

# Bilirrubina, una vieja amiga con una nueva historia

Jorge Alan López-Velázquez\*

## RESUMEN

La bilirrubina es el principal pigmento biliar. Se forma en el retículo endotelial a partir de la degradación del grupo hemo. En 1916 fue identificada por primera vez en cadáveres pigmentados, y hasta 1950 era considerada sólo un producto de desecho. Hoy en día la determinación sanguínea de esta molécula forma parte de las pruebas de laboratorio que evalúan la función excretora del hígado. Además, las evidencias moleculares, bioquímicas y clínicas actuales han permitido atribuirle diversas funciones benéficas como un potente antioxidante a concentraciones plasmáticas ligeramente elevadas; pero también se le ha atribuido una función tóxica a altas concentraciones sobre células del sistema nervioso central. Debido a su compleja estructura y fotosensibilidad, así como las limitantes existentes para su estudio y entendimiento fisicoquímico, se había considerado una molécula olvidada en el campo de la investigación. Los estudios para clarificar la química de la molécula tomaron auge a raíz de la descripción del papel fundamental de la hiperbilirrubinemia en el neonato (*kernicterus*). El panorama actual está dirigido al estudio de la propiedad antioxidante de esta molécula y su posible implicación terapéutica en la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y otras patologías relacionadas. El presente trabajo demuestra la importancia clínica de la bilirrubina a partir del entendimiento de su estructura y bioquímica dentro del organismo, así como las implicaciones fisiológicas que la han convertido en algo más que un desecho de color amarillo.

**Palabras clave.** Insuficiencia hepática. Pigmento biliar. Ictericia. *Kernicterus*. Hepatopatía.

## ABSTRACT

Bilirubin is the main pigment in bile. It is formed in endoplasmic reticulum from heme group breakdown. In 1916 it was first identified in pigmented bodies, and until 1950, was considered only a waste product. However, currently bilirubin is one of the liver function test, included to determine hepatocyte excretion. Therefore, molecular, biochemical, and clinical studies have allowed it several beneficial functions as a potent antioxidant to slightly elevated plasma concentrations but also has been attributed a toxic role in nerve cells at high concentrations. Because of its complex structure and being a photosensitive molecule, it has been difficult to study their chemical properties. Researches to clarify their physicochemical properties took boom following the description of the role of hyperbilirubinemia in the newborn (*kernicterus*). The current outlook is focus on the study of antioxidant property and their possible therapeutic implications in diabetes, cardiovascular disease and other related diseases. This review demonstrates the clinical significance of bilirubin from the understanding of the structure and biochemistry in the body, as well as the physiological implications that have become it more than just a yellow waste.

**Key words.** Hepatic liver failure. Bile pigment. Jaundice. *Kernicterus*. Chronic liver disease.

## QUÍMICA DE LA BILIRRUBINA: UNA MOLÉCULA COMPLEJA

Químicamente la bilirrubina está formada por cuatro anillos pirolicos unidos a través de enlaces de carbono, su estructura estereoquímica, casi simétrica, está determinada por la presencia de grupos hidrofílicos, como los

ácidos propiónicos, los cuales son grupos funcionales que pueden ionizarse dependiendo del pH del plasma, la bilis o la orina, condicionando la forma de esta molécula como diácida (sin carga), monoaniónica o dianiónica.<sup>2</sup> Por otro lado, los grupos hidrofílicos interactúan por medio de puentes de hidrógeno y hacen que la molécula asemeje una forma espacial de libro semi-abierto.<sup>1</sup> La presencia de estas

