

## Efecto de la ingesta de vitamina C en el proceso de formación de cálculos biliares de colesterol

REGINALD DEL POZO<sup>1,a</sup>, MIRNA MUÑOZ<sup>1,b</sup>, ANDRÉS DUMAS<sup>1,c</sup>,  
CLAUDIO TAPIA<sup>2</sup>, KATIA MUÑOZ<sup>1,d</sup>, FELIPE FUENTES<sup>1,e</sup>,  
MAFALDA MALDONADO<sup>3,e</sup>, DIETER JÜNGST<sup>4</sup>

### Effects of vitamin C administration on cholesterol gallstone formation

**Background:** Biliary cholesterol is transported by vesicles and micelles. Cholesterol microcrystals are derived from thermodynamically unstable vesicles. In experimental animals vitamin C deficiency leads to a super-saturation of biliary cholesterol and to the formation of gallstones. **Aim:** To search for a possible relationship between serum levels of vitamin C and the formation of cholesterol gallstones in patients with cholelithiasis. **Material and Methods:** Thirteen patients with cholelithiasis and a programmed surgical intervention were treated with 2 g/day of vitamin C per os for two weeks before surgery. Forty nine patients subjected to a cholecystectomy not supplemented with vitamin C were studied as controls. Plasma concentrations of vitamin C and lipid profiles were measured. The cholesterol saturation index, crystallization time, cholesterol and phospholipid content in vesicles and micelles, separated by gel filtration chromatography, were studied in bile samples obtained from the gallbladder. **Results:** Vitamin C supplementation did not change significantly plasma lipids and bile lipid concentrations. However, in supplemented patients, significant reductions in vesicular cholesterol content ( $6.5 \pm 4.8\%$  compared to  $17.9 \pm 14.0\%$  in the control group;  $p < 0.05$ ) and vesicular cholesterol/phospholipid ratio ( $0.71 \pm 0.53$  compared to  $1.36 \pm 1.15$  in controls;  $p < 0.05$ ), were observed. **Conclusions:** Vitamin C administration may modify bile cholesterol crystallization process, the first step in cholesterol gallstone formation.

(Rev Med Chile 2014; 142: 20-26)

**Key words:** Ascorbic acid; Cholesterol; Phospholipids.

<sup>1</sup>Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Concepción, Chile.

<sup>2</sup>Servicio de Cirugía, Hospital Herminda Martín, Chillán, Chile.

<sup>3</sup>Departamento de Fisiopatología, Universidad de Concepción, Chile.

<sup>4</sup>Departamento de Medicina Interna II, Clínica Grosshadern, Universidad de Munich, Munich, Alemania.

<sup>a</sup>Dr.rer.biol.hum.

<sup>b</sup>Magíster en Bioquímica Clínica.

<sup>c</sup>Interno.

<sup>d</sup>Químico Analista.

<sup>e</sup>Magíster en Bioquímica.

La presente investigación fue parcialmente sustentada con fondos de la Dirección de Investigación de la Universidad Católica de la Santísima Concepción (DIN 02/2004).

Recibido el 10 de enero de 2013, aceptado el 9 de diciembre de 2013.

Correspondencia a:  
Dr. Reginald del Pozo I.  
Facultad de Medicina,

Universidad Católica de la SSMA, Concepción, Alonso de Ribera 2850, Concepción, Chile.  
Teléfono: 41-2345413  
rpozo@ucsc.cl

La colelitiasis es una patología de muy alta prevalencia en Chile. Su etiología es considerada multifactorial<sup>1,2</sup>. Es generalmente aceptado que la formación de cálculos de colesterol requiere inicialmente de una bilis sobresaturada con colesterol, seguida de la precipitación de cristales de colesterol, que finalmente se aglomeran para formar los cálculos macroscópicos<sup>3-5</sup>. Las concentraciones relativas de sales biliares, fosfolípidos y colesterol forman diferentes agregados lipídicos

en la bilis. El colesterol biliar es transportado principalmente por micelas mixtas, conformadas por colesterol, fosfolípidos y sales biliares<sup>6,7</sup>. Cuando se excede la capacidad micelar de solubilizar colesterol, se forman vesículas, ricas en fosfolípidos y colesterol<sup>8-12</sup>. Estas últimas, cuando contienen una elevada razón colesterol/fosfolípidos (Col/Fos) se agregan y fusionan en la bilis, iniciando el proceso de cristalización y precipitación de colesterol<sup>13</sup>.

