

TEMA MEDICO DE ACTUALIDAD

Ictericia y el metabolismo de la bilirrubina. Nuevos conceptos.

por

Dr. Mario Miranda G. *

I. INTRODUCCION

La ictericia es uno de los signos físicos que más han llamado la atención de los clínicos, y es forzoso que se mencionara desde que los observadores dejaron escritas sus impresiones sobre los procesos mórbidos.

Hipócrates describió este signo, y Galeno, a fines del siglo segundo D. C. la asoció a los cálculos biliares.

El número de causas que pueden producir ictericia se ha ido ampliando conforme los hechos se han ido interpretando mejor. Sin embargo, las afecciones icterogénicas comunes no son muchas: hepatitis a virus, neoplasias, cirrosis hepática y cálculos biliares. La confirmación clínica de ictericia por lo general produce un relativo descanso mental en el médico, ya que hoy día establecer su origen sigue etapas bien precisas, y por lo general fructíferas.

En el campo del metabolismo de la bilirrubina y la íntima etiopatogenia de la ictericia ha habido avances recientes importantes y definidos, que han motivado esta revisión.

II. EVOLUCION DE LOS CONOCIMIENTOS RESPECTO AL METABOLISMO DE LA BILIRRUBINA

La relación entre la hemoglobina y los pigmentos biliares fue demostrada por Virchow quien describió la formación de cristales de bilirrubina en sangre extravasada, y su conversión se demostró introduciendo hemoglobina en las venas de perros con fístulas biliares, observándose un aumento de la excreción de pigmentos biliares.

* Jefe de Clínica, Sección de Medicina, Hospital San Juan de Dios.
Asistente de Medicina, Hospital Central, Caja Costarricense de Seguro Social.

A principios del presente siglo los investigadores estuvieron atareados tratando de establecer si el hígado se limitaba a excretar la bilirrubina, o si la formaba y la excretaba. El problema fue resuelto cuando se practicaron hepatectomías totales en mamíferos, observándose que la desintegración de la hemoglobina se produce en el sistema retículo endotelial, y que la bilirrubina así formada es transportada al hígado, que la excreta en la bilis.

En 1913 van den Bergh y Snapper (1) idearon un procedimiento para la determinación cuantitativa de la bilirrubina en el plasma, utilizando el reactivo de Erlich para la bilirrubinuria. En este método, que es el fundamento de todos los que se usan hoy día, se agrega alcohol para producir un medio homogéneo en el cual son solubles la bilirrubina y el reactivo. Debido a una omisión accidental, van den Bergh y Müller (2) encontraron que el alcohol no era necesario para la producción de la coloración cuando se utiliza bilis como fuente de pigmento, y que también se producía una reacción "directa" en el plasma de pacientes con ictericia obstructiva o hepatitis. Sin embargo, el alcohol era necesario para producir coloración con plasma normal o de pacientes con ictericia hemolítica. Esta reacción se denominó "indirecta", y al pigmento así medido "bilirrubina indirecta", en contraste con la "bilirrubina directa". Quedaba claro que el hígado producía algún cambio en la bilirrubina, haciendo variar la reacción.

Las diferencias entre la bilirrubina directa e indirecta se resumen en el cuadro número 1.

CUADRO N° 1

Diferencias entre los dos tipos de bilirrubina (Según Billing y Lathe (3))

