

VALOR PROPEDEUTICO DAS BILIRRUBINAS

DR. JOSÉ AUGUSTO LAUS FILHO

Assistente Extranumerário da 1.^a Clínica Médica da Faculdade
de Medicina da Universidade de S. Paulo.
Serviço do Dr. Otavio Rodovalho.

A cor amarela do soro é consequência da bilirrubina circulante. A icterícia é o resultado da hiperbilirrubinemia, que surge em vários estados patológicos.

METABOLISMO DA BILIRRUBINA — A bilirrubina se forma a custa da hemoglobina, não padecendo mais duvidas que são as células do sistema reticulo-endotelial as responsáveis pela bilirrubinogenese e só elas, porque segundo Rich não se tem demonstração de que nenhuma outra possa fazê-lo e nem que a bilirrubina possa se originar por ação enzimática.

Sendo apenas necessárias para a formação da bilirrubina a existência de células do S. R. E. e a presença de hemoglobina, advêm noções importantes a saber: a) A bilirrubinogenese se processa em qualquer território da economia; assim nos derrames sanguíneos, nos exsudatos hemorrágicos, na medula óssea, no baço, etc. b) Não é necessária a presença do fígado para a bilirrubinogenese. Todas as experimentações sobre hepatectomia total assim o provam, com exceção das realizadas sobre aves, em virtude de nestas, as células do S. R. E., capazes de formar bilirrubina se encontrarem quasi que exclusivamente no fígado. c) Sendo o fígado um órgão rico em células do S. R. E. (células de Kupffer) é evidente que desempenha papel importante na bilirrubinogenese.

A bilirrubina deriva de uma fração do total de 25 g. de hemoglobina libertada diariamente. Acreditava-se em tempos passados que a hematina, um complexo ferrico da protoporfirina fosse o primeiro corpo intermediário na transição da hemoglobina para a bilirrubina.

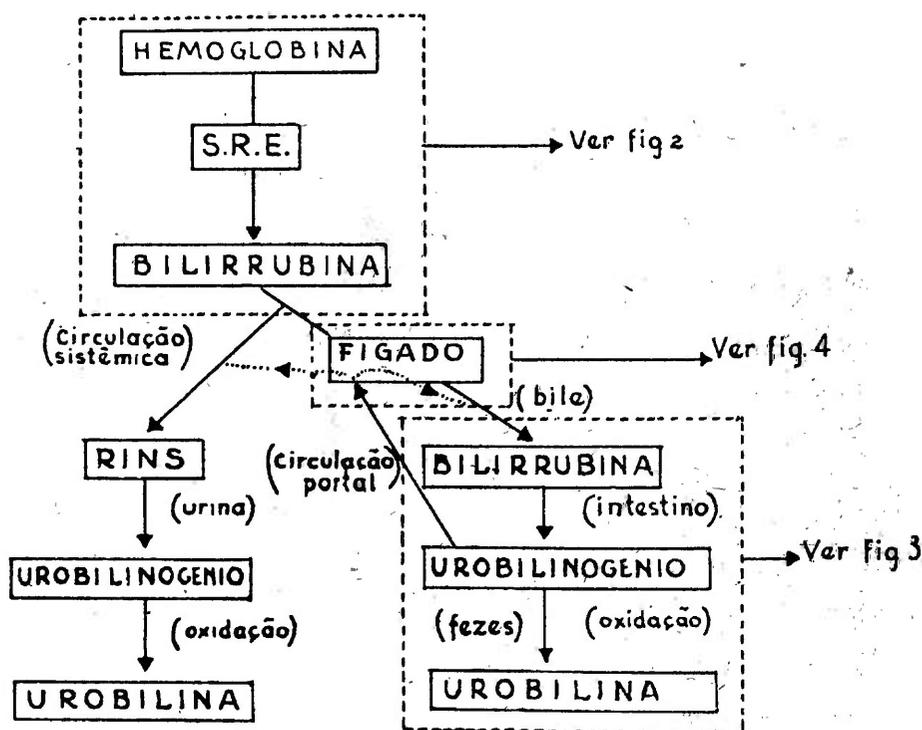


Fig. 1 — Esquema do Metabolismo da bilirrubina.

