

Toxicidad de la bilirrubina para los hematíes humanos: una visión más sanguínea

En 1962, Watson observó que en la sangre de recién nacidos con ictericia una pequeña fracción de la bilirrubina se asociaba con los hematíes¹. Unos pocos años más tarde, Wan Ho Cheung et al² revelaron que, cuando se incubaban con bilirrubina en la solución amortiguadora, en particular a concentraciones $> 340 \mu\text{M}$ (20 mg/dl), los hematíes experimentaban cambios dependientes del tiempo y la concentración en la morfología y metabolismo, con una hemólisis final. (Retrospectivamente, parece muy probable que las soluciones de bilirrubina a las que se expusieron las células estuvieran sobresaturadas y hubieran contenido formas agregadas de bilirrubina³⁻⁷.) Los cambios morfológicos inducidos por la bilirrubina se ilustraron con fotografías sorprendentes similares a las publicadas unos 30 años más tarde por otros^{8,9}, sin una referencia a la investigación previa. Fueron reversibles mediante la adición de albúmina sérica al medio de incubación y no se produjeron cuando esta proteína estuvo presente desde el principio en el medio. Más tarde, Brito et al han confirmado y extendido estas observaciones y recientemente han revisado la toxicidad de este pigmento para los hematíes¹⁰ (una vez más, sin hacer alusión a la investigación previa fundamental). Para el neonatólogo, un problema importante es si la hemólisis inducida por bilirrubina es clínicamente sustancial en la ictericia neonatal o en otras hiperbilirrubinemias no conjugadas. La revisión implica que lo es¹⁰. Sin embargo, disponemos de un número abundante de pruebas de que no es así:

1. Las ratas Gunn y los pacientes con síndrome grave de Crigler-Najjar presentan una hiperbilirrubinemia no conjugada de por vida, aunque no una hemólisis anómala. De hecho, originalmente el trastorno en el ser humano se describió como una "ictericia no hemolítica"¹¹ y se ha mencionado que, a pesar de una exposición prolongada a concentraciones plasmáticas altas de bilirrubina, en los pacientes no se identificó una morfología anómala de los hematíes, reticulocitosis u otras pruebas de hemólisis¹²⁻¹⁴. En las comparaciones entre ratas sin y con ictericia y portadoras de bilirrubinemia no conjugada congénita (ratas Gunn) no se demostraron diferencias en los valores del hematocrito en los machos y sólo valores ligeramente más bajos en las hembras¹⁵. No se detectaron diferencias en la fragilidad osmótica de los hematíes de animales con y sin ictericia. Si produce algún efecto, la bilirrubina es protectora^{15,16}.

2. Puesto que la hemólisis da lugar a una mayor formación de bilirrubina, sería de esperar que, si la inducida por bilirrubina es significativa¹⁰, sus concentraciones en ratas Gunn y en pacientes con síndrome de Crigler-

Najjar aumentarían a un ritmo constante con el tiempo pero este aumento no se ha observado.

3. Por lo que respecta a las pruebas de un efecto tóxico de la bilirrubina sobre los hematíes en lactantes con ictericia, Brito et al mencionan una mayor proporción de hematíes de morfología anómala en aquellos comparado con recién nacidos "sanos"^{10,17}. Sin embargo, en dicho estudio la sangre "sana" era umbilical, mientras que la sangre con ictericia era sangre venosa obtenida 2-4 días después de nacer, lo que hace que la comparación sea cuestionable. Además, la asociación entre ictericia y aumento del número de células anormales no implica necesariamente que lo primero diera lugar a lo segundo. Brown et al observaron hematíes de morfología anormal, picnócitos en sangre neonatal, pero no identificaron una asociación entre su número y las concentraciones de bilirrubina^{18,19}. Cuando expusieron los hematíes adultos al suero de un lactante con ictericia grave y picnócitosis, no observaron cambios de la morfología, lo que sugirió que la picnócitosis original no se debió a la bilirrubina¹⁹.

La picnócitosis se ha observado sobre todo en lactantes con ictericia y la mayor parte de autores han llegado a la conclusión de que se debe a un factor o factores extracelulares endógenos de la sangre²⁰⁻²⁶. Sin embargo, las investigaciones no han implicado claramente la bilirrubina como factor. Sigue siendo una pregunta sin respuesta si ésta es la causa o el resultado final de la picnócitosis, o incluso ambos.

