

Hiperbilirrubinemia no Hemolítica Congénita

Drs. Víctor Casanueva E.¹, Oscar Marín S.², Carlos Calvo M.³,
Ximena Cid C.⁴, Mónica Muñoz O.¹.

Congenital Nonhemolytic Hiperbilirubinemia

Two cases of Congenital nonhemolytic hyperbilirubinemia are reported. Enzymatic assays and electronic microscopy confirmed Crigler-Najjar syndrome type I and II respectively. A brief review of Non hemolytic hyperbilirubinemias is done.

A pesar, que el término Ictericia sugiere de inmediato enfermedad hepática o hematológica, existe un grupo de alteraciones específicas y familiares en que la hiperbilirrubinemia es resultado de una alteración de una función altamente especiali-

zada en una de las etapas intrahepáticas de la excreción de la bilirrubina.

El Síndrome de Crigler-Najjar pertenece a este grupo de hiperbilirrubinemia no hemolítica congénita de la cual han sido publicadas hasta este momento no más de 80 casos en la literatura mundial.

Se presentan dos casos de niños con hiperbilirrubinemia no conjugada desde recién nacido, cuya causa constituyó inicialmente un problema diagnóstico.

La actividad de la enzima Uridin-difosfo-gluconil-transferasa (UDPGT) desde una muestra de tejido hepático obtenido por punción percutánea. Para este efecto se separaron los microsomas

¹ Depto. de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción.

² Depto. de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales Universidad de Concepción.

³ Depto. de Bioquímica Aplicada, Facultad de Farmacia Universidad de Concepción.

⁴ Laboratorio Central Hospital Guillermo Grant Benavente de Concepción.

conteniendo la enzima por centrifugación diferencial del homogenizado de hígado en KCL 0,15 M y se incubaron en Tampón Tris 1M, pH 7.6; bilirrubina—albúmina 0.51 mM UDPGA 33,5 mM y $MgCl_2$ 50 mM. La actividad se expresó en μ g de bilirrubina conjugada producida por gramo de tejido en 30 minutos de incubación.

Casos Clínicos

L.J.M.

Nacido el 12 de Diciembre 1980, peso: 2950 gramos al nacer parto de término eutócico. Madre: 39 años, sana, dos hijos nacidos vivos y muertos en período de R.N. con ictericia. Padre: 51 años, sano. Relación parentesco: Abuelo paterno y Abuelo materno eran primos hermanos.

Examen físico normal al nacer. Al tercer día se constató ictericia con bilirrubinemia total de 17.6 mg.% que a los 11 días alcanza a 22,8 mg.%. Se practica recambio sanguíneo con lo cual disminuye a 9 mg.%. Posteriormente persisten valores elevados a expensas siempre de bilirrubina indirecta a pesar de fototerapia mantenida.

Los exámenes de laboratorio descartan procesos hematológicos u otros que expliquen los valores de ésta.

Se inició terapia con fenobarbital a la edad de 3 meses lográndose remisión importante de la bilirrubina sérica.

Se practicó biopsia hepática para estudio de microscopía de luz electrónica¹⁻² y evaluación de actividad de UDP—glucuronil transferasa (UDPGT). El análisis de los cortes semifinos (400 nm) observados con el microscopio de luz no reveló alteraciones. El análisis con el microscopio electrónico muestra cambios estructurales en el hepatocito.

El retículo endoplásmico granuloso (REG) se presenta normal y es posible observar ribosomas adheridos a su superficie.

Los hepatocitos presentan un núcleo grande redondo y central con cromatina muy fina y homogénea y un nucléolo muy bien diferenciado. Otros núcleos eran grandes y regulares y la cromatina más contrastada y formando grumos de diferente densidad (Fig. 1). Había gran desarrollo del retículo endoplásmico liso que ocupaba grandes áreas de citoplasma, formado por una gran cantidad de vesículas de borde redondeado y de tamaño muy parejo, dispuestas muy cerca una de otra dando a esta zona un aspecto reticululado. La mayor parte de ellas sin contenido en su interior (Fig. 2). Estas zonas del REL excluyen todo otro componente citoplasmático. En otras zonas fue posible observar cisternas de REG en estrecha relación con mitocondrias en las cercanías del núcleo (Fig. 1).