Baseados em recentes trabalhos de Bingold, Duesberg, Pass, Schwartz e Watson e outros a transição de hemoglobina a bilirrubina é inteiramente diferente da hipótese que colocava em primeiro plano a cadeia hematina-protoporfirina. Temos evidência de que antes da perda de ferro ou da remoção da proteína, como se acreditava antigamente (parte esquerda da figura) é a abertura do anel de protoporfirina que primeiramente se processa. Isso resulta na formação da verdohemoglobina ou billiverdina-globina-ferro, que tem a propriedade de facilmente perder o ferro e se transformar em bilirrubina (parte direita da figura).

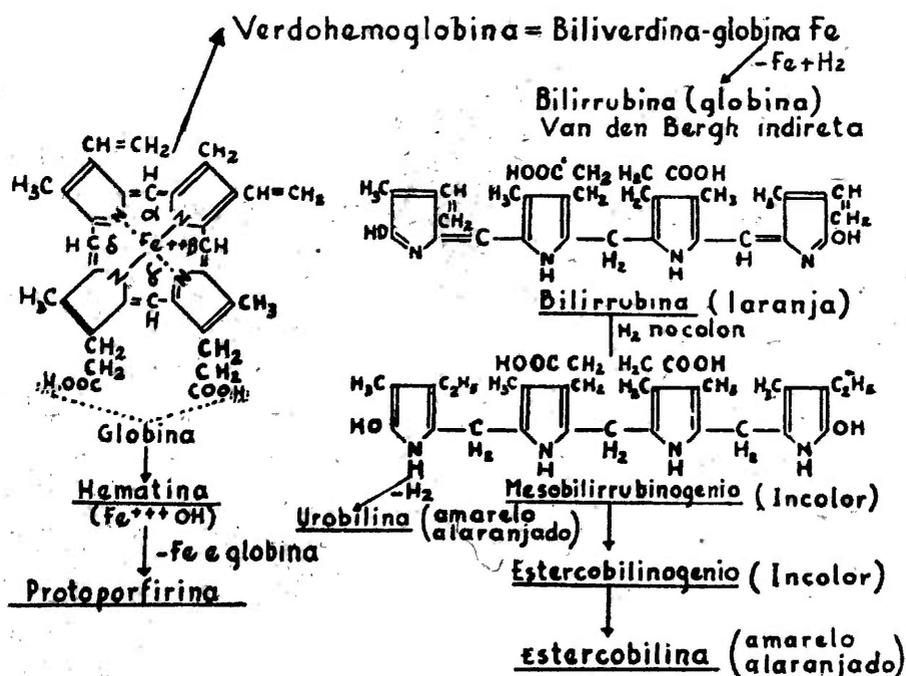


Fig. 2 — Alguns dos mais importantes derivados naturais da hemoglobina (Watson).

Assim formada passa a bilirrubina ao sangue e circula até certo limiar ultrapassado o qual é através das células hepáticas, por processos ainda discutidos (que veremos adiante) removida e excretada pela bile na quantidade diária de 250 a 370 mg, o que corresponde de 5 a 9 g. de hemoglobina libertada. Chegada ao intestino sofre a ação redutora da flora intestinal e se transforma em urobilogenio. Deste, uma parte é reabsorvida pela mucosa intestinal e através da circulação portal chega novamente ao fígado e o restante é excretado pelas fezes numa quantidade diária que varia entre 40 a 280 mg.

