

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Ex uno plures: la oculta complejidad de las especies de bilirrubina en las muestras sanguíneas neonatales

Anthony F. McDonagh, PhD

Para el tratamiento de los recién nacidos con ictericia neonatal los neonatólogos clínicos confían en gran medida, pero no exclusivamente, en las mediciones de bilirrubina. Las concentraciones específicas de bilirrubina también pueden tener una importancia crucial en las consideraciones medicolegales sobre la encefalopatía bilirrubínica y la ictericia nuclear. En este contexto, la bilirrubina se refiere específicamente a la forma biosintética no conjugada y potencialmente tóxica del pigmento, denominada por los químicos de forma casi incomprendible 4Z, 15Z-bilirrubina IX α .

Las concentraciones de bilirrubina pueden ser estimadas por técnicas transcutáneas, aunque es más habitual la medición por el análisis de la sangre, el suero o el plasma. Estos análisis pueden consistir en la espectrofotometría directa del suero o de la sangre total lisada, o en métodos menos directos en los que las muestras se tratan con un reactivo denominado diazo para convertir la bilirrubina en derivados coloreados que luego se miden espectrofotométricamente. Los métodos diazo son de dos tipos: los realizados por completo en una solución homogénea y aquellos en que los reactivos se encuentran en una matriz sólida a través de la cual se filtran la muestra y otros reactivos. Los métodos suelen estar normalizados por referencia al patrón de bilirrubina del National Bureau of Standards (NBS). De forma bastante extraña, el material del NBS no es puro, sino que contiene, además de la forma natural de bilirrubina, una escasa proporción de dos formas no naturales (bilirrubina III α y bilirrubina XIII α) que se generan durante su aislamiento a partir de la bilis animal o los cálculos biliares (fig. 1, *cuadro*). Afortunadamente, estas impurezas, que tienen propiedades similares a la bilirrubina, no parecen producir errores significativos en las mediciones clínicas de la bilirrubina no conjugada.

Pese a la plétora de métodos, las mediciones de bilirrubina se han considerado poco fiables¹⁻⁵. La escasa satisfacción con su exactitud y reproducibilidad ha engendrado numerosos estudios y una voluminosa bibliografía. Recientes investigaciones indican que la exactitud y la consistencia de la mayoría de los métodos ampliamente utilizados son aceptables, especialmente en las muestras que sólo contienen bilirrubina no conju-

gada^{6,7}. Sin embargo, estos estudios comparativos han sido realizados principalmente mediante patrones elaborados por la adición de bilirrubina al suero, en lugar de con muestras reales.

Un jefe de Neonatología me consultó hace poco sobre ocasionales y desconcertantes discrepancias en sus mediciones de bilirrubina. Su unidad había cambiado recientemente de un método diazo "húmedo" a mediciones espectrofotométricas directas realizadas en un analizador de gases sanguíneos por el menor tiempo de obtención de resultados. Antes del cambio, los estudios comparativos habían demostrado una buena correlación entre los dos métodos, aunque luego algunos casos curiosos habían demostrado discrepancias de hasta 90 μ M (5 mg %). La fig. 1A muestra el análisis por cromatografía líquida de gran rendimiento (HPLC) de una de esas muestras, correspondiente a un recién nacido sometido a exanguinotransfusión y fototerapia. Bajo ella (fig. 1B) se muestra, para comparación, un análisis similar de mi suero, bastante más senil que neonatal, pero que muestra principalmente un pico amarillo principal correspondiente a bilirrubina no conjugada. En principio, es de esperar que un niño con ictericia neonatal pura no complicada por enfermedad colestásica muestre un perfil similar, con un solo pico de bilirrubina, pero más intenso. Entonces, ¿qué son los demás picos (1-4) de la muestra del paciente?

Los numerosos picos de la fig. 1A son distintas formas isoméricas de bilirrubina no conjugada^{8,9}. Es decir, comparten la misma constitución, pero tienen distintas disposiciones espaciales de los átomos y diferentes propiedades. El pico principal (pico 5) es el isómero biosintético natural y los demás picos, que en este caso alcanzan el 27% de la bilirrubina no conjugada presente, son bilirrubinas isoméricas producidas durante la fototerapia. Estos isómeros no se forman sólo durante la fototerapia, sino también, aunque en menor medida, durante la exposición normal de los recién nacidos a la luz ambiental (fig. 1C). La breve exposición accidental de las muestras sanguíneas a la luz también puede desembocar en su formación. En ausencia de estudios detallados, no sabemos si la complejidad de las especies de bilirrubina de la muestra de la fig. 1A fue responsable de los valores discordantes (182 μ M y 148 μ M, respectivamente) obtenidos con los métodos de gases sanguíneos y diazo en la misma muestra, aunque es probable que hayan desempeñado un papel.