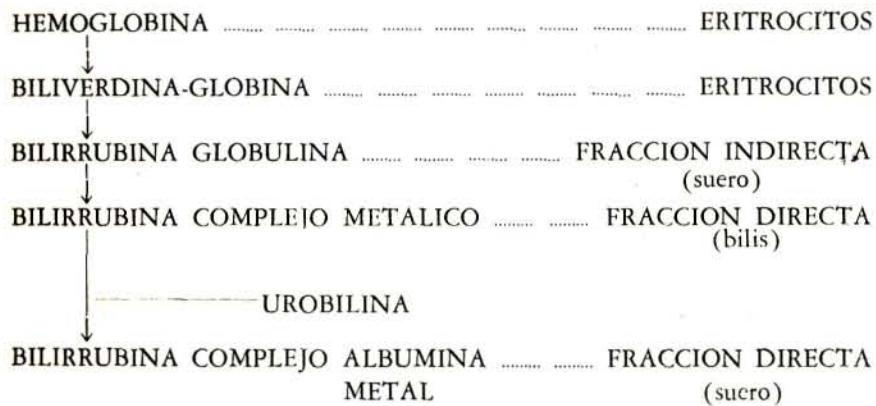
PROPIEDAD	BILIRRUBINA	
	"Indirecta"	"Directa"
Reacción de van den Bergh	Indirecta	Directa
Solubilidad en solución acuosa en pH ácido o neutro	—	+
Solubilidad en cloroformo o solventes de lípidos	+	—
Presencia en orina de ictericos	—	+
Presencia en la bilis	—	+
Afinidad por tejido cerebral	+	—
Enlace con la albúmina plasmática	+	+
Afinidad por las proteínas desnaturalizadas del plasma	—	+
Facilidad de oxidación	+	++
Asociación con ictericia hemolítica	++	(+)
Asociación con ictericia obstructiva y hepatitis	+	+++

Desde entonces se ha gastado mucha energía y papel tratando de explicar las diferencias entre ambos tipos de bilirrubina. Algunos autores consideraron que había dos tipos de pigmento, mientras que por ejemplo Najjar (4) consideraba la forma indirecta como bilirrubina ligada a una globulina, y a la directa como bilirrubina formando una molécula compleja con un metal, de modo que el alcohol era necesario para desunir la bilirrubina de la globulina y permitirle reaccionar con el ácido sulfanílico diazoado (Cuadro N° 2).

CUADRO N° 2

Etapas de transformación de hemoglobina a bilirrubina

(Según Najjar - 1952 (4))



III. AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DEL METABOLISMO DE LA BILIRRUBINA

En 1953 Cole y Lathe (5) iniciaron una serie de investigaciones que culminaron recientemente con la identificación de la naturaleza de las bilirrubinas directa e indirecta, produciendo así el único adelanto de envergadura acerca del metabolismo de los pigmentos biliares que se ha producido en los últimos 35 años. Las investigaciones iniciales consistieron en la separación y aislamiento de los dos tipos de bilirrubina mediante el uso de cromatografía en kieselghur tratado con silicon, demostrando que ambas están libres de cualquier unión con fracciones proteicas. Se ha demostrado que la bilirrubina, que es insoluble en agua, es liberada al torrente sanguíneo por el sistema retículo endotelial, de donde es transportada unida a las proteínas del plasma, predominantemente albúmina. En el hígado la bilirrubina insoluble es conjugada con una sustancia hidrofílica que convierte al pigmento en una forma soluble en agua, forma adecuada para ser excretada en la bilis. Esta sustancia solubilizante se ha demostrado que es ácido glucurónico, y que en la bilis prácticamente toda la bilirrubina está en forma de glucuronato de bilirrubina.

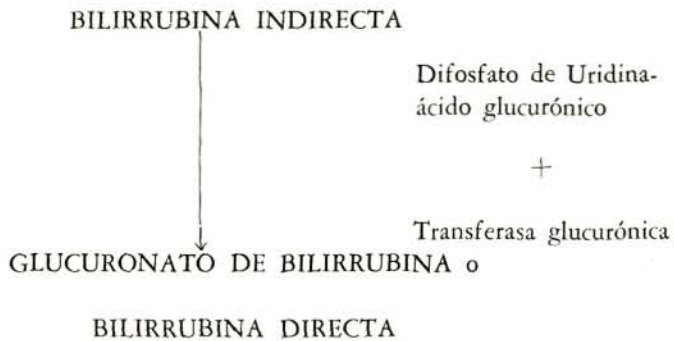
Que la bilirrubina directa es un glucuronato fue demostrado simultáneamente por tres grupos independientes de investigadores, a saber: Talafant en

Praga, Billing, Lathe y Cole en Inglaterra y Schmid en Estados Unidos (6).

