

Microestructura cristalina y microanálisis de cálculos biliares en la infancia y adolescencia

F. Garrido Martínez de Salazar^a, P. García Fernández^b,
M. García Guiral^c y F. Garrido García^d

^aDepartamento de Pediatría. Clínica Jerez ASISA. ^bCentro de Salud San Benito.

^cDepartamento de Anestesia. Clínica Jerez ASISA. ^dDepartamento de Cirugía. Universidad de Cádiz. España.

Objetivos

Conocer la estructura cristalina y la composición química de los cálculos biliares durante el período de la infancia y la adolescencia.

Diseño del estudio

Se llevó a cabo un estudio descriptivo simple de 21 cálculos biliares de pacientes en edad pediátrica en quienes se realizó una colecistectomía programada por padecer colecistitis crónica. Sólo 2 pacientes tenían una enfermedad de base que justificara la existencia de litiasis biliares. La estructura cristalina se determinó mediante difracción de rayos X y la visualización con microscopía electrónica de barrido. En el estudio de la composición se utilizó la espectroscopia de emisión y absorción atómica. Se usó un equipo de espectroscopia por dispersión de energía de rayos X, acoplado al microscopio, con el fin de confirmar la composición cristalina de alguna de las zonas estudiadas con este último.

Resultados

En cuanto a la composición cristalina, se encuentra un predominio de bilirrubinato y carbonato cálcico, lo cual demuestra el carácter pigmentario de los cálculos biliares de origen idiopático. El colesterol fue un elemento secundario. El microanálisis confirma al calcio como constituyente fundamental en la composición de las litiasis a cualquier edad. Se detectaron otros elementos como sodio, potasio, magnesio, manganeso, etc.

Conclusiones

Se confirma el carácter pigmentario de la litiasis idiopática en la infancia. Llamamos la atención las elevadas concentraciones de carbonato y bilirrubinato cálcico, a pesar de no demostrarse ningún factor de riesgo para la formación de este último. En cuanto a los elementos que componen el cálculo, el calcio es el más abundante.

Palabras clave:

Colelitiasis. Niños. Composición química. Cristalografía.

CRYSTALLINE MICROSTRUCTURE AND MICROANALYSIS OF GALLSTONES IN CHILDHOOD AND ADOLESCENCE

Objectives

To determine the crystalline structure and chemical composition of gallstones in children and adolescents.

Design of the study

A simple descriptive study was performed in 21 gallstones from pediatric patients with chronic cholecystitis who underwent elective cholecystectomy. Only two patients had an underlying disease that could explain the presence of gallstones. Crystalline structure was determined by X-ray diffraction and visualization with scanning electron microscopy. Emission and atomic absorption spectroscopy were used to study composition. An X-ray-dispersion energy spectroscope joined to the microscope was used to confirm the crystalline composition of some of the areas examined with the microscope.

Results

Bilirubinate and calcium carbonate predominated in the crystalline composition, demonstrating the pigmented appearance of idiopathic gallstones. Cholesterol was a secondary element. Microanalysis confirmed calcium as a fundamental constituent of gallstones irrespective of age. Other elements, such as sodium, potassium, magnesium and manganese, etc., were detected.

Conclusions

The present study confirms the pigmented character of idiopathic gallstones in childhood. The high levels of cal-

Correspondencia: Dr. F. Garrido Martínez de Salazar.
Pl. Hauries, 3, 6º A. 11405 Jerez de la Frontera. Cádiz. España.
Correo electrónico: med001334@nacom.es

Recibido en diciembre de 2002.

Aceptado para su publicación en marzo de 2003.

cium carbonate and bilirubinate, despite a lack of evidence for any risk factors for the formation of bilirubinate, was striking. Calcium was the most predominant element of the calculi.

Key words:

Cholelithiasis. Childhood. Chemical composition. Crystallography.

INTRODUCCIÓN

La litiasis biliar en la infancia ha sido siempre considerada como una patología poco frecuente¹. Esta idea ha cambiado en los últimos años, con ayuda de la ecografía, que ha permitido realizar diagnósticos de casos que hasta entonces pasaban desapercibidos²⁻⁴. El cálculo biliar del adulto ha sido ampliamente estudiado⁵⁻⁷ (microestructura, composición, etc.) y esto ha permitido determinar los mecanismos de nucleación y crecimiento⁸ y, en determinadas circunstancias, formas de tratamiento no quirúrgico. Sin embargo, la mayor parte de la información disponible sobre la litiasis infantil sólo se refiere a descripciones macroscópicas y a aspectos clínicos, radiológicos o terapéuticos^{9,10}.