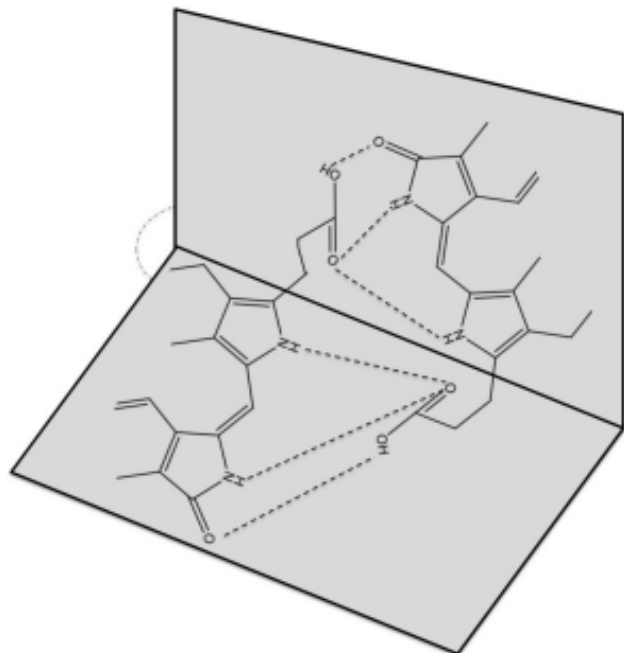
\* Posgrado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, UNAM. Investigación Biomédica, Fundación Clínica Médica Sur.

Correspondencia:

Jorge Alan López Velázquez

Biol., Candidato M. en C. Investigación Biomédica, Fundación Clínica Médica Sur. Sillón de Mendoza, Núm. 110.  
Col. Toriello Guerra. Deleg. Tlalpan, C.P. 14050, México, D.F. Tel.: 5424-7200. Correo electrónico: alanl.velazquez@gmail.com

interacciones covalentes al interior de la bilirrubina determina la alta hidrofobicidad de la molécula en medio acuoso (Figura 1).



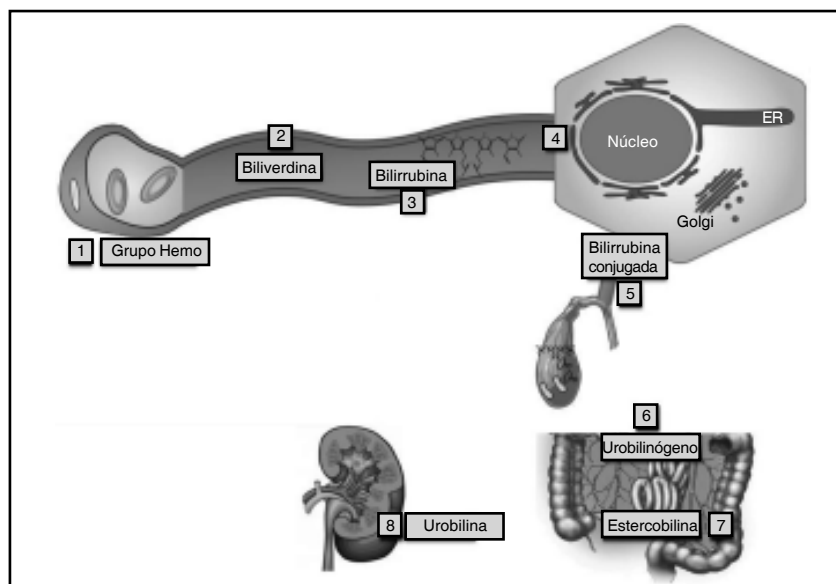
**Figura 1.** Estructura química de la bilirrubina no conjugada IXa. Las interacciones al interior de la molécula hacen que adopte espacialmente una forma que asemeja a un libro semi-abierto. Las líneas punteadas representan los enlaces de hidrógeno intramoleculares que le dan la propiedad de molécula lipofílica y neurotóxica.<sup>27</sup>

Los dobles enlaces internos de cada uno de los anillos explican la inestabilidad de la molécula por su capacidad altamente oxidable y fotosensible que, aunado a su baja solubilidad, la hacen una molécula difícilmente manipulable en el laboratorio, que requiere condiciones muy controladas en cuanto a niveles de pH, oxígeno y luz.<sup>3</sup>

