

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Mestrado de Oncologia Molecular
2002-2004

Síndromas de Gilbert e de Crigler-Najjar:
análise mutacional e relação genótipo/fenótipo

Elísio Manuel de Sousa Costa

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Mestrado de Oncologia Molecular (2002-2004)

**Elísio Manuel de
Sousa Costa**

**Síndromas de *Gilbert* e de
Crigler-Najjar: análise mutacional
e relação genótipo/fenótipo**

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Mestrado de Oncologia Molecular (2002-2004)

**Elísio Manuel de
Sousa Costa**

Síndromas de *Gilbert* e de *Crigler-Najjar*: análise mutacional e relação genótipo/fenótipo

Dissertação apresentada à Universidade de Medicina da Universidade do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Oncologia Molecular, sob orientação do Professor Henrique Almeida e da Dr.^a Rosário dos Santos.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Dr.^a Rosário dos Santos, da Unidade de Genética Molecular do Instituto de Genética Médica Dr. Jacinto de Magalhães pela sua orientação, colaboração e disponibilidade que tem demonstrado, não só na elaboração deste trabalho, como em todo o trabalho que temos desenvolvido em colaboração ao longo dos últimos anos. Gostaria ainda de lhe agradecer a sua contribuição no alargamento dos meus conhecimentos nesta área da Genética Molecular.

Agradeço ao Doutor Henrique Almeida, Professor Associado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, o seu empenhamento e as preciosas correcções que efectuou neste trabalho.

Agradeço à Dr.^a Emília Vieira, da Unidade de Genética Molecular do Instituto de Genética Médica Dr. Jacinto de Magalhães, para além do privilégio da sua amizade, a sua disponibilidade e competência, com que colaborou no estudo destes doentes. Gostaria ainda de lhe agradecer a forma como compartilhou comigo os seus conhecimentos.

Ao Dr.^o José Barbot pela sua contribuição para o alargamento dos meus conhecimentos ao longo dos anos em que trabalhamos juntos.

À Dr.^a Sandra Rebelo pela sua inesgotável paciência e atenção.

Resumo

O Síndrome de Gilbert (SG) é uma entidade clínica comum caracterizada por uma forma benigna de hiperbilirrubinemia não conjugada, na ausência de disfunção hepática e de hemólise. O seu diagnóstico, inicialmente de carácter presuntivo, passou a dispor de caracterização molecular quando em 1995 foram descritas as primeiras mutações no gene UDP-glucuronosil transferase-1. Em particular, uma inserção de 2 nucleotídeos [TA] na região promotora do gene que tem vindo a revelar-se como a principal causa de SG nas populações caucasianas estudadas. Todavia, esta caracterização foi estabelecida para outras populações que não a Portuguesa. Essa ausência de conhecimento levou-nos a realizar o presente estudo. Neste trabalho é descrito o estudo molecular efectuado em 120 doentes com diagnóstico clínico de SG, um doente com diagnóstico de Síndrome de Crigler-Najjar (SCN) tipo II e um caso de diagnóstico pré-natal de SCN tipo I. Dos 120 doentes com SG, 110 revelaram-se homocigóticos para a inserção dinucleotídica [TA] na região promotora do gene da UDP-glucuronosyltransferase-1 (UGT1A1) e um heterocigótico composto para duas inserções diferentes ([TA]7/[TA]8). Os restantes 9 doentes revelaram-se heterocigóticos para a inserção TA ([TA]6/[TA]7). Estudos adicionais efectuados nestes 9 doentes revelaram heterocigotia para as mutações c.674T>G e c.488_491dupACCT (um caso cada) e c.923G>A (4 casos). O doente com o diagnóstico de SCN tipo II apresentava heterocigotia composta para as mutações c.923G>A e inserção [TA]. O caso do diagnóstico pré-natal, efectuado porque na família havia um rapaz com o diagnóstico de SCN tipo I, com a mutação c.923G>A, revelou um feto não afectado.

Em conclusão, a homocigotia para a inserção [TA] revelou-se como a principal causa de SG na nossa população. A identificação de mutações adicionais no gene UGT1A1, é importante quer em termos de diagnóstico, quer em termos de aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal.

Abstract

Gilbert's syndrome (GS) is characterized by a chronic, non-haemolytic unconjugated hyperbilirubinemia in the absence of liver disease or overt haemolysis. Traditionally, GS has been a diagnosis of exclusion. In 1995, a two nucleotide (TA) insertion in the TA(6)TAA promoter region of the UGT1A1 gene was identified, which was found to be the main cause of GS in all studied populations. However, no studies are made in Portuguese population. For this reason, we make this work.

In the present work we describe the molecular study in a cohort of 120 Portuguese patients with clinical diagnosis of Gilbert Syndrome (GS) and in one with the diagnosis of type II Crigler-Najjar syndrome (CNS), as well as a prenatal diagnosis of type I SCN. Among the 120 unrelated patients with GS, 110 were homozygous for the [TA]7 allele ([TA]7/[TA]7) and one patient was a compound heterozygote for two different insertions, ([TA]7/[TA]8). The remaining 9 patients were heterozygous for the TA insertion ([TA]6/[TA]7). Additional studies in these 9 patients revealed heterozygosity for the c.674T>G, c.488_491dupACCT and c.923G>A mutations, in 1, 1 and 4 patients, respectively. The patient with type II CNS was a compound heterozygote for the [TA] insertion and the c.923G>A mutation. Prenatal diagnosis in a family with a boy previously diagnosed with type I CNS and c.923G>A mutation, revealed an unaffected foetus.

In summary, homozygosity for the [TA] insertion was found to be the most frequent cause of GS in our population. Identification of further mutations in the UGT1A1 gene, proved to be of significance in diagnosis, genetic counselling and prenatal diagnosis.

**Lista de
Abreviaturas**

AHNEC	- Anemia hemolítica não esferocítica crónica
DHC	- Doença hemolítica crónica
G6PD	- Glicose-6-fosfato desidrogenase
IN	- Icterícia neonatal
NADPH	- Nicotinamida adenosina fosfatase
PCR	- <i>Polymerase chain reaction</i>
RN	- Recém-nascidos
SG	- Síndrome de Gilbert
SCN	- Síndrome de Crigler-Najjar
SSCA	- Análise de polimorfismos de conformação em cadeia simples
TAE	- Tris-acetato-EDTA
TBE	- Tris-Borato-EDTA
UGT	- UDP- glucuroniltransferase
UGT1A1	- UDP-glucuroniltransferase-1