La formación del glucuronato de bilirrubina en el hígado es un proceso enzimático. El ácido glucurónico tiene que estar en su forma activa, unido al difosfato de uridina, formando el complejo difosfato de uridina ácido glucurónico. En los microsomas del hígado se encuentra la enzima que transporta el ácido glucurónico de su complejo con el difosfato de uridina y lo une a la bilirrubina; esta enzima se ha denominado transferasa del ácido glucurónico (7). (Cuadro 3).

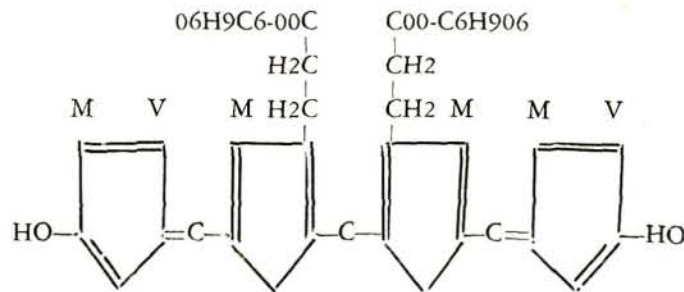
CUADRO N° 3

Síntesis del Glucuronato de Bilirrubina (7)

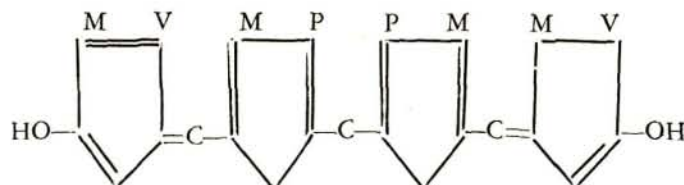


La bilirrubina se conjuga con el ácido glucurónico a través de su grupo carboxilo (8). La estructura de la bilirrubina libre y conjugada es como sigue (6):

Bilirrubina Conjugada de Reacción "DIRECTA"



Bilirrubina Libre de Reacción "INDIRECTA"



La conjugación intrahepática con el ácido glucurónico no es un proceso exclusivo de la bilirrubina y hay evidencia de que las siguientes sustancias endocrinas forman glucuronatos (9): estradiol, estriol, androsterona, testosterona, alopregnano 3beta 20beta diol, 4-4'-dihidroxi-alfa-beta-dietilestilbeno, pregnano alfa 20 alfa diol, L-tirosina y tetrahidrocortisona. Estos glucuronatos no poseen actividad fisiológica y a menudo son más solubles en agua que la sustancia original.

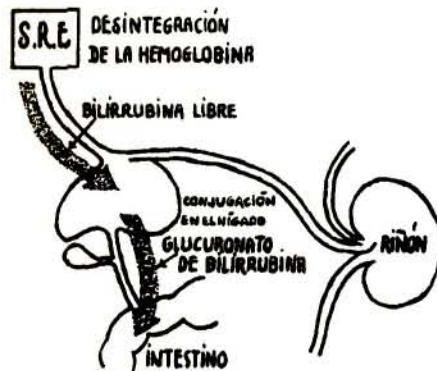
IV. LA APLICACION DE ESTOS CONOCIMIENTOS EN LA INTERPRETACION DE LA PATOGENIA DE LAS ICTERICIAS

Por el momento, entonces, puede decirse que en el hígado la bilirrubina sufre dos procesos: primero, la conjugación enzimática del pigmento con el ácido glucurónico; y segundo, la excreción del pigmento y su concentración en la bilis.

En condiciones fisiológicas, tanto el mecanismo de conjugación como el de excreción parecen ser altamente eficientes, y como resultado no hay retención de bilirrubina en el suero (Gráfico 1). Sin embargo, si la carga de pigmento que llega al hígado aumenta mucho, como en la ictericia hemolítica, el mecanismo de conjugación en el hígado se hace insuficiente, y la bilirrubina libre que no puede ser conjugada circula en el plasma aumentando la bilirrubinemia. La ausencia de bilirrubinuria en esta eventualidad ha servido por largo tiempo para diferenciarla de otros tipos de ictericia (Gráfico 2).

