

Mecanismos moleculares en la formación de la bilis

J.M. Bañales y J.F. Medina

División de Terapia Génica y Hepatología. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Fundación para la Investigación Médica Aplicada (FIMA). Universidad de Navarra. Pamplona. Navarra. España.

El tracto hepatobiliar se inicia con la red de canalículos biliares (espacios formados por la región apical de hepatocitos adyacentes), donde se genera la bilis, y continúa con los conductos biliares intrahepáticos, en los que la bilis resulta modificada por las células epiteliales que tapizan dichos conductos (los colangiocitos). La bilis es una solución acuosa que contiene solutos orgánicos (ácidos biliares, fosfolípidos, colesterol, pigmentos biliares, glutatión y proteínas, así como múltiples metabolitos de sustancias endógenas y exógenas) e inorgánicos (fundamentalmente bicarbonato, cloruro, sodio, potasio y calcio). La composición y concentración de cada uno de estos solutos varía a lo largo del tracto hepatobiliar. Por ello se puede distinguir entre la bilis canalicular (o primaria) y la bilis ductular (o bilis modificada a lo largo de los conductos biliares mediante procesos de secreción/absorción que la fluidifican y alcalinizan). En la generación y modificación de la bilis intervienen múltiples proteínas transportadoras localizadas en lugares específicos de los hepatocitos y colangiocitos, y todo el proceso está regulado por diversos estímulos de tipo metabólico, hormonal y neurovegetativo¹⁻³.

De los 600 a 1.200 ml de bilis generados diariamente en humanos, un 60% corresponde a bilis canalicular. La mitad del flujo biliar canalicular se genera por la fuerza osmótica que ejercen las sales biliares (flujo biliar dependiente de sales biliares; en inglés, *bile salt-dependent bile flow*), mientras que la otra mitad se genera por la fuerza osmótica debida a la excreción de otras sustancias, sobre todo glutatión y en menor medida bicarbonato y otros iones (esta porción del flujo biliar se cataloga como independiente de sales biliares; en inglés, *bile salt-independent bile flow*). En los conductos biliares, la fluidificación

de la bilis es el resultado de la fuerza osmótica que ejerce la excreción ductular de iones, y en particular el bicarbonato, que además de alcalinizarla determina un aumento de su volumen total hasta completar el 40% del flujo biliar diario.

Los hepatocitos constituyen una barrera anatómica entre la sangre portal y el líquido biliar, separados únicamente por las uniones intercelulares o *tight junctions*. La membrana plasmática de los hepatocitos presenta una polaridad estructural. Por el lado sinusoidal o basal, la membrana plasmática se encuentra en contacto casi directo con la sangre portal (solamente le separa de ella el espacio de Disse), y continúa en la membrana plasmática lateral (adyacente a los otros hepatocitos), determinando ambas porciones el dominio o membrana basolateral. Por otro lado, la membrana plasmática canalicular corresponde al dominio apical, que está separada del dominio basolateral por las uniones intercelulares. Estas uniones son impermeables a la mayoría de los componentes sanguíneos (incluida el agua), y en la membrana plasmática limitan además la difusión de lípidos y proteínas de membrana entre los dominios basolateral y apical. Los colangiocitos también poseen dominios basolateral y apical separados por las uniones intercelulares. Pero en el caso de los colangiocitos la membrana basolateral no está en contacto directo con la sangre como la membrana sinusoidal de los hepatocitos, ya que la sangre que circunda los conductos biliares fluye a través de los plexos vasculares periductulares que se derivan de la arteria hepática. Debido a la relativa impermeabilidad de las uniones intercelulares, y al carácter hidrofóbico de la membrana plasmática, los hepatocitos y colangiocitos disponen de diversos canales de agua denominados acuoporinas (*aquaporins*, AQP) que posibilitan el transporte transcelular de agua y, por tanto, desempeñan un papel importante para que la fuerza osmótica originada por la excreción de solutos a lo largo del tracto hepatobiliar se traduzca en un aumento del flujo biliar. A continuación se describen brevemente los diversos mecanismos de transporte que generan el flujo biliar, así como los principales estímulos reguladores y vías de señalización.

Correspondencia: Dr. Juan F. Medina.
División de Terapia Génica y Hepatología. Clínica Universitaria.
Facultad de Medicina. Fundación para la Investigación Médica Aplicada.
Universidad de Navarra.
Irunlarrea, 4. 31008 Pamplona. Navarra. España.
Correo electrónico: jfmedina@unav.es

Recibido el 18-11-2003; aceptado para su publicación el 18-11-2003.