Índice

I- Introdução-----	1
1- Estrutura química da bilirrubina -----	2
2- Síntese, transporte e conjugação da bilirrubina-----	3
3- Patologia hereditária relacionada com o metabolismo da bilirrubina-----	8
4- <i>Locus</i> do gene UDP-glucuroniltransferase-1 (UGT1A1)-----	11
5- Gene UGT1A1-----	12
6- Mutações do gene UGT1A1-----	12
7- Associação do SG com outras patologias-----	14
II- Objectivos-----	18
III- Material e métodos-----	20
1- Doentes-----	21
2- População controlo-----	21
3- Análise molecular-----	21
3.1- Material Biológico-----	21
3.2- Genotipagem da região A(TA) _n TAA do gene UGT1A1-----	21
3.3- Sequênciação do gene UGT1A1-----	22
3.4- Análise conformacional dos polimorfismos de cadeia simples -----	25
3.5 - Análise de Restrição-----	26
3.6 – Exclusão de contaminação materna-----	26
IV- Resultados-----	29
1- Rastreo de mutações nos doentes com SG-----	30
2- Estudos familiares nos doentes com SG-----	34
3- Rastreo de mutações no doente com SCN tipo II-----	36
4- Diagnóstico pré-natal-----	36
5- Polimorfismos-----	37
6- Relação genótipo/fenótipo nos doentes com SG-----	39
V- Discussão-----	41
VI- Perspectivas futuras-----	47
VII- Bibliografia-----	49

I – Introdução

- 1- Estrutura química da bilirrubina
- 2- Síntese, transporte e conjugação da bilirrubina
- 3- Patologia hereditária relacionada com o metabolismo da bilirrubina
- 4- *Locus* do gene UDP-glucuroniltransferase-1 (UGT1A1)
- 5- Gene UGT1A1
- 6- Mutações do gene UGT1A1
- 7- Associação do SG com outras patologias

I – Introdução

1- Estrutura química da bilirrubina

A bilirrubina é um composto com peso molecular de 584 Kd, com quatro anéis pirrole ligados por dois grupos de metileno (-CH=) e um grupo meteno (-CH₂=) (fig. 1)¹. A sua estrutura está directamente relacionada com as suas características físicas¹. De facto a ligação de carbono central é flexível permitindo que se constituam ligações por pontes de hidrogénio intramoleculares e que a molécula se dobre sobre si própria formando uma estrutura semelhante a uma telha. Ambos os planos são apolares e em cada extremidade apresenta um domínio hidrofóbico^{2,3}, o que torna a molécula quase insolúvel na água a pH fisiológico^{2,3} (inferior a 0,005 mg/dl a pH 7.4). A sua solubilidade na água é superior quando a molécula se encontra na forma ionizada, em que as suas ligações de hidrogénio estão parcialmente quebradas⁴. Acresce que a bilirrubina é insolúvel nas membranas biológicas, mas atendendo que se pode ligar aos fosfolípidos na superfície das membranas, fica assim habilitada a atravessar a membrana celular e ter acesso aos organelos citoplasmáticos⁵.

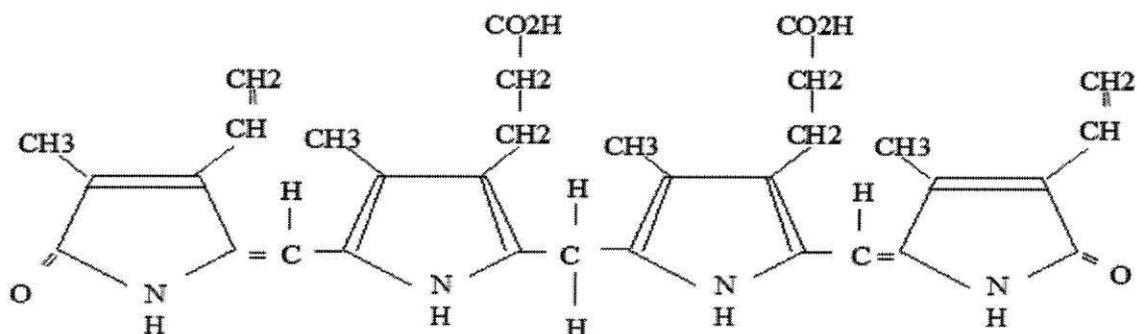


Fig. 1 – Estrutura química da bilirrubina IXa.

2- Síntese, transporte e conjugação da bilirrubina

O adulto normal produz aproximadamente 250 a 350 mg de bilirrubina por dia⁶, na sua maior parte sintetizada nos órgãos do sistema reticuloendotelial, particularmente no baço e no fígado^{7,8,9}. Aproximadamente 70 a 80% resulta da degradação do grupo heme da hemoglobina, a restante provém da degradação do grupo heme dos precursores eritróides e de proteínas tecidulares, como os citocromos hepáticos e a catalase⁷.

A maioria dos tecidos tem capacidade de utilizar o grupo heme na síntese da bilirrubina, em dois passos que são mediados por enzimas¹⁰. O primeiro envolve o enzima hemoxygenase, que converte a molécula de heme em biliverdina, tendo a forma reduzida da *nicotinamida adenosina fosfatase* (NADPH) como dador de hidrogénio¹¹. Nesta reacção é libertado monóxido de carbono, ferro ferroso e água (Fig. 2). Neste passo, a síntese da bilirrubina é regulável, podendo por exemplo aumentar três ou quatro vezes, como resposta a um processo hemolítico instalado^{12,13}, ou em consequência do jejum. Os indivíduos com síndrome de Gilbert (SG) apresentam níveis mais elevados de bilirrubina após períodos prolongados de jejum¹⁴, justamente por sobreactivação dessa enzima.

O segundo passo da síntese da bilirrubina envolve o enzima biliverdina reductase, que converte a biliverdina em bilirrubina, por quebra da ponte de metionina central, tendo o NADPH como dador de hidrogénio (Fig. 2)^{15,16}.