Figura 1.

Región de citoplasma de un hepatocito de L.J.M. mostrando extensas zonas ocupadas por retículo endoplásmico liso (REL) se observa además núcleo (N), retículo endoplásmico granuloso (REG) y numerosas mitocondrias, (mi). 9.400 X.

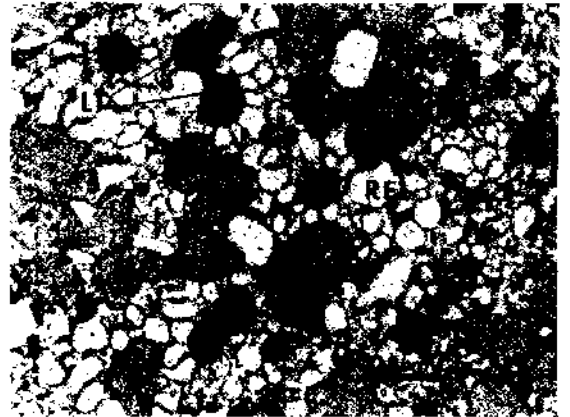


Figura 2.

Hepatocito de L.J.M. se observa el gran desarrollo del retículo endoplásmico liso (REL), además de lisosomas (Li) y mitocondrias (Mi). 23.600 X.

Los bordes de los hepatocitos presentaban canales biliares muy dilatados (Fig. 3), con gran cantidad de microvellosidades en su interior y fue posible apreciar en sus límites presencia de desmosomas.

La medición de la actividad de la enzima UDP—Glucuronil transferasa (UDPGT) mostró un valor de 143 μ g. de bilirrubina conjugada /30 minutos/gramo de tejido hepático. (Valor normal $500 \pm 150 \mu$ g x 30 min. x gr. de tejido).

M.V.G.

Nacido el 7 de Septiembre de 1978, peso: 2860 gramos al nacer. Madre de 16 años, sana, primigesta, embarazo controlado sin problemas salvo

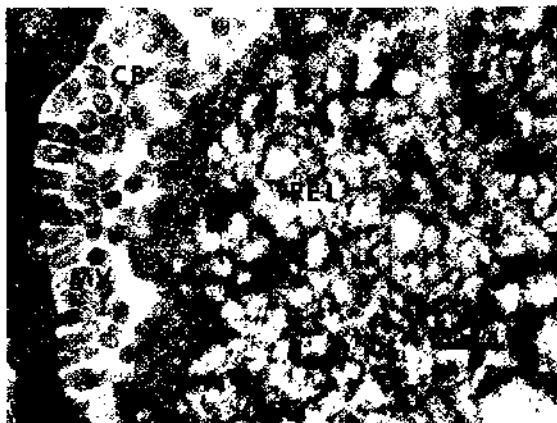


Figura 3.

Borde de un hepatocito de L.J.M. mostrando un canaliculo biliar dilatado (CB) con numerosa microvellosidades (Mv). REL (retículo endoplásmico liso). 28.400 X.

pre-eclampsia leve. Padre de 36 años, antecedentes de colecistitis. Aparentemente sin relación de consanguinidad entre ellos.

El examen físico al nacer era normal, a los 7 días había ictericia en cara, tronco y extremidades, hasta palmas y plantas con valores séricos de 19 mg. % de bilirrubina total.

Hígado 2 cm. bajo el reborde costal, orina clara, deposiciones normales. Examen neurológico normal.

La clínica y el laboratorio descartan proceso hemolítico, obstrucción de la vía biliar u anomalías de la bilirrubina conjugada.