El principal objetivo de este estudio es analizar la microestructura cristalina y composición de la litiasis biliar en el paciente pediátrico con el fin de poner las bases para la determinación de los posibles mecanismos de litogénesis.

MÉTODOS

Se estudiaron los cálculos biliares de pacientes pediátricos sometidos a colecistectomía mediante cirugía abier-

ta o laparoscópica. Se obtuvo el consentimiento informado de los padres para estudiar los cálculos.

Tipo de estudio. Descriptivo simple.

Procedimiento del estudio. Los cálculos biliares obtenidos se estudian utilizando las siguientes técnicas: difracción de rayos X (Difractómetro Philips®), microscopia electrónica de barrido (JSM-820®), análisis por dispersión de energía de rayos X (EDAX AN 10.000 Link®) y espectroscopia de emisión y absorción atómica (PU-9200X-Philips® y PU-7000 ICP-Philips®). Cada cálculo se lava con suero fisiológico al 0,9% estéril y se seca en una estufa a 60 °C durante 12 h. Posteriormente, cada cálculo se secciona por su ecuador mediante un golpe de bisturí y se realiza una clasificación macroscópica de éste. Una de las mitades se pulveriza en un mortero de ágata, obteniendo un polvo fino. Parte de éste se pasa a través de un tamiz ASTM de 53 µm de luz para su posterior difracción, mientras que en el resto se determina la composición cristalina cualitativa y cuantitativa mediante espectroscopia.

Para el reconocimiento de los diferentes elementos cristalinos que forman parte del cálculo, se han utilizado las fichas ASTM, y las tablas de Bogren para la identificación del bilirrubinato cálcico. Para identificar y cuantificar los elementos del sistema periódico que integran los cálculos, se realizó la espectroscopia de absorción atómica y de plasma acoplado por inducción.

La otra mitad del cálculo se valora mediante microscopia electrónica de barrido para el estudio de su microestructura cristalina. Cada muestra se coloca sobre un portamuestras de aluminio y se recubre con una fina capa de oro. Durante el barrido de la superficie, para confirmar la composición cristalina de determinadas áreas de estudio se utilizó un equipo acoplado para microanálisis mediante dispersión de energía de rayos X (EDX).

RESULTADOS

Se han estudiado 22 cálculos biliares, 8 (36%) pertenecían a varones y 14 (64%) a mujeres. La edad media de los niños fue de 10,3 años (límites, 1-15).

Todos los pacientes colecistectomizados tuvieron síntomas, excepto uno que fue diagnosticado casualmente en una ecografía. Dos niños presentaban una esferocitosis hereditaria; uno tenía síndrome de Down y otro padecía un cuadro de talla corta y asma. El aspecto macroscópico de la superficie de sección de los cálculos fue variable y predominaron los cálculos de aspecto pigmentario (77%).

Difracción de rayos X

Esta técnica no pudo aplicarse a un cálculo por falta de muestra. El resultado cualitativo de la difracción se expresa en la tabla 1. Se identificó bilirrubinato cálcico en 19 de las 21 muestras, lo cual representa el 90% del total. Sólo en 14 muestras (63%) apareció alguna forma de colesterol, hidratado y/o anhidro; presentando alta con-

TABLA 1. Resultados correspondientes al número y porcentaje de piezas que contenían diferentes formas cristalinas

Formas cristalinas	Número (21 muestras)	Porcentaje
Calcita	20	95,2
Vaterita	20	95,2
Bilirrubinato cálcico	19	90,4
Aragonito	13	61,9
Colesterol hidratado	10	47,6
Colesterol anhidro	10	47,6
Palmitato cálcico	8	38
Hidroxiapatito	8	38
Oxalato cálcico	8	38
Cloruro cálcico	7	33,3
Whitlockita	3	14,2
Ácido desoxicólico	2	9,5
Ácido cólico	2	9,5
Montmorillonita	2	9,5
Fluorapatito	1	4,7
Brushita	1	4,7