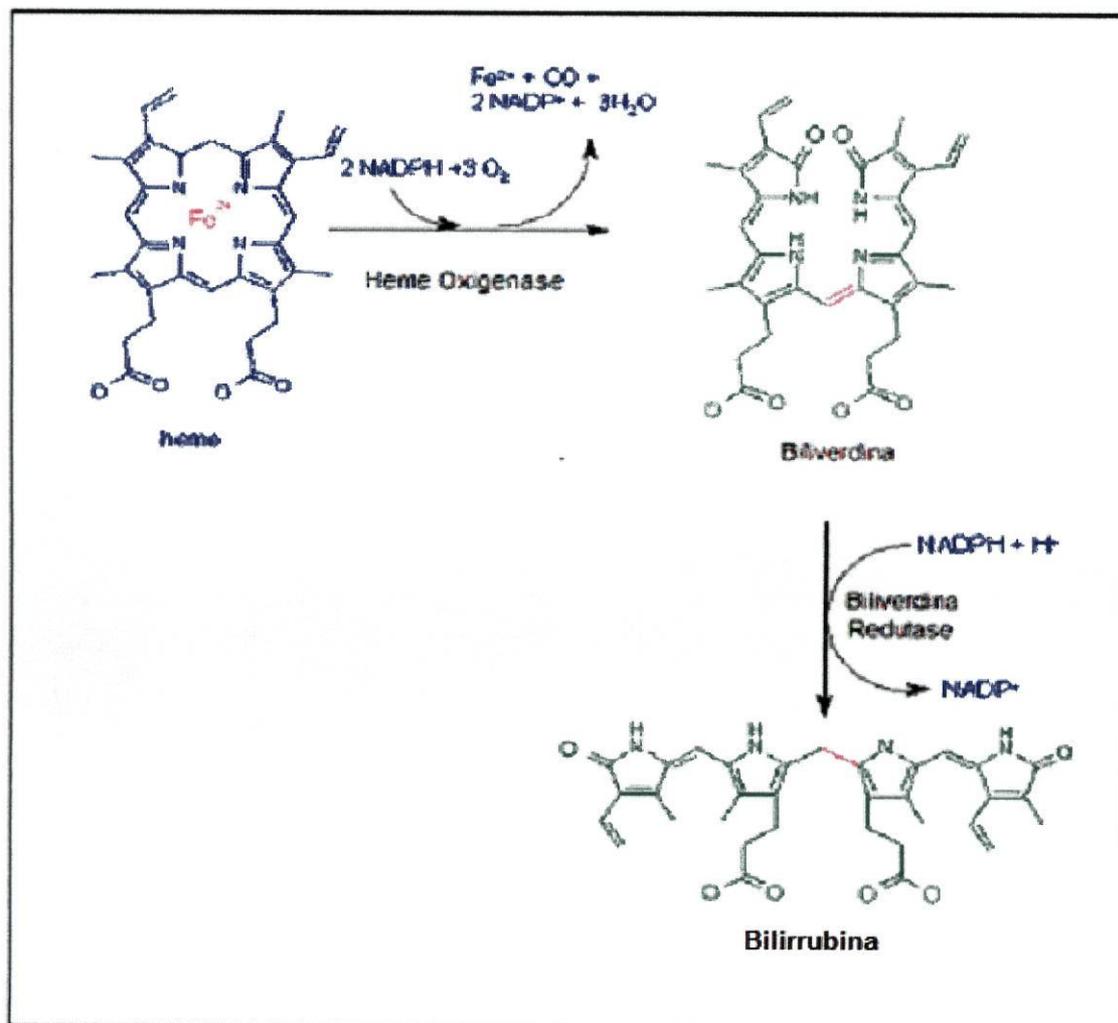


Fig. 2 – Via de Síntese de bilirrubina ao nível do sistema reticuloendotelial.

Parece existir uma vantagem biológica na conversão da biliverdina, solúvel na água e aparentemente não tóxica, em bilirrubina que por seu lado é um pigmento tóxico e não solúvel na água. Uma das possíveis vantagens está relacionada com a eliminação mais facilitada da bilirrubina produzida pelo feto, através da placenta. Por outro lado, a biliverdina em altas concentrações poderia formar cristais e obstruir os tubulos renais e ductos colectores¹⁷.

As concentrações séricas da bilirrubina estão directamente relacionadas com a quantidade produzida e com a capacidade do organismo para a eliminar⁶. Em relação à bilirrubina não conjugada, ela pode entrar em circulação de duas formas: síntese *de novo* ou por reabsorção no intestino após excreção biliar^{18,19}. A maioria da bilirrubina circulante do adulto advém da síntese *de novo*. No entanto, no recém-nascido (RN) a reabsorção é uma fonte importante de bilirrubina. A sua eliminação após ter sido conjugada pode ser tanto hepática como renal.

A bilirrubina no plasma encontra-se ligada covalentemente à albumina em dois locais distintos. Este complexo é formado no plasma por um processo não enzimático, pelo qual um grama de albumina se liga com 8.3 mg de bilirrubina em cada um dos seus locais de ligação. Assim, um indivíduo com uma concentração plasmática de albumina de 3,5 g/dl pode ligar-se teoricamente a 58 mg/dl de bilirrubina. A sua semi-vida no plasma é igual ao da albumina que se encontra ligada, cerca de 18 a 20 dias²⁰.

A bilirrubina entra no hepatócito por um processo não dependente de energia. A existência de proteínas transportadoras, na membrana do hepatócito, que promovam a entrada da bilirrubina está ainda em investigação²¹. Uma vez no interior, a bilirrubina é acumulada no hepatócito, mas subsiste alguma controvérsia quanto à forma como a bilirrubina aí se mantém. Estão no entanto, já identificadas duas proteínas que apresentam esta função, das quais, a mais importante é a ligandina ou proteína Y, que apresenta um peso molecular de 47 Kd e corresponde a 10% do total das proteínas citoplasmáticas do hepatócito²². A outra proteína identificada com capacidade de ligação à bilirrubina, embora com menor afinidade que a ligandina, é a proteína Z²³. No entanto, há evidência de que o fluxo de bilirrubina na membrana do hepatócito é

bidireccional, estando estimado que cerca de 40% da bilirrubina que entra no hepatócito volta de novo ao plasma^{24,25}.

No reticulo endoplasmático do hepatócito, a maioria da bilirrubina é mono- e diglucuronidada. Apenas uma pequena quantidade de bilirrubina é convertida em substâncias solúveis na água por conjugação de outras substâncias que não o ácido glucurónico²⁶.

O enzima UDP-glucuroniltransferase cataliza a transferência do ácido glucurónico existente no ácido UDP-glucurónico para formar ésteres nos carbonos 8 e 12 dos grupos carboxilo da bilirrubina (Fig. 3 e 4)²⁷. Os produtos desta reacção são a bilirrubina mono e diglucuronidada. Esta conjugação elimina as pontes de hidrogénio internas da molécula, não deixando que a molécula se dobre sobre si própria. Como consequência, a bilirrubina conjugada é muito mais solúvel na água, podendo ser excretada para a bile. Num indivíduo normal, aproximadamente 80% da bilirrubina é excretada sob a forma de bilirrubina diglucuronidada. Em situações de défice do enzima UDP-glucuroniltransferase, tais com em doentes com SG, e nos RN, a bilirrubina é excretada predominantemente sob a forma de bilirrubina monoglucuronidada^{26,28}. Existe evidência de uma relação directa entre a quantidade de bilirrubina mono e diglucuronidada e a actividade de UDP-glucuroniltransferase²⁸.

A excreção da bilirrubina para a bile faz-se de forma muito rápida após conjugação²⁹. Esta excreção envolve dois passos fundamentais, a deslocação da bilirrubina através do reticulo endoplasmático e a sua passagem através da membrana do hepatócito. Existe ainda pouca informação quanto ao movimento da bilirrubina conjugada dentro do hepatócito. No entanto, deverá existir algum tipo de mecanismo que a encaminhe para os canalículos, já que apenas uma muito pequena quantidade reflui para o plasma³⁰. A

excreção da bilirrubina conjugada está dependente da quantidade de sais de bile e lípidos biliares excretados. A bilirrubina conjugada adere às membranas celulares tal como a bilirrubina não conjugada, no entanto não consegue transpô-las. Assim os microtúbulos conseguem conduzir a bilirrubina conjugada, do local onde é conjugada até ao local de excreção^{30,31}.