La ictericia se ha mantenido sin remisión hasta su último control, a expensas exclusivamente de bilirrubina libre a pesar de la terapia mantenida con fenobarbital.

Desde la edad de tres años y medio en el examen neurológico existe hipotonía generalizada, reflejos profundos vivos con discreto aumento del área reflexógena y retardo psicomotor importante con edad motora \pm 10 meses y edad psíquica \pm 18 meses.

Se practicó biopsia hepática para estudio en microscopía de luz y electrónica y evaluación de la actividad de UDP-Glucuronil Transferasa (UDPGT).

El análisis de los cortes semifinos (400 nm) observando al microscopio de luz no reveló alteraciones.

El análisis al microscopio electrónico muestra retículo endoplásmico granuloso (REG) normal; adheridos a su superficie, es posible observar ribosomas.

La forma de los hepatocitos se mantiene conservada y presentan un núcleo redondo central y en el citoplasma mitocondrias que ocupan un alto por-

centaje de éste. (Fig. 4). Se observan lisosomas en cantidad normal y algunos gránulos de lipofucsina. El retículo endoplásmico liso (REL) aparece ligeramente hipertrofiado presentando algunas cisternas alargadas pero en su mayoría vesículas de contornos redondeados. Se observan también gránulos de glucógeno distribuidos homogéneamente en todo el citoplasma. En los bordes de los hepatocitos fue posible apreciar canaliculos biliares poco dilatados y con microvellosidades en su interior. (Fig. 4).

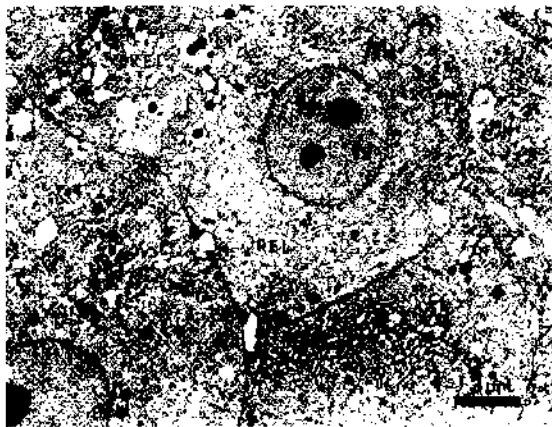


Figura 4.

Hepatocito de M.V.G. Se observa el núcleo redondo y central (N) y numerosas mitocondrias (Mi). Aparecen además nucleolo (Nu), retículo endoplásmico granuloso (REG) y liso (REL), lisosomas (Li) y canaliculos biliares (CB). 4.600 X.

La medición de la actividad de la enzima UDP-Glucuronil Transferasa (UDPGT) mostró un valor de 0 μ g de bilirrubina conjugada/30 minutos/gramo de tejido hepático.

Controles posteriores efectuados en los últimos 2 años de la biopsia de MVG que no han mostrado variaciones con la terapia efectuada.

DISCUSION

En 1952 Crigler y Najjar³ describieron 7 niños en tres familias emparentadas que tenían ictericia severa no hemolítica dentro de los primeros días de vida. La ictericia se caracterizaba por un aumento en la sangre de la bilirrubina No Conjugada y su duración era de por vida.

Solamente 2 de estos niños llegaron a la pubertad sin síntomas neurológicos. Eran primos por partida doble. El varón desarrolló daño neurológico a los 16 años y murió de Kernicterus. La niña se desarrolló normalmente hasta los 20 años que comenzó a presentar convulsiones, disartria.

En ninguno de estos pacientes hubo evidencia de hemólisis o de incompatibilidad de grupos clásicos. El estudio histológico del hígado y las prue-

bas corrientes de función hepática mostraron resultados normales. La bilirrubina plasmática fluctúa entre 17 y 45 mg.% sin bilirrubinuria.