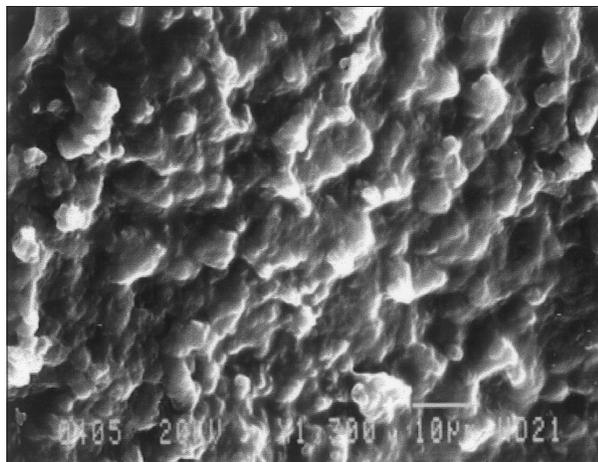


Figura 1. Imagen característica de bilirrubinato cálcico que aparece como una estructura esponjiforme.

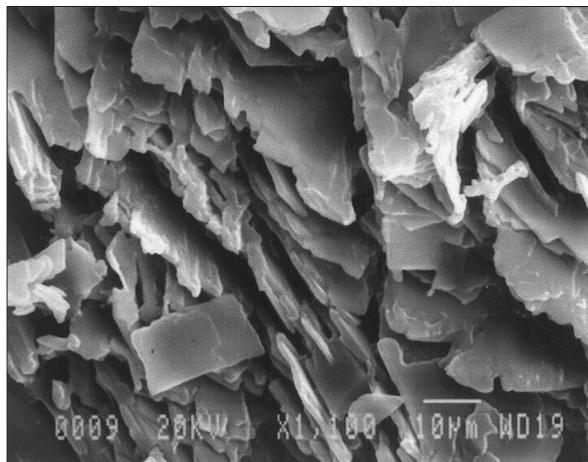


Figura 2. Clásica imagen de colesterol estratificado.

centración tan sólo en 3 muestras (13,6%). En 6 cálculos se aprecia la coexistencia de las dos formas de colesterol (hidratado y anhidro) en un mismo cálculo. Estas piezas, en las que predominó el colesterol, presentan de manera paralela carbonato y bilirrubinato cálcico. Los cálculos que contienen alguna forma de carbonato cálcico representan el 95% del total. Es, de forma aislada, el componente cristalino más frecuente en nuestra muestra. Ninguno de los cálculos contenía sólo una forma de carbonato cálcico en su composición. En el 65% de los casos se identificaba al mismo tiempo vaterita, calcita y aragonito.

Microscopio electrónico de barrido y EDX

Esta técnica permitió la visualización de los cristales presentes en la superficie de sección de los cálculos. Se encuentra un predominio de bilirrubinato cálcico en el 90% de las piezas, lo cual confirma el estudio de difracción. El bilirrubinato se visualiza con un aspecto esponjiforme, o formando una malla de gránulos irregulares (fig. 1). La disposición del colesterol sobre la masa de bilirrubinato cálcico no tiene aparentemente un orden concreto, sino que parece incrustarse en determinadas zonas de una forma aleatoria (fig. 2). Las regiones que se visualizan más oscuras macroscópicamente (núcleo y anillos) contienen fundamentalmente bilirrubinato cálcico. Se objetiva el carbonato cálcico en el 57% de las muestras, siendo muy abundante la vaterita en forma de esferas de pequeño tamaño y muy agrupadas, y con menos frecuencia el aragonito con su típica cristalización hexagonal (fig. 3). Se localizan áreas compatibles con fosfato cálcico en el 18% de las piezas. Su aspecto es similar al encontrado en los adultos, o sea, formas esferoidales de superficie irregular (fig. 4). No se identificaron formas laminares. Sólo se distinguió claramente palmitato cálcico en una pieza, adoptando la característica forma de roseta, con múltiples hojas irregulares, que se contraen fácilmente al incidir el haz de electrones sobre ellas (fig. 5). En el

