bile, a forma de colesterol encontrada nos cálculos. Além disso, ele é mais hidrófilo que os outros dois mencionados anteriormente⁽³⁰⁾. Alta concentração de colesterol nos cálculos tem sido a base para o uso de ácidos biliares como tratamento não cirúrgico para dissolução dos cálculos de colesterol⁽³¹⁾. CDCA e UDCA são utilizados para o tratamento, prevenção e recidivas de cálculos de colesterol radiotransparentes, porém UDCA é mais utilizado devido à sua menor toxicidade por sua natureza mais hidrofílica. Os efeitos terapêuticos desse sal incluem inibição da secreção hepática, redução de absorção intestinal de colesterol e possivelmente aumento do esvaziamento vesicular ao melhorar a contração muscular⁽³²⁾.

1.2.1 Secreção hepática de lipídios biliares

A secreção hepática da bile está regulada pelas proteínas transportadoras da família ABC e ocorre quando a bile canalicular flui em sentido contrário ao fluxo do plasma sinusal. Desta forma, os hepatócitos da parte final do espaço portal sintetizam bile contendo solutos em concentração maior que aquela bile encontrada na parte final do espaço venoso hepático. Isso favorece a formação de bile com alta concentração de solutos orgânicos (ácidos biliares, pigmentos biliares, colesterol e fosfolipídios)⁽³³⁾. Na bile hepática, o colesterol é transportado em blocos de fosfolipídios e colesterol conhecidos como vesículas unilamelares. Diferentes

estudos demonstraram que os sais biliares estimulam a secreção biliar dessas vesículas desde a capa externa da membrana canalicular⁽³⁴⁻³⁶⁾. As vesículas multilamelares, ou cristais líquidos de colesterol, são derivadas da fusão de vesículas unilamelares na vesícula biliar e invariavelmente implicam na iniciação da seqüência de nucleação do colesterol.

1.3 Fisiopatologia da formação do cálculo de colesterol

A fisiopatologia da formação do cálculo de colesterol envolve principalmente três mecanismos de grande importância: supersaturação biliar de colesterol, nucleação na presença de fatores pró-nucleação, como a mucina e hipomotilidade vesicular. A interação desses fatores resulta na retenção de cristais de colesterol monohidratados com gel de mucina na vesícula, o barro biliar, onde o cálculo de colesterol se formará pela aglomeração de cristais unidos pelo gel de mucina e misturados à variadas proporções de sais de cálcio⁽¹²⁾.

A hipersecreção hepática de colesterol representa o principal fator indutor de supersaturação de colesterol na bile vesicular e pode estar acompanhada, ou não, por diferentes níveis de secreção de sais biliares e fosfolipídios. Em seus trabalhos, Carey definiu a relação entre quantidade de colesterol presente na bile e máxima solubilidade micelar como índice de saturação do colesterol (ISC)^(37;38). Em pacientes com litíase biliar ocorre a precipitação de cristais de colesterol ($ISC > 1$) o que indica que a

solubilidade do colesterol na bile vesicular está no limite. A solubilidade do colesterol depende de três principais componentes lipídicos da bile: sais biliares conjugados, fosfolipídios e colesterol. Esses três componentes correspondem a quase 90% do peso da bile vesicular. A relação entre secreção de sais biliares, colesterol e fosfolipídios é curvilínea. Quando a secreção de sais biliares está em baixos níveis ($<10\mu\text{mol/h/kg}$ em humanos), mais colesterol é secretado por molécula de sal biliar se comparado com altos níveis de secreção. Durante e depois das refeições aumenta o nível de secreção de sais biliares e a saturação biliar de colesterol é menor que durante os períodos interprandiais. Este ritmo diurno persiste no estado litogênico^(38;39). O fator crítico que influencia na cristalização do colesterol procedente das vesículas parece ser a relação molar colesterol:fosfolipídio dentro das vesículas. Quando a relação molar se aproxima a 1:1, as vesículas ficam instáveis e tendem a precipitar. Quando os sais biliares estão presentes em concentrações elevadas, o colesterol se reparte entre as vesículas e a micela. Esta distribuição do colesterol reduz a relação colesterol:fosfolipídio dentro das vesículas fazendo com que sejam estáveis e diminuindo o risco de formação e precipitação de cristais⁽³⁸⁾.

A nucleação é o processo inicial para formação do cálculo e o gel de mucina na vesícula biliar parece ser o principal fator pró nucleação para formação de cristais de colesterol que se desenvolveram em cálculo biliar. Em 1979, Holan, Holzbach Hermann, Cooperman e Claffey⁽⁴⁰⁾ foram os primeiros cientistas em demonstrar a importância da nucleação alterada no desenvolvimento da litíase biliar. Apesar de praticamente não haver

diferença na supersaturação biliar de colesterol entre o grupo controle e o grupo com cálculo, houve uma considerável diferença no tempo de nucleação comparativo entre os grupos, isto é, o tempo que o micro cristal de colesterol demora em aparecer nas amostras isotrópicas (uma fase) da vesícula biliar. Na bile procedente do grupo controle o tempo de nucleação foi de 10 -14 dias ou mais; na bile do outro grupo foi somente de 1 -2 dias. Como o tempo de estadia da bile na vesícula biliar é questão de horas, é evidente que os tempos de nucleação medidos *in vitro* não se relacionam diretamente com os obtidos *in vivo*. Somente servem como valor comparativo em ambos os grupos. Não está claro se a nucleação se deve ao excesso de promotores e/ou uma deficiência de inibidores de cristalização. As provas mais convincentes vão a favor do excesso de promotores e procedem dos trabalhos realizados por Strasberg *et al* ⁽⁴¹⁾. Quando se adicionam amostras de bile da vesícula biliar de pacientes com cálculo nas amostras de bile de pacientes sem cálculo, o tempo prolongado da nucleação do grupo controle se converte na nucleação rápida do grupo com cálculo. Em realidade, foram necessários somente 10% do volume da bile do grupo cálculo para converter o tempo lento da nucleação do grupo controle em um tempo anormalmente rápido. Não se conhece a natureza desses promotores ou inibidores da cristalização, mais é possível que sejam mucoglicoproteínas como a mucina^(42;43). A mucosa da vesícula biliar responde com um aumento da síntese de mucoglicoproteínas e sua liberação quando ocorre secreção biliar supersaturada de colesterol antes do aparecimento dos micro cristais de colesterol. Estudos experimental e clínico

conduzidos por Lee⁽⁴⁴⁾ e Esterling *et al*⁽⁴⁵⁾ respectivamente, demonstraram que o ácido acetilsalicílico e outros AINES previnem o aumento de mucoglicoproteínas biliares induzida por dieta litogênica e também previnem a formação de cálculo. Outro estudo conduzido por Hood *et al*⁽⁴⁶⁾ mostrou que a ingestão prolongada de AINE parece prevenir a recidiva da litíase biliar. Portanto esses autores sugerem que a prevenção do desenvolvimento de cálculo biliar, tanto primários como recidivantes, consegue-se manipulando a nucleação dos cristais de colesterol, mais do que reduzindo a saturação biliar de colesterol. Considerar tempo de nucleação como fator para formação do cálculo indica que a estase biliar na vesícula tem importante papel já que para ocorrer à formação, não somente a bile deve estar supersaturada de colesterol, mais também os cristais de colesterol resultantes do efeito de nucleação devem permanecer um tempo suficiente na vesícula biliar para aglomerar-se, experimentar coalescência e crescer até formar cálculos macroscópicos. A liberação do hormônio CCK duodenal favorece a contratilidade da vesícula biliar e sua supressão, que pode ser causada, por exemplo, pela somatostatina, diminui a contração muscular vesicular o que favorece a formação do cálculo^(47;48). Não existe consenso se o esvaziamento insuficiente é causado pela presença do cálculo ou vice-versa, apesar de alguns estudos experimentais e em humanos sugerirem que o esvaziamento vesicular anormal precede ao desenvolvimento do cálculo^(49;50). Jazrawi *et al*⁽⁵¹⁾ usaram simultaneamente as técnicas de ultrasonografia e cintilografia para comparar *turnover* vesicular biliar em pacientes normais e com litíase. Os resultados mostraram *turnover*

claramente diminuído nos pacientes com litíase reforçando a teoria que a hipomotilidade vesicular pode ser um fator primário que associado ao tempo de nucleação conduz a formação do cálculo.