Convém neste ponto abrir um parentesis para esclarecer algumas questões importantes a respeito do que entendemos atualmente por urobilinogenio. Para tal rememoremos alguns fatos. Watson e Schwartz, retirando bile humana através de fistulas biliares e reduzindo a bilirrubina, obtinham um cromogenio que extraído e exposto à luz dava origem a uma urobilina denominada urobilina 9, α . (Essa denominação advem de particularidades da molecula na sua formação, cujo estudo não cabe aqui). Este cromogenio assim obtido é o mesobilirrubinogenio. Conseguiu-se depois isolar das fezes e da urina cristais de estercobilina, cuja redução dava origem a um cromogenio diferente do mesobilirrubino-

genio. Estes fatos aliados às diferenças físicas entre a estercobilina cristalina e a urobilina 9, α , provam que existem realmente nas fezes e urinas dois tipos de cromogenios: mesobilirrubinogenio e estercobilinogenio. Contudo como eles se comportam igualmente em relação ao reativo de Ehrlich e são sempre dosados em conjunto são também em conjunto denominados de urobilinogenios. Os corpos resultantes da oxidação do estercobilinogenio e do mesobilirrubinogenio, quer dizer a estercobilina e a urobilina 9, α , são em conjunto denominados urobilina.

A redução natural da bilirrubina em mesobilirrubinogenio se dá principalmente ao nível do colon, atribuindo-se esta reação à atividade redutora da flora bacteriana. Ficou demonstrado que o mesobilirrubinogenio se transforma também no colon em estercobilinogenio por um processo de redução (sistema cistina-cisteina).

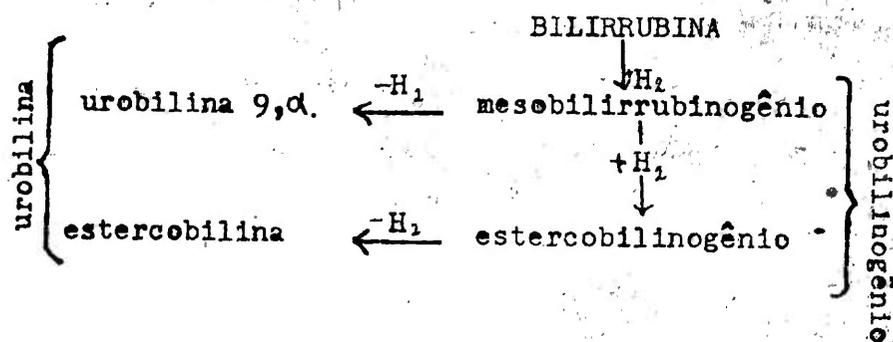


Fig. 3 — Conceito de urobilinogênio e urobilina (Watson).

A maior parte da fração do urobilinogenio que chega ao fígado é removida pela célula hepática e talvez reconvertida em bilirrubina ou em outros produtos e novamente é excretada pela bile. O restante escapa pela circulação geral e é excretado pela urina sob essa mesma forma e em seguida no meio exterior é oxidado e passa a urobilina que se encontra numa taxa diária de aproximadamente 4 mg.

BILIRRUBINAS DIRETA E INDIRETA

Desde os trabalhos iniciais de van den Bergh, publicados a partir de 1913, quando aplicou a diazo-reação de Ehrlich ao soro sanguíneo para a evidencição da bilirrubina, temos a noção da existencia de duas maneiras diferentes de reagir da bilirrubina com esse reativo: A bilirrubina de reação direta e a bilirrubina de reação indireta.

Bilirrubina de reação direta: É a que desenvolve coloração vermelha ou violacea quando em presença do diasso-reativo de Ehrlich, sem qualquer tratamento previo e conforme a rapidez com que se desenvolve essa cor temos dois tipos de reação:

a) Reação direta imediata — se a coloração vermelha se manifestar dentro de 30 segundos.

b) Reação direta retardada — se a coloração só aparecer depois de 30 segundos.

Bilirrubina de reação indireta: É a que desenvolve a coloração vermelha somente após a adição do alcool.