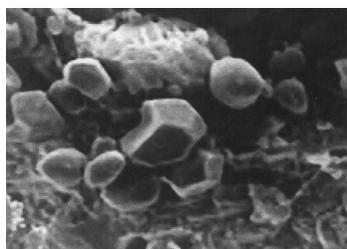
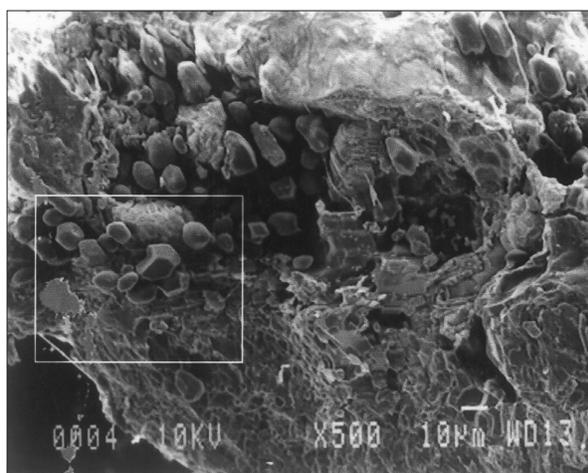


Figura 3. El carbonato cálcico, en concreto aragonito, cristaliza formando estructuras hexagonales.

9% de la serie se aprecian imágenes de cristalización acelerada, situados sobre áreas con abundante colesterol hidratado.

Microanálisis mediante emisión y absorción atómica

No pudieron valorarse cinco cálculos mediante espectroscopia por falta de muestra, debido al pequeño tamaño de alguna de ellas. El resultado de las mediciones se expresa en la tabla 2. El elemento más importante cuantitativamente fue el calcio, con una concentración de 140,3 mg/g. Destaca por su presencia en todas

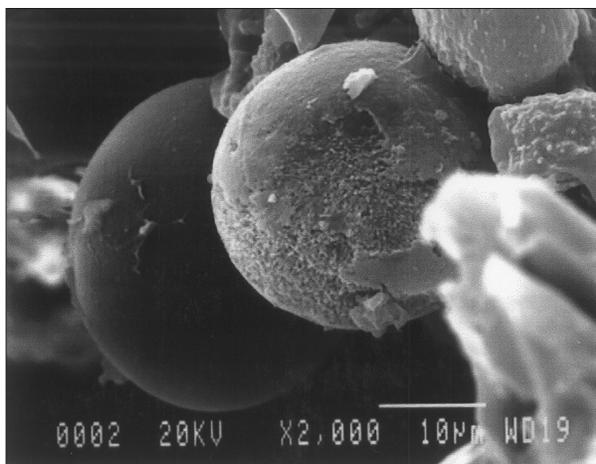


Figura 4. El fosfato cálcico lo encontramos cristalizando en estructuras esféricas con espículas en su superficie.

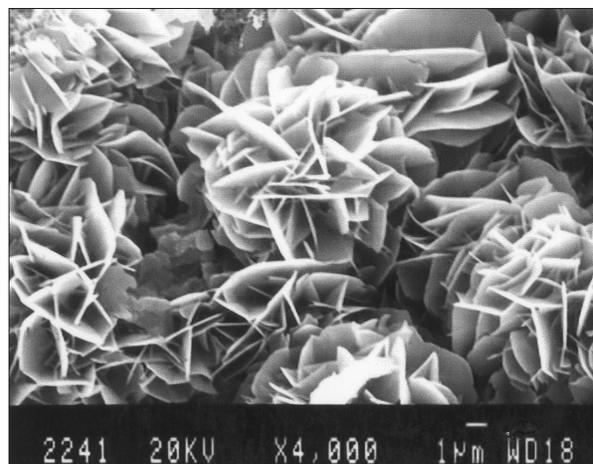


Figura 5. El palmitato cálcico adopta formas en hojas alabeadas que se fracturan fácilmente al incidir sobre ellas el haz de electrones.

TABLA 2. Concentración media de cada uno de los elementos detectados mediante microanálisis

Elemento	Concentración media (mg/g)
Calcio	140,2
Sodio	4,3
Potasio	2,2
Magnesio	2,1
Manganeso	0,5
Hierro	0,5
Cobre	0,4
Cinc	0,1

las muestras, formando parte de las diferentes sales cálcicas. En menor cantidad se encuentran sodio, potasio y magnesio. El cobre y el hierro, aunque se han considerado elementos de gran importancia en la formación de bilirrubinato cálcico, no están presentes en elevadas concentraciones, a pesar de ser muestras ricas en este elemento cristalino. No se encontró mercurio en ninguna pieza.

DISCUSIÓN

Se han comparado los resultados obtenidos con otros autores que han llevado a cabo determinaciones similares, en muestras recogidas de pacientes adultos, utilizando las mismas técnicas de estudio¹¹⁻¹⁵. La originalidad de la publicación sólo permite comparar los resultados con una publicación que realiza una valoración más grosera de los cálculos, utilizando otras técnicas de estudio¹⁶.