## METABOLISMO DE LA BILIRRUBINA

En una persona sana, la producción diaria promedio de bilirrubina es aproximadamente de 0.5 mmol (250-300 mg).<sup>4</sup> La bilirrubina se forma después de la degradación del grupo hemo proveniente de la hemoglobina de eritrocitos senescentes (80%) y otras hemoproteínas, como citocromos, catalasa, peroxidasa, pirrolasa y mioglobina. La degradación del grupo hemo y posterior formación de bilirrubina son catalizadas por dos enzimas, una microsomal y otra citosólica: la hemo oxigenasa y la biliverdina reductasa, respectivamente. Ambas enzimas utilizan al NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) como cofactor y están presentes en todos los tejidos, pero abundan principalmente en células del retículo endotelial, hepatocitos, túbulos renales y en la mucosa intestinal.<sup>5</sup>

La degradación del grupo hemo se considera el primer paso en la formación de la bilirrubina, así como la reacción limitante (Figura 2). En este proceso se forma una molécula de monóxido de carbono y una de biliverdina, que es convertida a bilirrubina por la acción de la enzima biliverdina reductasa.<sup>4,6</sup> La bilirrubina circulante es transportada por medio de su unión reversible y no covalente



**Figura 2.** Metabolismo de la bilirrubina. 1. Degradación de hemoproteínas en sistema reticuloendotelial. 2. Síntesis de biliverdina por la hemo oxigenasa. 3. La biliverdina reductasa transforma biliverdina en bilirrubina. 4. En el hepatocito se desprende la albúmina unida a la bilirrubina. 5. La UDP-glucuronil acil transferasa forma conjugados de bilirrubina que se excretan en la bilis. 6. Las bacterias del intestino delgado forman urobilinógeno. 7. En el colon se forma estercobilina que da color a las heces. 8. En el riñón se forma urobilina que da color a la orina.

con la albúmina, la fracción resultante se le denomina bilirrubina indirecta o no conjugada.<sup>7</sup> Una vez que la bilirrubina indirecta unida a la albúmina es transportada al hígado, atraviesa la membrana basolateral de los hepatocitos y se disocia de la albúmina, a través del OATP2 (transportador de aniones orgánicos tipo 2), un miembro de la familia de transportadores de aniones orgánicos.<sup>8</sup> Dentro del citosol, proteínas citosólicas, como la ligandina Y y Z, se unen a la bilirrubina y la transportan hacia el retículo endoplásmico liso del hepatocito para su conjugación con ácido glucurónico, y así evitar el regreso del pigmento libre hacia el plasma.<sup>9</sup> En presencia del co-sustrato uridina difosfato (UDP), la enzima uridina difosfoglucuronil acil transferasa (UDP-GT) cataliza la conjugación de la bilirrubina en su forma hidrofóbica a conjugados monoglucurónidos y diglucurónidos de bilirrubina (hidrofílicos), a los cuales en conjunto se les denomina como bilirrubina directa, siendo capaces de ser excretados; llevándose a cabo desde el retículo endoplásmico hacia la membrana celular canalicular, dentro del canalículo biliar por medio de una bomba exportadora dependiente de adenosin trifosfato, conocida como proteína 2 de resistencia múltiple a fármacos (MRP2). Esta etapa constituye el paso limitante en la síntesis de la bilirrubina, por lo que en el daño hepático agudo y crónico se promueve el aumento de bilirrubina conjugada.<sup>3</sup> Cabe mencionar que la actividad de la UDP-GT se mantiene aún en presencia de daño hepatocelular agudo o crónico, incluso aumenta en la colestasis debido al aumento en la expresión de la familia de genes (UGT1 en humanos) que la codifica.<sup>10,11</sup>

Las concentraciones séricas de bilirrubina se ven influenciadas por diversos factores, incluyendo el tabaco, el género, al ayuno, la ingesta de productos herbáceos y medicamentos, la altitud, la raza y la edad.<sup>12</sup>

La bilirrubina total es la suma de las fracciones no conjugada y conjugada. El equilibrio entre la formación y depuración hepáticas de bilirrubina posibilita concentraciones plasmáticas relativamente bajas, entre 5.1 y 17.1  $\mu\text{mol/L}$  (0.3 a 1.0 mg/100 mL). La excreción hepática de

bilirrubina se desarrolla en cuatro pasos: captación hepática de la bilirrubina circulante, tránsito y almacenamiento celular, conjugación y secreción biliar.<sup>13,14</sup>