4. Vest y Grieder no encontraron una relación entre la concentración de bilirrubina y la tasa de destrucción de hematíes en recién nacidos o que la hiperbilirrubinemia prolongada se correlacionara con una menor supervivencia de los hematíes²⁷. Estas observaciones coinciden con los datos previos que también han indicado que la bilirrubina plasmática no es responsable de la fragilidad mecánica de los hematíes del lactante^{28,29}.

5. En el pasado la inyección intravenosa de bilirrubina no conjugada se usaba ampliamente como prueba de función hepática y en muchos estudios experimentales se ha inyectado a lactantes y adultos sin observarse una hemólisis destacada³⁰⁻³³.

La hipótesis de que la bilirrubina induciría hemólisis de los hematíes se basa sobre todo en los estudios sobre su citotoxicidad *in vitro*. En la mayor parte de estos estudios, el pigmento se presentó a las células como una solución en un neutralizador o medios de cultivo en presencia o ausencia de albúmina u otras proteínas. Puesto que la bilirrubina cristalina no se disuelve en estos solventes, invariablemente las soluciones se producen añan-

diendo una solución concentrada de bilirrubina a un pH alcalino fuerte ~ 13 (o en ocasiones en dimetilsulfóxido [DMSO] o etanolamina) al medio, con frecuencia seguido de una neutralización con un ácido fuerte. En general, se supone que la estructura y propiedades de la bilirrubina en las soluciones finales son idénticas a las de la bilirrubina presentada a los hematíes u otras células *in vivo*. Sin embargo, esta asunción no siempre es válida debido a su capacidad para formar complejos con la albúmina de diferente estequiometría y estereoquímica; a su labilidad conformacional y a su capacidad para formar complejos unidos al hidrógeno; y a su tendencia bien conocida a agregarse³⁴⁻³⁶. De casi todos los estudios *in vitro* sobre toxicidad de la bilirrubina faltan datos sobre la estructura, molecularidad y estabilidad de la bilirrubina en los medios usados, tanto en presencia como en ausencia de células. La mayor parte de estudios donde se han observado efectos tóxicos significativos, incluidos los que han usado agentes de desplazamiento, se emprendieron en condiciones no fisiológicas en las que habría estado presente bilirrubina. Sin embargo, no disponemos de pruebas de la presencia de agregados de bilirrubina en los hematíes o en el plasma de recién nacidos o de pacientes con síndrome de Crigler-Najjar, incluso con concentraciones altas de bilirrubina, y hay pruebas de que es muy improbable que ocurra^{34,35}. La sorprendente lesión de los hematíes inducida por bilirrubina y representada en la figura 1 de una revisión reciente¹⁰ llega a ser menos considerable desde un punto de vista clínico cuando se reconoce que se obtuvo por la exposición de las células a concentraciones de bilirrubina cuyos órdenes de magnitud eran mayores que las de bilirrubina libre a la que se exponen los hematíes en lactantes con ictericia. Ni habría ocurrido si en el medio hubieran estado presentes concentraciones fisiológicas de bilirrubina². Además, puesto que las soluciones acuosas de bilirrubina a las que se expusieron los hematíes tuvieron más probabilidades de estar sobresaturadas, su mezcla con las células podría haber multiplicado la nucleación, agregación y precipitación del pigmento originando mezclas multifásicas no fisiológicas^{3,4,6,37}. En sangre completa se han efectuado pocos estudios sobre los efectos tóxicos de la bilirrubina sobre los hematíes. Algunos se han emprendido con hematíes lavados reconstituidos hasta un hematocrito del 10%. En dichos estudios no parece haberse reconocido que la carga total de bilirrubina presentada a las células para la misma concentración plasmática de bilirrubina sea mucho mayor con un hematocrito del 10% que con el normal de ~ 45%. Petrich et al describieron que la bilirrubina añadida a la sangre heparinizada de un adulto a una concentración de sólo 70-80 µM (~ 4-5 mg/dl) indujo hemólisis después de 4 h a 37 °C³⁸. Sin embargo, esta observación aislada no coincide con otras efectuadas en hematíes *in vitro* en los que no se identificó hemólisis con concentraciones incluso más altas de bilirrubina en presencia de albúmina sérica^{2,8}. En estos estudios sólo se utilizaron hematíes de un adulto, y no se verificó la posible interferencia de la bilirrubina en el método espectroscópico usado para estimar la hemólisis³⁸, un fenómeno documentado por Watson¹.