Procurou-se estudar a razão do modo diferente de reagir da bilirrubina e o proprio van den Bergh trouxe contingentes importantes para a elucidação. Assim em linhas gerais mostrou que:

a) A bile dá reação direta imediata.

b) O soro de individuos com obstrução mecanica das vias biliares dá reação direta.

c) O soro de individuo normal dá reação indireta.

d) Os soros de individuos com ictericia hemolitica dão reação indireta.

Para explicar estas diferencias van den Bergh, relacionando os fatos da observação clinica, admitiu a existencia de duas bilirrubinas:

a) Bilirrubina de reação indireta — que é a de origem reticulo-endotelial, que não sofreu a ação das celulas hepaticas.

b) Bilirrubina de reação direta — é a que foi modificada e excretada pelas celulas hepaticas e refluio ao sangue depois de ter atingido os canaliculos hepaticos.

Está hoje definitivamente acentado que entre as chamadas bilirrubinas de reação direta e indireta existem diferencias essenciais a saber: A bilirrubina direta é mais facilmente oxidada: quando as proteínas do soro são precipitadas pelo alcool a bilirrubina direta é adsorvida no precipitado mais facilmente. A bilirrubina direta é dissolvida pelo cloroformio e a indireta não; a direta é dialisavel e a indireta não. A bilirrubina direta é excretada pelos rins em um limiar baixo e a indireta nunca o é.

Discute-se ainda as bases dessas diferenças e ainda não se chegou a uma solução definitiva.

Certos autores procuraram explicar as diferenças de comportamento não em dualidade de bilirrubinas, mas sim por diferenças quantitativas. Parece não ser verdadeiro esse fato porque nas ictericias hemolíticas encontramos muitas vezes taxas elevadas de bilirrubina sempre dando reação indireta ao contrario as ictericias por lesão das celulas hepaticas, mesmo não dando taxas tão elevadas de bilirrubina oferecem sempre reação direta.

Watson e cols para provar a existencia de duas bilirrubinas colocaram soro icterico em contato com o diaso-reativo e determinaram a quantidade de bilirrubina que de instante a instante ia se combinando com o diaso-reativo de modo a desenvolver coloração vermelha cada vez mais intensa por meio da qual em um colorimetro foto eletrico podia-se medir qual essa quantidade.

Fizeram essa determinação no primeiro minuto em intervalos de 1/4 de minuto, do segundo ao quarto minuto em intervalos de 1/2 minuto e em seguida até quinze minutos em intervalos de um minuto. Projetaram os resultados em um grafico.

Pois bem, se se tratasse de uma unica especie de bilirrubina a se combinar com o diaso-reativo dever-se-ia ter uma curva parabolica: contudo a obtida muito se afasta da curva parabolica e se percebe claramente ter dois componentes: um tendendo ao vertical e outro tendendo ao horizontal o que indica a mudança de uma ordem de reação para outra ordem.

Outros autores baseando-se principalmente na identidade espectrofotometrica e no comportamento diferente em relação a dialização admitem apenas diferenças fisico-quimicas e discutem se seja por um estado fisico-quimico particular e inerente a cada tipo de bilirrubina ou se depende apenas de condições do meio. Assim muitos pensam que o aumento na concentração de substancias que baixam a tensão superficial (sais biliares, colesterol, acidos graxos) podem ser os responsaveis pela produção da reação direta. Outros ainda acreditam que apenas o pH do meio seja o responsavel por essas diferenças.

A generalidade dos autores acreditam contudo que existem duas bilirrubinas quimicamente distintas. Collenson e Fowweather admitem que a bilirrubina seja um acido quando produzida pelo S. R. E. e seria a que produz reação indireta, convertendo-se em sal de amoniaco ao passar pelas celulas hepaticas dando então a reação direta.

Sabe-se atualmente que mesmo em soros normais (que não dão reação direta qualitativa) existe uma fração que dá reação direta quantitativa. Este fato vem em apoio de que a diferença reside essencialmente na molécula de bilirrubina ou na sua maneira de combinação no soro.