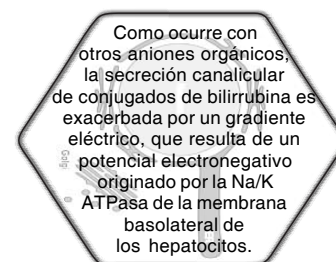
En la vesícula biliar, 80-85% de la bilis se encuentra formada por

diglucurónidos de bilirrubina, mientras que 15-19% la constituyen monoglucurónidos de bilirrubina; la composición restante se conforma de trazas de bilirrubina no conjugada.<sup>15</sup>

La bilirrubina conjugada excretada dentro de la bilis fluye hacia el duodeno y atraviesa sin cambios el intestino delgado proximal hasta que alcanza el intestino delgado distal y el colon, donde es hidrolizada a bilirrubina no conjugada por medio de la enzima  $\beta$  glucuronidasa proveniente de las bacterias intestinales. La bilirrubina resultante es reducida por la flora intestinal hacia urobilinógeno; 80-90% de éste es excretado en las heces fecales sin cambios u oxidado a urobilina o estercobilina, productos que confieren el color característico de la orina y las heces, respectivamente. De 10-20% restante del urobilinógeno es absorbido de forma pasiva y recirculado a través de la circulación enterohepática para su reconjugación y posterior excreción hacia la bilis. Trazas de esta bilirrubina absorbida en la circulación enterohepática escapa de la captación hepática hacia la circulación sistémica, siendo filtrada a través del glomérulo para ser excretada en la orina.<sup>16</sup>

## IMPORTANCIA BIOQUÍMICA Y CLÍNICA DE LA BILIRRUBINA

La ictericia y la hiperbilirrubinemia son indicadores de hepatopatía. La ictericia se define como la coloración amarillenta de la piel, las escleróticas y las membranas



mucosas, debido a una elevación anormal de la concentración de bilirrubina sérica, considerándose como el primer signo más común de las hepatopatías. El depósito de bilirrubina en los tejidos se presenta sólo cuando existe hiperbilirrubinemia, siendo generalmente un signo de disfunción hepática, aunque es menos común que exista como resultado de un desorden hemolítico<sup>9,17</sup> (Tabla 1).

En la hepatitis aguda con frecuencia se presentan episodios de ictericia que generalmente se resuelven. Por el contrario, en otras alteraciones hepatocelulares, como hepatitis alcohólica, cirrosis alcohólica, cirrosis no alcohólica y en el daño hepático inducido por drogas (DILI, por sus siglas en inglés), la ictericia tiene un mal pronóstico. La evidencia muestra la asociación de la ictericia con un pronóstico elevado de mortalidad en pacientes con septicemia o politraumatizados. Por otro lado, en la cirrosis

biliar primaria la ictericia se ha clasificado como un indicador principal de pronóstico pobre, siendo las determinaciones seriales de bilirrubina empleadas por el clínico con el fin de definir el tiempo apropiado de trasplante hepático.<sup>10</sup> Cabe mencionar que las alteraciones del flujo biliar originadas por obstrucción del conducto biliar intra o extrahepático conducen a ictericia.<sup>10</sup>

Diversos estudios han demostrado que altas concentraciones de bilirrubina, tanto en plasma como tisulares, son citotóxicas. En la hiperbilirrubinemia no conjugada severa, como en los neonatos y en el síndrome de Crigler-Najjar, se pueden formar depósitos de bilirrubina en el sistema nervioso central (SNC), ocasionando daño neurológico.<sup>18</sup> Estudios *in vitro* recientes demuestran que la fracción de bilirrubina libre plasmática determina la difusión de bilirrubina indirecta hacia las células y su neurotoxi-