En la década 1970-79, datos clínicos y experi-

mentales sugirieron un potencial efecto protector de la vitamina C en la formación de cálculos vesiculares<sup>14,15</sup>. En animales de experimentación se ha demostrado una asociación entre una deficiencia crónica de vitamina C con la formación de cálculos de colesterol<sup>14,16-18</sup>. En el hombre, se ha descrito una situación similar en el incremento del desarrollo de la coleditiasis en sujetos con deficiencia de vitamina C<sup>19</sup>. Duane y col. mostraron que una deficiencia de vitamina C en 5 voluntarios sanos no incrementaron el potencial litogénico en sus bilis<sup>20</sup>. Contrariamente, Gustafsson y col. describieron cambios significativos en la composición de sales biliares y niveles de fosfolípidos biliares en pacientes coleditiásicos tratados con vitamina C<sup>21</sup>. El suministro oral de vitamina C a pacientes con cálculos biliares de colesterol, no alteró los niveles séricos de lípidos ni la concentración y saturación del colesterol biliar; sólo se apreció una prolongación del tiempo de cristalización<sup>21</sup>. También se ha observado una reducción en los niveles séricos de ácido ascórbico en grupos de alto riesgo de padecer coleditiasis<sup>22</sup>. Un estudio en mujeres norteamericanas reveló que un incremento en los niveles séricos de vitamina C se asoció con 13% de disminución en la enfermedad vesicular clínica<sup>23</sup>. Otros estudios recientes han sugerido también una asociación entre la ingesta de vitamina C y la enfermedad vesicular<sup>24-26</sup>.

El objetivo del presente trabajo es estudiar la relación entre la ingesta de vitamina C y los lípidos biliares constituyentes de vesículas y micelas, de pacientes con cálculos biliares de colesterol en la región del Bío-Bío (Chile).

## Pacientes y Método

### Pacientes

Este estudio incluyó 13 pacientes con cálculos de colesterol (contenido > 50% colesterol), some-

tidos a colecistectomía electiva, y suplementados con vitamina C. El grupo control consistió en 49 pacientes con cálculos de colesterol, sometidos a colecistectomía electiva, sin administración de vitamina C. La Tabla 1 proporciona información adicional de los pacientes considerados en este estudio. Los pacientes no recibieron antibióticos, al menos 3 semanas antes de la cirugía. Fueron excluidos de este estudio pacientes que presentaran evidencias clínicas y de laboratorio de diabetes mellitus, hiperlipoproteinemias, obesos, hipertensos, con abuso de alcohol y otras drogas o con ingesta de anticonceptivos. De cada paciente se obtuvo un consentimiento informado, proporcionándoles una detallada explicación sobre la naturaleza y propósito del estudio, responsabilidades del paciente, beneficios y riesgos, y eventual opción de retiro de la investigación (protocolo aprobado por el Comité Ético del Hospital "Herminda Martín", Chillán).

### Procedimiento experimental

Al grupo de 13 pacientes se les administró una dosis de 2 g de vitamina C (1 g, 2 veces al día) durante 2 semanas previas a la cirugía. Las muestras de sangre en ayunas fueron obtenidas antes del tratamiento con vitamina C y en la mañana antes de la cirugía, para la posterior determinación de lípidos plasmáticos y vitamina C. La bilis fue aspirada completamente de la vesícula biliar con una jeringa estéril, depositándola en un frasco conteniendo antiproteasas (PMSF 1 mM, EDTA 5 mM, N-etilmaleinimida 10 mM) y azida sódica 0,02% como antibacteriano. La muestra de bilis, y el(los) correspondiente(s) cálculo(s), se procesaron de inmediato, y además se conservaron alícuotas de cada bilis a -30°C. Fueron excluidas del estudio las muestras biliares que contenían sangre o aquellas que presentaron una concentración de lípidos totales menor a 5 g/dL.

**Tabla 1. Datos basales de 62 pacientes controles y tratados con vitamina C previo a las colecistectomías**

Grupo de pacientes	n	Género (F/M)	Edad* (años)	Colesterol total sérico* (mg/dL)	Triglicéridos séricos* (mg/dL)	LDL-colesterol* (mg/dL)	HDL-colesterol* (mg/dL)
No tratados	49	40/9	44 ± 15	189 ± 16	113 ± 60	129 ± 28	37 ± 8
Tratados con vitamina C	13	11/2	41 ± 4	191 ± 25	193 ± 171	113 ± 17	45 ± 11

\*(Promedio ± SEM).