Los pocos sobrevivientes de este síndrome mueren de Kernicterus en la adolescencia tardía a pesar del empleo de medidas como plasmaféresis, exsanguíneo transfusión y fototerapia. No tienen explicación los casos de 50 años sin Kernicterus⁵.

Arias⁴ diferencia varias alteraciones en que la conjugación está defectuosa o inhibida. Entre ellas el Crigler Najjar I, Crigler Najjar II, homologado al antiguo síndrome de Gilbert.

Los casos clínicos incluidos en esta presentación pertenecerían a Crigler Najjar I (MVG) y Crigler Najjar II (LJV) según la evolución clínica, estudio de la enzima UDP Glucuronil Transferasa (UDPGT) y microscopía electrónica y respuesta frente al inductor enzimático fenobarbital.

En los dos niños comunicados en este trabajo el estudio se hizo después de iniciado el tratamiento con fenobarbital.

Para una mejor comprensión de la etiopatogenia de estas alteraciones revisaremos brevemente el transporte y conjugación normal de la bilirrubina. (Fig. 5).

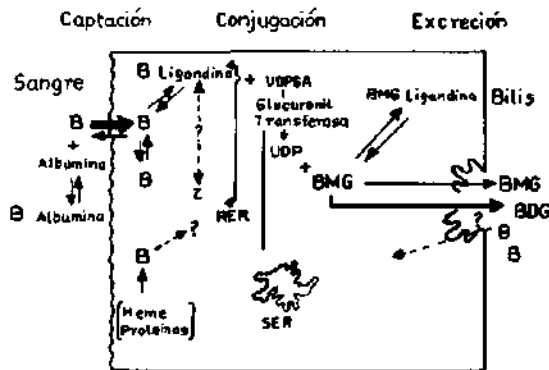


Figura 5.

Metabolismo hepático de la bilirrubina: B: bilirrubina, BMG: bilirrubina monoglucuronada, BDG: bilirrubina diglucuronada, UDPGA: Acido uridín difosfoglucuronado, RER: retículo endoplásmico rugoso, SER: sistema retículo endoplásmico.

La bilirrubina, derivada del glóbulo rojo senescente secuestrado en las células fagocitarias, es transportada en el plasma unida a la Albúmina y menos de un 10% se une al glóbulo rojo⁶.

La captación en el hígado es posterior a la separación de la albúmina y la bilirrubina en la membrana plasmática del sinusoides, a través de un transportador, que es compartido por una variedad de aniones orgánicos excluyendo los ácidos biliares⁷⁻⁸.

El flujo de la bilirrubina a través de la membra-

na plasmática es bidireccional y en la ictericia no hemolítica congénita el reflujo de la bilirrubina desde el hepatocito al plasma está aumentado⁹.

Existen varias proteínas en el citosol hepático que unen la bilirrubina en forma reversible. La más importante es la proteína Y (ligandina) que existe solamente en la célula hepática; la proteína Z, existe en un menor porcentaje y se encuentra también en el intestino delgado. Esta última capta la bilirrubina sólo cuando la concentración de proteína Y, llega a un nivel crítico¹⁰. Se especula si ambas proteínas juegan un rol esencial en el transporte de la bilirrubina o solamente sirven para acumular el pigmento en la célula en una forma no tóxica¹¹. Una opinión reciente sugiere que forman un sistema de transporte en un medio acuoso, regulando el metabolismo de la bilirrubina¹². Otros¹³ consideran que la ligandina es decisiva en la captación hepática de la bilirrubina.

En las células hepáticas existe un estanco de bilirrubina monoglucuronada en cuya formación participa solamente la enzima UDPGT (UDPG glucurónico glucuronil transferasa). Esta enzima de microsoma del retículo endoplásmico liso cataliza el transporte del ácido glucurónico desde el UDP - ácido glucurónico a las agliconas¹⁴. Se cree que el UDPGA se sintetiza en el citoplasma y se encuentra con la enzima situada en la cisterna de la membrana del microsoma por acción de una permeasa¹⁵.