**Tabla 1.** Hiperbilirrubinemia.

Metabolismo normal	Alteración	Tipo de hiperbilirrubinemia
1. Producción (250-300 mg/día) a partir de: Degradación de hemoglobina eritrocitaria Degradación de mioglobina Síntesis de hemo en la médula ósea.	Hemólisis Diseritropoyesis	No conjugada
2. Transporte en plasma unido a albúmina	Unión competitiva a salicilatos, algunos ácidos grasos, sulfonamidas.	
3. Captación en los hepatocitos: Transporte por OATP	Inhibición por indinavir, ciclosporina A, rifamicina.	
Unión a ligandinas y a proteínas de unión a AG	Inmadurez neonatal de ligandina. Síndrome de Rotor.	
4. Conjugación en microsomas	Inmadurez neonatal. Síndrome de Crigler-Najjar. Síndrome de Gilbert. Inhibición por novobiocina, atazanavir, ketoconazol. Falta de conjugación (cirrosis, TIPS).	
5. Secreción biliar Canalículo biliar	Inmadurez neonatal. Defectos en MRP2: Síndrome Dubin-Johnson. MDR3/PFIC3: colestasis del embarazo. Cirrosis, hepatitis.	Conjugada
Conducto biliar		
6. Destino intestinal Deconjugación enzimática Reducción bacteriana a urobilinógenos Eliminación fecal	Ausencia neonatal de bacterias.	

Alteraciones en el metabolismo y transporte de bilirrubina. OATP: proteína transportadora de aniones orgánicos tipo 2. AG: ácidos grasos. TIPS: derivación porto-sistémica intrahepática transyugular, por sus siglas en inglés. MRP2: proteína de resistencia a múltiples drogas tipo 2. MDR3: bomba exportadora de fosfolípidos. PFIC3: colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 3, por sus siglas en inglés.

dad, más que la concentración total de bilirrubina indirecta.<sup>19</sup> El depósito de bilirrubina en el SNC es selectivo y difiere en cuanto a la sensibilidad de las células hacia la citotoxicidad de la bilirrubina; otros factores determinan también el nivel de toxicidad de la bilirrubina libre, por ejemplo:<sup>20-23</sup>

- La capacidad del SNC para exportar bilirrubina no conjugada, dado por la presencia del transportador dependiente de ATP (MRP1) en el epitelio del plexo coroideo, neuronas y astrocitos.
- Disponibilidad de ligandina y otras proteínas de unión a la bilirrubina en el citosol de las células del SNC.
- La capacidad de las células del SNC de metabolizar bilirrubina no conjugada hacia productos menos tóxicos, por medio de conjugación y/u oxidación.
- El balance entre los niveles y actividad oxidante/antioxidante y factores apoptóticos/antiapoptóticos regulados en las células del SNC, así como su regulación por parte de la bilirrubina.

### HIPERBILIRRUBINEMIA NEONATAL

La también conocida ictericia fisiológica del neonato es causada por la retención de bilirrubina no conjugada durante un periodo posnatal transitorio de desequilibrio en la producción y eliminación de bilirrubina. Cuando este proceso se exagera, la acumulación anormal de bilirrubina IX alfa conlleva a la muerte del neonato o, en el mejor de los casos, se presenta clínicamente acompañado de un conjunto de secuelas conocidas como *kernicterus* (parálisis cerebral, disfunción auditiva, alteraciones cognitivas, trastornos en el movimiento ocular).<sup>24,25</sup> Este daño neurológico inducido por la bilirrubina ocurre como resultado de diversos factores que suceden en el recién nacido, por ejemplo:

- Existe una gran cantidad de hemoglobina en el neonato comparado con el adulto, lo cual aumenta la producción de bilirrubina.
- Niveles disminuidos de albúmina plasmática, lo que favorece la disminución del transporte hacia el hígado.
- Tasa de conjugación disminuida a consecuencia de la baja cantidad de UDP-glucuronidos, así como la inmadurez de la enzima UDP-glucuronilaciltransferasa.
- Inmadurez del aparato de secreción biliar.
- Ausencia de flora bacteriana que resulta en la elevación de la degradación de bilirrubina, así como un aumento en la desconjugación de mono o diglucuróni-

dos de bilirrubina hacia bilirrubina no conjugada debido a la circulación enterohepática.<sup>23,26,27</sup>