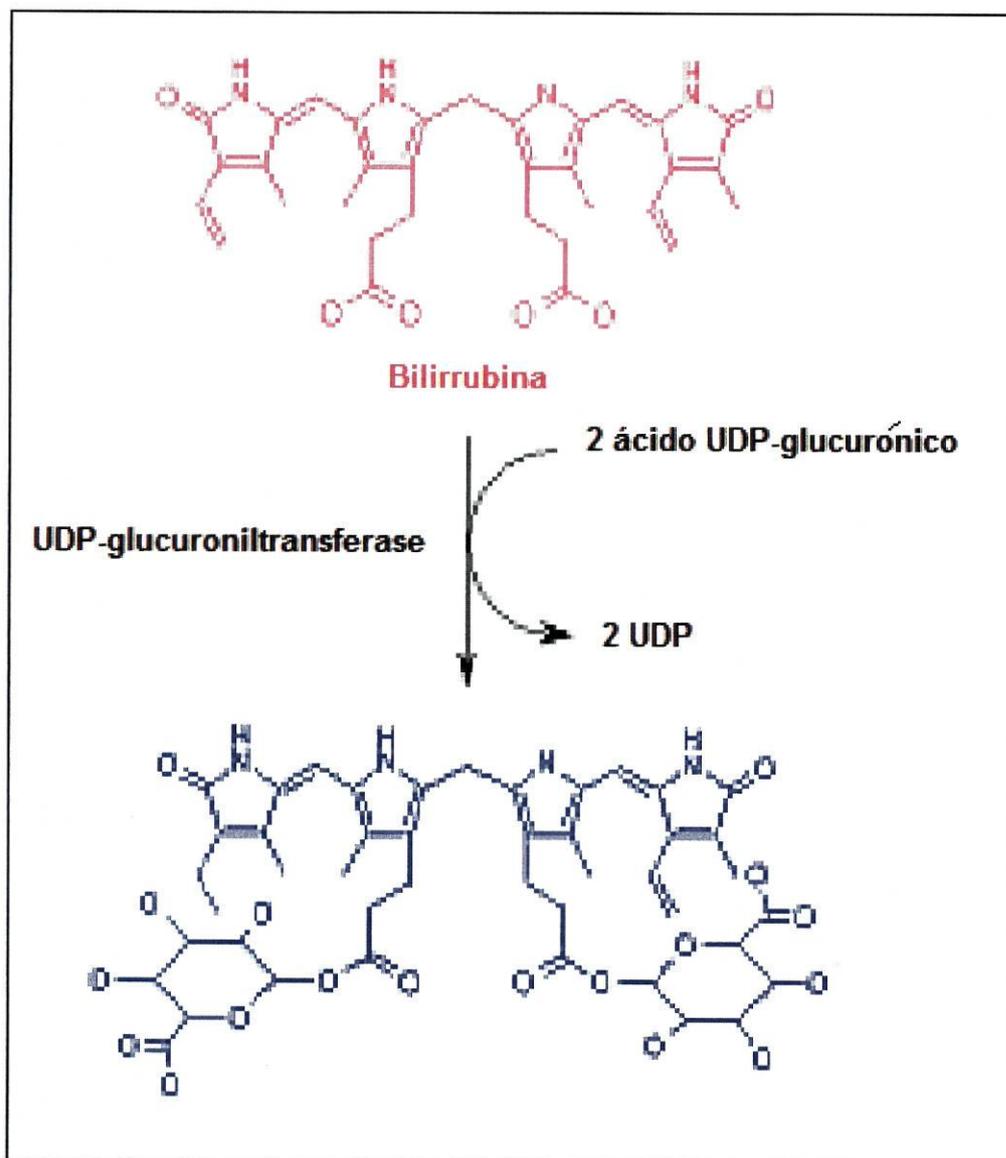


Fig. 3- O enzima UDP-glucuroniltransferase é responsável pela conjugação hepática da bilirrubina.

A excreção da bilirrubina está dependente do grau de formação de bile; como tal, uma diminuição da excreção de sais de bile e redução do seu fluxo diminuem o grau de excreção da bilirrubina^{30,31}.

Os eventos que ocorrem no intestino e na circulação entero-hepática influenciam significativamente as concentrações séricas de bilirrubina¹⁹. A bilirrubina conjugada é relativamente instável, sendo convertida em não conjugada no lúmen do intestino. Esta conversão pode ocorrer de forma não enzimática ou então mediada pelo enzima β -glucuronidase produzida por algumas bactérias intestinais³². Quando isto acontece, a bilirrubina, já não conjugada, pode ser reabsorvida pela mucosa intestinal, possivelmente por um mecanismo passivo e voltar ao fígado via circulação portal³³. A bilirrubina quando atinge o trato intestinal distal é transformada em diferentes urobilinóides, nomeadamente; urobilinas, urobilinogénio, estercobilinogénio e estercobilina. Estes são parcialmente absorvidos e entram na circulação entero-hepática, sendo uma pequena porção excretada na urina³⁴.

3- Patologia hereditária relacionada com o metabolismo da bilirrubina

O SG é uma entidade clínica comum caracterizada por uma forma benigna de hiperbilirrubinemia não conjugada, na ausência de disfunção hepática e de hemólise^{35,36,37,38}. Geralmente apresenta-se durante a adolescência ou em jovens adultos. Em vários estudos, baseados no doseamento de bilirrubina total, o SG foi identificado em 3% a 6% da população, sendo mais frequente no homem (razão homem/mulher de 4:1). Esta disparidade poderá estar relacionada com o facto de o homem ter uma massa

eritrocitária maior, e como tal um maior aporte hepático de bilirrubina, e/ou com a inibição dos enzimas da glucuronidação causada pelos androgénios³⁹.