Segundo os trabalhos mais recentes, (Duesberg, 1934; Coolidge, 1940; Watson, 1946.) a bilirrubina uma vez formada se liga à fração albumina das proteínas do soro. Contudo como se pode ver na figura 2, tudo nos faz acreditar que a bilirrubina continua presa à globina (globina original da molécula de hemoglobina), e que seja esta a responsável pela reação indireta de van den Bergh.

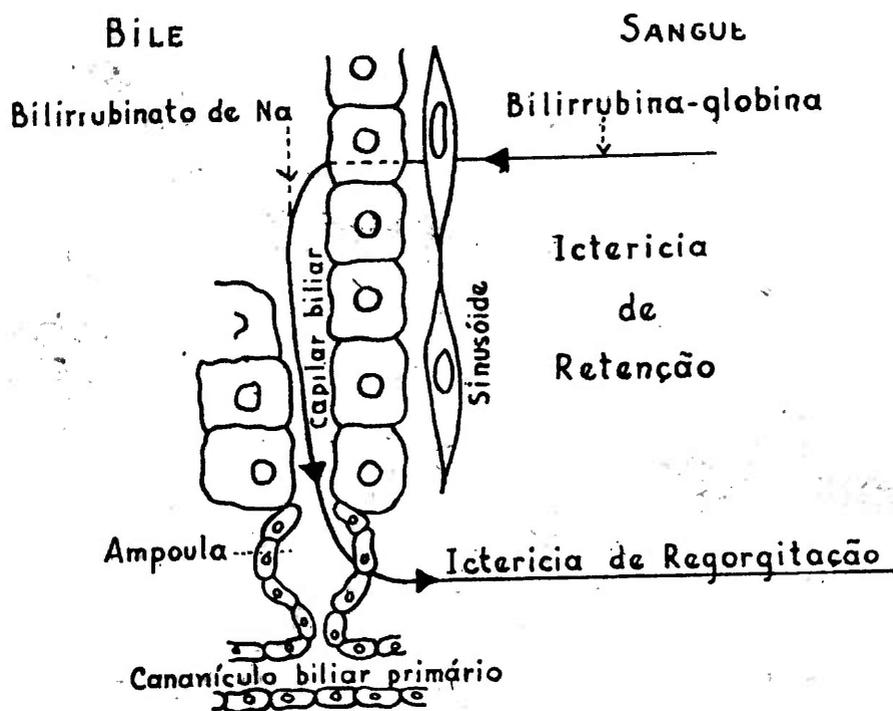


Fig. 4 — Esquema da formação da bilirrubina direta. (Watson).

Ao chegar às células hepáticas esse composto bilirrubina-globina se liberta da sua proteína, não se sabendo se essa função cabe às células de Kupffer ou às células poligonais do fígado.

Ao chegar ao canaliculo biliar, a bilirrubina libertada de sua proteína se ligaria ao sódio para a formação do bilirrubinato de sódio (Wunter, 1930) e seria esta a responsável pela reação direta com o diáso-reativo.

Convem acrescentar que embora a generalidade dos autores admitam a existencia de duas bilirrubinas, discordando na interpretação dessa diferença há ainda trabalhos recentes, principalmente de autores ingleses realizados no ano passado que negam a existencia de duas bilirrubinas, negando também papel ao fígado como transformador de uma em outra. Contudo esses trabalhos não têm ainda confirmação e até que se prove o contrario devemos raciocinar em clinica com os conceitos assinalados anteriormente.

VALORES NORMAIS DAS BILIRRUBINAS DIRETA E INDIRETA — METODOS DE DETERMINAÇÃO

A cor vermelha ou violeta que se desenvolve em um soro ao se acrescentar o diazo-reativo (reação direta) ou o diazo-reativo mais o alcool (reação indireta) deve-se a formação de um composto — azobilirrubina. A maneira exata de sua formação é até hoje desconhecida. No entanto foi a partir deste composto que tanto impulso tomou a questão das bilirrubinas, desde que van den Bergh usou-o pela primeira vez.