O tempo de trânsito colônico é outro fator recentemente considerado por alguns autores como Van Erpecum *et al*⁽⁵²⁾ e Thomas *et al*^(52;53) como parte da fisiopatologia da formação do cálculo. Seus estudos mostraram aumento da enzima bacteriana 7 alfa hidroxilase nas amostras fecais de pacientes com cálculo de colesterol. Thomas *et al*⁽⁵⁴⁾ também demonstrou que a prolongação do trânsito colônico induzida por Octreotideo aumenta bactérias anaeróbicas fecais, enzimas do metabolismo de sais biliares e DCA sérico em pacientes acromegálicos.

Pode-se entender, portanto, que a formação do cálculo biliar de colesterol é o resultado da ação de diferentes mecanismos patológicos que levam a alterações funcionais hepatocelulares e vesiculares e que estão associados a uma complexa interação de fatores de risco genéticos, dietéticos (dieta rica em carboidratos, gorduras e baixo consumo de fibras), fisiológicos (gravidez, menopausa) além de fatores ambientais (sedentarismo) ainda não bem definidos^(19;20;55). Esses mecanismos têm sido estudados bem como sua relação com outras patologias e alterações associadas à formação do cálculo, como por exemplo, hipertrigliceridemia⁽⁵⁶⁾, resistência insulínica⁽⁵⁷⁾ e acometimento inflamatório do íleo terminal que acarreta diminuição do “pool” de sais biliares e conseqüente aumento da concentração de colesterol formando assim a chamada “bile litogênica”⁽⁵⁸⁾.

2 Objetivos

1. Análise dos lipídios biliares no cálculo e na bile.
 - a. Análise da composição do cálculo e da bile;
 - b. Comparar perfil dos lipídios biliares, ISC e tempo de nucleação dos pacientes com cálculo e sem cálculo de colesterol.

3 Métodos

Estudo retrospectivo de análise da composição do cálculo e da bile vesicular extraídos de 72 pacientes portadores de litíase biliar, submetidos à cirurgia laparoscópica em vários hospitais da grande São Paulo, durante o período de 1987 – 2004. Originalmente foram armazenadas 178 amostras, porém os critérios de exclusão adotados somados a problemas técnicos que impediram a análise de alguns parâmetros reduziram em 72 o número de amostras onde foi possível analisar todos os parâmetros propostos no estudo.

3.1 Casuística

Materiais biológicos (bile vesicular e cálculo biliar) de 72 pacientes com diagnóstico de litíase biliar, comprovados através de critérios clínicos, radiológicos e endoscópicos, foram coletados por cirurgia laparoscópica em vários hospitais da grande São Paulo entre os anos 1987 e 1998. Foram incluídos pacientes com idade variando entre 18 e 74 anos. Excluíram-se os materiais biológicos de pacientes que receberam tratamento medicamentoso prévio para litíase biliar, portadores de Doença de Crohn e pacientes com diagnóstico de câncer gastrointestinal. O grupo controle utilizado foi composto por 14 amostras de bile vesicular, livre de cálculo biliar, de

pacientes submetidos à cirurgia laparoscópica por problemas gastrointestinais mais que não apresentavam litíase biliar no momento da cirurgia. Os equipamentos e kits comerciais usados no trabalho foram descritos na tabela Equipamentos e Reagentes - Anexo A.

3.2 Cálculo biliar

O cálculo biliar retirado durante a cirurgia foi imediatamente lavado em água destilada e armazenado em frasco estéril, a temperatura ambiente. No laboratório, o cálculo foi colocado na estufa a 37°C até a estabilização do peso (perda de água) durante 48 horas (processo de secagem do cálculo). Após o processo de secagem, o cálculo foi macerado e transformado em pó para análise de colesterol e bilirrubina através de método colorimétrico e o resultado foi expresso em porcentagem de colesterol e bilirrubina em relação ao peso seco do cálculo em miligramas. As dosagens foram feitas segundo métodos propostos pelos fabricantes dos kits utilizados em cada técnica^(59;60).

3.2.1 Dosagem de colesterol

Para dosagem do colesterol, pesamos o pó de cálculo em triplicata (1mg/tubo). Adicionamos aos tubos 0,125mL de água destilada e 1,125mL de isopropanol. Sonicamos os tubos por 10 minutos. Coletamos 50µL da

amostra e adicionamos 1mL da solução do Kit de colesterol comercial enzimático colorimétrico Biodiagnóstica® código BD 301(Tabela 1). Agitamos os tubos e incubamos por 10 minutos em temperatura de 20 – 25 °C. Realizamos a leitura em espectrofotômetro a 500nm e calculamos o fator através da curva de absorbância.

[Fator = concentração de colesterol / leitura da absorbância (média – branco)]

Colesterol nas amostras = leitura de absorbância (média – branco) x fator.

3.2.2 Dosagem de bilirrubina

Para dosagem de bilirrubina adicionamos a 1mg de pó de cálculo, 1mL de solução DMSO/acetona/HCl(1M) – 90:9:1. Sonicamos os tubos por 15 minutos e centrifugamos por 1 hora a 5000rpm a temperatura de 10 °C. A partir do sobrenadante retiramos 200µL e seguimos a reação conforme estipulado pelo fabricante (Tabela 2). Misturamos todos os componentes e deixamos em repouso a temperatura ambiente (20 – 25 °C) por 10 – 60 minutos. Após esse período adicionamos 1 mL de solução Fehring aos tubos (branco e amostras), misturamos e depois de 5 – 30 minutos realizamos leitura em espectrofotômetro a 578nm para então contrastar as absorbâncias da amostra e branco. A bilirrubina reage com o ácido sulfanílico diazotado, produzindo pigmento vermelho/róseo (azabilirrubina).

[Concentração de bilirrubina total x (Abs x 180umol/L) = Abs x 10,5mg/dl]

Tabela 1 – Quantidade de reagentes segundo fabricante Biodiagnóstica® para curva de leitura de absorbância para dosagem de colesterol no cálculo

		PADRÃO	ISOPROPANOL	SOLUÇÃO KIT
	BRANCO	—	50uL	1mL
P I	0,02mg/20ug	10uL	40uL	1mL
P II	0,04mg/40ug	20uL	30uL	1mL
P III	0,06mg/60ug	30uL	20uL	1mL
P IV	0,08mg/80ug	40uL	10uL	1mL

Tabela 2 – Quantidade de reagentes segundo fabricante Merck® para dosagem de bilirrubina no cálculo

KIT MERCK®	TUBO AMOSTRAS	TUBO BRANCO
NITRITO DE SÓDIO	50uL	—
ÁCIDO SULFANÍLICO	200uL	200uL
ACELERADOR BENZOATO DE SÓDIO	1,0mL	1,0mL
AMOSTRA	200uL	200uL

3.3 Bile vesicular

As amostras de bile *in natura* foram obtidas por punção e aspiração do conteúdo vesicular durante o procedimento cirúrgico em pacientes em jejum, com seringas estéreis contendo 10 mL de bile vesicular isoladas em papel plástico e transportadas em garrafa térmica à temperatura de 37 °C. Estocamos parte dessa amostra (3 mL) em tubo esterilizado, pré-aquecido a 37 °C, os quais foram mantidos em estufa à temperatura controlada de

37 °C, para avaliação do tempo de nucleação. Diluímos a outra parte da bile coletada (7 mL) em isopropanol (1:9) e armazenamos a -20 °C para posterior quantificação de colesterol total, sais biliares totais e frações, fosfolipídios totais e bilirrubina direta.