En la bilis la bilirrubina es predominantemente diglucuronada. La conversión de bilirrubina monoglucuronada a bilirrubina diglucuronada no requiere de la enzima glucuronil transferasa ni del UDPGA. Se ha descrito una segunda enzima en la membrana adyacente al conducto biliar; la Bilirrubina Glucuronosido-Glucuronosil transferasa (E.C. 2.4.1.9.5.)¹⁶. Dos moles de bilirrubina monoglucuronada se transforman estequiométricamente en un mol de bilirrubina diglucuronada. Inmediatamente de sintetizado es excretado al canalículo biliar, y por lo tanto no se acumula en el hepatocito. El destino de la bilirrubina no conjugada es desconocido. La bilirrubina monoglucuronada aparece en la sangre cuando la velocidad de formación excede de la capacidad excretora de la célula hepática. El diglucuronado se encuentra en el plasma solamente en casos de obstrucción de las vías biliares.

Refiriéndonos al grupo de las hiperbilirrubinemias no hemolíticas crónicas, a pesar de los avances en el conocimiento de su patógenia queda mucho por aclarar todavía.

El síndrome de Crigler Najjar (CN), con falla hepática de conjugación de la bilirrubina, fue clasificada en dos grupos⁴. Esto es artificial pues hay nexos entre el síndrome Gilbert y el C.N.II. El tipo

de herencia es discutible¹⁸. Hay casos de C.N.II en adultos sin respuestas al fenobarbital¹⁹. La proporción de bilirrubina-monoglucuronido aumenta en la bilis progresivamente desde los controles hasta los pacientes con S. Gilbert, C.N. II y C.N.I²⁰. La consanguinidad está presente, como en uno de nuestros casos. Las familiares de los siete primeros casos de C.N. presentaban además homocistinuria, S. de Morquio, enanismo y otros trastornos²¹⁻²². Algunos autores no encuentran antecedentes de consanguinidad, como ocurrió en el caso de M.V.G. En el tratamiento del C.N. se han empleado dieta hipergrasa, Acido Aspártico²³ Colestiramina²⁴ Fototerapia²⁵ sin resultado. Solamente el fenobarbital produce descenso de la bilirrubina en el C.N. II y en el S. Gilbert después de dos semanas de tratamiento²⁶. La droga aumenta también el flujo de la bilis, de las sales biliares y fosfolípidos, la actividad de la UDPGT y de la ligandina²⁷⁻²⁸, y produce hipertrofia del aparato de Golgi y proliferación del R.E.L.²⁹⁻³⁰

El síndrome Gilbert presenta una hiperbilirrubinemia fundamentalmente no conjugada. Se hereda de modo autosómico dominante, aumenta durante el ayuno³¹. Su curso es benigno y no se justifica tratarlo con fenobarbital³². Existe una reducción de la actividad de la glucuronil transferasa sin correlación con el nivel de bilirrubina³³, asociada a un retardo en la acetilación de drogas y la depuración de tolbutamida, sustancia excretada sin glucuronización³⁴.

El síndrome de Dubin Johnson es una ictericia benigna, familiar crónica o intermitente relacionada con una falla de excreción canalicular de moléculas orgánicas como Bilirrubina, Porphirinas y Agentes Colecistográficos. El transporte de ácidos biliares es normal; la hiperbilirrubinemia es de predominio conjugado³⁵. Existe un depósito de melanina en el hepatocito. La excreción urinaria de coproporphirinas I está aumentada y la de coproporphirina III disminuida. El fenobarbital reduce la ictericia pero el efecto es moderado y sin valor terapéutico³⁶.