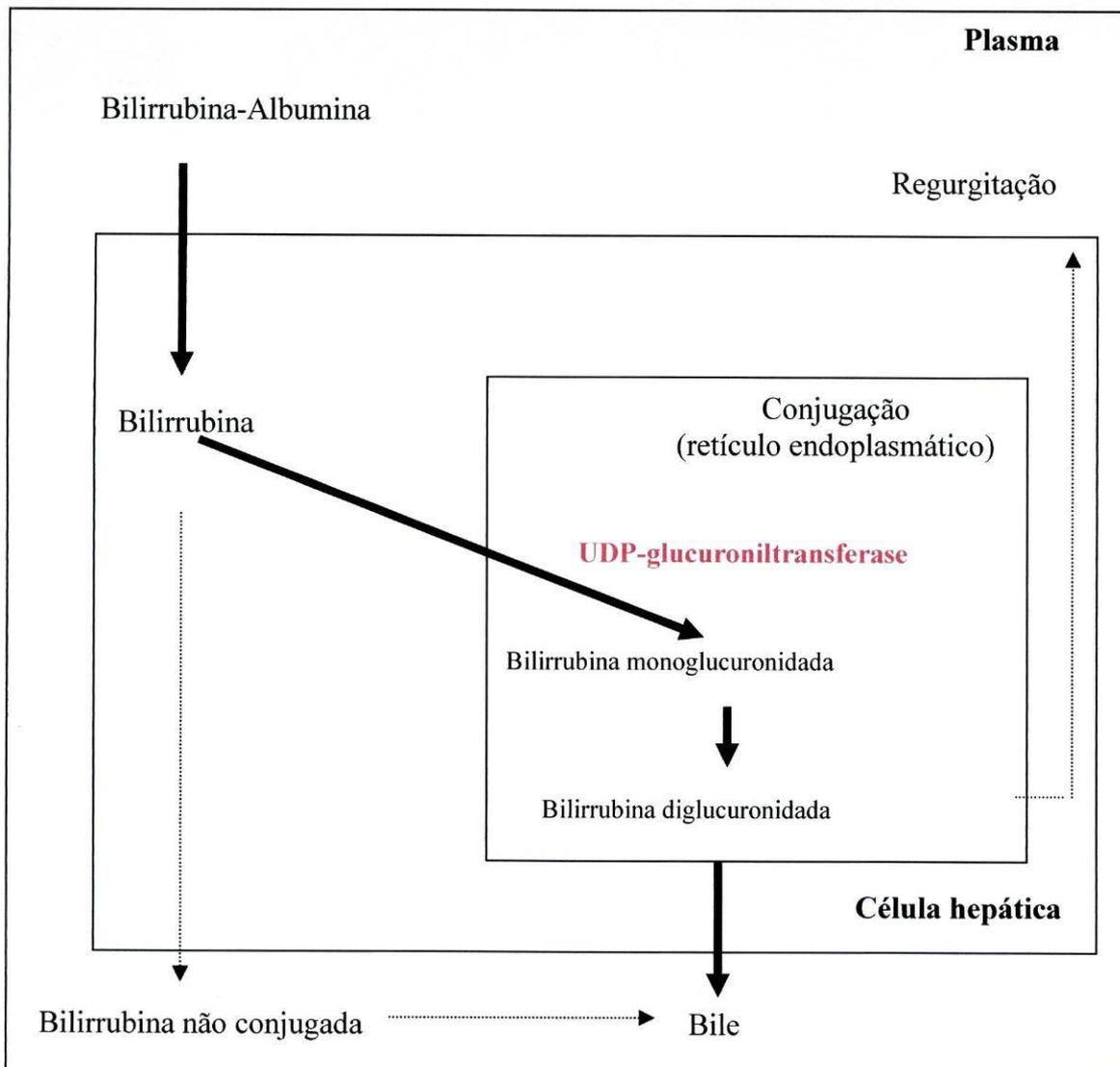


Fig. 4- Esquema representativo das vias de excreção da bilirrubina pela célula hepática. A via normal de excreção está representada com linhas sólidas e a anormal representada a tracejado.

O SG deve-se a um déficit parcial da glucuronidação hepática da bilirrubina, resultante de uma redução de cerca de 30 a 50% da actividade do enzima UDP-glucuroniltransferase-1 (UGT1A1)⁴⁰. No entanto, está descrita uma baixa correlação entre o doseamento hepático do enzima *in vitro* e o nível sérico de bilirrubina total. Em doentes com SG, este nível de bilirrubina total varia entre 1 e 6 mg/dl, 95 % da qual é não conjugada⁴¹.

Restrição alimentar, como por exemplo o jejum, e a administração de ácido nicotínico causam aumento do nível de bilirrubina, que pode subir três ou quatro vezes nos indivíduos com SG, em contraste com os indivíduos normais em que este aumento é apenas de duas vezes. Por outro lado, da administração de fenobarbital, resulta normalização dos níveis de bilirrubina total. Estas características têm vindo a ser usadas no diagnóstico desta entidade, dada a natural dificuldade do estudo enzimático, que necessita de tecido hepático e suscita por vezes dificuldades na interpretação dos resultados^{42,43}. Acresce que o SG é uma patologia benigna, pelo que na maioria das vezes prescinde-se dos testes bioquímicos e funcionais, bastando o diagnóstico de presunção. Este é efectuado na base de uma hiperbilirrubinémia não conjugada (< 6 mg/dl), e na ausência de outra causa para essa alteração. A localização do gene que codifica o enzima UGT1A1 e, posteriormente, a identificação nesse gene de mutações relacionáveis com o SG, veio alterar de forma significativa este panorama e permitiu na maioria dos casos realizar um diagnóstico de certeza.

Défices ligeiros na actividade do enzima UGT1A1 estão associados com SG e défices graves com o Síndrome de *Crigler-Najjar* (SCN)⁴⁴. Este último, apresenta dois tipos: o tipo I, relacionado com défices severos, e o tipo II, com défices mais moderados. Em termos clínicos estes dois tipos podem ser distinguidos pelos níveis de bilirrubina e pelo

tipo de resposta à administração de fenobarbital. Os níveis de bilirrubina não conjugada, no tipo I, podem ser superiores a 20 mg/dl, ou mesmo exceder os 30 mg/dl, enquanto que no tipo II os níveis de bilirrubina são mais moderados, variando entre 6 e 20 mg/dl.

O SCN tipo I, descrito pela primeira vez em 1952 por Crigler e Najjar, é uma patologia de transmissão autossômica recessiva rara. Na literatura, estão descritos, com algum pormenor aproximadamente 100 casos, onde a consanguinidade é muitas vezes referida. Estes doentes morrem habitualmente nos dois primeiros anos de vida, devido aos efeitos neurotóxicos da bilirrubina. O único tratamento efectivo é o transplante hepático, já que não respondem à terapêutica com fenobarbital^{38,39,45,46}.

O SCN tipo II, descrito pela primeira vez em 1962 por Arias e col.⁴⁷, é uma patologia também rara, mas com consequências clínicas muito mais benignas que o SCN tipo I. As alterações neurológicas resultantes da hiperbilirrubinémia são raras, o que permite que a maioria dos doentes atinjam a vida adulta sem complicações. O modo de transmissão não é claro: existem descrições em que o modo de transmissão é claramente autossômico dominante com penetrância variável e outras em que o modo de transmissão é autossômico recessivo^{38,39,48,49}.

4- Locus do gene UDP-glucuroniltransferase-1 (UGT1A1)

Até ao momento, mais de 16 *uridine diphosphateglucuronosiltransferase* (UGT) humanas foram descritas e divididas em duas famílias – UGT1 e UGT2. Todos membros da família 1 são codificados por genes localizados no *locus* UGT1A, localizado no cromossoma 2q37 e estão relacionados com a transcrição de 13 UGT distintas. Este *locus* apresenta os 13 primeiros exões, comuns a todas as UGT1A (Fig.

5), cada um dos quais com o seu promotor e regiões *enhancer*, os quais na transcrição são ligados aos exões 2 a 5. No entanto, apenas 8 estão relacionados com transcritos funcionais (UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9 e UGT1A10)^{50,51}.

5- Gene UGT1A1

O gene da UGT1A1 está localizado no final do *locus* UGT1A e codifica para uma proteína que tem como função principal a glucuronidação da bilirrubina. Este gene compreende 5 exões, sendo o primeiro, específico desta isoforma e os restantes 4, comuns a todas as 8 isoformas codificadas neste *locus*^{50,51}. Com a análise da sequência deste gene, prevê-se uma proteína com 533 aminoácidos. A sua porção terminal tem como função a ligação da proteína ao retículo endoplasmático, encontrando-se os restantes domínios do enzima no lúmen do retículo endoplasmático. O exão 1 está relacionado com o domínio da proteína com especificidade para o substrato, e os exões 2 a 5 estão relacionados com o local de ligação ao ácido UDP-glucurónico, assim como ao domínio transmembranar e à cauda citoplasmática^{52,53,54}.