Division of Gastroenterology and the Liver Center, University of California, San Francisco, California, Estados Unidos.

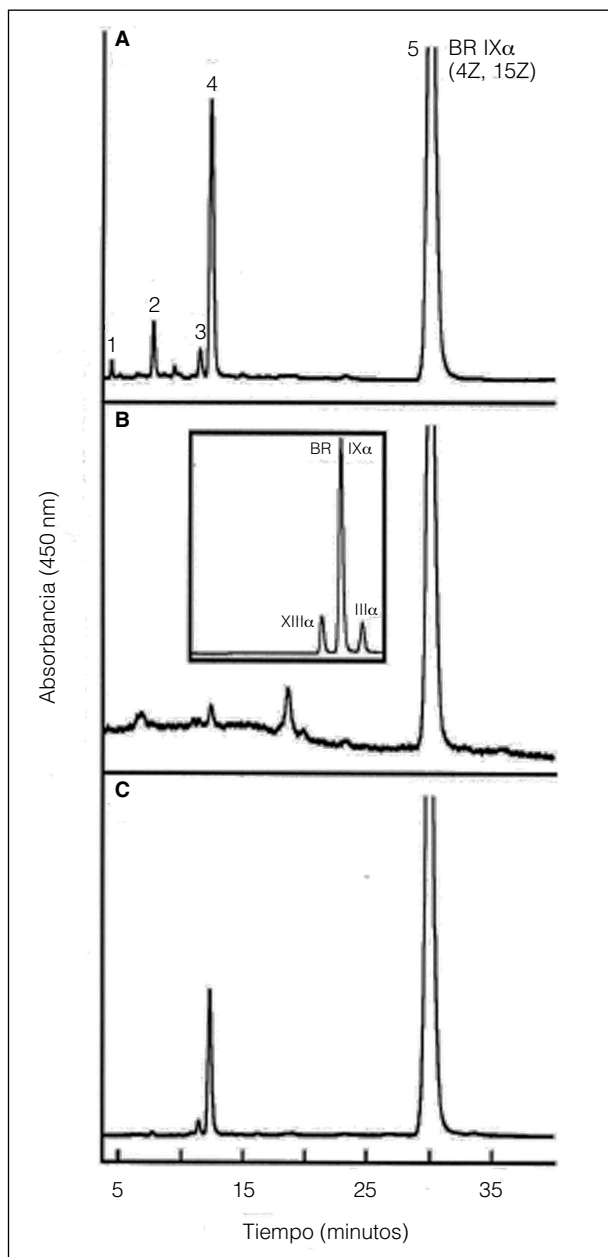


Fig. 1. Cromatografía líquida de gran rendimiento de suero de: A) recién nacido tras exanguinotransfusión y fototerapia. Todos los picos numerados corresponden a isómeros de la bilirrubina no conjugada. Los picos 1-4 son isómeros de la bilirrubina formada durante la fototerapia y el pico 5 es el isómero biosintético normal de la bilirrubina. Véase que las alturas o las áreas de los picos no reflejan con exactitud las cantidades relativas de cada isómero, porque los cinco isómeros no tienen los mismos coeficientes de absorción molar a 450 nm. Las proporciones reales de los picos 1, 2 y 4 son mayores que lo que parece en la cromatografía. Los isómeros 1-4 constituyen ~27% del total de la bilirrubina no conjugada. B) Voluntario adulto sano. El pico cercano a 18 mm es hemo. C) Recién nacido con ictericia neonatal no sometido a fototerapia. El cuadro muestra la cromatografía del patrón de referencia bilirrubina del National Bureau of Standards. (Todas las cromatografías fueron normalizadas a la misma altura del pico 5, 4Z, 15Z-bilirrubina IX α . Columna, C-18 fase inversa; disolvente di-n-octilamina acetato 0,1 M en metanol con un 8% de agua; flujo 0,75 ml/minuto; detección a 450 nm.)