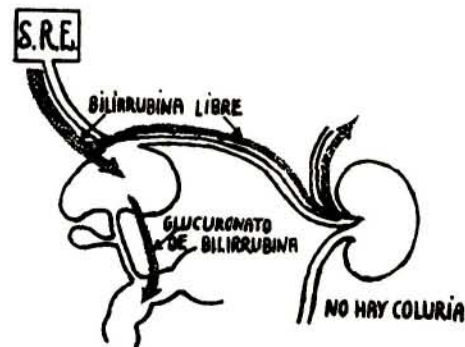
GRAFICOS Nos. 1 y 2 — Tomados de Butts y Col. (6)

Nº 1



No. 1
Metabolismo Normal
de la BILIRRUBINA

Nº 2

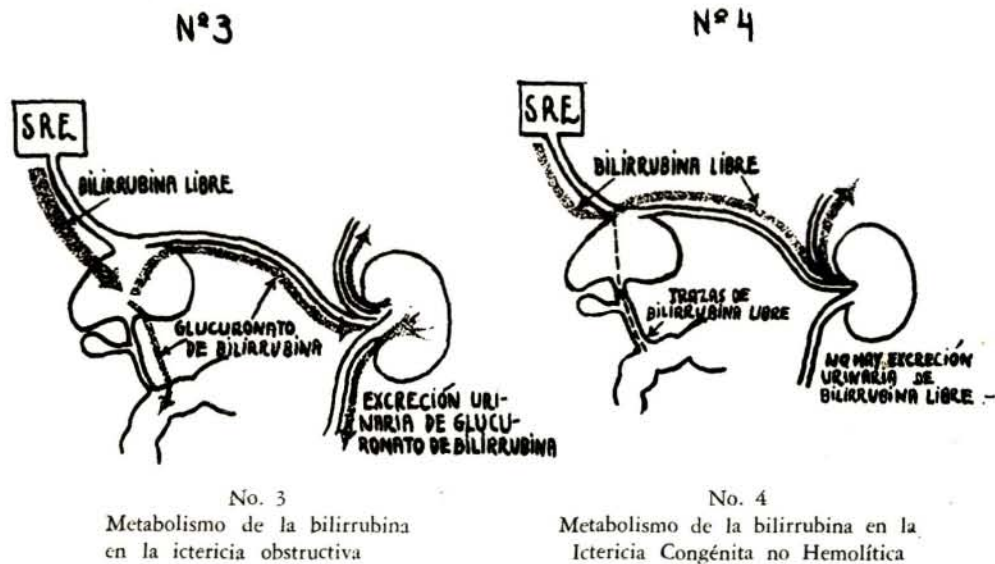


No. 2
Metabolismo de la Bilirrubina
en la Ictericia Hemolítica

En los casos en que la ictericia es debida a obstrucción o hepatitis la situación es diferente. En este caso la formación de bilirrubina conjugada en el hígado no está alterada, pero por razones varias el pigmento no puede llegar al intestino. Esto produce una regurgitación de bilirrubina conjugada dentro del plasma, resultando en elevación de la bilirrubinemia directa y también en bilirrubinuria debido a que la forma hidrosoluble del pigmento es excretada rápidamente en la orina (Gráfico 3).

Si asumimos que la conjugación de la bilirrubina con el ácido glucurónico es indispensable para su excreción en la bilis, y que al intestino no pueden llegar cantidades apreciables de bilirrubina no conjugada, entonces teóricamente puede producirse un tipo de ictericia debido a un defecto en el mecanismo de conjugación, reteniéndose bilirrubina no conjugada. Sería un tipo de ictericia parecido a la hemolítica, pero en el cual no hay hemólisis, o sea, no hay sobrecarga de pigmentos (Gráfico 4).

GRAFICOS Nos. 3 y 4 — (Según Butts y Col. (6))



La existencia de ictericias de este tipo, o sea, acolúricas y no hemolíticas, ha sido confirmado.