Para la generación de la bilis canalicular, los hepatocitos disponen de múltiples sistemas de transporte polarizado, localizados unos en la membrana plasmática basolateral, y otros en la membrana canalicular o apical. Así, en la membrana basolateral se encuentra el transportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, que mantiene un gradiente iónico ($\text{Na}^+_{\text{exterior}} > \text{interior}; \text{K}^+_{\text{interior}} > \text{exterior}$) y genera, junto con un canal de K^+ , un potencial eléctrico intracelular de aproximadamente -35 mV. Este potencial eléctrico permite la homeostasis intracelular de iones y del pH, así como la entrada electrogénica, dependiente de Na^+ , de sales biliares conjugadas (glicocolato, taurocolato, tauroquenodeoxicolato y tauroursodeoxicolato), que se realiza mediante el cotransportador $\text{Na}^+\text{-taurocolato}$ (*sodium/taurocholate cotransporting polypeptide*, NTCP o SLC10A1). La membrana sinusoidal dispone además de otro grupo de proteínas (*organic anion transporter polypeptides*, OATP) que llevan a cabo el transporte independiente de Na^+ de una gran variedad de moléculas anfipáticas, incluidas sales biliares conjugadas y no conjugadas (colato, glicocolato, taurocolato, tauroquenodeoxicolato y tauroursodeoxicolato), conjugados de estrógenos, aniones orgánicos tales como bromosulfoftaleína y el leucotrieno C_4 , y numerosos metabolitos de xenobióticos. La alta concentración intracelular de glutatión reducido en el hepatocito estimula su intercambio con sustratos orgánicos del torrente circulatorio a través de esta familia de transportadores. Recientemente, se ha visto que las rifampicinas interaccionan con los diversos miembros de estos transportadores que facilitan el aclaramiento de xenobióticos (OATP-A o SLC21A3, OATP-B o SLC21A9, OATP-C o SLC21A6 y OATP8 o SLC21A8)⁴. A la hora de interpretar los estudios de este tipo de transportadores en animales, conviene tener presente que la numeración de OATP aplicada en humanos no siempre se corresponde con la de los Oatp en roedores; por ejemplo, el OATP-C humano es el ortólogo del Oatp4 en roedores⁵. Las proteínas MRP (*multidrug resistance-associated proteins*) forman otra familia de transportadores de aniones orgánicos y se engloban en el grupo C dentro de la superfamilia de transportadores con *ATP-binding cassette* o superfamilia ABC. MRP3 (ABCC3), MRP4 (ABCC4), MRP5 (ABCC5) y MRP6 (ABCC6) se localizan en la membrana sinusoidal del hepatocito y aumentan su expresión en situaciones de colestasis para mediar la salida de diversos aniones orgánicos como la bilirrubina conjugada hacia la sangre. El MRP4, además de poder transportar prostaglandinas, es capaz de transportar hacia la sangre el glutatión reducido junto con sales biliares monoaniónicas (colato, colitaurina y coliglicina). En situaciones de colestasis con un incremento intrahepatocitario de la bilirrubina conjugada, es característico el aumento que se produce en la expresión basolateral de MRP3, así como la aparición a este nivel de MRP1.

Para la captación sinusoidal de cationes orgánicos (neurotransmisores y otras aminas endógenas, xenobióticos catiónicos, etc.), la membrana basolateral hepatocitaria dispone de transportadores poliespecíficos como el OCT1 (*organic cation transporter 1*, SLC22A1), que en el hígado

fetal presenta una forma equivalente (OCTN1 o SLC22A4), y el OCT3 (SLC22A3), el cual parece desempeñar un papel importante en la captación de monoaminas. Por último, la membrana basolateral del hepatocito posee otros transportadores de iones inorgánicos, además de los mencionados anteriormente, como es el caso del intercambiador Na^+/H^+ 1 (*Na⁺/H⁺ exchanger 1*, NHE1 o SLC9A1) y del intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dependiente de sodio⁶, encargados, junto a otros transportadores iónicos, del mantenimiento de la homeostasis iónica y del pH intracelular.