Existe um grande numero de metodos, todos eles baseados na formação da azobilirrubina, variando apenas na tecnica.

O metodo atualmente em uso no Laboratorio Central do Hospital das Clinicas é o de Evelyn-Malloy, que apresenta a vantagem de se usar o alcool metilico, em uma proporção tal que sem precipitar as proteínas liberta toda a bilirrubina ligada à fração proteica do plasma, dando por conseguinte o valor da *bilirrubina total*.

Segundo Evelyn-Malloy o valor normal de bilirrubina total é de 0,6 mg. por 100 ml. de soro, tendo encontrado só em raros casos valor normal de 0,8 mg. por 100 ml. de soro. Os valores normais da bilirrubina direta estão compreendidos entre 0,000-0,157 mg. por 100 ml de soro, isto quando a leitura é realizada em um minuto, é a *bilirrubina direta imediata*. Quando a leitura é realizada depois de trinta minutos de se acrescentar o reativo, o valor maximo normal é de 0,4 mg. por 100 ml. de soro — o que vem a ser o valor da *bilirrubina direta total*.

Da subtração dos valores da bilirrubina direta total dos da bilirrubina total, temos os valores normais da *bilirrubina indireta*.

$$BI = BT - BDT$$

COMPORTAMENTO DAS BILIRRUBINAS NAS DIVERSAS SINDROMES HEMOLITICAS

a) *Ictericia hemolitica* — Dos conhecimentos expostos anteriormente se conclue que nos casos de ictericia hemolitica pura (sem complicação hepatica), as taxas de bilirrubina sobem no soro a custa exclusivamente da de reação indireta. Como consequencia imediata de taxas elevadas de bilirrubina indireta no soro temos tambem taxas elevadas de urobilinogenio fecal nas 24 horas. E ainda mais, apesar do figado estar funcionalmente normal, não é capaz de metabolizar as taxas elevadas de urobilinogenio que, reabsorvidas através da mucosa intestinal, chegam até o figado pela circulação portal e como consequencia temos a sua elevação no sangue e excreção alta na urina das vinte e quatro horas.

Logo um dos melhores meios de se estudar a hemolise é através do urobilinogenio urinario e principalmente fecal, por que é o reflexo imediato da formação da bilirrubina ou em outros termos da hemoglobina destruida. Sabe-se que 100 mg. de urobilinogenio fecal derivam de 2,39 g. de hemoglobina. Por meio de uma simples regra de tres, sabendo-se a quantidade de urobilinogenio, temos a quantidade de hemoglobina destruida.

Sendo a bilirrubina aumentada a de reação indireta ela nunca aparecerá na urina, porque segundo os conhecimentos atuais o rim não é capaz de excreta-la, por maiores taxas que se encontrem no sangue circulante. Watson relata um caso em que essa taxa era de 14,8 mg. por 100 ml. de soro e em nenhum momento houve bilirrubinuria demonstravel pelos metodos mais sensiveis.

Resumindo: a) Hiperbilirrubinemia indireta com ictericia fraca (por ser este tipo de bilirrubina muito pouco dializavel através dos capilares para impregnar os tecidos. b) Urobilinogenio fecal aumentado nas 24 horas. c) Aumento do urobilinogenio urinario. d) Ausencia de bilirrubinuria — urinas claras no instante da micção.