3.3.1 Tempo de nucleação

O estudo do tempo de nucleação foi realizado segundo técnica descrita por Chijiwa *et al*⁽⁶¹⁾. Antes de receber as amostras de bile, o fluxo laminar era higienizado com sabão e água e mantido com a lâmpada ultravioleta acesa. Todo material a ser utilizado estava dentro do fluxo, inclusive o banho maria, no momento de chegada da amostra. Nesse momento a lâmpada ultravioleta era apagada e trabalhávamos somente com o fluxo ligado. Transferíamos 3 mL de bile das seringas para tubos estéreis de tampa rosqueada que estavam em banho maria a 37 °C e filtrávamos a bile em filtro 0,22µm. Os filtros eram previamente esterilizados em autoclave ou usávamos filtros descartáveis da Merck®. Depois da filtração colocávamos nitrogênio no espaço vazio do tubo com pipeta de Pasteur esterilizada. O tubo era então cerrado, identificado com as iniciais do paciente, data e hora da coleta da bile, coberto com papel alumínio e armazenado em estufa a 37 °C. Os frascos eram então observados em intervalos de 3 a 4 horas no primeiro dia, 3 vezes ao dia nos 5 dias seguintes e 1 vez ao dia durante os últimos 15 dias. As amostras eram observadas em microscópio de luz polarizada durante 21 dias para verificação da presença

de micro cristais. Caso a amostra se apresentasse limpa, uma alíquota era centrifugada a 3000 rpm, por 5 minutos, à temperatura ambiente. Com esse procedimento as formas cristalizadas do colesterol biliar eram separadas da solução micelar por diferença de densidade e os cristais de colesterol porventura formados se precipitavam por serem mais pesados que a solução micelar, que permanecia no sobrenadante.

3.4 Quantificação dos lipídios biliares na bile vesicular

A bile usada para quantificação dos lipídios (7mL) foi armazenada em tubo de ensaio lavado com sulfocrômica e água bidestilada deionizada.

3.4.1 Dosagem de colesterol e bilirrubina direta

O colesterol total e a bilirrubina direta foram dosados através de método enzimático espectrofotométrico de acordo com as instruções do kit comercial descritas pelo fabricante Wiener Lab[®] (62;63) e também com kit comercial Roche[®] para dosagem desses dois lipídios no aparelho Cobas Mira[®].

3.4.2 Dosagem de fosfolipídios

A dosagem de fosfolipídios está de acordo com as técnicas descritas por Ewing⁽⁶⁴⁾ e Fiske e Subbarow⁽⁶⁵⁾.

Para dosagem de fosfolipídios na bile foi necessário converter o fósforo orgânico em inorgânico total para ser dosado colorimetricamente em 830nm. Para extração de fósforo homogeneizamos o suco biliar, pipetamos 0,5mL em tubo cônico com tampa esmerilhada, e adicionamos 20mL (com pipeta sorológica) de solução Hexano/Isopropanol na proporção 3:2. A seguir, agitamos no *mixer*, por 5 minutos e deixamos em repouso, na geladeira, por uma noite. A fase orgânica foi denominada extrato.

Em um tubo de ensaio, pipetamos 0,1mL do extrato (ou quantidade suficiente para que a leitura ocorra dentro da faixa da curva de calibração), secamos em corrente de nitrogênio e adicionamos 0,5mL de ácido sulfúrico 5M. A seguir, levamos ao bloco digestor, a 150° C, durante 1 hora. Após este período, resfriamos tubo, em água corrente, e adicionamos 60 ul de água oxigenada 30% (Peridrol) e deixamos por mais 1 hora, no bloco digestor, a 150° C. Para o branco, usamos a solução de hexano/isopropanol na proporção 3:2 na mesma quantidade que foi pipetada para o extrato. Os demais procedimentos foram executados do mesmo modo na amostra. Foram efetuados ensaios em triplicata para o branco e para a amostra.

A recuperação do fósforo inorgânico foi feita pipetando-se para um tubo de ensaio, 150uL de uma solução de fosfato de sódio, cuja concentração correspondesse a 20 ug/mL de fósforo, e 50 ul de água milli-Q para um tubo de ensaio. O "branco" foi feito pipetando-se 200ul de água milli-Q em outro tubo. A seguir, evaporamos os tubos em corrente de nitrogênio até a secura. Os demais procedimentos foram idênticos ao item anterior.

A recuperação do fósforo orgânico foi feita pipetando-se, para um tubo de ensaio, 150uL de uma solução de Lecitina 522ug/mL em Folch, que correspondeu a, aproximadamente, 3ug de fósforo, e 50uL de Folch (mistura 2:1 clorofórmio/metanol). O "branco" foi feito, pipetando-se 200uL de Folch em outro tubo. A seguir, evaporamos os dois tubos em corrente de nitrogênio até a secura. Os demais procedimentos foram idênticos ao item anterior.

Para curva de calibração pipetamos alíquotas de 50uL, 100uL, 150uL e 200uL de uma solução de fosfato de sódio, cuja concentração correspondesse a 20ug/mL de fósforo, em tubos de ensaio. Estes tubos correspondiam, respectivamente, a 1ug, 2ug, 3ug e 4ug de fósforo inorgânico. A seguir, pipetamos, respectivamente, 150uL, 100uL e 50uL de água Milli-Q a cada um dos tubos, de maneira que o volume final fosse 200uL. Executamos o branco colocando 200ul de água Milli-Q em outro tubo. Adicionamos 0,5mL de ácido sulfúrico 5M a todos os tubos, agitamos, adicionamos 4,0mL da solução de molibdato de amônio 0,22% p/v a todos os tubos, agitamos e a adicionamos 0,2mL do reagente de Fisk-Subbarow (0,5g de ácido q-amino-2-naftol-4-sulfônico em 200mL de solução a 7,5 % p/v de Dissulfito de Sódio anidro) seguimos com a adição de 1,0g de sulfito de sódio anidro em todos os tubos e agitamos. A seguir, tampamos os tubos com bolinhas de gude, e levamos ao bloco digestor, por 10 minutos, a 115°C. Eram feitas triplicatas de cada ponto da curva de calibração. Terminado este período, resfriamos os tubos, em água corrente, e fazemos a leitura de absorbância, em 830nm, num aparelho "zerado" contra água, de cada um dos tubos. Calculamos a média aritmética de cada um dos tubos e

subtraímos da média do "branco". Construímos a curva de calibração, lançando-se estes valores, na ordenada e na abscissa, a concentração de fósforo correspondente. Aos tubos das amostras e das recuperações, pipetamos 600ul de água Milli-Q, agitamos, pipetamos 4,0mL de solução de molibdato de amônio 0,22 % *p/v*, agitamos; pipetamos 0,2mL do reagente de Fisk-Subarow e agitamos. A seguir, tampamos os tubos, com as bolinhas de gude, e levamos ao bloco digestor, a 115 °C, por 10 minutos. Resfriamos os tubos, em água corrente, e fizemos a leitura da absorbância como o indicado no item da Curva de calibração. Os valores obtidos tinham que estar compreendidos na faixa de absorbância da curva de calibração. Caso contrário, era feita a diluição apropriada. Na curva obtida, calculamos a reta média, utilizando-se regressão linear. O valor obtido, para o coeficiente de correlação, deveria ser maior ou igual a 0,99. Caso contrário, a curva era refeita. Os valores das amostras e das recuperações foram interpolados nesta curva, para obtenção da concentração de fósforo inorgânico (F em ug). O cálculo da Concentração média de fosfolipídios, no suco biliar, é dado por: $C = F \times 13,2$ (C em mM, F em ug de Fósforo total). O método espectrofotométrico tem um erro absoluto de 1%. O erro relativo pode ser obtido pela seguinte relação: $\%E = 230/S$ (%E = Erro percentual relativo e S = Variação da %T para uma variação de dez vezes a concentração. %T = Porcentagem de Transmitância). O coeficiente de variação permitido para a faixa de concentração de 1ug a 4ug de Fósforo é 15%.