En 1938 el genetista canadiense Gunn describió un tipo de ictericia acolúrica no hemolítica en una cepa mutante de ratas Wistar; las homocigotas desarrollaban ictericia poco después del nacimiento y a menudo desarrollaban kernicterus. Posteriormente se ha demostrado que en el hígado de estas ratas hay una marcada deficiencia de la transferasa glucurónica, explicando así el mecanismo de producción de la ictericia.

En 1952 Crigler y Najjar (10) describieron el cuadro clínico que lleva su nombre, en siete niños, los cuales provenían de tres familias emparentadas entre sí. El cuadro clínico fue muy similar en todos los casos: ictericia desde el segundo día de la vida, asintomática, sin alterar el estado general, sin hepatomegalia, ni síntomas de anemia. En cuatro de los casos hubo kernicterus con manifestaciones varias en diferentes grados. Un solo caso vivía aún a los 18 meses de edad y sin kernicterus, y la muerte más temprana se registró a los 18 días de edad. Los niveles de bilirrubina en sangre oscilaron entre 10 y 44 mgm%, casi toda la bilirrubina era indirecta pues la directa nunca fue mayor de 2 a 4 mgm. Con excepción hecha de la prueba de excreción de bilirrubina que demostró una retención definitiva de la bilirrubina inyectada, las demás pruebas de funcionamiento hepático estaban dentro de límites normales. Por medio de estudios de grupo sanguíneo y Rh se excluyó incompatibilidades, y por medio de la fragilidad de los eritrocitos, porcentaje de reticulocitos y otras pruebas se descartó la existencia de un factor hemolítico. Las lesiones histopatológicas hepáticas no explicaron el proceso patológico, pues consistieron fundamentalmente en trombos biliares en los canalículos, sin relación con el grado o edad de la ictericia, y ligera fibrosis periportal en algunos de los casos. Las exanguinotransfusiones sólo produjeron reducción temporal de la bilirrubinemia y no se observó ninguna respuesta al ACTH, cortisona o extracto hepático. Schmid (11) examinó la bilis de tres niños con un síndrome similar al descrito y encontró que es incolora y sólo contiene trazas de bilirrubina conjugada, encontró además que la capacidad de estos niños para conjuguar el ácido glucurónico con mentol, ácido salicílico y metabolitos de la hidrocortisona se encontraba muy disminuída. O sea, los niños portadores de este síndrome recuerdan en un todo lo que sucede con la cepa de ratas descrita por Gunn, y se ha encontrado que tienen una deficiencia de la enzima transferasa del ácido glucurónico.

Ictericia del recién nacido.— El principal pigmento de la ictericia del recién nacido es bilirrubina no conjugada. En contraste con lo que sucede en los adultos, no está necesariamente asociada a una sobreproducción de bilirrubina. Mollison (12) demostró que, en ausencia de enfermedad hemolítica, la velocidad de desintegración de los eritrocitos en el recién nacido no está elevada, y que debe buscarse otra explicación para la ictericia. La ausencia de bilirrubina conjugada en el plasma sugirió a Billing, Cole y Lathe (13) que la acumulación de bilirrubina en el plasma podría ser debida a un bloqueo metabólico en el proceso de excreción, en la etapa en que la bilirrubina es transformada en un glucuronato. Calcularon además que en muchos niños ictericos la capacidad del hígado para efectuar la conjugación puede estar reducida a 1 o 2% en comparación con un adulto. Cuando una situación como la descrita se presenta en un niño prematuro en que los mecanismos enzimáticos todavía están menos desarrollados, los niveles de bilirrubina no conjugada pueden ser considerablemente más altos, y puede producirse kernicterus.