La serie estudiada corresponde a cálculos que en su mayoría son de origen idiopático, circunstancia habitual en nuestro medio. Sólo en 2 casos había una enferme-

dad hemolítica de base que justificara la litiasis. En un estudio retrospectivo en el que se recogieron datos clínicos de niños con litiasis en España, se observa que la gran mayoría (60%) son de origen idiopático, y la edad media de los niños afectados de 7,8 años¹⁷.

Macroscópicamente, los cálculos pigmentarios predominan claramente sobre aquellos de aspecto colesterólico, lo cual es típico en la infancia. Se sabe que gran parte de las litiasis infantiles son de tipo pigmentario, gracias a estudios radiológicos y a la valoración macroscópica posquirúrgica. La mayor parte de los cálculos estudiados tienen carbonato y bilirrubinato cálcico como principal componente. El colesterol es un elemento secundario, a excepción de tres muestras. Esto sucede a pesar de que tan sólo dos de los pacientes padecen una enfermedad hemolítica. Es importante destacar que en nuestro medio la mayor parte de los cálculos en los adultos están compuestos por colesterol (60-100%). Kauffman detecta bilirrubinato cálcico en el 52% de sus muestras de aspecto colesterólico y en el 100% de las pigmentarias¹⁸. Éste raramente aparece en cálculos vesiculares en el adulto, mientras que en los de colédoco se encuentra hasta en el 35,5%^{11,12}. Esta diferencia es la más importante en cuanto a la composición cristalina de los cálculos biliares en niños y adultos. Sin embargo, deseamos destacar que la diferencia no es tanto por el número de cálculos que contienen colesterol, sino por la concentración que ésta alcanza en las piezas, que es muy inferior en el niño. Los cálculos puros de colesterol permitirían el tratamiento médico de la litiasis biliar con ácido quenodesoxicólico. Kleiner et al¹⁶ valoran 21 cálculos procedentes de niños y concluyen, utilizando microscopia de fluorescencia y espectroscopia, que los cálculos negros y marrones contienen cantidades apreciables de bilirrubinato cálcico. Igualmente, postulan que el exceso de bilirrubina constituye un factor etiológico fundamental en la patogenia de la coledocitis en la infancia,

aunque confirman la necesidad de más estudios que clarifiquen esta circunstancia.

La alta presencia de bilirrubinato plantea la posibilidad de que la infección crónica de la vía biliar puede desempeñar un papel fundamental en la formación de estos cálculos, aunque esta sospecha es poco probable, ya que, en los pocos estudios realizados, hay una escasa incidencia de infección de la bilis en vesículas que contienen litiasis¹⁹. Esta situación abre la posibilidad de valorar en un futuro la posibilidad de que la β -glucuronidasa endógena tenga una función importante en la génesis de cálculos pigmentarios idiopáticos durante la infancia.

Otro aspecto destacado del estudio es la extraordinaria presencia de sales de carbonato cálcico en los cálculos. Las sales cálcicas se han identificado en el 36,7% de las litiasis vesiculares²⁰. Suelen demostrarse mediante microscopía electrónica de barrido, fundamentalmente en el núcleo, tanto de los cálculos pigmentarios como de los de colesterol, lo cual sugiere el papel del calcio en la nidación y crecimiento de las litiasis. En ningún caso se detectan formas únicas de carbonato cálcico, como describen García Vázquez et al¹¹ en el 1,4% de su serie. En nuestro caso lo más frecuente fue la asociación en la misma pieza de los tres polimorfos de carbonato cálcico (vaterita, calcita y aragonito). Algunos autores relacionan la formación de carbonato cálcico con la presencia de determinados elementos traza como el manganeso o el magnesio. A este respecto no se encuentra una relación significativa en nuestros resultados. Kleiner et al¹⁶ no destacan la presencia de este elemento en su valoración.

El palmitato cálcico se localiza fundamentalmente en los cálculos pigmentarios. Costilla et al¹² lo detectan en el 20% de los cálculos coledocianos en adultos. La formación de palmitato cálcico se relaciona con la actividad enzimática de las fosfolipasas bacterianas, a partir de la lecitina biliar. El oxalato cálcico, se identifica en un porcentaje relativamente elevado (38%). En nuestro ámbito, y en el adulto, no aparece en ninguna muestra vesicular, aunque sí en el 25% de las coledocianas^{11,12}. Raha et al⁷ afirman la existencia de oxalato cálcico en los cálculos biliares, lo cual es rechazado por Sutor y Woley²¹, que indica que los espaciados del difractograma se han identificado erróneamente, correspondiendo realmente a colesterol hidratado. En nuestro caso se detectaron picos en el difractograma que se relacionan sin ninguna duda con la presencia de este material.