3.4.3 Dosagem de sais biliares totais

A dosagem de sais biliares totais foi feita de acordo com os trabalhos de Osuga et al^(66;67). A dosagem foi feita através de método enzimático com kit comercial Merk[®] HSD (3 α hidroxisteroide dehidrogenase e diaforase). Coletamos 100uL de bile e adicionamos 900uL de metanol. Diluímos alíquotas de padrão de TCA (200mM) em balões volumétricos de 5mL com metanol (tabela 3). Construímos a curva de calibração de acordo com a tabela 4. Para realizar a reação preparamos alíquotas em triplicata de 20 μ L de cada uma das soluções diluídas e acrescentamos os reagentes conforme tabela 5. Para o branco de cada amostra adicionamos 1,2mL de tampão pH 9,4 (ajuste com ácido ortofosfórico) às alíquotas de 20uL da amostra diluída. Incubamos os tubos a 26°C por 1 hora e então leíamos a absorbância em 340nm. Para o cálculo de sais biliares totais usamos a fórmula (valores em mM): [Fator = concentração / média da leitura de absorbância - branco]

Depois calculamos a média de fatores e utilizamos a fórmula:

Média de leituras – branco x media dos fatores x 10 (diluição da amostra)

Tabela 3 – Diluição das alíquotas de TCA em metanol

Alíquotas de TCA (200mM)	Concentração final
0,5mL	20mM
1,0mL	40mM
2,0mL	80mM
4,0mL	160mM
Solução mãe	200mM

Tabela 4 – Curva de Calibração para cálculo de concentração de sais biliares totais

Tubos	solução diluída (µL)	metanol (µL)
I	100	900
II	100	900
III	100	900
I		
V	100	900
V	100	900
VI (branco)	—	1000

Tabela 5 – Reagentes utilizados para cálculo de concentração de sais biliares totais

	Solução tampão pH 9,4	Solução NAD pH 5,4	Solução HSD
TUBOS DAS AMOSTRAS	1,0mL	0,1mL	0,1mL
TUBOS DA CURVA	1,0mL	0,1mL	0,1mL

3.4.4 Dosagem de frações de sais biliares

A dosagem das frações dos sais biliares foi feita por método cromatográfico HPLC segundo técnica descrita por Rossi *et al* ⁽⁶⁸⁾. Para dosagem dos ácidos biliares por HPLC diluímos 0,1mL de bile em 0,8mL de NaOH, 0,1N, passamos a amostra pelo Sep Pak[®] e desprezamos o filtrado. Os ácidos biliares foram recolhidos passando 8mL da fase móvel pelo Sep Pak[®], posteriormente então secada em nitrogênio até 1 mL. Essa solução foi filtrada em filtro Millipore 0,45um e injetada no HPLC. Os padrões para identificação dos sais biliares também foram injetados no HPLC e usamos o integrador-processador para calcular a quantidade dos sais biliares. O Sep Pak[®] foi lavado em 5mL de metanol e 5mL de água destilada antes de ser usado nos experimentos. Os reagentes usados para fase móvel foram metanol MeOH : KH₂PO₄ 0,01M na proporção 75:25. Para cada litro da mistura adicionamos 4.2mL de NaOH 5N. Para melhorar a separação adicionamos 5% de água e ajustamos o pH para 5.35 por adição de ácido orto-fosfórico 85% (H₃PO₄). O solvente usado foi filtrado antes do uso e o seu fluxo foi de 0,7mL/min a uma pressão entre 2200 -2400psi(154 – 168 atm). Os reagentes liofilizados foram reconstituídos conforme orientação do fabricante. Foram usados 200μL de solução reativa para amostra nos tubos de amostra e branco e 500μL de solução reativa para branco em cada tubo. As amostras foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente ou 15 minutos a 37 °C. Após adição de 500μL de reativo de bloqueio na amostra

e no branco medimos a extinção da amostra frente ao branco em 500nm (em um período de 8 horas se a amostra permaneceu a 20 – 25 °C ou dentro de 24 horas se a amostra permaneceu estocada entre 2 -8 °C).

3.5 Cálculo do Índice de Saturação do Colesterol (ISC)

O índice de saturação do colesterol foi calculado na bile nativa dividindo a concentração do colesterol pela máxima solubilidade do colesterol. A máxima solubilidade do colesterol foi corrigida para concentração lipídica total de cada amostra de acordo com as tabelas de correção propostas por Carey.

Formula de ISC determinada por Carey, 1978⁽³⁷⁾:

$$[\text{colesterol}] \times 100 (1) / [\text{sais biliares}] + [\text{lecitina}] + [\text{colesterol}](2)$$

(1): concentração de colesterol na amostra (Mol%)

(2): solubilidade máxima do colesterol (Mol%) referente à concentração lipídica total da amostra (g/dl).

3.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados usando o programa estatístico SPSS® considerando-se $p < 0,05$ como valor significativo. Utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para definir a normalidade das variáveis. O teste de chi-quadrado foi utilizado na associação de duas várias categóricas ou binárias. As variáveis contínuas paramétricas foram comparadas através do teste T de Student e os teste Mann – Whitney, Tau_b de Kendall e Rho de Spearman foram aplicados às não paramétricas.

3.7 Aspectos Éticos

Utilizamos para o presente estudo material biológico estocado, que normalmente é descartado, após procedimento cirúrgico, como rotina na prática dos serviços.

O manual operacional para comitês de ética e a Resolução Nacional CNS 196/96 – item IV.3 "C" prevêem situações similares onde não foi possível a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Esse estudo cumpre com as instruções de ambos os documentos e em concordância com as diretrizes éticas internacionais para pesquisas envolvendo seres humanos foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética para análise de projetos de pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq).

4 Resultados

Setenta e duas amostras de bile vesicular e cálculo biliar de pacientes com diagnóstico de litíase biliar e quatorze amostras de bile vesicular de pacientes controles foram incluídos no estudo. No grupo de pacientes com litíase biliar, 48 eram do sexo feminino (66,7%) e a média de idade foi 54,1 anos $\pm$ 13,1 (mínima 18 anos e máxima 75 anos). Do total de cálculos analisados (n=72) 75% foram classificados como cálculo de colesterol e 25% como cálculo de bilirrubina. A tabela 1 mostra as diferentes proporções de colesterol e bilirrubina consideradas para a classificação quantitativa do cálculo.

Tabela 1 – Composição do cálculo

Classificação quantitativa	Cálculo	
	Colesterol (n=54)	Bilirrubina (n=18)
> 80% de colesterol < 10% de bilirrubina	75,9%	
$\geq$ 50% de bilirrubina < 10% de colesterol		64,4%
> 70% de colesterol 10 - 30% de bilirrubina	13,0%	
$\geq$ 50% de bilirrubina e 10 - 30% de colesterol		24,4%
>50% de colesterol < 10% de bilirrubina	11,1%	
40 - 50% de bilirrubina < 10% de colesterol		11,2%

Na composição da bile dos pacientes com litíase, os sais biliares representaram 67% do total de lipídios biliares e o restante estava composto principalmente por fosfolipídios (20,7%) e colesterol (9,3%). Os sais biliares estavam compostos por 66,7% de sais primários, 31,1% de sais secundários e 2,2% de ursodeoxicolato (Gráfico 1 e 2).

Gráfico 1 - Composição da Bile

Gráfico 2 - Composição dos Sais Biliares

As características gerais dos grupos estão descritas na tabela 2. Não encontramos diferença estatisticamente significativa ao comparar idade ($p=0,7$), sexo ($p=0,2$), concentração de colesterol ($p=0,6$) e sais biliares ($p=0,06$) entre os grupos com litíase biliar. Porém ao comparar a concentração de fosfolipídios das amostras encontramos menor concentração deste lipídio entre os pacientes com cálculo de colesterol ($p=0,02$) quando comparado tanto com grupo de cálculo pigmentar como grupo controle.

Tabela 2 – Características gerais dos grupos

Variável	Grupo Litíase biliar		Controle (n=14)
	Cálculo de Colesterol (n=54)	Cálculo pigmentar (n=18)	
Sexo (F:M)	38:16	10:8	7:7
Media de Idade (anos $\pm$ DP)	53,8 $\pm$ 12,4	54,9 $\pm$ 15,5	49,1 $\pm$ 18,1
Colesterol (mmol/L)	13,0 $\pm$ 11,9	12,92 $\pm$ 6,8	15,2 $\pm$ 9,9
Fosfolipídios (mmol/L)	27,2 $\pm$ 25,3	39,8 $\pm$ 21,6	39,5 $\pm$ 23,8
Sais Biliares (mmol/L)	91,9 $\pm$ 44,8	110,2 $\pm$ 39	106,8 $\pm$ 35,2
Ácido cólico	37,8 $\pm$ 11,5	36,5 $\pm$ 15,3	41,16 $\pm$ 11,2
Ácido quenodeoxicólico	34,4 $\pm$ 11,1	32,5 $\pm$ 8,2	37,9 $\pm$ 10,6
Ácido Deoxicólico	25,9 $\pm$ 14,1	27,4 $\pm$ 17,6	20,9 $\pm$ 11,5
Ácido litocólico	3,4 $\pm$ 1,5	1,9 $\pm$ 1,2	1,0 $\pm$ 0,5
Ácido Ursodeoxicólico	4,6 $\pm$ 4,4	4,1 $\pm$ 2,3	2,15 $\pm$ 0,53
Media de valores $\pm$ DP			

Para as análises da bile considerou-se o grupo de cálculo pigmentar como parte do grupo controle. Os resultados encontrados para ambas as variáveis estão descritos na tabela 3. O ISC do grupo controle estava reduzido significativamente quando comparado com grupo colesterol ($p<0,001$). Essa relação ocorreu pela significativa diferença na concentração de fosfolipídios entre os grupos ($p<0,05$). O gráfico 3 ilustra a comparação de ISC entre os grupos de colesterol e controle. O gráfico 4 demonstra a frequência com que valores menores e maiores que 1 para ISC apareceram em ambas as amostras. O tempo de nucleação variou em ambos os grupos e foi significativamente menor no grupo com cálculo de colesterol. A variação do tempo de nucleação para ambos os grupos está demonstrado no gráfico 5. A proporção de DCA também foi maior no grupo de pacientes com cálculo de colesterol. Esse dado está ilustrado no gráfico 6. Para os demais dados avaliados não encontramos diferença entre os grupos.