Como se sabe, el kernicterus es una condición patológica en el cerebro

que se produce concomitantemente con los elevados niveles de la bilirrubina en el plasma, y que se observa en niños prematuros, o niños portadores de enfermedad hemolítica del recién nacido, en la hiperbilirrubinemia familiar (Crigler y Najjar) y en la rata de Gunn. El nombre de kernicterus se deriva de la intensa pigmentación que se observa en las áreas lesionadas. Cleireaux, Cole y Lathe (14) han sugerido que la causa fundamental del daño cerebral es la bilirrubina. El efecto tóxico de la bilirrubina sobre el tejido cerebral está apoyado por el hecho de que aquélla reduce el consumo de oxígeno del tejido cerebral y por el efecto letal de la inyección de grandes cantidades de bilirrubina no conjugada, experimentalmente. La acción de la bilirrubina sobre el cerebro probablemente está relacionada con la naturaleza lipófila del pigmento. Esto explicaría la ausencia de kernicterus en los adultos intensamente ictericos pero en los cuales el pigmento dominante es el glucuronato de bilirrubina, que es hidrosoluble y que no impregna ni tiñe el tejido cerebral.

El último tipo de ictericia acolúrica no hemolítica es la disfunción hepática constitucional o enfermedad de Gilbert. Este autor describió en 1900 una serie de pacientes con ictericia crónica acolúrica familiar no hemolítica, de intensidad variada. Muchos de los pacientes de Gilbert probablemente tenían lo que hoy se reconoce como estados hemolíticos compensados; sin embargo, la entidad de una ictericia crónica acolúrica no hemolítica en adultos existe, y se trata de pacientes cuya única manifestación es una hiperbilirrubinemia del pigmento no conjugado, sin que existan evidencias de hemolisis o disfunción hepática de ningún otro tipo, y en los cuales tampoco hay alteraciones histopatológicas del hígado. En 1957 Arias y London (15) demostraron que en la disfunción hepática constitucional existe una deficiencia de la transferasa del ácido glucurónico, lo que explica la dificultad de la excreción de la bilirrubina y su consiguiente retención. Más recientemente, sin embargo, Schmid y Col. (16) estudiaron la formación de glucuronato de N-acetil-paraaminofenol después de la administración de N-acetil-paraaminofenol por vía oral, sustancia ésta que es excretada como glucuronato. Esto lo hicieron en controles normales y en sujetos con disfunción hepática constitucional, y en estos últimos pacientes no se observaron cambios en los valores de bilirrubina, a pesar de observarse en la orina aumento de los glucuronatos de la sustancia administrativa. Estos hallazgos no apoyan el concepto de que en estos pacientes la hiperbilirrubinemia se debe a un defecto de la transferasa glucurónica hepática.

Así, el nuevo conocimiento del metabolismo de la bilirrubina ha permitido unificar el concepto de las alteraciones de ese metabolismo (9): una deficiencia persistente de la enzima que se requiere para la conversión de la bilirrubina libre a la conjugada (glucuronato) conduce a varias entidades que son mejor denominadas como "errores congénitos del metabolismo". La inmadurez transitoria de esta enzima produce moderada hiperbilirrubinemia en el niño de término, y severa en el prematuro. Cuando existe incompatibilidad de grupo entre la madre y el niño y hay una hemolisis masiva, el sistema enzimático, inmaduro, es incapaz de conjugar las cantidades excesivas de bilirrubina

indirecta. Cuando se acumulan en la sangre o líquido céfalo-raquídeo cantidades excesivas de bilirrubina indirecta, se presenta el kernicterus.

También han surgido nuevas interpretaciones sobre otros problemas. Así en 1955 varios investigadores (17-18-19) en forma independiente notaron una asociación entre la administración de los análogos hidrosolubles de la vitamina K, y el desarrollo de anemia hemolítica y kernicterus en el recién nacido. Más recientemente otros autores (20) han observado, en niños prematuros cuyas madres habían recibido 72 mgm. de otro análogo de la vitamina K antes del parto, el desarrollo de marcada hiperbilirrubinemia, la cual se presentó entre las 40 y 72 horas de nacidos. Consideran estos autores que esta medicación predispuso los infantes a la hiperbilirrubinemia y enuncian la hipótesis de que los análogos de la vitamina K pasan a través de la placenta y ejercen un efecto hepatotóxico sobre el recién nacido. Se menciona que los análogos de la vitamina K son excretados parcialmente como glucuronatos y pueden competir por la transferasa glucurónica.