6- Mutações do gene UGT1A1

A primeira mutação no gene do UGT1A1 foi descrita em 1992⁵⁵. Tratava-se de uma mutação *nonsense* encontrada em homozigotia num doente com SCN tipo I. A partir dessa altura muitas mutações têm vindo a ser descritas neste gene. Até à data, estão descritas 56 diferentes mutações neste gene, a maioria das quais (53/56) descritas pela primeira vez em associação com SCN, (41 associadas ao tipo I e 12 ao tipo II). A

maioria destas mutações são do tipo *missense* (28/56) ou *nonsense* (11/56). Estão também descritas, embora mais raramente, pequenas deleções ou inserções no gene e mutações que alteram o *splicing* normal do gene⁵⁶.

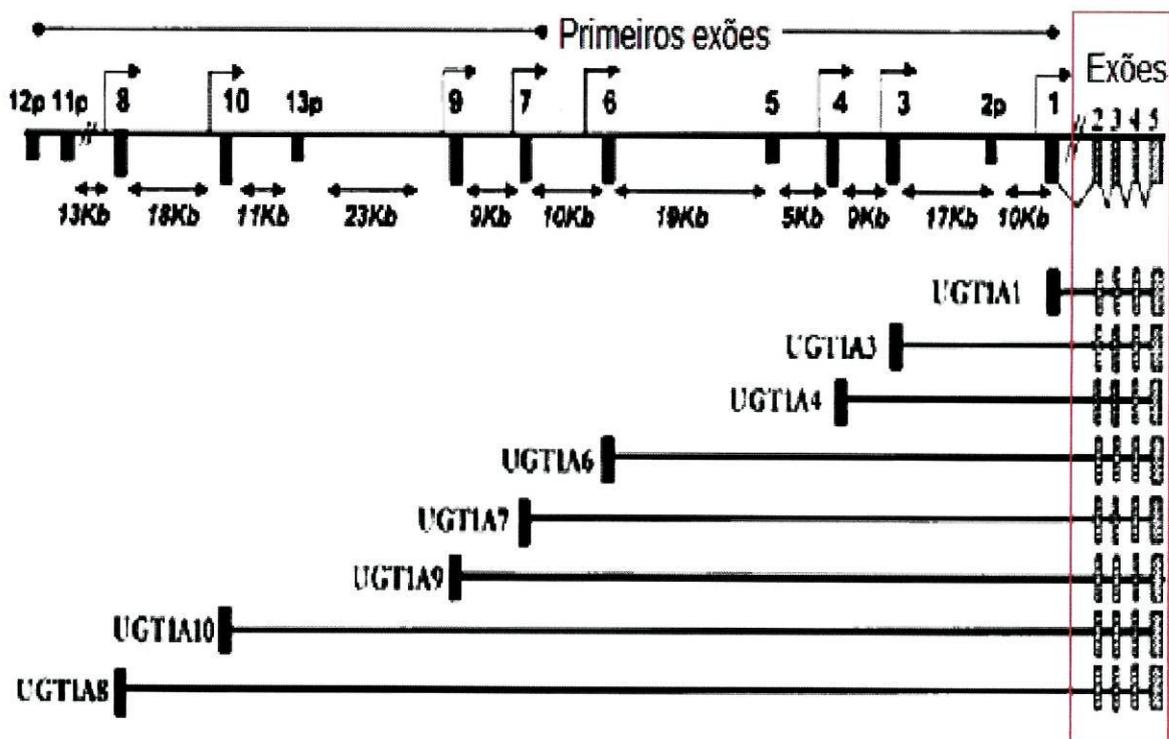


Fig. 5- Representação esquemática do locus UGT1A, onde se pode observar os primeiros exões, assim como os exões comuns a todas as isoformas.

Apenas em 1995 foram descritas as primeiras mutações neste gene relacionadas com o SG, em particular, uma inserção de 2 nucleotídeos [TA] na região promotora do gene, que tem vindo a revelar-se como a principal causa de SG nas populações caucasianas estudadas. Esta inserção na região A(TA)_nTAA do promotor do gene do UGT1A1

dificulta a ligação do factor transcripcional IID, um importante factor no início da transcrição⁵⁷⁻⁵⁹, o que condiciona uma diminuição da velocidade de transcrição do gene. Em consequência diminui a actividade do enzima UGT1A1 e aumenta o nível de bilirrubina, tanto em indivíduos normais como em portadores de outras patologias que condicionem hiperbilirrubinémia⁶⁰⁻⁷¹. A frequência estimada desta mutação é 38,7% na população europeia, 16% na população de origem asiática e 42,6% na população de origem africana. Beutler et al⁵⁹ previram uma frequência de homozigotia na população caucasiana de 15%.

7- Associação do SG com outras patologias

A alta incidência de SG na população, condiciona a sua associação frequente com outras patologias. Uma das primeiras associações foi sugerida em 1980 por Odell⁷², que afirmava que o SG poderia influenciar o aparecimento e a gravidade da icterícia neonatal (IN). No entanto, só depois de identificadas as alterações no gene UGT1A1 associadas ao SG, nomeadamente a inserção dinucleotídica (TA) no promotor do gene UGT1A1 na população caucasiana e a mutação G71R na população asiática, foi possível efectuar estudos que procuraram relacionar a IN e o SG. Esta associação foi estudada pela primeira vez em 1997 por Kaplan et al⁷³ em RN com défice de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) que desenvolveram IN. Mais tarde, em 1999, Monaghan et al⁷⁴ sugeriam uma relação entre IN prolongada em RN sem outros factores de risco e SG. No mesmo ano, Maruo et al⁷⁵ descreveram a mutação G71R como factor de risco de IN não fisiológica na população Japonesa. No entanto, diferentes trabalhos entretanto publicados na literatura apresentam resultados contraditórios, uma vez que em alguns

deles a associação entre SG e IN é demonstrada e em outros não. Relativamente a este assunto, nós estudamos 100 RN com IN (23 dos quais com IN prolongada), 100 RN com ausência de IN documentada e 18 doentes com diagnóstico de défice de G6PD com referência a IN, cinco dos quais com variantes associadas a anemia hemolítica não esferocítica crónica (AHNEC). Nestes RN com IN, apenas o subgrupo que desenvolveu IN prolongada apresentou uma proporção superior (tabela I), estatisticamente significativa, de homozigotia para o alelo [TA]7, quando comparado com o grupo controlo (39,1% versus 10%). Nos restantes RN, os nossos resultados sugerem que a presença deste polimorfismo não é um factor de risco *major* para o aparecimento da IN^{65,71}.

Tabela I – Distribuição do genótipo do gene da UGT1A1 pelos RN estudados com e sem IN.