Tabela 3 – Comparação de variáveis entre os grupos de cálculo de colesterol e controle

Variável	Cálculo de Colesterol (n=54)	Grupo Controle (n=32)	p
Sexo (F:M)	38:16	17:15	p=0,1
Média de Idade (anos $\pm$ DP)	53,8 $\pm$ 12,4	52,4 $\pm$ 16,7	p= 0,7
Colesterol (mmol/L)	13,0 $\pm$ 11,9	13,9 $\pm$ 8,2	p=0,07
Fosfolipídios (mmol/L)	27,2 $\pm$ 25,3	39,64 $\pm$ 22,2	P<0,05
Sais Biliares (mmol/L)	91,9 $\pm$ 44,8	108 $\pm$ 36,8	p=0,06
ISC	1,5 $\pm$ 1,2	1,0 $\pm$ 0,45	p<0,001
TN (em dias)	7,7 $\pm$ 6,5	16,5 $\pm$ 6,6	p<0,05
% DCA	27,7 $\pm$ 19,9	20,3 $\pm$ 14,4	p<0,05

Gráfico 3 – Comparação de ISC entre os grupos de colesterol e controle

Ao avaliar os índices de saturação de colesterol individuais e compará-los, observamos que valores menores que 1 foram mais frequentes no grupo controle quando comparado ao grupo cálculo de colesterol ($p < 0,05$).

Gráfico 4 – Comparação da frequência de ISC entre os grupos

$p < 0,05$

Gráfico 5 – Comparação do tempo de nucleação entre os grupos controle e cálculo de colesterol

$p < 0,05$

Em ambos os grupos encontramos correlação inversamente proporcional entre tempo de nucleação e ISC (Tabela 4). Não encontramos diferença entre os grupos ao correlacionar tempo de nucleação com sexo e idade ($p=0,4$) assim como não houve correlação entre ISC com sexo e idade ($p=0,4$).

Tabela 4 – Correlação de ISC e TN para os grupos de cálculo de colesterol e controle

Variável	ISC	TN (días)	P
Cálculo de Colesterol (n=54)	1,5 ± 1,2	7,7 ± 6,5	p<0,05
Grupo Controle (n=32)	1,0 ± 0,45	16,5 ± 6,6	p<0,05

media ± DP

Comparamos a proporção de DCA entre os pacientes com e sem cálculo de colesterol e encontramos maior %DCA entre os pacientes do grupo de cálculo de colesterol ($p < 0,01$) (gráfico 6). Porém não houve diferença ao correlacionar %DCA e sexo, idade, ISC e tempo de nucleação entre os grupos (Tabela 5).

Tabela 5 – Correlação de %DCA e variáveis para os grupos de cálculo de colesterol e controle

	Variáveis	Grupo Colesterol	Grupo Controle	P
	% DCA	27,7 ± 19,9	20,3 ± 14,4	P<0,01
% DCA	Sexo (F:M)	38:16	17:15	P=0,03
	Idade	53,8 ± 12,4	52,4 ± 16,7	P=0,3
	TN	7,7 ± 6,5	16,5 ± 6,6	P=0,4
	ISC	1,5 ± 1,2	1,0 ± 0,45	P=0,3

Gráfico 6 – Correlação de %DCA entre os grupos de cálculo de colesterol e controle

$p < 0,01$

Nossos resultados mostraram que entre os pacientes com cálculo de colesterol havia 20% (11 pacientes) que apresentaram mais de 50% de DCA na composição da bile. Os dados desses pacientes estão descritos na tabela 6. Correlacionamos então a %DCA na bile com as variáveis sexo, idade, tempo de nucleação e ISC somente para os pacientes do grupo cálculo de colesterol (tabela 7). Os pacientes com proporção de DCA maior que 50% apresentaram maior ISC ($p<0,05$). Entre os pacientes do sexo feminino 25,8% apresentaram proporção de DCA acima de 50% do total de ácidos na bile ($p<0,05$). Entre os pacientes com idade entre 46 e 55 anos, 37% tinham maior proporção de DCA na bile ($p<0,05$). Não houve diferença ao comparar %DCA e tempo de nucleação.

Tabela 6 – Descrição dos pacientes de grupo de colesterol com %DCA maior ou menor que 50%

Grupo de Colesterol (n=54)		
Variáveis	DCA < 50% n=43	DCA > 50% n=11
Sexo (F:M)	29:14	9:2
Idade	54,4 ± 13,3	51,4 ± 14,9
TN	7,7 ± 7,4	8,7 ± 8,4
ISC	1,55 ± 1,04	1,22 ± 0,4

Tabela 7 – Correlação de %DCA com sexo, idade, ISC e tempo de nucleação entre os pacientes com cálculo de colesterol

Variáveis			N	P
Grupo Colesterol (n=54)				
%DCA	Sexo	Feminino	38	p<0,05*
		Masculino	16	p=0,4
	Idade	entre 18 - 35 anos	8	p=0,3
		entre 36 e 45 anos	8	p=0,3
		entre 46 e 55 anos	16	p<0,05*
		entre 56 e 65 anos	14	p=0,3
		acima de 65 anos	8	p=0,4
	TN	7,7 ± 6,5 dias	54	p=0,2
	ISC	1,5 ± 1,2	54	p<0,05*

Relação significativa para os pacientes com proporção de DCA>50%.

5 Discussão

O perfil dos lipídios biliares no cálculo e na bile para pacientes com litíase biliar em nosso meio foi apresentado nesse trabalho. Estudamos a composição do cálculo dos nossos pacientes em diferentes proporções de bilirrubina e colesterol e não encontramos cálculos mistos nas amostras estudadas. Definir a composição dos cálculos é o primeiro passo para optar a tratamento não invasivo medicamentoso, direcionado unicamente a dissolução de cálculo de colesterol⁽³²⁾. Até o momento os ácidos biliares hidrofílicos eram a única opção de tratamento para dissolução desses cálculos, porém recente estudo experimental com uma nova droga anti lipídica, que atua diminuindo a absorção de colesterol no intestino, mostrou resultados promissores para prevenção e dissolução do cálculo biliar de colesterol⁽⁶⁹⁾. Angwafo *et al*⁽⁷⁰⁾ realizou estudo de composição de cálculo em pacientes da República de Camarão e mostrou que nessa população o tratamento não seria efetivo para mais de 60% dos pacientes estudados os quais apresentaram menos de 30% de colesterol nos cálculos. A incidência de cálculo pigmentar difere entre as populações. A epidemiologia da Litíase biliar é relativamente uniforme entre os países europeus e estima-se que os cálculos pigmentares, nessa população, representam 5 – 10% dos cálculos biliares^(20;71). Devido à direta relação entre esse tipo de cálculo e infecção bacteriana, alguns fatores como avançado processo de urbanização e projetos abrangentes de saneamento básico poderiam estar associados à