### NUEVAS IMPLICACIONES

Durante la formación de bilirrubina diversas enzimas están implicadas en la regulación de las reacciones limitantes, como la hemooxigenasa, biliverdina y la uridina difosfoglucuronil transferasa 1A1.<sup>28</sup> Recientemente, en cada una de ellas, incluyendo a la bilirrubina, se ha demostrado su impacto en el desarrollo de algunas enfermedades metabólicas, eventos cardiovasculares, síndrome metabólico, diabetes, hipertensión arterial y obesidad.<sup>12,29</sup>

Desde 1954 se demostró la actividad antioxidante de la bilirrubina.<sup>30</sup> Sin embargo, ha sido hasta los últimos años que la investigación científica se ha enfocado en explorar esta implicación fisiológica. Se ha descubierto que la bilirrubina posee un efecto protector antioxidante sobre los lípidos de las membranas, siendo mayor con respecto al glutatión, el cual básicamente sólo confiere protección a las proteínas.<sup>31</sup> Más aún, la bilirrubina ha mostrado tener un efecto protector sobre la oxidación de LDL, treinta veces mayor con respecto a los análogos de la vitamina E.<sup>32</sup> Aunado a esto, la bilirrubina se ha propuesto como la principal molécula que contribuye a la capacidad antioxidante total plasmática. Por otro lado, en los últimos años se han demostrado propiedades antiinflamatorias por medio de estudios *in vitro*, basadas en la inhibición del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), regulando positivamente a la E-selectina, la molécula 1 de adhesión celular vascular (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1).<sup>33</sup> En el ámbito metabólico se ha demostrado consistentemente que sujetos que presentan niveles bajos de bilirrubina presentan mayor riesgo de desarrollar enfermedad coronaria y aterosclerótica periférica.<sup>34</sup> Por el contrario, en sujetos con síndrome de Gilbert, quienes cursan con hiperbilirrubinemia moderada, presentan un menor riesgo de enfermedad cardiovascular.<sup>35</sup> La evidencia clínica ha demostrado que concentraciones ligeramente elevadas de bilirrubina en pacientes diabéticos predisponen a la disminución en las complicaciones de base,<sup>36,37</sup> existiendo una correlación negativa entre los niveles de bilirrubina y las pruebas de tolerancia a la glucosa,<sup>38</sup> así como una baja prevalencia de síndrome metabólico<sup>39,40</sup> y de obesidad abdominal.<sup>41</sup>

### CONCLUSIONES

La bilirrubina, el principal pigmento biliar en mamíferos, es el producto final del metabolismo del grupo hemo.

Esta molécula, antiguamente descubierta, es una molécula interesante por las propiedades fisicoquímicas que presenta, dadas –en esencia– por su estructura. Aunque en elevadas concentraciones séricas resulta severamente neurotóxica en humanos, niveles ligeramente elevados de bilirrubina ejercen una acción citoprotectora a través de capturar especies reactivas de oxígeno. Diversas y crecientes evidencias sugieren que los productos bioquímicos involucrados en el metabolismo del hemo tienen efectos moleculares cruciales con posibles implicaciones terapéuticas con consecuencias favorables para múltiples procesos fisiopatológicos.

## ABREVIATURAS

- ATP: adenosin trifosfato.
- DILI: drug induced liver injury (daño hepático inducido por drogas).
- ICAM-1: molécula de adhesión intercelular tipo 1.
- LDL: low density lipoprotein (lipoproteína de baja densidad).
- mmol: milimolar.
- MRP1: proteína resistente a múltiples drogas tipo 1.
- MRP2: proteína resistente a múltiples drogas tipo 2.
- NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido.
- OATP2: proteína transportadora de aniones orgánicos tipo 2.
- pH: potencial de hidrógeno.
- SNC: sistema nervioso central.
- TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor alfa, factor de necrosis tumoral alfa.
- UDP: uridina difosfato.
- UDP-GT: uridina difosfato glucuronil aciltransferasa.
- VCAM-1: molécula de adhesión vascular tipo 1.