Normalmente, el transporte de constituyentes biliares a través de la membrana canalicular es la etapa limitante para la formación de bilis. Al menos 6 transportadores activos primarios están involucrados en la secreción canalicular de componentes biliares (MDR1, MDR3, BSEP, MRP2, BCRP y FIC1). El MDR1 (*multidrug resistance P-glycoprotein 1* o ABCB1) actúa como una bomba que exporta componentes orgánicos de tipo catiónico hidrofóbico (p. ej., fármacos como la colchicina, adriamicina, vimblastina y doxorubicina). Hasta el momento no se ha descrito ninguna enfermedad causada por déficit en este transportador. El MDR3 (ABCB4, *mdr2* en roedores) actúa como una flipasa que transloca fosfolípidos como el fosfoinositol; alteraciones diversas en este transportador conducen al cuadro de colestasis intrahepática familiar progresiva de tipo 3. El BSEP (*bile salt export pump*, ABCB11, antes también denominado SPGP, del inglés *sister of P-glycoprotein*) actúa como una bomba que exporta sales biliares y su déficit conduce a otro tipo de colestasis intrahepática familiar progresiva (la tipo 2). El transportador BSEP es, en definitiva, el principal responsable de la generación del flujo biliar canalicular dependiente de las sales biliares. Respecto a FIC1, las alteraciones en este transportador pueden ser más o menos graves y dar lugar bien a la colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 1, o bien a un cuadro colestásico más benigno denominado BRIC (*benign recurrent intrahepatic cholestasis*). Por último, el transportador MRP2 (ABCC2, también denominado cMOAT, de *canalicular multispecific organic anion transporter*) media la excreción canalicular de componentes biliares tan importantes como la bilirrubina conjugada y el glutatión reducido. Su déficit es la causa del síndrome de Dubin-Johnson, en el que existe un aumento de las concentraciones de la bilirrubina conjugada en sangre (hiperbilirrubinemia conjugada).

Para el transporte de iones, la membrana canalicular se encuentra dotada de canales de Cl^- cuya(s) identidad(es) queda(n) por determinar. Pueden activarse por un aumento de volumen y/o por la liberación de Ca^{2+} intracelular (*swelling- and Ca²⁺-activated chloride channels*), pero en cualquier caso son distintos del CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* o ABCC7). El CFTR es un canal de Cl^- sensible al adenosinmonofosfato cíclico (cAMP) que en el tracto hepatobiliar se expresa en colangiocitos (véase más adelante), pero no en hepatocitos. De todas formas, es muy probable que los hepatocitos posean otros canales de Cl^- canaliculares que, directa o indirectamente, sean también sensibles al aumento de las

concentraciones intracelulares de cAMP tras estímulos coleréticos como el glucagón. Por otra parte, la membrana canalicular también posee una actividad de intercambio de aniones (*anion exchange*, AE), que es independiente de sodio y estimulable por cAMP. La proteína AE2 (SLC4A2) es el único intercambiador de aniones independiente de sodio que se ha descrito en el hígado y se expresa en la región apical a lo largo del tracto hepatobiliar⁷. Por tanto, lo más probable es que la AE2 sea la proteína responsable de la excreción hepatobiliar de bicarbonato tanto en hepatocitos como en colangiocitos. El modelo más aceptado actualmente sostiene que el desencadenante de la excreción de bicarbonato tras un estímulo colerético es la activación de los canales de Cl⁻, que a su vez permiten que se establezca un gradiente favorable a un intercambio Cl⁻/HCO₃⁻, con entrada de Cl⁻ a cambio de la salida de HCO₃⁻. La movilización de agua desde el sinusoides hacia el canalículo se ve facilitada por 2 tipos de canales de agua o acuoporinas. En la membrana basolateral de los hepatocitos de rata se ha descrito la AQP9, que es una acuogliceroporina presuntamente encargada de la internalización de agua en el hepatocito (además de glicerol, principal sustrato de la gluconeogénesis hepática). La salida de agua del hepatocito hacia el polo canalicular parece requerir la presencia de otra acuoporina, la AQP8. Se ha descrito que la AQP8 se transloca desde el interior del hepatocito a la membrana canalicular en respuesta al glucagón, que activa la vía de señalización de la proteína cinasa A (PKA) tras aumentar las concentraciones de cAMP. La activación de la PKA, así como cambios en el volumen y pH intracelular, pueden regular el movimiento de vesículas con AQP8 de la región subapical a la membrana canalicular y viceversa, mediante procesos de endocitosis y exocitosis, de modo similar a como se ha demostrado recientemente en colangiocitos para vesículas que contienen simultáneamente AQP1 (antes denominada CHIP28), CFTR y AE2⁸. También en el hepatocito es muy probable que las mismas vesículas que transportan AQP8 contengan AE2 y canales de Cl⁻ sensibles a cAMP. Como ya se ha señalado anteriormente, la bilis canalicular se modifica en los conductos biliares a través de distintos transportadores de electrólitos y canales de iones que se localizan en los colangiocitos. Estas células epiteliales que tapizan los conductos biliares determinan la fluidificación y alcalinización de la bilis primaria hepatocelular, secretando o absorbiendo agua, así como diversos solutos biliares (electrólitos, glucosa, aminoácidos, etc.). Aunque constituyen sólo el 3-5% de la masa celular del hígado, los colangiocitos son responsables de la generación (regulada en atención a los requerimientos fisiológicos) de hasta el 40% del volumen biliar ductular. De esta manera, el árbol biliar intrahepático desempeña un papel importante en la regulación del volumen y la composición de la bilis. A semejanza de los hepatocitos, los colangiocitos poseen múltiples transportadores iónicos, tanto en la membrana basolateral como en la apical. Así, en la basolateral se localiza el intercambiador sodio/protón NHE1, que alcaliniza la célula al internalizar Na⁺ a cambio de una salida de H⁺. También se encuentran en la