Se assim acontece nos casos puros de hiperhemolise (casos iniciais graves ou leves mesmo de longa duração) o que se costuma presenciar na pratica são os casos complicados com lesão de celulas hepaticas ou com processos obstrutivos, principalmente intra hepaticos, que decorrem de severa anoxia ou de produtos da hemolise (estroma dos eritrocitos). Assim acontecendo a bilirrubina de reação direta (ver figura) reflue para a circulação e consequentemente eleva-se também a taxa de bilirrubina de rea-

ção direta. Contudo mesmo nestes casos, Watson (1946) demonstrou que a bilirrubina de reação direta nunca ultrapassa a cifras de 0,71 mg. por 100 ml. de soro, ao passo que a total atinge valores que variaram nos seus casos entre 3,2 a 9,8 mg. por 100 ml. de soro. Apesar da hiperbilirrubina direta subir nunca encontrou bilirrubinúria, em virtude das taxas daquela serem inferiores ao limiar de excreção.

b) *Icterícia por obstrução extra-hepática* — Qualquer obstrução extra-hepática traz hipertensão biliar intra hepática, depois de certo tempo dependendo da intensidade haverá ruptura de canaliculos biliares e lesões das celulas hepaticas. O resultado é a regorgitação da bile de reação direta para o sangue e a sua consequente elevação.

Barron encontrou que as taxas de bilirrubina direta são normais nas primeiras ou segundas horas e tornam-se elevadas entre a segunda e quarta horas da ligação do canal coledoco.

Pois bem, nas primeiras duas horas já a bilirrubina indireta sobe no sangue, em virtude das celulas hepaticas não metaboliza-la normalmente. Logo depois as duas bilirrubinas se apresentam altas no soro. São portanto casos mistos, no sentido de que as bilirrubinas sobem por deficiencia de remoção (icterícia de retenção) e secundariamente por refluxo através dos canaliculos biliares para a linfa e sangue (icterícia de regorgitação).

No entanto a diferença entre esta icterícia de retenção com a precedente por hiper hemolise será facil se nos basearmos nos trabalhos de Watson, porque estes evidenciaram taxas de bilirrubina direta superiores a 6,1 mg. por 100 ml. de soro atingindo até valores de 27 mg. por 100 ml. de soro (comparem-se com os dados precedentes da icterícia hemolítica).

Mas tambem clinicamente a diferença é facil em virtude de nestes casos ou não haver fluxo biliar por conseguinte ausencia de urobilinogenio fecal — fezes acolicas ou brancas — ou estar muito diminuido (obstrução parcial, geralmente por calculos) e o urobilinogenio se mostrar tambem baixo — fezes hipocolicas e acolicas, intervaladamente). Nos casos de obstrução total não existe urobilinogenio na urina, quando no inicio, porque depois de certa duração a bilirrubina passa através da mucosa intestinal e atinge o colon onde se transforma em urobilinogenio.

A icterícia de obstrução é intensa, porque se faz mais a custa da direta que é muito mais difusivel e impregna muito mais os tecidos. Por sua vez aparece a bilirrubinúria mais ou menos intensa, por apresentar os rins limiar baixo de excreção para este

tipo de bilirrubina. Este limiar é amplamente variavel segundo os individuos e segundo a evolução da molestia.

De acordo com os trabalhos de Watson (1946) esse limiar foi até de 0,7 mg. de bilirrubina direta por 100 ml. de soro, variando contudo mais comumente esse limiar entre 1 a 2 mg. por 100 ml. de soro.

Resumindo: a) Icterícia intensa (bilirrubina direta). b) Fezes acolicas (ausencia de urobilinogenio). c) Urinas escuras (bilirrubinuria). d) ausencia de urobilinogenio urinario.

c) *Icterícia hepato-celular* — Nos casos de lesão das células hepáticas por toxico ou infecção, torna-se ela inicialmente incapaz de metabolizar normalmente a bilirrubina circulante e esta sobe no soro sanguineo. Logo, em uma primeira fase, as taxas de bilirrubina direta se mostram dentro dos limites normais, ao passo que a dosagem da bilirrubina indireta mostra aumento, sendo este variavel de caso para caso e no mesmo caso segundo a evolução.