### *Análisis de lípidos plasmáticos*

Los lípidos plasmáticos (colesterol total, HDL-colesterol, triglicéridos) fueron cuantificados mediante métodos enzimáticos colorimétrico realizados en forma manual, utilizando reactivos Labtest<sup>27</sup>. El LDL-colesterol se estimó utilizando la fórmula de Friedewald<sup>28</sup>.

### *Cuantificación de vitamina C plasmática*

Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos con EDTA, y el plasma separado mediante centrifugación. Los plasmas se conservaron a  $-30^{\circ}\text{C}$ . Se midió la cinética de formación del complejo metanol-ácido dehidroascórbico a  $346\text{ nm}^{29,30}$ . Se excluyeron aquellos pacientes que no aumentaron significativamente las concentraciones de vitamina C post tratamiento.

### *Separación de transportadores de colesterol biliar: vesículas y micelas*

Las vesículas se separaron de las micelas por medio de cromatografía de filtración en gel. Se aplicaron 500 ml de bilis isotrópica sobre una columna ( $80 \times 1,5\text{ cm}$ ) conteniendo Bio-Gel A-5m (rango operación: 10 a 5.000 kDa). Las fracciones cromatográficas (1 ml/fracción; flujo: 0,5 ml/min) se obtuvieron luego de eluir con *buffer* Tris-HCl 20 mM (pH: 8,0), NaCl 140 mM, azida sódica 3 mM, conteniendo colato de sodio 5 mM para prevenir la disrupción de los lípidos micelares. Se validó esta etapa de separación utilizando diferentes concentraciones de colato de sodio (0, 2,5, 5, 7,5, 10 y 15 mM) en el *buffer* de elución. Se concluyó que las concentraciones de 2,5 y 5 mM de colato de sodio eran las óptimas para preservar la integridad vesicular y micelar, evitando la subestimación de la fracción vesicular. En definitiva, el uso de una concentración de 5 mM de colato de sodio tiene sus limitaciones<sup>31</sup>, y nuestros datos acerca de la cantidad de colesterol en vesículas deberían ser interpretados más bien en términos relativos que absolutos<sup>12</sup>. El  $V_0$  se determinó utilizando azul de dextrano.

### *Análisis de lípidos biliares, determinación del tiempo de nucleación y cálculo de la saturación de colesterol*

El colesterol biliar y de las fracciones cromatográficas se cuantificaron mediante método colorimétrico de Liebermann-Burchard<sup>32</sup>. Los fosfolípidos en bilis y fracciones cromatográficas

fueron determinados mediante el análisis de fósforo inorgánico por un método colorimétrico<sup>33</sup>. Las sales biliares se analizaron mediante una modificación del método de 3-a-hidroxiesteroide deshidrogenasa<sup>34</sup>. El tiempo de cristalización (COT) se determinó en bilis isotrópica (sobrenadante de bilis nativa, ultracentrifugada a  $100.000\text{ g} \times 60\text{ min}$ ; ultracentrífuga Beckman Óptima LE80K), observando diariamente la presencia de cristales de colesterol en un microscopio con contraste de fase, manteniendo la bilis isotrópica a  $37^{\circ}\text{C}$ <sup>5</sup>. El índice de saturación de colesterol biliar (CSI) se calculó utilizando el método descrito por Carey<sup>35</sup>.

### *Análisis estadístico*

Los datos se presentan como valores promedio  $\pm$  S.E.M (excepto COT, que se muestra como mediana). Se utilizó el test t-Student, para variables independientes con distribución normal, para establecer los niveles de significancia estadística entre los distintos grupos analizados. Valores de p menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

### *Materiales*

Se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO) los siguientes reactivos: colato de sodio, colesterol, fosfatidilcolina, azul de dextrano. El Bio-Gel A-5m se adquirió de Bio-Rad.

La vitamina C, utilizada en forma de tabletas, se obtuvo de Vitamin Life Nature Science (cada tableta contiene 1.000 mg de ácido ascórbico puro + 25 mg de escaramujo; New Jersey, USA).