menor incidência de cálculo pigmentar nesses países. Nossos resultados mostraram que apesar da maioria dos cálculos estarem compostos por colesterol, 25% deles estavam compostos por mais de 50% de bilirrubina. No Brasil, a presença de cálculo pigmentar poderia relacionar-se a fatores como baixo nível socioeconômico da população, problemas sanitários, verminoses e anemia falciforme. Ao analisarmos a bile, os pacientes com cálculo pigmentar foram inseridos no grupo controle pela completa diferença na patogenia de formação do cálculo. Os fatores que contribuem para a formação do cálculo biliar de colesterol estavam presentes na bile dos pacientes estudados. Nossos resultados mostraram que a composição fosfolipídica, ISC e tempo de nucleação estavam anormais no grupo de colesterol quando comparados ao grupo controle e que, portanto, os parâmetros litogênicos analisados na bile estavam de acordo ao descrito em outros trabalhos onde o número de amostra foi semelhante^(29;72). Ao comparar a composição da bile entre os pacientes com cálculo de colesterol e grupo controle encontramos uma diminuição significativa na concentração de fosfolipídios no grupo com cálculo de colesterol ($p < 0,05$), porém não encontramos diferença em relação à concentração de sais biliares e colesterol. Esse dado corrobora com a diferença significativa de ISC encontrada entre os grupos ($p < 0,05$). Para confirmar esse dado, comparamos a frequência de ISC com valores menores e maiores que 1 entre os grupos e claramente os valores de ISC menores que 1 se encontraram no grupo de pacientes com cálculo de colesterol ($p < 0,05$). Além de mostrar o grau de saturação do colesterol, o ISC também é útil para

prever as proporções das partículas lipídicas e, portanto, o equilíbrio físico químico da bile. Porém o grau de supersaturação da bile não é por si só fator preditivo de formação de cálculo e não deve ser avaliado isoladamente já que estudos mostraram que ISC similares podem ser obtidos da bile de pacientes com ou sem cálculo de colesterol^(40;73). Não obstante, há uma clara diferença no tempo de nucleação na bile com ISC idênticos o que nos mostra que combinação de ISC e tempo de nucleação alterados na bile são importantes fatores de distinção entre a bile de pacientes com cálculo e controle⁽⁴⁰⁾. A cristalização dos cristais de colesterol na bile tem sido convencionalmente definida como a detecção mais precoce que se pode ter da formação do cálculo através de microscopia de luz polarizada. A definição de tempo de nucleação indica agregação precoce de moléculas de colesterol desde bile supersaturada dentro do núcleo sub microscópico. Este passo crucial é seguido de precipitação e crescimento de cristal de colesterol, que será visível ao microscópio. Fatores como a mucina são conhecidos por promover a nucleação na bile de pacientes com cálculo de colesterol mais ainda não está claro quais seriam os fatores inibidores da nucleação na bile de pacientes normais. Em recente estudo Abeyasuriya *et al*⁽⁷²⁾ encontrou forte relação entre tempo de nucleação e aumento no risco de formação de cálculo de colesterol. Nossos resultados também mostraram diferença significativa entre o tempo de nucleação dos pacientes com litíase e controle. Tempo de nucleação estava claramente reduzido em pacientes com cálculo de colesterol quando comparados com controles. Também encontramos correlação entre tempo de nucleação e ISC entre os grupos. Portanto,

ambos os fatores mostraram-se bons indicadores para formação do cálculo entre nossos pacientes. Outro dado significativo encontrado foi o aumento da proporção de DCA entre os pacientes com cálculo de colesterol. De acordo com alguns autores, a proporção de DCA na bile de pacientes com cálculo de colesterol é maior que em pacientes sem cálculo^(29;74). Esse aumento de DCA no pool de ácidos biliares está associado com aumento dos níveis da enzima bacteriana 7 alfa hidroxilase nas amostras fecais desses pacientes. Portanto esses autores sugerem que trânsito intestinal lento é outro fator fisiopatológico importante na litíase biliar. Estudos experimentais⁽⁷⁵⁾ e clínicos⁽⁷⁶⁾ apontaram o baixo consumo de fibra na dieta como um importante fator associado a trânsito intestinal lento e que contribuiu para formação do cálculo. A dieta ocidental, que consiste principalmente no aumento de consumo de calorias, colesterol, gordura saturada, proteínas, sal e diminuição do consumo de fibras é um dos fatores de risco para a formação do cálculo. Ao diminuir o tempo de trânsito colônico, esse tipo de dieta favorece a ação bacteriana e conseqüente aumento de DCA. Porém a relação entre aumento da proporção de DCA e formação de cálculo não é consenso entre alguns pesquisadores como, por exemplo, Gustafsson⁽⁷⁷⁾ e Jüngst⁽⁷⁸⁾ que não encontraram diferença na proporção de DCA entre pacientes com e sem cálculo de colesterol e, portanto, esses autores não reconhecem a contribuição de DCA para formação do cálculo. No nosso estudo encontramos correlação significativa entre a proporção de DCA na bile de pacientes com e sem cálculo de colesterol o que nos leva a crer que a proporção de DCA na bile está relacionada à formação de cálculo de

colesterol nos nossos pacientes. Não houve diferença ao comparar %DCA e os outros parâmetros estudados para ambos os grupos. Apesar de haver diferença em relação ao sexo e idade na proporção de DCA dentro do grupo de cálculo de colesterol, com 20% dos pacientes apresentando mais de 50% de DCA na bile, as diferenças se aplicaram a uma baixa proporção de indivíduos e por isso não puderam ser consideradas como resultados conclusivos. O ISC aumentado entre esses pacientes foi um fator isolado que reflete o mesmo encontrado na bile de pacientes com cálculo de colesterol quando comparado ao grupo controle. Finalmente, a importância do nosso estudo foi a avaliação da composição do cálculo, perfil dos sais biliares e nucleação *in vitro* em um país em desenvolvimento, o que permitiu comparar nossos resultados com os países desenvolvidos, mostrando, por exemplo, que o percentual de cálculos pigmentados na nossa amostra é intermediário entre os países sub desenvolvidos e os mais desenvolvidos. Quanto ao perfil da composição dos sais biliares e a nucleação *in vitro*, como era de se esperar foram semelhantes aos estudos já realizados em vários centros, o que corrobora a importância do DCA na etiopatogenia do cálculo de colesterol. Outro aspecto a ser ressaltado é que este estudo servirá de parâmetros para estudos futuros de calculose biliar em nosso meio.

6 Conclusões

- 1- Os cálculos de colesterol representaram 75% das amostras e os cálculos pigmentares representaram 25% das amostras.
- 2- Os fosfolipídios estavam diminuídos na bile de pacientes com cálculo de colesterol
- 3- Os fatores fisiopatológicos: ISC aumentado, menor tempo de nucleação e aumento da proporção de DCA estavam presentes na bile de pacientes com cálculo de colesterol

Anexo A - Equipamentos e Reagentes

EQUIPAMENTOS	Marca	Modelo	Série
Centrifuga refrigerada	Sorvall	RC 5B	7809471
Freezer -20	Metalfrio	EVC6D	EVC6D40001
Balança analítica	JPN	200W	21000236
Chapa de aquecimento	FANEN	176-0	NE2715
Estufa secagem	FABBE	116	584
Microscópio	Olympus	CBA	_____
Espectrofotômetro	CELM	E215-D	201
HPLC	Shimadzu	LC-6A	267392MS
	Shimadzu	SPD-10AVP	C20993603045LP
	Shimadzu	C-R6A	28E8845A
Fluxo laminar	VECO	VLFS 12	FL02316
Banho maria e sonicador	Unique Ultrasonic cleaner	_____	2106508A014
Autoclave	Sppencer cientific	1512	_____
Mixer	Termolyne	_____	37644307
pHmetro	MICRONAL	B375	_____
REAGENTES	LABORATÓRIOS	CÓDIGO	
Kit enzimático para dosagem de colesterol no cálculo vesicular	Biodiagnóstica	BD 301	
Kit enzimático para dosagem de bilirrubina no cálculo vesicular	Merck	1.033.330.001	
	Merck	1.033.580.001	
Kit enzimático para dosagem de colesterol na bile	Roche Diagnostics	CF03000050	
Kit enzimático para dosagem de bilirrubina na bile	Roche Diagnostics	BF04000050	
Kit enzimático para dosagem de colesterol na bile	Wiener Lab	1220101	
Kit enzimático para dosagem de bilirrubina na bile	Wiener Lab	1120005	
Kit enzimático para dosagem dos sais biliares	Merck	_____	
Metanol	Merck	_____	
Hexano	Merck	_____	
Isopropanol	Merck	_____	
Ácido sulfúrico	Merck	_____	
Clorofórmio	Merck	_____	
Ácido acético glacial	Merck	_____	
TUDCA	Sigma Aldrich	_____	
GUDCA	Sigma Aldrich	_____	
TCA	Sigma Aldrich	_____	
GCA	Sigma Aldrich	_____	
TCDCA	Sigma Aldrich	_____	
TDCA	Sigma Aldrich	_____	
GCDCA	Sigma Aldrich	_____	
GDCA	Sigma Aldrich	_____	
TLCA	Sigma Aldrich	_____	
GLCA	Sigma Aldrich	_____	