O urobilinogenio fecal está muito diminuido ou mesmo ausente em periodos curtos de tempo e consequentemente o urobilinogenio urinario tambem muito diminuido ou ausente respectivamente. Não há bilirrubinuria. Simula por conseguinte um caso de obstrução biliar extra hepática inicial.

A icterícia é de retenção apenas. Contudo horas ou dias depois, com o progredir dos processos anatomicos (degeneração, necrose, descamação epitelial) complicam-se as graves alterações celulares com obstrução de canaliculos e rupturas de outros, desfaz-se a continuidade dos mesmos e estabelece-se o curto-circuito bilio-sanguineo. Temos a passagem e ascensão no sangue da bilirrubina de reação direta. A icterícia passa a ser mista — de retenção e de regurgitação.

Watson encontrou nestes casos taxas de bilirrubina direta que variavam entre 1,9 a 31,9 mg. por 100 ml. de soro e de bilirrubina indireta entre 4,0 a 51,2 mg. por 100 ml. de soro.

Clinicamente, a icterícia é franca, com forte bilirrubinuria e sempre o urobilinogenio urinario se mostra elevado. Aliás a bilirrubinuria pode ser o primeiro sinal de estado patologico, exteriorizando-se através de urinas escuras, que mancham as roupas mesmo antes de haver icterícia.

Como vemos, nas ictericias hepato celular e por obstrução biliar, o comportamento das bilirrubinas é praticamente o mesmo, razão porque é bem aceitavel o termo generico de icterícia de

regurgitação para incluir ambas as formas — obstrutiva e hepato-cítica.

Não cabe aqui discutir com pormenores o comportamento do colesterol, — mesmo porque ainda não se conhece exatamente seu metabolismo — mas convem acrescentar que nas ictericias hepato-cíticas os esteres de colesterol caem no sangue e nas obstrutivas puras o colesterol total se eleva.

Varela Fuentes dá grande importancia a hiperbilirrubinemia indireta como indice de lesão hepatocítica, não só no diagnostico desta mas também no prognostico. Assim refere que nas ictericias mecanicas puras a concentração de bilirrubina indireta se mantém dentro dos limites normais, pelo menos abaixo de 1,0 mg. por 100 ml. de soro, ao passo que a elevação da bilirrubina indireta acima de 1,5 mg. por 100 ml. de soro (na ausencia de hiperhemolise) nos faz admitir seria lesão do hepatocito. Quanto ao seu valor no prognostico refere que nos casos da ictericia catarral a bilirrubina indireta começa a cair no oitavo dia quando tende para a cura e a sua estabilização ou a sua ascensão acima de 2,0 mg. por 100 ml. de soro, a partir do oitavo dia do inicio do processo, constitue prognostico grave.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1) ROSENTHAL, F. — Enfermedades del higado e de las vias biliares. Editorial Labor S. A. — Argentina. 1939.
- 2) VARELA FUENTES, B. e CAPURRO, F. G. — Patologia digestiva — Espasa — Calpe. Argentina. 1943.
- 3) WATSON, C. J. — Some newer concepts os the natural derivatives of hemoglobin. Blood — The journal of hematology — I: 2 — 99 — 1946.
- 4) SEPULVEDA, B. e OSTERBERG, A. E. — Serum bilirubin: a procedure for the determination for indirect and direct values. — J. Lab. and clin. Med. — 28: 11 — 1359 — 1943.
- 5) CANTAROW and TRUMPER — Clinical Biochemistry. Philadelphia and London. 1945.
- 6) MENDONÇA CORTEZ, J. — Ictericias — Biblioteca Médica Brasileira — Serie II — Volume III — 1936.
- 7) LOPES GARCIA, A. — El Síndrome Coledociano — Libreria Hachette S. A., Buenos Aires.
- 8) ABU JAMRA, M. — Contribuição para o estudo do metabolismo da hemoglobina na Anemia Perniciosa. Tese de doutoramento. 1946.