Genótipo do gene UGT1A1	RN sem IN (n=100)	RN com IN e sem outros factores de risco (n=54*)	RN com IN e com outros factores de risco (n=23)	RN com IN prolongada (n=23)	Défices de G6PD com história de IN (n=18**)
(TA)6/(TA)6	47 (47%)	27 (50%)	6 (26%)	8 (34,8%)	8 (44,4%)
(TA)6/(TA)7	43 (43%)	18 (33%)	14 (60,8%)	6 (26%)	8 (44,4%)
(TA)7/(TA)7	10 (10%)	8 (14,8%)	3 (13%)	9 (39,1%)	1 (5,5%)

*um apresentava o genótipo (TA)5/(TA)6; ** um dos casos apresentava o genótipo (TA)5/(TA)8

A associação entre SG e **doença hemolítica crónica** (DHC) também tem sido largamente estudada, nomeadamente no que se refere aos níveis de bilirrubina, como também relativamente às suas consequências, nomeadamente a litíase vesicular. Um dos primeiros trabalhos na literatura sobre este assunto foi publicado em 1999, por Guidice et al⁶⁷. Neste trabalho é demonstrado de forma inequívoca que a presença do alelo

[TA]7 em doentes com Esferocitose Hereditária lhes aumenta de forma estatisticamente significativa os níveis de bilirrubina e o risco de desenvolvimento de litíase vesicular. Entretanto, outros trabalhos têm surgido na literatura relacionando SG e outras patologias com algum tipo de componente hemolítico, nomeadamente, drepanocitose⁶², β -talassemia^{60,61}, incompatibilidade ABO⁶³ e défice de G6PD⁶⁴. Relativamente a esta associação o nosso grupo de trabalho publicou um estudo efectuado em 44 crianças⁶⁹, com diagnóstico de DHC (esferocitose hereditária - 30, défice de G6PD da classe I - 6, défice de piruvato kinase - 6, xerocitose hereditária - 1 e sem diagnóstico etiológico - 1). Neste trabalho encontramos uma média de bilirrubina total nos doentes com o genótipo ([TA]7/[TA]7) significativamente superior ao dos doentes com genótipo ([TA]6/[TA]6), assim como um aumento estatisticamente significativo, na proporção de doentes que desenvolveram litíase vesicular (0% dos doentes com o genótipo [TA]6/[TA]6, 16 % dos doentes com o genótipo [TA]6/[TA]7 e 60% dos doentes com o genótipo [TA]7/[TA]7).

É sabido que níveis endógenos das hormonas esteróides ligadas ao sexo têm um papel importante na etiologia de cancro na mulher, incluindo o **cancro da mama** e do endométrio. A glucuronidação dos estrogénios em metabolitos solúveis na água e menos reactivos é efectuada pelos enzimas do UGT, sendo a UGT1A1 o membro mais representativo^{76,77}. Neste contexto, e já que a inserção dinucleotídica [TA] na região promotora do gene *Ugt1a1* reduz a expressão, a associação deste polimorfismo tem vindo a ser estudado como factor de risco de cancro da mama. Os trabalhos não são muito numerosos e apresentam resultados contraditórios. O trabalho mais completo sobre este assunto foi publicado em 2004, por Adegoke et al⁷⁷, tendo concluído que a presença do

alelo [TA]7 está associado com aumento do risco de desenvolvimento de cancro da mama em mulheres chinesas com idade inferior a 40 anos. Neste mesmo trabalho, os autores especulam que as conclusões contraditórias encontradas nos diferentes trabalhos se relacionam com variações raciais existentes em outros genes relacionados com o metabolismo dos estrogénios. Qualquer que venham a ser os resultados finais dos estudos, a possibilidade de este gene condicionar de alguma forma o aparecimento de cancro da mama tornou-o um motivo de interesse para os Oncobiologistas.

Durante muitos anos pensou-se que a bilirrubina era apenas um tóxico produzido durante o catabolismo do heme. No entanto, existe evidência recente que a bilirrubina é um potente antioxidante fisiológico e como tal tem um efeito protector contra aterosclerose, doença coronária arterial, e inflamação^{78,79}. Muitos estudos têm vindo a ser efectuados, existindo evidência de uma associação inversa entre os níveis séricos de bilirrubina e doença cardiovascular. Num estudo efectuado por Hopking et al⁷⁹, em 1996, concluiu que existia uma redução de 60 a 90% do risco de doença coronária arterial nos indivíduos que apresentavam valores de bilirrubina mais elevados, alargando ainda mais a importância potencial do gene da UGT1A1.

II- Objetivos

II- Objectivos

O SG é reconhecidamente uma entidade clínica benigna, cujo diagnóstico é difícil do ponto de vista bioquímico. Este diagnóstico é, no entanto, importante, pois é comum que estes doentes sejam sujeitos a inúmeros exames invasivos para um esclarecimento etiológico da hiperbilirrubinémia que apresentam. O SCN é uma entidade clínica muito mais grave, o que realça a importância do seu diagnóstico, como também em determinadas situações, a necessidade de proceder a aconselhamento genético e mesmo diagnóstico pré natal.

O objectivo principal deste trabalho foi o de investigar a presença de mutações no gene UGT1A1, e estabelecê-las como diagnóstico etiológico em doentes portugueses com hiperbilirrubinémia e suspeita clínica de SG ou SCN.

A partir do perfil mutacional desta população, outros objectivos foram o estabelecimento de uma estratégia para o rastreio molecular e de uma relação genótipo/fenótipo.

III- Material e métodos

- 1- Doentes
- 2- População controlo
- 3- Análise molecular
 - 3.1- Material Biológico
 - 3.2- Genotipagem da região A(TA)_nTAA do gene UGT1A1
 - 3.3- Sequenciação do gene UGT1A1
 - 3.4- Análise conformacional dos polimorfismos de cadeia simples (PCR-SSCA)
 - 3.5 - Análise de Restrição
 - 3.6 – Exclusão de contaminação materna

III- Material e métodos

1- Doentes

Este trabalho incluiu 120 doentes com diagnóstico clínico de SG (77 do sexo masculino e 43 do sexo feminino), um com diagnóstico clínico de SCN tipo II e um diagnóstico prenatal de SCN tipo I, da região Norte de Portugal. A média (\pm SD) de bilirrubina total nos doentes com diagnóstico de SG era de $36,02 \pm 22,94 \mu\text{mol/l}$. O doente com diagnóstico de SCN tipo II apresentava valores basais de bilirrubina total de $108 \mu\text{mol/l}$, que diminuía com a administração de fenobarbital ($70 \mu\text{mol/l}$) e aumentava com jejum ($198 \mu\text{mol/l}$). O diagnóstico prenatal foi efectuado num feto cujos pais tinham já um filho com diagnóstico de SCN tipo I, relacionado com a mutação c.923G>A.

2 – População controlo

Nos rastreios populacionais foram utilizadas amostras de DNA (100 para as mutações e 50 para os polimorfismos) de indivíduos não relacionados.

3- Análise molecular

3.1- Material Biológico

O DNA genómico foi obtido de sangue periférico pelo método convencional da solução saturada de cloreto de sódio. O DNA foi extraído da amostra das vilosidades coriônicas usando o reagente comercial DNAzol® (Invitrogen life technologies, California, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.2- Genotipagem da região A(TA)_nTAA do gene UGT1A1

Em todos os doentes foi inicialmente pesquisado o número de repetições [TA] na região TATA-box do promotor do gene UGT1A1. Esta região foi amplificada pela reacção em

cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*- PCR) usando os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Bancroft et al⁸⁰ (UGT1A1-TAF e UGT1A1-TAR da tabela II), tendo um dos oligonucleotídeos iniciadores sido marcado com um fluorocromo (Ned).