8 Referências

- (1) Lammert F, Neubrand MW, Bittner R, Feussner H, Greiner L, Hagenmuller F et al. [S3-guidelines for diagnosis and treatment of gallstones. German Society for Digestive and Metabolic Diseases and German Society for Surgery of the Alimentary Tract]. *Z Gastroenterol* 2007; 45(9):971-1001.
- (2) Everhart JE, Khare M, Hill M, Maurer KR. Prevalence and ethnic differences in gallbladder disease in the United States. *Gastroenterology* 1999; 117(3):632-639.
- (3) Attili AF, Carulli N, Roda E, Barbara B, Capocaccia L, Menotti A et al. Epidemiology of gallstone disease in Italy: prevalence data of the Multicenter Italian Study on Cholelithiasis (M.I.COL.). *Am J Epidemiol* 1995; 141(2):158-165.
- (4) Shaffer EA. Gallstone disease: Epidemiology of gallbladder stone disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20(6):981-996.
- (5) Miquel JF, Covarrubias C, Villaroel L, Mingrone G, Greco AV, Puglielli L et al. Genetic epidemiology of cholesterol cholelithiasis among Chilean Hispanics, Amerindians, and Maoris. *Gastroenterology* 1998; 115(4):937-946.
- (6) Chen CH, Huang MH, Yang JC, Nien CK, Etheredge GD, Yang CC et al. Prevalence and risk factors of gallstone disease in an adult population of Taiwan: an epidemiological survey. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21(11):1737-1743.
- (7) Nomura H, Kashiwagi S, Hayashi J, Kajiyama W, Ikematsu H, Noguchi A et al. Prevalence of gallstone disease in a general population of Okinawa, Japan. *Am J Epidemiol* 1988; 128(3):598-605.
- (8) Ure BM, Lefering R, Troidl H. Costs of Laparoscopic cholecystectomy. Analysis of potential savings. *Surg Endosc* 1995; 9(4):401-406.
- (9) Bosch F, Wehrman U, Saeger HD, Kirch W. Laparoscopic or open conventional cholecystectomy: clinical and economic considerations. *Eur J Surg* 2002; 168(5):270-277.
- (10) Coelho JC, Frare RC, Arce VF, Pitaki SA, Vitola ML, De George MA. [Prevalence of vesicular lithiasis in hospitalized patients in Curitiba: ultrasonographic evaluation]. *AMB Rev Assoc Med Bras* 1991; 37(4):169-172.

- (11) Coelho JC, Bonilha R, Pitaki SA, Cordeiro RM, Salvalaggio PR, Bonin EA et al. Prevalence of gallstones in a Brazilian population. *Int Surg* 1999; 84(1):25-28.
- (12) Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Cholesterol gallstone disease. *Lancet* 2006; 368(9531):230-239.
- (13) Stewart L, Grifiss JM, Jarvis GA, Way LW. Biliary bacterial factors determine the path of gallstone formation. *Am J Surg* 2006; 192(5):598-603.
- (14) Maki T. Pathogenesis of calcium bilirubinate gallstone: role of *E. coli*, beta-glucuronidase and coagulation by inorganic ions, polyelectrolytes and agitation. *Ann Surg* 1966; 164(1):90-100.
- (15) Cetta F. The role of bacteria in pigment gallstone disease. *Ann Surg* 1991; 213(4):315-326.
- (16) Ohdan H, Oshiro H, Yamamoto Y, Tanaka I, Inagaki K, Sumimoto K et al. Bacteriological investigation of bile in patients with cholelithiasis. *Surg Today* 1993; 23(5):390-395.
- (17) Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2):167-193.
- (18) Cetta F. [The classification of biliary calculi and the clinico-therapeutic implications]. *Ann Ital Chir* 1998; 69(6):701-708.
- (19) Marschall HU, Einarsson C. Gallstone disease. *J Intern Med* 2007; 261(6):529-542.
- (20) Attili AF, Capocaccia R, Carulli N, Festi D, Roda E, Barbara L et al. Factors associated with gallstone disease in the MICOL experience. Multicenter Italian Study on Epidemiology of Cholelithiasis. *Hepatology* 1997; 26(4):809-818.
- (21) Wang DQ, Carey MC. Complete mapping of crystallization pathways during cholesterol precipitation from model bile: influence of physical-chemical variables of pathophysiologic relevance and identification of a stable liquid crystalline state in cold, dilute and hydrophilic bile salt-containing systems. *J Lipid Res* 1996; 37(3):606-630.
- (22) Wang DQ, Carey MC. Characterization of crystallization pathways during cholesterol precipitation from human gallbladder biles: identical pathways to corresponding model biles with three predominating sequences. *J Lipid Res* 1996; 37(12):2539-2549.

- (23) Reihner E, Angelin B, Bjorkhem I, Einarsson K. Hepatic cholesterol metabolism in cholesterol gallstone disease. *J Lipid Res* 1991; 32(3):469-475.
- (24) Stahlberg D, Rudling M, Angelin B, Bjorkhem I, Forsell P, Nilsell K et al. Hepatic cholesterol metabolism in human obesity. *Hepatology* 1997; 25(6):1447-1450.
- (25) Rudling M, Angelin B, Stahle L, Reihner E, Sahlin S, Olivecrona H et al. Regulation of hepatic low-density lipoprotein receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and cholesterol 7 α -hydroxylase mRNAs in human liver. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(9):4307-4313.
- (26) Hofmann AF. Biliary secretion and excretion in health and disease: current concepts. *Ann Hepatol* 2007; 6(1):15-27.
- (27) Shoda J, He BF, Tanaka N, Matsuzaki Y, Osuga T, Yamamori S et al. Increase of deoxycholate in supersaturated bile of patients with cholesterol gallstone disease and its correlation with de novo syntheses of cholesterol and bile acids in liver, gallbladder emptying, and small intestinal transit. *Hepatology* 1995; 21(5):1291-1302.
- (28) van Erpecum KJ, Wang DQ, Lammert F, Paigen B, Groen AK, Carey MC. Phenotypic characterization of Lith genes that determine susceptibility to cholesterol cholelithiasis in inbred mice: soluble pronucleating proteins in gallbladder and hepatic biles. *J Hepatol* 2001; 35(4):444-451.
- (29) Thomas LA, Veysey MJ, Bathgate T, King A, French G, Smeeton NC et al. Mechanism for the transit-induced increase in colonic deoxycholic acid formation in cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology* 2000; 119(3):806-815.
- (30) Iida T, Ogawa S, Hosoi K, Makino M, Fujimoto Y, Goto T et al. Regioselective oxyfunctionalization of unactivated carbons in steroids by a model of cytochrome P-450: osmiumporphyrin complex/tert-butyl hydroperoxide system. *J Org Chem* 2007; 72(3):823-830.
- (31) Venneman NG, van Kammen M, Renooij W, Vanberge-Henegouwen GP, van Erpecum KJ. Effects of hydrophobic and hydrophilic bile salts on gallstone growth and dissolution in model biles. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1686 3:209-219.
- (32) Guarino MP, Cong P, Cicala M, Alloni R, Carotti S, Behar J. Ursodeoxycholic acid improves muscle contractility and inflammation in symptomatic gallbladders with cholesterol gallstones. *Gut* 2007; 56(6):815-820.