El S. de Rotor es una hiperbilirrubinemia crónica de predominio conjugado, benigna, familiar, sin pigmentación hepática. La falla sería un defecto en la captación y almacenamiento de aniones orgánicos³⁷. Esto es paradójico. Una explicación sería que hay un aumento en el reflujo del hígado al plasma por mala fijación intrahepática de bilirrubina. Esto se ha demostrado en la oveja mutante Southdown, con iguales anomalías. En ella el contenido intrahepático de ligandina es normal³⁸. Se confirma esto por el tratamiento con fenobarbital que no influencia la hiperbilirrubinemia ni la excreción de bromosulfaleína en estos pacientes²⁰.

RESUMEN

Se presentan dos casos de niños portadores de síndrome de Crigler Najjar. Su diagnóstico ha sido confirmado por estudio enzimático y de microscopía electrónica. Se clasifican en tipo I y II de acuerdo con su respuesta al tratamiento con fenobarbital.

Se revisan brevemente las hiperbilirrubinemias no hemolíticas congénitas, destacando que a pesar del conocimiento actual queda aún mucho por investigar.

REFERENCIAS

- ¹ Karnovsky M.J. Formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27: 137 A, 1965.
- ² Reynolds E.S. The use of Pb citrate at high pH as an electron-opaque stain for electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208, 1963.
- ³ Crigler J.F., Najjar V.A.: Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus. *Pediatrics* 10: 169-180, 1952.
- ⁴ Arias Irvin M. et als.: Chronic nonhemolytic Unconjugated hyperbilirubinemia with Glucuronyl transferase deficiency. *Am. J. of Med.* 47: 395-406, 1969.
- ⁵ Gollan J.L. S.N. Huang et als.: Prolonged Survival in 3 brothers with severe type 2 Crigler-Najjar syndrome. *Gastroenterology* 68: 1543-1555, 1975.
- ⁶ Barnhart, J.L. and Clarenburg, R. Binding of bilirubin to erythrocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 142: 1101-1103, 1973.
- ⁷ Goresky, C.A. citado por B.H. Billing *Gut*: 19: 481-491, 1978.
- ⁸ Scharschmidt, B.F. and Schmid, R. The micellar sink. *Gastroenterology* 72: 1182, 1977.
- ⁹ Billing B. et als.: Defects in hepatic transport of bilirubin. *Clin. Sc.* 27: 245-257, 1964.
- ¹⁰ Levi, A. Gaitman Z and Arias I. Two Hepatic Cytoplasmic protein Fractions Y and Z.J. of *Clin. Investigation* 48: 2155-2167, 1969.
- ¹¹ Fleischner, G. and Arias I.M. Structure and Function of Ligandin y protein. GSH Transferase B. and protein in the liver: A progress report. *Progress in Liver Disease*, 5: 172-182, 1976.
- ¹² Meuwissen, J.A.: Ketterer and Heirwegh K. Role of soluble binding proteins in overall hepatic transport of bilirubin. *Chemistry and Physiology of Bile Pigments*, pp. 323-327. Edited by P.D. Berk and N.I. Berlin, 1976.
- ¹³ Wolkoff A.W. Sellin J. et als.: Role of the ligandin in transfe of bilirubin from plasma into the liver. *Gastroenterology* 73: 1255, 1977.
- ¹⁴ Billing B. Twenty five years of progress in bilirubin metabolism. *Gut*. 19: 481, 1978.
- ¹⁵ Berry C. and Hallinan T. Summary of a novel three component model for UDPG transferase. *Bioch. Soc. Trans.* 4: 650-652, 1976.
- ¹⁶ Wolkoff A.W. Crigler Najjar syndrome (type I) in an Adult Male. *Gastroenterology* 76: 840-848, 1979.
- ¹⁷ Mc Kusic Victor. *Human Genetics. J. of Heredity* 71: 370, 1980.
- ¹⁸ Kreek M. and Sleisenger M.H. Reduction of serum Unconjugated bilirubin with phenobarbitone in adult Congenital nonhemolytic Hyperbilirubinemie. *Lancet* 2: 73-78, 1968.