### **Resultados**

La Tabla 2 muestra las concentraciones plasmáticas de vitamina C, antes y después de su administración. Todos los pacientes analizados incrementaron individualmente la concentración plasmática de vitamina C post tratamiento; en efecto, se observó un marcado aumento en el promedio de sus niveles plasmáticos. En la Tabla 2 se presentan también los niveles de lípidos plasmáticos, los cuales no mostraron diferencias significativas antes y después del tratamiento.

La composición de lípidos, CSI y tiempo de cristalización de las muestras biliares de pacientes con y sin administración de vitamina C, se muestran en la Tabla 3. En el grupo de pacientes tra-

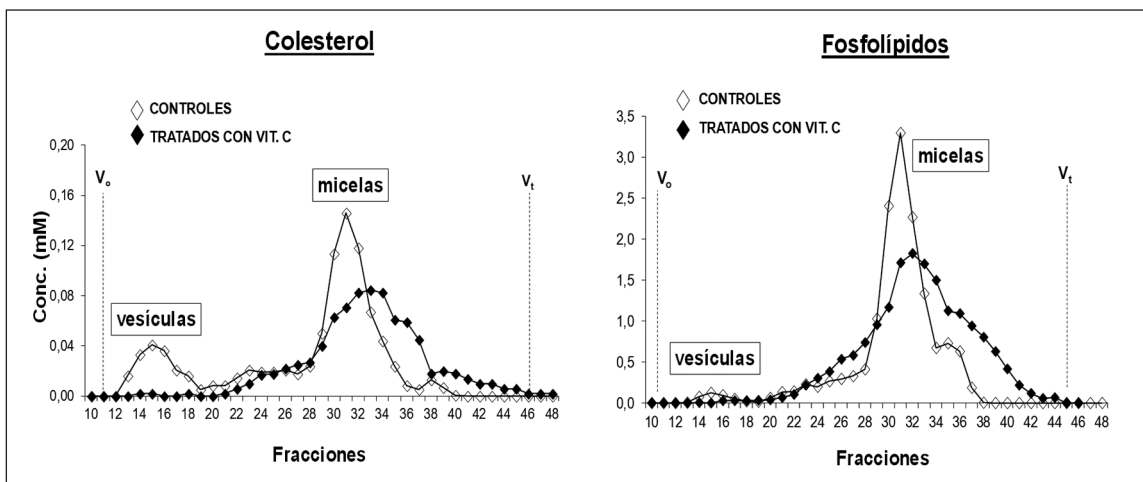
**Tabla 2. Concentraciones de vitamina C y de lípidos en plasma de pacientes con colestitis, tratados con 2 g de vitamina C durante 14 días antes de las colecistectomías**

Tratamiento con vitamina C	Vitamina C* ( $\mu\text{M}$ )	Colesterol total* (mg/dL)	LDL-colesterol* (mg/dL)	HDL-colesterol* (mg/dL)	Triglicéridos* (mg/dL)
Pre-tratamiento	47,8 $\pm$ 38,5	191 $\pm$ 25	113 $\pm$ 17	45 $\pm$ 11	193 $\pm$ 171
Post-tratamiento	83,1 $\pm$ 23,0	168 $\pm$ 35	113 $\pm$ 29	37 $\pm$ 10	88 $\pm$ 32

\*(Promedio  $\pm$  SEM).**Tabla 3. Lípidos, índice de saturación de colesterol (CSI) y tiempo de cristalización (COT) en bilis de los pacientes colestiáticos (promedio  $\pm$  SEM)**

Pacientes	Colesterol (mM)	Fosfolípidos (mM)	Sales biliares (mM)	Lípidos totales (g/dL)	CSI	COT** (días)
No tratados	13,5 $\pm$ 5,8	40,5 $\pm$ 16,0	98,6 $\pm$ 39,5	8,5 $\pm$ 3,2	1,20 $\pm$ 0,33	3
Tratados con vitamina C	10,0 $\pm$ 4,4*	28,0 $\pm$ 12,1*	103,4 $\pm$ 33,3	7,7 $\pm$ 2,4	1,16 $\pm$ 0,30	2,5

\*p &lt; 0,05; \*\*mediana.