- (33) Zanolungo S, Rigotti A. Determinants of transhepatic cholesterol flux and their relevance for gallstone formation. *Liver Int* 2009; 29(3):323-330.
- (34) Crawford JM, Mockel GM, Crawford AR, Hagen SJ, Hatch VC, Barnes S et al. Imaging biliary lipid secretion in the rat: ultrastructural evidence for vesiculation of the hepatocyte canalicular membrane. *J Lipid Res* 1995; 36(10):2147-2163.
- (35) Somjen GJ, Marikovsky Y, Lelkes P, Gilat T. Cholesterol-phospholipid vesicles in human bile: an ultrastructural study. *Biochim Biophys Acta* 1986; 879(1):14-21.
- (36) Somjen GJ, Marikovsky Y, Wachtel E, Harvey PR, Rosenberg R, Strasberg SM et al. Phospholipid lamellae are cholesterol carriers in human bile. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1042(1):28-35.
- (37) Carey MC. Critical tables for calculating the cholesterol saturation of native bile. *J Lipid Res* 1978; 19(8):945-955.
- (38) Carey MC, Small DM. The physical chemistry of cholesterol solubility in bile. Relationship to gallstone formation and dissolution in man. *J Clin Invest* 1978; 61(4):998-1026.
- (39) Admirand WH, Small DM. The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *J Clin Invest* 1968; 47(5):1043-1052.
- (40) Holan KR, Holzbach RT, Hermann RE, Cooperman AM, Claffey WJ. Nucleation time: a key factor in the pathogenesis of cholesterol gallstone disease. *Gastroenterology* 1979; 77(4 Pt 1):611-617.
- (41) Gallinger S, Harvey PR, Strasberg SM. Evidence for a nucleation defect in bile from gallstone patients. *Hepatology* 1984; 4(5 Suppl):177S-179S.
- (42) Bar DY, Vilkin A, Niv Y. Gallbladder mucin plays a role in gallstone formation. *Eur J Intern Med* 2004; 15(7):411-414.
- (43) Grases F, Isern B, Perello J, Costa-Bauza A. The role of glycoproteins in calcium oxalate crystal development. *BJU Int* 2004; 94(1):177-181.
- (44) Lee SP. Lessons from experimental cholelithiasis: gallbladder and mucosa, nonsteroidal antiinflammatory drugs, and gallstones. *Gastroenterology* 1991; 101(3):857-860.
- (45) Sterling RK, Shiffman ML, Sugerman HJ, Moore EW. Effect of NSAIDs on gallbladder bile composition. *Dig Dis Sci* 1995; 40(10):2220-2226.

- (46) Hood K, Gleeson D, Ruppin DC, Dowling RH. Prevention of gallstone recurrence by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet* 1988; 2(8622):1223-1225.
- (47) Moschetta A, Stolk MF, Rehfeld JF, Portincasa P, Slee PH, Koppeschaar HP et al. Severe impairment of postprandial cholecystokinin release and gall-bladder emptying and high risk of gallstone formation in acromegalic patients during Sandostatin LAR. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15(2):181-185.
- (48) Portincasa P, Minerva F, Moschetta A, Venneman N, Vanberge-Henegouwen GP, Palasciano G. Review article: in vitro studies of gall-bladder smooth muscle function. Relevance in cholesterol gallstone disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14 Suppl 2:19-26.
- (49) Spengler U, Sackmann M, Sauerbruch T, Holl J, Paumgartner G. Gallbladder motility before and after extracorporeal shock-wave lithotripsy. *Gastroenterology* 1989; 96(3):860-863.
- (50) Pellegrini CA. Asymptomatic gallstones. Does diabetes mellitus make a difference?. *Gastroenterology* 1986; 91(1):245-247.
- (51) Jazrawi RP, Pazzi P, Petroni ML, Prandini N, Paul C, Adam JA et al. Postprandial gallbladder motor function: refilling and turnover of bile in health and in cholelithiasis. *Gastroenterology* 1995; 109(2):582-591.
- (52) van Erpecum KJ, Berge-Henegouwen GP. Gallstones: an intestinal disease?. *Gut* 1999; 44(3):435-438.
- (53) Veysey MJ, Thomas LA, Mallet AI, Jenkins PJ, Besser GM, Murphy GM et al. Colonic transit influences deoxycholic acid kinetics. *Gastroenterology* 2001; 121(4):812-822.
- (54) Thomas LA, Veysey MJ, Murphy GM, Russell-Jones D, French GL, Wass JA et al. Octreotide induced prolongation of colonic transit increases faecal anaerobic bacteria, bile acid metabolising enzymes, and serum deoxycholic acid in patients with acromegaly. *Gut* 2005; 54(5):630-635.
- (55) Lammert F, Miquel JF. Gallstone disease: from genes to evidence-based therapy. *J Hepatol* 2008; 48 Suppl 1:S124-S135.
- (56) Jonkers IJ, Smelt AH, Ledeboer M, Hollum ME, Biemond I, Kuipers F et al. Gall bladder dysmotility: a risk factor for gall stone formation in hypertriglyceridaemia and reversal on triglyceride lowering therapy by bezafibrate and fish oil. *Gut* 2003; 52(1):109-115.

- (57) Biddinger SB, Haas JT, Yu BB, Bezy O, Jing E, Zhang W et al. Hepatic insulin resistance directly promotes formation of cholesterol gallstones. *Nat Med* 2008; 14(7):778-782.
- (58) Pereira SP, Bain IM, Kumar D, Dowling RH. Bile composition in inflammatory bowel disease: ileal disease and colectomy, but not colitis, induce lithogenic bile. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17(7):923-933.
- (59) Roeschlau P, Bernt E, Gruber W. Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Z Klin Chem Klin Biochem* 1974; 12(5):226.
- (60) Jendrassik e Grof. Enzymatic assay of bilirubin. *Biochem Z* 1938; 297:81.
- (61) Chijiwa K, Kiyosawa R, Nakayama F. Cholesterol monomer activity correlates with nucleation time in model bile. *Clin Chim Acta* 1988; 178(2):181-191.
- (62) Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974; 20(4):470-475.
- (63) Bartels H, Bohmer M. [Automated determination of serum bilirubin]. *Z Klin Chem Klin Biochem* 1971; 9(2):133-135.
- (64) STECK EA, EWING GW, NACHOD FC. Absorption spectra of heterocyclic compounds; some bz-halo-4-aminoquinoline derivatives. *J Am Chem Soc* 1948; 70(10):3410-3416.
- (65) Fiske CH, Subbarow Y. Phosphorus compounds of muscle and liver. *Science* 1929; 70(1816):381-382.
- (66) Osuga T, Mitamura K, Mashige F, Imai D. Evaluation of fluorimetrically estimated serum bile acid in liver disease. *Clin Chim Acta* 1977; 75(1):81-90.
- (67) Mashige F, Imai K, Osuga T. A simple and sensitive assay of total serum bile acids. *Clin Chim Acta* 1976; 70(1):79-86.
- (68) Rossi SS, Converse JL, Hofmann AF. High pressure liquid chromatographic analysis of conjugated bile acids in human bile: simultaneous resolution of sulfated and unsulfated lithocholyl amidates and the common conjugated bile acids. *J Lipid Res* 1987; 28(5):589-595.
- (69) Wang HH, Portincasa P, Mendez-Sanchez N, Uribe M, Wang DQ. Effect of ezetimibe on the prevention and dissolution of cholesterol gallstones. *Gastroenterology* 2008; 134(7):2101-2110.

- (70) Angwafo FF, III, Takongmo S, Griffith D. Determination of chemical composition of gall bladder stones: basis for treatment strategies in patients from Yaounde, Cameroon. *World J Gastroenterol* 2004; 10(2):303-305.
- (71) Sauerbruch T. [Gallstones: pathogenesis and therapy]. *Z Gastroenterol* 2002; 40 Suppl 2:27-28.
- (72) Abeysuriya V, Deen KI, Kumarage SK, Navarathne NM. Assessment of 'nucleation time' as a predictor of cholelithiasis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20(10):1020-1023.
- (73) Holzbach RT, Marsh M, Olszewski M, Holan K. Cholesterol solubility in bile. Evidence that supersaturated bile is frequent in healthy man. *J Clin Invest* 1973; 52(6):1467-1479.
- (74) Azzaroli F, Mazzella G, Mazzeo C, Simoni P, Festi D, Colecchia A et al. Sluggish small bowel motility is involved in determining increased biliary deoxycholic acid in cholesterol gallstone patients. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(9):2453-2459.
- (75) Segasothy M, Phillips PA. Vegetarian diet: panacea for modern lifestyle diseases? *QJM* 1999; 92(9):531-544.
- (76) Pixley F, Wilson D, McPherson K, Mann J. Effect of vegetarianism on development of gall stones in women. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985; 291(6487):11-12.
- (77) Gustafsson U, Sahlin S, Einarsson C. High level of deoxycholic acid in human bile does not promote cholesterol gallstone formation. *World J Gastroenterol* 2003; 9(7):1576-1579.
- (78) Jungst D, Muller I, Kullak-Ublick GA, Meyer G, Frimberger E, Fischer S. Deoxycholic acid is not related to lithogenic factors in gallbladder bile. *J Lab Clin Med* 1999; 133(4):370-377.