De las pruebas clínicas e *in vitro* publicadas, con la excepción del artículo mencionado previamente³⁸, es difícil negar la conclusión de que la hemólisis inducida por bili-

rubina es insignificante *in vivo* incluso con concentraciones plasmáticas del pigmento asociadas a querníctero o con concentraciones mayores que con las que se considera forzosa una intervención terapéutica. Incluso se dispone de pruebas de que la bilirrubina refuerza la membrana de los hematíes y los protege frente a la lesión oxidativa que podría dar lugar a una hemólisis^{8,15,16,39}. Naturalmente, es difícil sustanciar una negativa. La documentación de la hemólisis de carácter leve en recién nacidos es compleja, e incluso un grado insignificante de hemólisis, insuficiente para producir un efecto sustancial sobre las determinaciones del hematocrito, podría aumentar de manera destacada la reserva de bilirrubina circulante⁴⁰⁻⁴². Necheles et al y, más recientemente, Maisels y Kring han demostrado que el aumento del catabolismo del hem es importante en el desarrollo de la hiperbilirrubinemia en lactantes sanos en los 5 primeros días después del nacimiento^{41,43}. La causa es desconocida y merece una investigación adicional, pero sería prematuro atribuirlo a la hemólisis inducida por bilirrubina.

Sin duda, la hipótesis de que la unión de la bilirrubina predispondría a la hemólisis o fagocitosis de los hematíes de recién nacidos es verosímil y parece respaldada por algunos estudios *in vitro*¹⁰. Incuestionablemente la bilirrubina puede separarse en las membranas celulares, modificando sus propiedades. No obstante, las extrapolaciones precipitadas a partir de los estudios *in vitro* a la vida real han enturbiado previamente las aguas del metabolismo de la bilirrubina; dando lugar, por ejemplo, a sugerencias de que su fotodegradación es la vía más importante en la fototerapia y que la fotohemólisis sería un efecto adverso sustancial del tratamiento, sugerencias que hoy día se consideran incorrectas^{44,45}. Parece haber pasado desapercibido que la bilirrubina tiene las características de un inhibidor promiscuo⁴⁶⁻⁴⁸. Los inhibidores promiscuos son moléculas que dan lugar a falsos positivos en el cribado de alto rendimiento de los fármacos potenciales *in vitro*. Al igual que la bilirrubina, en general, los inhibidores promiscuos son moléculas hidrófobas con una tendencia a agregarse, y muchas veces la agregación es la causa de la inhibición *in vitro* promiscua, no fisiológica. Aunque los efectos tóxicos de este pigmento sobre los hematíes y otras células *in vitro* puedan ser interesantes desde un punto de vista científico con respecto a sus propiedades químicas y los efectos inespecíficos de las moléculas lipofílicas y agregadas sobre las membranas, se requieren pruebas más potentes que las presentadas recientemente¹⁰ o las disponibles en la actualidad para respaldar la hipótesis de que la lesión de los hematíes inducida por bilirrubina es suficiente alguna vez para suscitar preocupación clínica.

AGRADECIMIENTOS

Financiado con la beca DK-26307 (AFM) de los National Institutes of Health.

ANTONY F. McDONAGH, PhD
Division of Gastroenterology and the Liver Center, University of California, San Francisco, California, Estados Unidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Watson D. The absorption of bilirubin by erythrocytes. Clin Chim Acta. 1962;7:733-4.