V. APLICACIONES PRACTICAS DE LOS NUEVOS CONOCIMIENTOS

Basados en el concepto de que la bilirrubina no conjugada o indirecta es neurotóxica y que cantidades excesivas de ella en el plasma producen el kernicterus, Danoff y Col. (21-22-23-24) han intentado bajar la hiperbilirrubinemia en niños con eritroblastosis fetal, prematuros y niños con marcada ictericia fisiológica administrando glucuronato de sodio por vía oral o intravenosa. En la mayoría de los pacientes tratados se observó una disminución bien definida de los valores de la bilirrubina indirecta en el suero, que comenzó tres horas después de iniciada la terapia y que a menudo fue seguida de un rebote de los valores de bilirrubinemia después de ser suspendido el tratamiento.

Estos resultados, tan promisorios, ya que abren la posibilidad de un tratamiento que no fuera la exsanguinotransfusión, no han podido ser reproducidos por otros autores (25), por lo que esta posibilidad terapéutica debe ser todavía investigada.

RESUMEN

La desintegración de la hemoglobina, en el sistema retículo endotelial, produce bilirrubina a expensas del anillo tetrapirrólico. La bilirrubina de reacción "indirecta" es transportada al hígado donde mediante un proceso enzimático (con intervención de la transferasa del ácido glucurónico) es conjugada con el ácido glucurónico dando así la de reacción "directa" o glucuronato de bilirrubina, hidrosoluble, y que es excretada en la bilis. Si hay una excesiva oferta de bilirrubina, como en la ictericia hemolítica, los mecanismos de conjugación se hacen insuficientes y se acumula bilirrubina indirecta en el plasma. En la hepatitis e ictericia obstructiva la bilirrubina directa no puede alcanzar el intestino y es "regurgitada" a la sangre, pasando el filtro renal y produciendo coluria,

Cuando los procesos enzimáticos están incompletamente desarrollados puede producirse ictericia a expensas de la bilirrubina indirecta, sin que exista hemólisis (tal como en la ictericia de los prematuros y recién nacidos). Si hay déficit congénito de transferasa glucurónica se produce ictericia acolúrica no hemolítica. Tal parece ser el caso en la ictericia descrita por Crigler y Najjar y en la disfunción hepática constitucional.

SUMMARY

Bilirubin is produced in the reticulo endothelial system as a result of the breakdown of hemoglobin. "Indirect" bilirubin is then carried to the liver where, through the intervention of the enzyme glucuronic transferase, is transformed into bilirubin glucuronate, or water soluble, "direct" bilirubin, that is excreted in bile. If there is overproduction of bilirubin, as in hemolytic jaundice, the capacity of the liver to conjugate bilirubin with glucuronic acid becomes insufficient and the "indirect", non conjugated pigment accumulates in plasma.

In hepatitis and obstructive jaundice bilirubin glucuronate cannot reach the intestine, and is "regurgitated" into blood stream, going through the kidney filter (choloria).

In premature and newborn infants jaundice due to increase of "indirect" bilirubin may be present due to the incomplete development of enzymatic devices into the liver.

If there is a congenital defect of glucuronic transferase, a type of acholuric, non hemolytic jaundice may be present, and this appears to be the case in the Crigler Najjar syndrome and constitutional hepatic dysfunction (Gilbert's disease).

BIBLIOGRAFIA

1. HIJMANS VAN DEN BERGH, A. A. y SNAPPER, I.
Die Farbstoffe des Blutserums. *Deutsch. Arch. Klin. Med.* 110:540, 1913. (Citado por Billing y Col. (3).
2. HIJMANS VAN DEN BERGH, A. A. y MÜLLER, P.
Über eine direkte und indirekte Diazoreaktion auf Bilirubin. *Biochem. Ztschr.* 77: 90, 1916. (Citado por Billing y Col. (3).
3. BILLING, BARBARA H., and LATHE, G. H.
Bilirubin Metabolism in Jaundice. *Am. J. Med.* 24:111, 1958.
4. NAJJAR, V. A.
The Metabolism of Bilirubin. *Pediatrics* 10:1, 1952.
5. COLE, P. G., and LATHE, G. H.
Separation of Serum Pigments Giving the Direct and Indirect van den Bergh Reaction. *J. Clin. Path.* 6:99, 1953.
6. BUTTS, H. R.; ARIAS, I. M.; BOLLMAN, J. L.; ISSELBACHER, K.; SCHMID, R.
Panel: bilirubin metabolism. *Gastroenterology* 36:161, 1959.