membrana basolateral de los colangiocitos un cotransportador Na⁺/HCO₃⁻ (*sodium bicarbonate cotransporter*, familia NBC) y un intercambiador electroneutro Cl⁻/HCO₃⁻ dependiente de Na⁺, que serían responsables de internalizar el bicarbonato que posteriormente se excretará a la luz de los conductos biliares. Todavía no se han determinado con exactitud las proteínas implicadas en estas actividades transportadoras, pero NBC4 (SLC4A5)⁹ podría ser el cotransportador basolateral, mientras que NDCB1¹⁰ u otra isoforma de éste podría ser el intercambiador basolateral de Cl⁻/HCO₃⁻ dependiente de Na⁺. El gradiente de Na⁺ requerido para el flujo de iones se mantiene gracias a 2 proteínas basolaterales: la Na⁺-K⁺-ATPasa (que extruye 3 cationes de Na⁺ a cambio de la salida de 2 cationes de K⁺) y un canal de K⁺ (que permite la salida de este catión). A su vez, la entrada de Cl⁻ es facilitada por el cotransportador Na⁺/K⁺/2Cl⁻ basolateral. En situaciones de colestasis, los intercambiadores sodio/protón apicales NHE2 (SLC9A2) y NHE3 (SLC9A3) pueden actuar en procesos de reabsorción de Na⁺.

En la membrana apical o ductular de los colangiocitos se localizan el intercambiador de aniones Cl⁻/HCO₃⁻ independiente de sodio AE2⁷ y el canal de Cl⁻ CFTR, que parecen tener un papel importante en la formación del flujo biliar independiente de sales biliares. Como ya se mencionó previamente, estudios recientes indican la presencia simultánea de AE2, CFTR y APQ1 en vesículas subapicales que pueden migrar e insertarse en la membrana apical tras un estímulo colerético como la secretina⁸. La interacción de la secretina con su receptor específico SCTR, localizado en la membrana basolateral de los colangiocitos, incrementa las concentraciones intracelulares de cAMP, que a través de la PKA parecen estimular la inserción apical de las vesículas, con el consiguiente aumento de la actividad de las 3 proteínas transportadoras (sin que ello descarte un efecto estimulador directo sobre la actividad de una o más de ellas, como parece ser el caso del CFTR). Por tanto, para explicar la hidrocoleresis rica en bicarbonato que sigue al estímulo con secretina cabría hipotetizar aquí un modelo paralelo al mencionado antes para los hepatocitos y la coleresis tras el estímulo con glucagón (si bien en los colangiocitos los canales de Cl⁻ y de agua serían diferentes). Así, la salida inicial de Cl⁻ tras la activación del CFTR posibilitaría el intercambio Cl⁻/HCO₃⁻ en presencia del intercambiador de aniones AE2, y la fuerza osmótica ejercida por el bicarbonato ductular arrastraría el agua, que fluiría con facilidad hacia la luz de los conductos biliares a través de la AQP1 apical. La necesaria entrada de agua en los colangiocitos estaría posibilitada por la AQP4 localizada en la membrana basolateral. La bombesina es otro estímulo colerético, si bien su mecanismo de acción es poco conocido². Un efecto antagónico al de la secretina es el que produce la somatostatina, ya que la interacción con su receptor específico basolateral SSTR2 provoca un descenso de las concentraciones intracelulares de cAMP que inhibe la actividad del CFTR. La gastrina también tiene un efecto colestásico tras interactuar con su receptor específico basolateral GASR (coincidente con el receptor B de la colecistoqui-