**Figura 1.** Separación cromatográfica característica de transportadores biliares de colesterol (vesículas y micelas) de pacientes no tratados y tratados con vitamina C.

tados, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de sales biliares y lípidos totales. Sin embargo, se apreció una significativa disminución en las concentraciones biliares de colesterol (10,0  $\pm$  4,8 mM vs 13,5  $\pm$  5,8 mM en grupo control; p < 0,05) y fosfolípidos (28,0  $\pm$  12,1 mM vs 40,5  $\pm$  16,0 mM en grupo control; p < 0,05). El CSI y el tiempo de cristalización no fueron alterados por la administración oral de vitamina C.

La Figura 1 muestra la separación caracterís-

tica de los transportadores biliares, vesículas y micelas, obtenida por cromatografía de filtración en gel y analizadas por su composición lipídica (concentración de colesterol y fosfolípidos en las fracciones) en ambos grupos de pacientes. La Tabla 4 muestra la composición lipídica de los transportadores vesiculares y micelares de pacientes tratados con vitamina C comparados con el grupo de pacientes control. Se observó una disminución significativa en el porcentaje de colesterol de los transportadores vesiculares en los pacientes trata-

**Tabla 4. Porcentaje de colesterol (Col) y fosfolípidos (Fos), y relación Col/Fos en transportadores vesiculares y micelares presentes en bilis de pacientes coleditiásicos tratados con 2 g de vitamina C por 14 días antes de las colecistectomías (promedio  $\pm$  SEM)**

Pacientes	Transportadores vesiculares		Transportadores micelares	
	% Colesterol	Relación Col/Fos	% Colesterol	Relación Col/Fos
No tratados	17,9 $\pm$ 14,0	1,36 $\pm$ 1,15	70,6 $\pm$ 14,7	0,24 $\pm$ 0,05
Tratados con vitamina C	6,5 $\pm$ 4,8*	0,71 $\pm$ 0,53*	92,5 $\pm$ 5,4*	0,27 $\pm$ 0,09

\*p < 0,05.

dos con vitamina C (17,9%  $\pm$  14,0 grupo control vs 6,5%  $\pm$  4,8 grupo tratado; p < 0,05). Además, se observó un aumento significativo en el porcentaje de colesterol en los transportadores micelares en el grupo de pacientes tratados (70,6%  $\pm$  14,7 grupo control vs 92,5%  $\pm$  5,4 grupo tratado; p < 0,05).

En los pacientes tratados con vitamina C, también se encontró una disminución significativa en la relación Col/Fos en los transportadores vesiculares (1,36  $\pm$  1,15 grupo control vs 0,71  $\pm$  0,53 grupo tratado; p < 0,05), sin encontrar alteraciones en la relación Col/Fos en los transportadores micelares.

## Discusión

Este estudio muestra el efecto de la ingesta de vitamina C en el proceso de formación de cálculos biliares de colesterol en un grupo de pacientes colecistectomizados de la VIII región de Chile.

En nuestros pacientes pre tratados encontramos un nivel plasmático promedio de vitamina C de 48 mmol/L, que resulta inferior a los 69 mmol/L reportado en la población sueca<sup>21</sup>. En un reciente estudio realizado en escolares chilenos (n = 214; edad promedio = 16,4  $\pm$  1,4), se estableció que 39% de la mujeres y 43% de los hombres presentaron un contenido plasmático de vitamina C inferior a 20 mmol/L (datos aún no publicados; proyecto Fonis N°SA04I2022; Maldonado M et al.; "Vitamina C en adolescentes de nivel socioeconómico bajo")<sup>36</sup>. La aparente deficiencia plasmática de ácido ascórbico, observada en nuestra población por bajo consumo de alimentos ricos en vitamina C, podría constituir un factor de riesgo adicional en el desarrollo de la coleditiasis.

Todos nuestros pacientes tratados incrementaron el nivel plasmático de vitamina C, obteniéndose un aumento promedio de 74%, lo que además corrobora el cumplimiento de su ingesta previa a

la cirugía. La administración oral de vitamina C a nuestros pacientes no modificó las concentraciones de lípidos plasmáticos. Similares resultados fueron obtenidos en otros estudios previos realizados en pacientes hiperlipidémicos<sup>37</sup>, en sujetos sanos<sup>38</sup>, y en un estudio más reciente en pacientes colecistectomizados<sup>21</sup>. En contraposición, otros estudios han mostrado una disminución en los niveles séricos de colesterol en sujetos tratados con vitamina C<sup>15,39</sup>.