## REFERENCIAS

1. Bonnett R, Davies JE, Hursthouse MB. Structure of bilirubin. *Nature* 1976; 262: 326-8.
2. Ostrow JD, Mukerjee P, Tiribelli C. Structure and binding of unconjugated bilirubin: relevance for physiological and pathophysiological function. *J Lipid Res* 1994; 35: 1715-37.
3. Vitek L, Ostrow JD. Bilirubin chemistry and metabolism; harmful and protective aspects. *Curr Pharm Des* 2009; 15: 2869-83.
4. Berk PD, Howe RB, Bloomer JR, Berlin NI. Studies of bilirubin kinetics in normal adults. *J Clin Invest* 1969; 48: 2176-90.
5. Fevery J, Vanstapel F, Blanckaert N. Bile pigment metabolism. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1989; 3: 283-312.
6. Tenhunen R, Ross ME, Marver HS, Schmid R. Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate dependent biliverdin reductase: partial purification and characterization. *Biochemistry* 1970; 9: 298-303.
7. Weisiger RA, Ostrow JD, Koehler RK, Webster CC, Mukerjee P, Pascolo L, Tiribelli C. Affinity of human serum albumin for bilirubin varies with albumin concentration and buffer composition-Results of a novel ultrafiltration method. *J Biol Chem* 2001; 276: 29953-60.
8. Cui Y, König J, Leier I, Buchholz U, Keppler D. Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *J Biol Chem* 2001; 276: 9626-30.
9. Wang X, Chowdhury JR, Chowdhury NR. Bilirubin metabolism: applied physiology. *Current Pediatrics* 2006; 16: 70-74.
10. Roy Chowdhury N, Arias IM, Wolkoff AW, Roy Chowdhury J. Disorders of bilirubin metabolism. In: Arias IM, Jakoby WB, Schachter D, Shafritz DA (ed.). *The liver: biology and pathobiology*. 3rd Ed. New York: Raven Press; 2001.
11. Fevery J, Blanckaert N, Heirwegh KPM, Preaux AM, Berhelot P. Unconjugated bilirubin and an increased proportion of bilirubin monoconjugates in the bile patients with Gilbert's syndrome and Crigler Najjar disease. *J Clin Invest* 1977; 60: 970-9.
12. Vitek L, Schwertner HA. The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem* 2007; 43: 1-57.
13. Fevery J, Van D, Michiels R, De Groote J, Heirwegh KP. Bilirubin conjugates in bile of man and rat in the normal state and in liver disease. *J Clin Invest* 1972; 51: 2482-92.
14. Muraca M, Rubaltelli FF, Blanckaert N, Fevery J. Unconjugated and conjugated bilirubin pigments during perinatal development. II. Studies on serum of healthy newborns and of neonates with erythroblastosis fetalis. *Biol Neonate* 1990; 57: 1-9.
15. Weiss JS, Gautam A, Lauff JJ, Sundberg MW, Jatlow P, Boyer JL, Seligson D. The clinical importance of a protein-bound fraction of serum bilirubin in patients with hyperbilirubinemia. *N Engl J Med* 1983; 309: 147-50.
16. Blake MJ, Castro L, Leeder JS, Kearns GL. Ontogeny of drug metabolizing enzymes in the neonate. *Semin Fetal Neonatal Med* 2005; 10: 123-38.
17. Gazzini S, Strazielle N, Tiribelli C, Ghersi-Egea JF. Transport and metabolism at blood brain interfaces and in neural cells: relevance to bilirubin-induced encephalopathy. *Front Pharmacol* 2012; 3: 1-13.
18. Calligaris SD, Bellarosa C, Giraudi P, Wennberg RP, Ostrow JD, Tiribelli C. Cytotoxicity is predicted by unbound and not total bilirubin concentration. *Pediatr Res* 2007; 62: 576-80.
19. Ostrow JD, Pascolo L, Brites D, Tiribelli C. Molecular basis of bilirubin-induced neurotoxicity. *Trends Mol Med* 2004; 10: 65-70.
20. Bhutani VK, Maisels MJ, Stark AR, Buonocore G. Management of jaundice and prevention of severe neonatal hyperbilirubinemia in infants  $\geq$  35 weeks gestation. *Neonatology* 2008; 94: 63-7.
21. Shapiro SM. Bilirubin toxicity in the developing nervous system. *Pediatr Neurol* 2003; 29: 410-21.
22. Falcao AS, Fernandes A, Brito MA, Silva RF, Brites D. Bilirubin-induced immunostimulant effects and toxicity vary with neural cell type and maturation state. *Acta Neuropathol* 2006; 112: 95-105.
23. Ostrow JD, Pascolo L, Brites D, Tiribelli C. Molecular basis of bilirubin-induced neurotoxicity. *Trends Mol Med* 2004; 10: 65-70.
24. American Academy of Pediatrics, Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. *Pediatrics* 2004; 114: 297-316.
25. Shapiro SM. Definition of the clinical spectrum of kernicterus and bilirubin induced neurological dysfunction (BIND). *J Perinatol* 2005; 25: 54-9.