- ¹⁹ *Gollan J.L. SN. Huang et als.*: Prolonged survival in 3 brothers with severe type 2 Crigler Najjar syndrome. *Gastroenterology* 68: 1543-1555, 1975.
- ²⁰ *Berthelot P. and D. Dhumeaux.* New insights into the classification and mechanisms of hereditary, chronic, non-haemolytic hyperbilirubinemias. *Gut*. 19: 478-480, 1978.
- ²¹ *Berk P. et als.*: Unconjugated hyperbilirubinemia. *Annals of Int. Med.* 82: 552, 1975.
- ²² *Childs B. and V. Najjar.* Familial nonhemolytic jaundice with Kernicterus. *Ped.*: 18: 369, 1956.
- ²³ *Matsuda I et als.* Effects of Aspartic Acid and Orotic Acid upon bile serum bilirubin levels in newborn infants. *J. of Exp. Med.* 90: 133, 1966.
- ²⁴ *Grotti F. Finocchi et als.*: Congenital non haemolytic jaundice in a 4 year old girl without disease of the CNS. *Helv. Paed. Acta* 24: 399, 1969.
- ²⁵ *Arrowsmith W. et als.*: Comparison of treatment for Congenital Neonatal non haemolytic hyperbilirubinemia. *Arch. Dis. Child.* 50: 197, 1975.
- ²⁶ *Blachke IB et als.*: Drugs and the liver. *Biochem Pharmacol.* 23: 2795 - 2806, 1974.
- ²⁷ *Arias I.* Inheritable and Congenital hyperbilirubinemia. *New Engl. J. of Med.* 285: 1416 - 1421, 1971.
- ²⁸ *Redinger et als.*: Effect of Phenobarbitone upon bile salt and Pool size. *J. Clin. Inv.* 52: 161, 1973.
- ²⁹ *Yaffe, S. Levy.* Enhancement of glucuronide - conjugating capacity in a hyperbilirubinemia infant due to apparent enzyme induction by phenobarbitone. *New Eng. J. Med.* 275: 1461, 1966.
- ³⁰ *Gotze, H.D. Sidiropoulos et als.* Das Crigler-Najjar Syndrome. Klinische, biochemische, morphologische und therapeutische aspekte. *Helv. Paed. act.* 27: 335-351, 1977.
- ³¹ *Owens, D., and Sherlock S.* Diagnosis of Gilbert's syndrome. Role of reduced caloric intake test. *Brit. Med. J.* 3: 559-563, 1973.
- ³² *Black M. and Sherlock s.* Treatment of Gilbert's syndrome with phenobarbitone. *Lancet* 1: 1359-1362, 1970.
- ³³ *Berk P.D. et al.*: A new approach to quantitation of the various sources of bilirubin in man. *Journal of lab and Clin. Med.* 87: 767-780, 1976.
- ³⁴ *Carulli, N. Ponz de Leon et als.*: Alteration of drug metabolism in Gilbert's syndrome. *Gut*. 17: 581-587, 1976.
- ³⁵ *Berthelot P. and D. Dhumeaux.* New Insights into the classification and mechanisms of hereditary, chronic, non - haemolytic hyperbilirubinemias. *Gut*. 19: 474-480, 1978.
- ³⁶ *Ben-Ezzer, J. Rimington, C. et als.*: Abnormal excretion of the urinary coproporphyrin by patients with Dubin-Johnson syndrome in Israel. *Clin. Science.* 40: 17-30, 1971.
- ³⁷ *Dhumeaux, D. and Berthelot, P.* Chronic hyperbilirubinemia associated with hepatic uptake and storage impairment. A new syndrome resembling that of the mutant southdown sheep. *Gastroenterology* 69: 988-993, 1975.
- ³⁸ *Arias, I.* Transfer of bilirubin from blood to bile. *Seminars in Hematology* 9: 55-70, 1972.