nina), tras lo cual se producen una disminución de las concentraciones intracelulares de cAMP y un aumento de las de Ca^{2+} que activa la vía de la proteinquinasa $\text{C}\alpha$ (PKC α). Sin embargo, el aumento intracelular de Ca^{2+} no es de por sí colestásico, sino que su efecto se relaciona más bien con la vía específica de señalización que determina un patrón subcelular de ondas, oscilaciones, etc.¹¹. Al igual que los hepatocitos, los colangiocitos poseen en la región apical canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} (y por tanto distintos del CFTR ya mencionado), que se estimulan, por ejemplo, por la elevación de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} tras estímulos de ATP o acetilcolina. Se ha conjeturado que el ATP excretado a la bilis canalicular por los hepatocitos podría activar los receptores purinérgicos P_{20} , que se encuentran en la membrana apical de los colangiocitos. La activación de los receptores P_{20} estimula la generación del segundo mensajero inositol 1,4,5-trifosfato (InsP_3), el cual se une a sus receptores InsP_3R (o ITPR), fundamentalmente al de tipo 3, que es muy abundante en el dominio apical de los colangiocitos. Mediante esta vía, el ATP es capaz de inducir la señalización de oscilaciones del Ca^{2+} intracelular, que a su vez activa los canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} apicales. Por su parte, la acetilcolina es capaz de interaccionar con los receptores basolaterales M_3 originando un aumento de las concentraciones intracelulares de InsP_3 y la consiguiente activación de los InsP_3Rs con el desencadenamiento de ondas intracelulares de Ca^{2+} (de región apical hacia la basolateral). Es interesante destacar aquí el papel colerético de algunas sales biliares, especialmente del ácido ursodeoxicólico, que es capaz de producir una coleresis particularmente rica en bicarbonato. Se sabe que el ácido ursodeoxicólico es capaz de aumentar los valores de Ca^{2+} intracelular y de activar los canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} . Es posible que los múltiples efectos beneficiosos del ácido ursodeoxicólico en situaciones de colestasis estén también relacionados (directa o indirectamente) con un aumento de la actividad $\text{AE2}^{12, 13}$.

Además, los colangiocitos disponen de un sistema de reabsorción de sales biliares que resulta particularmente útil en situaciones de obstrucción del árbol biliar. Así, los colangiocitos expresan en su membrana apical la misma proteína que se encuentra en el íleon para reabsorber sales biliares junto a sodio (*ileum sodium bile salt transporter*, ISBT, también denominada NTCP tipo 2 y más recientemente SLC10A2). En los colangiocitos esta proteína apical, que ha pasado a llamarse ASBT (*apical sodium bile salt transporter*), es capaz de reabsorber taurocolato y otras sales biliares en situaciones de colestasis. Es interesante el hecho de que en la membrana basolateral se encuentra a su vez una forma truncada de este transportador (t-ASBT), que parece responsable de ultimar la reabsorción de las sales biliares desde la bilis hasta la sangre. En dichas situaciones de colestasis la AQP1 actuaría reabsorbiendo agua desde el lumen canalicular y la AQP4 secretaría agua desde el interior celular a la sangre.

En situaciones en las que se produce una acumulación de los productos finales del catabolismo del colesterol como son las sales biliares, tanto la síntesis como la excreción