26. Strauss KA, Robinson DL, Vreman HJ, Puffenberger EG, Hart G, Morton DH. Management of hyperbilirubinemia and prevention of kernicterus in 20 patients with Crigler -Najjar disease. *Eur J Pediatr* 2006; 165: 306-31.
27. Ahlfors CH, Wennberg RP, Ostrow JD, Tiribeli C. Unbound (Free) Bilirubin: Improving the Paradigm for Evaluating Neonatal Jaundice. *Clinical Chemistry* 2009; 55: 1288-99.
28. Vitek L, Schwertner HA. The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem* 2007; 43: 1-57.
29. Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 16093-8.
30. Bernard K, Ritzel G, Steiner KU. Über eine biologische bedeutung der gallenfarbstoffe: bilirubin und biliverdin als antioxidantien für das vitamin A und die essentiellen Fettsäuren. *Helv Chim Acta* 1954; 37: 306-13.
31. Sedlak TW, Saleh M, Higginson DS, Paul BD, Juluri KR, Snyder SH. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 5171-6.
32. Wu TW, Fung KP, Yang CC. Unconjugated bilirubin inhibits the oxidation of human low density lipoprotein better than Trolox. *Life Sci* 1994; 54: 477-81.
33. Mazzone GL, Rigato I, Ostrow JD, Bossi F, Bortoluzzi A, Sukowati CH, Tedesco F, et al. Bilirubin inhibits the TNF alpha-related induction of three endothelial adhesion molecules. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 386: 338-44.
34. Vitek L, Novotný L, Šperl M, Holaj R, Spáčil J. The inverse association of elevated serum bilirubin levels with subclinical carotid atherosclerosis. *Cerebrovasc Dis* 2006; 21: 408-14.
35. Vitek L, Jirsa M, Brodanová M, Kaláb M, Marecek Z, Danzig V, Novotný L, et al. Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis* 2002; 160: 449-56.
36. Yasuda M, Kiyohara Y, Wang JJ, Arakawa S, Yonemoto K, Doi Y, Ninomiya T, et al. High serum bilirubin levels and diabetic retinopathy: the Hisayama Study. *Ophthalmology* 2011; 118: 1423-8.
37. Han SS, Na KY, Chae DW, Kim YS, Chin HJ. High serum bilirubin is associated with the reduced risk of diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Tohoku J Exp Med* 2010; 221: 133-40.
38. Ko GT, Chan JC, Woo J, Lau E, Yeung VT, Chow CC, Li JK, et al. Serum bilirubin and cardiovascular risk factors in a Chinese population. *J Cardiovasc Risk* 1996; 3: 459-63.
39. Choi SH, Yun KE, Choi HJ. Relationships between serum total bilirubin levels and metabolic syndrome in Korean adults. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011. Doi:10.1016/j.numecd.2011.03.001.
40. Andersson C, Weeke P, Fosbøl EL, Brendorp B, Køber L, Coutinho W, Sharma AM, et al. Acute effect of weight loss on levels of total bilirubin in obese, Cardiovascular high-risk patients: an analysis from the lead-in period of the sibutramine cardiovascular outcome trial. *Metab Clin Exp* 2009; 58: 1109-15.
41. Vitek L. The role of bilirubin in diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases. *Front Pharmacol* 2012; 3: 1-7.