2. Cheung WH, Sawitsky A, Isenberg HD. The effect of bilirubin on the mammalian erythrocyte. *Transfusion*. 1966;6:475-86.
3. Bratlid D. The effect of pH on bilirubin binding by human erythrocytes. *Scand J Clin Lab Invest*. 1972;29:453-9.
4. Brodersen R. Supersaturation with bilirubin followed by colloid formation and disposition, with a hypothesis on the etiology of kernicterus. *Scand J Clin Lab Invest*. 1972;29:447-52.
5. Brodersen R. Aqueous solubility, albumin binding, and tissue distribution of bilirubin. En: Ostrow JD, editor. *Bile pigments and jaundice*. Nueva York, NY: Marcel Dekker, Inc; 1986. p. 157-81.
6. Brodersen R, Stern L. Aggregation of bilirubin in injectates and incubation media: its significance in experimental studies of CNS toxicity. *Neuropediatrics*. 1987;18:34-6.
7. Brodersen R, Theilgaard J. Bilirubin colloid formation in neutral aqueous solution. *Scand J Clin Lab Invest*. 1969;24:395-8.
8. Brites D, Silva R, Brito A. Effect of bilirubin on erythrocyte shape and haemolysis, under hypotonic, aggregating or nonaggregating conditions, and correlation with cell age. *Scand J Clin Lab Invest*. 1997;57:337-49.
9. Brito MA, Silva R, Tiribelli C, Brites D. Assessment of bilirubin toxicity to erythrocytes: implication in neonatal jaundice management. *Eur J Clin Invest*. 2000;30:239-47.
10. Brito MA, Silva RFM, Brites D. Bilirubin toxicity to human erythrocytes: a review. *Clin Chim Acta*. 2006;374:46-56.
11. Crigler JF Jr, Najjar VA. Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus. *Pediatrics*. 1952;10:169-80.
12. Arias IM. Chronic unconjugated hyperbilirubinemia without overt signs of hemolysis in adolescents and adults. *J Clin Invest*. 1962;41:2233-45.
13. Martin HP, Black O, Vanleeuwen G. Congenital nonhemolytic icterus: report of a case. *Am J Dis Child*. 1964;107:195-7.
14. Sugar P. Familial nonhemolytic jaundice. *Arch Intern Med*. 1961;108:121-7.
15. Luzzio BB, McDonald TP, Lange RD, Cawein MJ, Chernoff AI. Splenomegaly and haematologic disorders of the Gunn rat. *Br J Haematol*. 1970;19:543-54.
16. Malloy HT, Lowenstein L. Hereditary jaundice in the rat. *Can Med Assoc J*. 1940;42:122-5.
17. Brito MA, Silva RM, Matos DC, Da Silva AT, Brites DT. Alterations of erythrocyte morphology and lipid composition by hyperbilirubinemia. *Clin Chim Acta*. 1996;249:149-65.
18. Brown AK. Peculiarities of erythrocytes of the newborn. En: Sass-Kortsák A, editor. *Kernicterus*. Toronto, Ontario, Canadá: University of Toronto Press; 1961. p. 54-61.
19. Tuffy P, Brown AK, Zuelzer WW. Infantile pyknotocytosis: a common erythrocyte abnormality of the first trimester. *AMA J Dis Child*. 1959;98:227-41.
20. Zannos-Mariolela L, Kattamis C, Paidoucis M. Infantile pyknotocytosis and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Br J Haematol*. 1962;8:258-65.
21. Keimowitz R, Desforges JF. Infantile pyknotocytosis. *N Engl J Med*. 1965;273:1152-4.
22. Ackerman BD. Infantile pyknotocytosis in Mexican-American infants. *Am J Dis Child*. 1969;117:417-23.
23. Carpentieri U, Gustavson LP, Haggard ME. Pyknotocytosis in a neonate: an unusual presentation of hereditary elliptocytosis. *Clin Pediatr (Phila)*. 1977;16:76-8.
24. Maxwell DJ, Seshadri R, Rumpf DJ, Miller JM. Infantile pyknotocytosis: a cause of intrauterine haemolysis in 2 siblings. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 1983;23:182-5.
25. Dabbous IA, El Bahlawan L. Infantile pyknotocytosis: a forgotten or a dead diagnosis? *J Pediatr Hematol Oncol*. 2002;24:507.