El microanálisis de los elementos que componen los cálculos biliares en la infancia difiere poco de los resultados obtenidos en muestras procedentes de adultos²²⁻²⁹. En general, al igual que sucede en los adultos, el número de elementos encontrados en los cálculos pigmentarios es mayor que en los de colesterol, si bien en nuestra muestra, la escasez de cálculos de colesterol hace que la comparación no tenga un valor real.

Otro dato significativo es que nuestras muestras contienen una mayor peso por gramo de material que el publicado en el adulto. Nuestras cifras son más coincidentes con los resultados de Chen-Guo y Pai-Ching³⁰, aunque este grupo utiliza un espectroscopio de activación de neutrones.

El calcio es el elemento más abundante de nuestros cálculos. Los niveles de calcio varían sin duda de un estudio a otro, pero sin duda es el elemento predominante, ya que forma parte de todas las sales cálcicas tan abundantes en los cálculos biliares. En estudios previos se ha demostrado la elevada concentración de calcio en el núcleo del cálculo, y que ésta va disminuyendo a medida que nos acercamos a la cortical¹⁴. En este caso no pueden valorarse estos resultados en el niño, porque el tamaño de los cálculos no permite diferenciar entre núcleo, zona intermedia y cortical.

El sodio es el segundo elemento en importancia, con una concentración media de 4,3 mg/g. Para algunos autores, éste, junto con el calcio, son factores importantes en la nucleación y formación de los cálculos³¹.

Encontramos hierro y cobre en concentraciones similares a las del manganeso. Se consideran elementos metálicos unidos a la bilirrubina y parecen tener un papel importante en la formación de las zonas negras de los cálculos pigmentarios, sobre todo en la fase de nucleación¹⁹.

En resumen, se confirma el carácter pigmentario de la mayor parte de los cálculos biliares de origen idiopático en el período de la infancia, así como el alto contenido en calcio, algo ya descrito en los adultos. Destaca también la presencia de cantidades apreciables de carbonato cálcico. A nuestro entender, esta valoración de la composición de los cálculos biliares en la infancia, básicamente idiopáticos, puede servir para iniciar futuros estudios que intenten explorar los mecanismos de nucleación y crecimiento de las litiasis.

Agradecimientos

Este proyecto ha sido financiado por la Junta de Andalucía: "Estudio de las calcificaciones de los tejidos blandos". Código CTS-475.

BIBLIOGRAFÍA

1. Palasciano G, Portincasa P. Gallstone prevalence and gallbladder volume in children and adolescents. An epidemiological ultrasonography survey and relationship to body mass index. *Am J Gastroenterol* 1989;84:1378-82.
2. Friesen CA, Roberts CC. Cholelithiasis: Clinical characteristics in children, case analysis and literature review. *Clini Pediatr* 1989;28:294-8.
3. Keller MS, Markle BM, Laffey PA. Spontaneous resolution of cholelithiasis in infants. *Radiology* 1985;157:345-8.
4. Ljung R, Ivarsson S, Nilsson P, Solvig J. Cholelithiasis during the first year of life: A case report and literature review. *Acta Pediatr* 1992;81:69-72.
5. Sutor DJ, Woley SE. A statistical survey of the composition of gallstones in eight countries. *Gut* 1971;12:55-64.