Nuestro estudio mostró una variación significativa en la composición de lípidos biliares. El grupo de pacientes tratados con vitamina C presentó una disminución en las concentraciones biliares de colesterol y fosfolípidos, sin alteración en la concentración de lípidos totales. Pese a ello, no se modificaron significativamente el índice de saturación de colesterol y tiempo de cristalización en la bilis de los pacientes tratados con vitamina C. Un estudio realizado en la población sueca, utilizando una dosis similar de vitamina C, reportó sólo una disminución en la concentración de fosfolípidos, junto con un aumento en el tiempo de cristalización en la bilis de los pacientes tratados<sup>21</sup>.

El colesterol hepático es secretado en la bilis dentro de transportadores vesiculares con una relación Col/Fos cercana a 0,3, pero al concentrarse en la vesícula biliar se produce un incremento en la relación Col/Fos que sobrepasa la unidad. Como consecuencia, los transportadores vesiculares con elevada relación Col/Fos se agregan y fusionan, formando cristales de colesterol<sup>40</sup>. En nuestra investigación se observó una disminución significativa en el contenido de colesterol de los transportadores vesiculares, junto con una disminución en la relación Col/Fos en los pacientes tratados con vitamina C. En consecuencia, estos resultados sugieren que la ingesta de altas dosis de vitamina C podría favorecer un retardo en el mecanismo de cristalización del colesterol biliar, contribuyendo



a disminuir el proceso inicial en la formación de cálculos de colesterol en la vesícula biliar.

Nuestros resultados proporcionan evidencias que sustentan la hipótesis que un suplemento de vitamina C se asocia con una reducción en la prevalencia de coleditiasis<sup>23,24,25,26</sup>. Se ha identificado una relación bioquímica, que nos permite postular un posible efecto protector de dietas ricas en vitamina C en el proceso de formación de cálculos vesiculares de colesterol.

**Agradecimientos:** Este trabajo está dedicado, en un homenaje póstumo, al Profesor Dr. Dieter Jüngst († 20.10.2009). La presente investigación fue parcialmente financiada con fondos de la Dirección de Investigación de la UCSC (DIN 02/2004).

## Referencias

- Covarrubias C, Valdivieso V, Nervi F. Epidemiology of gallstone disease in Chile. En: Copocaccia L, Ricci G, Angelico F, Editores, *Epidemiology and prevention of gallstone disease*. Lancaster, England: MTP; 1984. p. 26-30.
- Sama C, Labate AM, Taroni F, Barbara L. Epidemiology and natural history of gallstone disease. *Semin Liver Dis* 1990; 10: 149-58.
- Small DM. Cholesterol nucleation and growth in gallstone formation. *N Engl J Med* 1980; 302: 1305-7.
- Sedaghat A, Grundy SM. Cholesterol crystals and the formation of cholesterol gallstones. *N Engl J Med* 1980; 302: 1274-7.
- 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: 611-7.
- Admirand WH, Small DM. The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *J Clin Invest* 1968; 47: 1043-52.
- 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: 998-1026.
- Sömjen GL, Gilat T. Contribution of vesicular and micellar carriers in cholesterol transport in human bile. *J Lipid Res* 1985; 26: 699-705.
- Pattinson NR. Solubilization of cholesterol in human bile *FEBS* 1985; 181: 339-402.
- Ulloa N, Garrido J, Nervi F. Ultracentrifugal isolation of vesicular carriers of biliary cholesterol in native human bile. *Hepatology* 1987; 7: 235-44.
- Schriever CE, Jüngst D. Association between cholesterol-phospholipid vesicles and cholesterol crystals in human gallbladder bile. *Hepatology* 1989; 9: 541-6.
- Jüngst D, Gussmann E, Zündt B, Meyer G, Jüngst C, del Pozo R, et al. Solubility of cholesterol in the crystal-free gallbladder bile of gallstone patients. *J Lab Clin Med* 2004; 144: 134-40.
- Halpern Z, Dudley MA, Kibe A, Lynn MP, Breuer AC, Holzbach RT. Rapid vesicle formation and aggregation in abnormal human bile: a time-lapse video-enhanced contrast microscopy study. *Gastroenterology* 1986; 90: 875-85.
- Ginter E. Cholesterol: vitamin C controls its transformation to bile acids. *Science* 1973; 179: 702-4.
- Ginter E. Chenodeoxycholic acid, gallstones and vitamin C. *N Engl J Med* 1976; 295: 1260-1.
- Greene YJ, Harwood HJ, Stacpoole PW. Ascorbic acid regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and cholesterol synthesis in guinea pig liver. *Biochim Biophys Acta* 1985; 834: 134-8.
- Bjorkhem I, Kallner A. Hepatic 7 alpha-hydroxylation of cholesterol in ascorbate-deficient and ascorbate-supplemented guinea pigs. *J Lipid Res* 1976; 17: 360-5.
- Jenkins SA. Hypovitaminosis C and cholelithiasis in guinea pigs. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 77: 1030-5.
- Simon JA. Ascorbic acid and cholesterol gallstones. *Med Hypotheses* 1993; 40: 81-4.
- Duane WC, Hutton SW. Lack of effect of experimental ascorbic acid deficiency on bile acid metabolism, sterol balance, and biliary lipid composition in man. *J Lipid Res* 1983; 24: 1186-95.
- Gustafsson U, Wang FH, Axelson M, Kallner A, Sahlin S, Einarsson K. The effect of vitamin C in high doses on plasma and biliary lipid composition in patients with cholesterol gallstones: prolongation of the nucleation time. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 387-91.
- Hemilä H. Vitamin C and plasma cholesterol. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1992; 32: 33-57.
- Simon JA, Hudes ES. Serum ascorbic acid and gallbladder disease prevalence among US adults. *Arch Intern Med* 2000; 160: 931-6.
- Ortega RM, Fernández-Azuela M, Encinas-Sotillos A, Andrés P, López-Sobaler AM. Differences in diet and food habits between patients with gallstones and controls. *J Am Coll Nutr* 1997; 16: 88-95.
- Tsai CJ, Leitzmann MF, Willett WC, Giovannucci EL. Fruit and vegetable consumption and risk of cholecystectomy in women. *Am J Med* 2006; 119: 760-7.