26. Eyssette-Guerreau S, Bader-Meunier B, Garçon L, Guitton C, Cynober T. Infantile pyknotocytosis: a cause of haemolytic anaemia of the newborn. *Br J Haematol*. 2006;133:439-42.
27. Vest MF, Grieder HR. Erythrocyte survival in the newborn infant, as measured by chromium 51 and its relation to the postnatal serum bilirubin level. *J Pediatr*. 1961;59:194-9.
28. Hsia DY, Goldbloom RB, Gellis SS. Studies on the relation of mechanical fragility of erythrocytes to physiological jaundice. *AMA Am J Dis Child*. 1953;86:505-9.
29. Hsia DY, Goldbloom RB, Gellis SS. Studies of the mechanical fragility of erythrocytes. II. Relation to physiological jaundice of the newborn infant. *Pediatrics*. 1954;13:24-9.
30. Lin H, Eastman NJ. The behavior of intravenously injected bilirubin in newborn infants. *Am J Obstet Gynecol*. 1937;33:317-23.
31. Thompson HE, Wyatt BL. Experimentally induced jaundice (hyperbilirubinemia). *Arch Int Med*. 1938;61:481-95.
32. Weech AA, Vann D, Grillo RA. The clearance of bilirubin from the plasma: a measure of the excreting power of the liver. *J Clin Invest*. 1941;20:323-32.
33. Kornberg A. Latent liver disease in persons recovered from catarrhal jaundice and in otherwise normal medical students as revealed by the bilirubin excretion test. *J Clin Invest*. 1942;21:299-308.
34. Blaha G, Siam M, Lehner H. A circular dichroism (CD) study of the consecutive binding of serum albumin to bilirubin: possible implications for the bilirubin level. *J Chem Soc Perkin Trans 2*. 1997;2119-24.
35. Siam M, Blaha G, Lehner H. Maximum binding capacity of serum albumin for bilirubin is one, as revealed by circular dichroism. *J Chem Soc Perkin Trans 2*. 1998;853-6.
36. Boiadjev SE, Watters K, Wolf S, et al. pK_a and aggregation of bilirubin: titrimetric and ultracentrifugation studies on water-soluble pegylated conjugates of bilirubin and fatty acids. *Biochemistry*. 2004;43:15617-32.
37. Brodersen R. Physical chemistry of bilirubin: binding to macromolecules and membranes. En: Heirwegh KPM, Brown SB, editores. *Bilirubin*. Boca Raton, FA: CRC Press, Inc; 1982. p. 75-123.
38. Petrich C, Krieg W, Voss HV, Göbel U. Effects of bilirubin on red cell metabolism. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1977;15:77-80.
39. Mireles LC, Lum MA, Dennery PA. Antioxidant and cytotoxic effects of bilirubin on neonatal erythrocytes. *Pediatr Res*. 1999;45:355-62.
40. Brown AK. Bilirubin metabolism with special reference to neonatal jaundice. *Adv Pediatr*. 1962;12:121-87.
41. Maisels MJ, Kring E. The contribution of hemolysis to early jaundice in normal newborns. *Pediatrics*. 2006;118:276-9.
42. Zuelzer W. Introduction. En: Sass-Kortsák A, editor. *Kernicterus*. Toronto, Ontario, Canadá: University of Toronto Press; 1961. p. 39-40.
43. Necheles TF, Rai US, Valaes T. The role of haemolysis in neonatal hyperbilirubinaemia as reflected in carboxyhaemoglobin levels. *Acta Paediatr Scand*. 1976;65:361-7.
44. Lightner DA, McDonagh AF. Molecular mechanisms of phototherapy for neonatal jaundice. *Acc Chem Res*. 1984;17:417-24.45. Maisels MJ, Kring EA. Does intensive phototherapy produce hemolysis in newborns of 35 or more weeks gestation? *J Perinatol*. 2006;26:498-500.
46. Feng BY, Shelat A, Doman TN, Guy RK, Shoichet BK. Highthroughput assays for promiscuous inhibitors. *Nat Chem Biol*. 2005;1:146-8.
47. McGovern SL, Caselli E, Grigorieff N, Shoichet BK. A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *J Med Chem*. 2002;45:1712-22.
48. Seidler J, McGovern SL, Doman TN, Shoichet BK. Identification and prediction of promiscuous aggregating inhibitors among known drugs. *J Med Chem*. 2003;46:4477-86.