6. Arnaud JP, Aprahamian M, Eloy R, Adolff M. Cristalographie de la lithiasis biliare. *Med Chir Dig* 1979;8:1113-4.
7. Raha PK, Sengupta KP, Aikat B. X-ray diffraction analysis of gallstones. *Indian J Med Res* 1966;54:729-34.
8. Miguel JF, Von Ritter C, Del Pozo R, Lange V, Jüngst D, Paumgartner G. Fibronectin in human gallbladder bile: Cholesterol pronucleating and/or mucin "link" protein? *Am J Physiol* 1994; 267:G393-400.
9. Bruch SW, Ein SH, Rocchi C, Kim PC. The management of non-pigmented gallstones in children. *J Pediatr Surg* 2000;35:729-32.
10. Halpern Z, Vinograd Z, Laufer H, Gilat T, Moskowitz M, Bujanover Y. Characteristics of gallbladder bile of infants and children. *J Pediatr Gastroenterol* 1996;23:147-50.
11. García Vázquez F, Domínguez S, Caballero A, Garrido F. Estructura y composición de los cálculos biliares. *Cir Esp* 1989;55: 404-10.
12. Costilla L, Gutiérrez A, Garrido GMF, Caballero A, Garrido F. Coledocolitiasis. Estructura y composición de los cálculos. *Cir Esp* 1993;53:263-7.
13. Gutiérrez A, Costilla L, Garrido GMF, Caballero A, Garrido F. Microestructura y composición de los cálculos salivares. *Cir Esp* 1995;57:216-21.
14. Reguera R, Costilla L, Garrido MSF, Jiménez R, Garrido F. Microanálisis de la litiasis biliar. *Cir Esp* 1999;65:314-8.
15. Garrido MSF, Jesús I, Costilla L, Gutiérrez A, Reguera R, Garrido F. Colecistitis y litiasis biliar. *Cir Andal* 1997;8:423-6.
16. Kleiner O, Armes J, Huleihel M, Cohen B, Kantarovich K, Levi C, et al. A comparative study of gallstones from children and adults using FTIR spectroscopy and fluorescence microscopy. *BMC Gastroenterol* 2002;2:3.
17. Ruibal JL, Aleo E, Álvarez A, Piñero E, Gómez R. Colelitis en la infancia. Análisis de 24 pacientes y revisión de 123 casos publicados en España. *An Esp Pediatr* 2001;54:120-5.
18. Kauffman HS, Magnuson TH, Pitt HA, Frasca P, Lillmoe KD. The distribution of calcium salts precipitates in the core, periphery and shell of cholesterol, black pigment and brown pigment gallstones. *Hepatology* 1994;19:1124-32.
19. Klin B, Boldur PhD, Halevy A, Barr J, Vinograd I. Bacteriology of cholelithiasis in infants and children. *Surg Laparoscopy & Endoscopy* 1997;7:137-9.
20. Ruiz de Aguiar A, Leguey S, López Domingo MI, Medina JA, De Andrés RM, Arias A. Microestructura de los cálculos biliares. *N Arch Fac Med* 1983;41:39-42.
21. Sutor DJ, Woley SE. Gallstones of unusual composition: Calcite, aragonite and vaterite. *Science* 1969;159:1113-4.
22. Wu JG, Zhou XS, Xu Z, Shen T, Xu YZ, Li WH, et al. A spectroscopic investigation of the formation mechanism of pigment gallstones. *Biospectroscopy* 1997;3:381-91.
23. Zhou XS, Shen GR, Wu JG, Li WH, Xu YZ, Weng SF, et al. A spectroscopic study of pigment gallstones in China. *Biospectroscopy* 1997;3:371-80.
24. Rajgopal S, Kartha B, Prasad GE, Mathur SK. Trace elements in biliary calculi. *Indian J Gastroenterol* 1988;7:15-7.
25. Yamamoto I, Itoh M, Narimatsu S, Sukusi N, Demura R, Kotani N, et al. Determination of metal content in three types of human gallstones. *Bull Enviorm Contam Toxicol* 1989;42:1-8.
26. Been JM, Bills PM, Lewis D. Electron probe microanalysis in the study of gallstones. *Gut* 1977;18:836-42.
27. Al-kinani AT, Harris IA, Watt DE. Analysis of minor and trace elements in gallstones by induction of characteristic ionising radiation. *Phys Med Biol* 1984;2:175-84.
28. Harifah BA, Jaya R, Cheng J. Determination of trace elements in gallstones by neutron activation analysis. *J Fiz Mal* 1988;9: 98-102.
29. Paluszkiwicz C, Kwiatek WM, Galka M, Sobieraj D, Wentrup-Byrne D. FT-Raman, FT-IR spectroscopy and PIXE analysis applied to gallstones specimens. *Cell Mol Biol* 1998;44: 65-73.
30. Chen-Guo K, Pai-Ching S. Ultraestructura and electron microanalysis at the core of human gallstones III: Black stones. *Kaohsiung J Med* 1986;2:201-11.
31. Tera H. Stratification of human gallbladder bile *in vivo*. *Acta Chir Scand* 1960;256:4-85.