26. Walcher T, Haenle MM, Kron M, Hay B, Mason RA, Walcher D, et al. Vitamin C supplement use may protect against gallstones: an observational study on a randomly selected population. *BMC Gastroenterol* 2009; 9: 74-9.
27. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974; 20: 470-5.
28. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 1972; 18: 499-502.
29. Badrakhan CD, Petrat F, Holzhauser M, Fuchs A, Lomonosova EE, de Groot H, Kirsch M. The methanol method for the quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples. *J Biochem Biophys Methods* 2004; 58 (3): 207-18.
30. Moeslinger T, Brunner M, Volf I, Spieckermann PG. Spectrophotometric determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid. *Clin Chem* 1995; 41: 1177-81.
31. Donovan JM, Jackson AA. Accurate separation of biliary lipid aggregates requires the correct intermixed micellar/intervesicular bile salt concentration. *Hepatology* 1998; 27: 641-48.
32. Abell LL, Levy BB, Brodie BB, Kendall FE. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J Biol Chem* 1952; 195: 357-66.
33. Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925; 66: 375-400.
34. Talalay P. Enzymatic analysis of steroid hormones. *Biochem Anal* 1960; 8: 119-43.
35. Carey MC. Critical tables for calculating the cholesterol saturation of native bile. *J Lipid Res* 1978; 19: 945-55.
36. Rozowski J, Cuevas A, Castillo O, Marin P, Strobel P, Pérez D, et al. Diferencias en antioxidantes plasmáticos según nivel socioeconómico en mujeres chilenas. *Rev Med Chile* 2001; 129: 43-50.
37. Peterson VE, Crapo PA, Weininger J, Ginsberg H, Olefsky J. Quantification of plasma cholesterol and triglyceride levels in hypercholesterolemic subjects receiving ascorbic acid supplements. *Am J Clin Nutr* 1975; 28: 584-7.
38. Kallner A. Serum bile acids in man during vitamin C supplementation and restriction. *Acta Med Scand* 1977; 202: 283-7.
39. Dobson HM, Muir MM, Hume R. The effect of ascorbic acid on the seasonal variations in serum cholesterol levels. *Scot Med J* 1984; 29: 176-82.
40. Donovan JM. Physical and metabolic factors in gallstone pathogenesis. *Gastroenterology Clinics of North America* 1999; 28: 75-97.