La potencial complejidad de las bilirrubinas no conjugadas en la sangre de los neonatos, demostrada en la fig. 1A, se conoce de antiguo, aunque no suele ser estimada. En general ha sido ignorada u omitida por los fabricantes de instrumentos analíticos y en los estudios comparativos de los distintos métodos. En las cromatografías mostradas en la fig. 1, los isómeros eluyen en orden inverso a su lipofilia. El isómero biosintético normal de la bilirrubina (pico 5, fig. 1A) es el más lipófilo, mientras que los demás son relativamente hidrófilos. Sobre esta base, quizá débil, se ha asumido que tienen menos probabilidades de ser captadas por el cerebro y posiblemente sean menos tóxicas que el isómero biosintético. De ser cierto, la concentración de bilirrubina más importante para el clínico es la del isómero biosintético aislado (pico 5 de la fig. 1A). Desgraciadamente, los actuales métodos clínicos de medición de la bilirrubina son incapaces de determinar específicamente esta fracción y no es seguro hasta qué punto los distintos métodos incluyen o excluyen a los isómeros en sus estimaciones de la bilirrubina total. Incluso la HPLC, a menudo proclamada como el patrón oro en la medición de la bilirrubina, puede omitir la presencia de isómeros si las condiciones cromatográficas no son idóneas.

Aunque estos recónditos detalles de la bilirrubinología pueden ser de escaso interés para el clínico atareado, debemos reconocer que la cifra ofrecida por el laboratorio clínico puede ocultar la complejidad real de las especies de bilirrubina presentes y no constituir una medición exacta del valor realmente necesario. Afortunadamente, la mayoría de las actuales mediciones de bilirrubina en los recién nacidos cometidos a fototerapia constituyen probablemente sobrevaloraciones, y no infravaloraciones, de la verdadera concentración del isómero más tóxico de la bilirrubina, lo que provoca un sobretratamiento en vez de lo contrario. En cualquier caso, deberíamos recordar que la rápida conversión de la bilirrubina a los isómeros presumiblemente menos tóxicos empieza en cuanto se inicia la fototerapia y mucho antes que cualquier declinación de la aparente concentración de bilirrubina en la circulación.

Excepto una diminuta fracción, prácticamente toda la bilirrubina circulante forma un complejo con la albúmina sérica. La concentración de esta fracción no ligada a la albúmina ha sido propuesta como mejor factor de predicción del riesgo de ictericia nuclear que la concentración total de bilirrubina, propuesta que goza de cierto apoyo experimental¹⁰. La multiplicidad de las especies de bilirrubina, evidente en las figs. 1A y 1C, indica que puede ser difícil medir selectivamente sólo la fracción no ligada del tipo no isomerizado ni conjugado de la bilirrubina en algunas muestras clínicas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco los útiles comentarios de M.J. Daood y de los Dres. T.W.R. Hansen, D.A. Lightner, M.J. Maisels y J.F. Watchko, así como el apoyo de los National Institutes of Health (DK-26307, DK-26743).

BIBLIOGRAFÍA

1. Mather A. Reliability of bilirubin determinations in icterus of the newborn infant. *Pediatrics*. 1960;26:350-4.
2. Watkinson LR, St John A, Penberthy LA. Investigation into paediatric bilirubin analyses in Australia and New Zealand. *J Clin Pathol*. 1982;35:52-8.

3. Dumas BT, Eckfeldt JH. Errors in measurement of total bilirubin: a perennial problem. *Clin Chem.* 1996;42:845-8.
4. Apperloo JJ, Van der Graaf F, Scharnhorst V, Vader HL. Do we measure bilirubin correctly anno 2005? *Clin Chem Lab Med.* 2005;43:531-5.
5. Vreman HJ, Verter J, Oh W, et al. Interlaboratory variability of bilirubin measurements. *Clin Chem.* 1996;42:869-73.
6. Lo SF, Dumas BT, Ashwood ER. Performance of bilirubin determinations in US laboratories – revisited. *Clin Chem.* 2004;50:190-4.
7. Lo SF, Dumas BT, Ashwood ER. Bilirubin proficiency testing using specimens containing unconjugated bilirubin and human serum: results of a College of American Pathologists study. *Arch Pathol Lab Med.* 2004;128:1219-23.
8. Lightner DA, McDonagh AF. Molecular mechanisms of phototherapy for neonatal jaundice. *Acc Chem Res.* 1984; 17:417-24.
9. Ennever JF. Phototherapy for neonatal jaundice. En: Polin RA, Fox WW, editores. *Fetal and neonatal physiology.* 2.^a ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1998. p. 1505-14.
10. Wennberg RP, Ahlfors CE, Bhutani VK, Johnson LH, Shapiro SM. Toward understanding kernicterus: a challenge to improve the management of jaundiced newborns [revision en *Pediatrics.* 2006;117:1467]. *Pediatrics.* 2005;117:474-527.