7. SCHMID, R.
Jaundice and Bilirubin Metabolism. *A. M. A. Arch. Int. Med.* 101:669, 1958.
8. SCHACHTER, D.
Nature of the Glucuronide in Direct Reacting Bilirubin. *Science* 126:507, 1957.
9. DRISCOLL, SHIRLEY G.; YI-YUNG HSIA, D.
The Development of Enzyme Systems During Early Infancy. *Pediatrics* 22:785 (Supplement) 1958.
10. CRIGLER, J. F.; NAJJAR, V. A.
Congenital Familial Nonhemolytic Jaundice with Kernicterus. *Pediatrics* 10:169, 1952.
11. SCHMID, R.; AXELROD, J.; HAMMAKER, L. and ROSENTHAL, I. M.
Congenital Defects in Bilirubin Metabolism. *J. Clin. Invest.* 36:927, 1957.
12. MOLLISON, P. L.
Physiological Jaundice in the Newborn. *Lancet* 234:513, 1948.
13. BILLING, BARBARA H.; COLE, P. G.; and LATHE, G. H.
Increased Plasma Bilirubin in Newborn Infants in Relation to Birth Weight. *Brit. M. J.* 2:1263, 1953.
14. CLAIREAUX, A. E.; COLE, P. G. and LATHE, G. H.
Icterus of the Brain in the Newborn. *Lancet*, 265:1226, 1953.
15. ARIAS, I. M.; LONDON, I. M.
Bilirubin Glucuronide Formation in Vitro: Demonstration of a Defect in Gilbert's Disease. *Science*, 126:563, 1957.
16. SCHMID, R. and HAMMAKER, L.
Glucuronide Formation in Patients with Constitutional Hepatic Dysfunction (Gilbert's Disease). *New Engl. J. Med.* 260:1310, 1959.
17. ASTERIADOU-SAMARTZIS, E.; LEIKIN, S.
The Relation of Vitamin K to Hyperbilirubinemia. *Pediatrics* 21:397, 1958.
18. ALLISON, A. C.
Danger of Vitamin K Analogues to Newborn. (Letter to the Editor). *Lancet*, 1:669, 1955.
19. LAURENCE, B.
Danger of Vitamin K Analogues to Newborn (Letter to the Editor). *Lancet*, 1:819, 1955.
20. LUCEY, J. F.; DOLAN, R. G.
Hyperbilirubinemia of Newborn Infants Associated with the Parenteral Administration of Vitamin K Analogues to the Mothers. *Pediatrics*, 23:553, 1959.
21. DANOFF, S.; GRANTZ, CH.; BOYER, AUDREY and HOLT, L. E.
Reduction of Indirect Bilirubinemia in vivo. (Letters to the Editor). *Lancet* 1:316, 1958.
22. DANOFF, S.; GRANTZ, CH.; BOYER, AUDREY and HOLT, L. E.
Conversion of Indirect to Direct Reacting Bilirubin in Vivo. *Science*, 127:759, 1958.

23. DANOFF, S.; BOYER, AUDREY; HOLT, L. E.
Observations on the Control of Bilirubinemia. *A. M. A. J. Dis. Children* 96:440, 1958.
24. DANOFF, S.; BOYER, A.; HOLT, L. E.
The Treatment of Hyperbilirubinemia of the Newborn with Sodium Glucuronate. *Pediatrics*, 23:570, 1959.
25. JELIU, GLORIA; SCHMID, R.; GELLIS, S.
Administration of Glucuronic Acid to Icteric Newborn Infants. *Pediatrics*, 23:92, 1959.