de estos productos se alteran profundamente en los hepatocitos. En este sentido, resulta cada vez más evidente el papel de la interacción de las sales biliares con receptores nucleares (p. ej., FXR, RAR, VDR, PXR, RXR, LXR, LHR-1) y con factores nucleares (HNF1 α y HNF4 α , por un lado, y SHP-1, por otro)¹⁴. Los ácidos biliares son ligandos endógenos de FXR, el cual regula los genes de la síntesis de ácidos biliares, además de su excreción biliar y absorción intestinal. A través de la inducción del represor transcripcional SHP-1, FXR es capaz de proteger a los hepatocitos del exceso de ácidos biliares activando directamente su exportación a través del transportador BSEP y disminuyendo la expresión hepatocitaria tanto de los importadores basolaterales de sales biliares OATP-C y NTCP (que normalmente se activan por la vía del HNF4 α \rightarrow HNF1 α), como de las enzimas CYP7A1 y CYP8B1, que catabolizan el colesterol en ácidos biliares. El papel del factor nuclear HNF1 α en la regulación de la expresión de múltiples genes que intervienen en la síntesis y catabolismo del colesterol, así como en la generación del flujo biliar dependiente de sales biliares, ha quedado aún más patente en el modelo de ratones *knock-out* para este factor de transcripción¹⁵. Recientemente hemos observado que el HNF1 α es también capaz de regular la expresión de una de las isoformas de AE2^{16} , lo que induce a pensar que este factor de transcripción puede tener un papel en la generación del flujo biliar independiente de ácidos biliares.

El conocimiento cada vez más profundo de los mecanismos moleculares implicados en la formación de la bilis será de indudable valor a la hora de sentar las bases científicas para el tratamiento particularizado de las diferentes formas de colestasis, y en especial las de origen intrahepático y no obstructivo como las colestasis familiares (de origen genético), las de causa hormonal (desencadenadas por estrógenos) y las debidas a fármacos y xenobióticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 2003;83:633-71.
2. Baiocchi L, LeSage G, Glaser S, Alpini G. Regulation of cholangiocyte bile secretion. *J Hepatol* 1999;31:179-91.
3. Strazzabosco M, Boyer JL. Regulation of intracellular pH in the hepatocyte. Mechanisms and physiological implications. *J Hepatol* 1996;24:631-44.
4. Vavricka SR, Van Montfort J, Ha HR, Meier PJ, Fattinger K. Interactions of rifamycin SV and rifampicin with organic anion uptake systems of human liver. *Hepatology* 2002;36:164-72.
5. Meier PJ, Stieger B. Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 2002;64:635-61.
6. Strazzabosco M, Joplin R, Zsembery A, Wallace L, Spirli C, Fabris L, et al. Na^+ -dependent and -independent $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange mediate cellular HCO_3^- transport in cultured human intrahepatic bile duct cells. *Hepatology* 1997;25:976-85.
7. Martínez-Ansó E, Castillo JE, Díez J, Medina JF, Prieto J. Immunohistochemical detection of chloride/bicarbonate anion exchangers in human liver. *Hepatology* 1994;19:1400-6.
8. Tietz PS, Marinelli RA, Chen XM, Huang B, Cohn J, Kole J, et al. Agonist-induced coordinated trafficking of functionally related transport proteins for water and ions in cholangiocytes. *J Biol Chem* 2003;278:20413-9.

9. Pushkin A, Abuladze N, Newman D, Lee I, Xu G, Kurtz I. Two C-terminal variants of NBC4, a new member of the sodium bicarbonate cotransporter family: cloning, characterization, and localization. *IUBMB Life* 2000;50:13-9.
10. Grichtchenko, II, Choi I, Zhong X, Bray-Ward P, Russell JM, Boron WF. Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a human electroneutral Na(+)-driven Cl-HCO₃ exchanger. *J Biol Chem* 2001;276:8358-63.
11. Hirata K, Dufour JF, Shibao K, Knickelbein R, O'Neill AF, Bode HP, et al. Regulation of Ca²⁺ signaling in rat bile duct epithelia by inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms. *Hepatology* 2002;36:284-96.
12. Medina JF, Martínez-Ansó E, Vázquez JJ, Prieto J. Decreased anion exchanger 2 immunoreactivity in the liver of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1997;25:12-7.
13. Prieto J, García N, Martí-Climent JM, Peñuelas I, Richter JA, Medina JF. Assessment of biliary bicarbonate secretion in humans by positron emission tomography. *Gastroenterology* 1999; 117:167-72.
14. Karpen SJ. Nuclear receptor regulation of hepatic function. *J Hepatol* 2002;36:832-50.
15. Shih DQ, Bussen M, Sehayek E, Ananthanarayanan M, Shneider BL, Suchy FJ, et al. Hepatocyte nuclear factor-1 α is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. *Nat Genet* 2001;27:375-82.
16. Malumbres R, Lecanda J, Melero S, Ciesielczyk P, Prieto J, Medina JF. HNF1 α upregulates the human AE2 anion exchanger gene (SLC4A2) from an alternate promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:233-40.