A reacção de PCR foi efectuada usando PCR *Master Mix* (Promega, Madison, EUA). A 25 µl desta mistura, que tem DNA Taq polimerase, dNTPs e cloreto de magnésio, foi adicionado 1 µl de DNA genómico (concentração inferior a 250 ng/µl), 1 µl de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (50 pmol/µl) e água para um volume final de 50 µl. O programa de PCR, inclui uma desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C e extensão final de 30 minutos a 72°C, num termociclador *GeneAmp PCR System 9600* (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Após amplificação, 1 µl do produto foi adicionado a 15 µl de formamida desionizada e 0,2 µl de padrão de tamanho interno (ROXTM – 500 *size standard*). A separação dos fragmentos amplificados foi realizada no sequenciador automático ABI 310 utilizando o polímero POP4TM (Applied Biosystems, Foster City, EUA). O tamanho dos fragmentos amplificados e respectivo número de repetições [TA], foi determinado usando o programa *GeneScan v3*. O número de repetições [TA] foi confirmado em 4 amostras homozigóticas para 6 repetições, em 4 homozigóticas para 7 repetições e em 4 heterozigóticas para 6 e 7 repetições.

3.3- Sequenciação do gene UGT1A1

Nos doentes com SG que se revelaram heterozigóticos para a inserção dinucleotídica [TA] na região promotora do gene UGT1A1, assim como no doente com SCN tipo II, foi efectuada sequenciação directa dos cinco exões e da região promotora do gene

UGT1A1. A amplificação foi efectuada usando os oligonucleotídeos iniciadores apresentados na tabela II. A reacção de PCR foi efectuada usando PCR *Master Mix* (Promega, Madison, EUA), tal como na genotipagem da região A(TA)_nTAA. O programa de PCR inclui uma desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 56°C e 1 minuto a 72°C e extensão final de 10 minutos a 72°C (num termociclador *GeneAmp PCR System 9600*, Applied Biosystems, Foster City, EUA).

3.3.1- Purificação e quantificação do produto de PCR

Para eliminar os oligonucleotídeos não incorporados, o produto de PCR foi separado num gel de agarose a 2%, em tampão 1X TAE. As bandas correspondentes foram excisadas e centrifugadas em colunas de separação spin-X® (COSTAR, Baar, Alemanha) durante 15 minutos à rotação de 20800 rcf a 4°C. A concentração deste produto de PCR purificado, foi determinado por comparação com um marcador de peso molecular (*DNA mass ladder*, Invitrogen, California, EUA) num gel de agarose a 1%, com tampão TAE. A quantidade de produto usada na reacção de sequenciação foi de 1 a 3 ng por cada 100 pb.

3.3.2 – Reacção de sequenciação

As reacções de sequenciação foram efectuadas usando reagentes comerciais (*Kit Big Dye Terminator v.2*, Applied Biosystems, Foster City, EUA), nas condições recomendadas pelo fabricante. Foram adicionados para um volume final de 20 µl, 4 µl de *Big Dye Terminator v.2* (que contém MgCl₂, dNTPs, ddNTPs marcados com fluorocromos e *AmpliTaq DNA polimerase*), 1,5 µl de cada um dos oligonucleotídeos

iniciadores (5 pmol/μl), 5 μl de produto de PCR purificado e 9,5 μl de água destilada. O programa das reacções de sequenciação incluí uma desnaturação inicial de 6 minutos a 94°C, seguido de 25 ciclos de 10 seg a 96°C, 5 seg a 50°C e 4 seg a 60°C e de extensão final de 10 minutos a 60°C, num termociclador *GeneAmp PCR System 9600* (Applied Biosystems, , Foster City, EUA).

Tabela II – Oligonucleotídeos iniciadores usados na amplificação dos 5 exões e região promotora do gene UGT1A1

Região do gene	Nome	Sequência (5'→3')
UGT1A1		
Promotor	UGT1A1-PF	5'CTCTAAGCACATCCCCAAGTA ¹
	UGT1A1-PR	5'TAAGCAAGTTTCCATCCTTCA ¹
	UGT1A1-TAF	5'TAACTTGGTGTATCGATTGGTTTTTG*
	UGT1A1-TAR	5'ACAGCCATGGCGCCTTTGCT
Exão 1	UGT1A1-1aF	5'AGGAGCAAAGGCGCCATGGC
	UGT1A1-1aR	5'TGCAGTAAGTGGGAACAGCC
	UGT1A1-1bF	5'GCTGTTCCCACTTACTGCACA
	UGT1A1-1bR	5'CGCATGTAAAAGTCCCCTCC
Exão 2	UGT1A1-2F	5'TCTATCTCAAACACGCATGCC
	UGT1A1-2R	5'GGCAGGGAAAAGCCAAATCTA
Exão 3	UGT1A1-3F	5'TTGCCAGTCCTCAGAAGCCTT
	UGT1A1-3R	5'ATGCCCTTGCAGAAATTTGC
Exão 4	UGT1A1-4F	5'TGCAAGGGCATGTGAGTAACA
	UGT1A1-4R	5'AAGCCAAGATTGCACCACTG
Exão 5	UGT1A1-5F	5'GAGGATTGTTTCATACCACAGG
	UGT1A1-5R	5'GCACTCTGGGGCTGATTAAT

1- As sequências destes oligonucleotídeos iniciadores foram descritas na referência 81. *Oligonucleotídeo iniciador marcado com fluorocromo (Ned)

3.3.3- Purificação dos produtos de sequenciação

De forma a eliminar os dNTPs e ddNTPs não incorporados e sais que pudessem interferir com a electroforese capilar, os produtos de sequenciação foram purificados através da precipitação com etanol e MgCl₂. Ao produto de reacção (20 µl) adicionou-se 20 µl de MgCl₂ a 2 mM e 55 µl de etanol absoluto e centrifugou-se a mistura a 28000 ref a 4°C, durante 20 minutos. Após a remoção do sobrenadante o *pellet* obtido foi lavado com etanol a 70% e novamente centrifugado nas mesmas condições.

3.3.4 – Electroforese capilar

Os produtos purificados foram ressuspensos em 30 µl de formamida desionizada por agitação no *vortex* durante 10 segundos. A separação dos fragmentos foi realizada por electroforese capilar no sequenciador automático utilizando como matriz de separação o polímero POP4TM. Os resultados foram analisados no programa *sequence analysis v3.7* (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

3.4- Análise conformacional dos polimorfismos de cadeia simples (PCR-SSCA)

O rastreio populacional e/ou a pesquisa de portadores das mutações c.674T>G e c.488_491dupACCT e do polimorfismo c.997(-82T>C), foram efectuados por PCR-SSCA.

Os produtos amplificados referentes aos exões 1 (oligonucleotídeos iniciadores UGT1A1-1bF e UGT1A1-1bR) e 3 do gene UGT1A1 (5 µl) foram diluídos (1:1) num tampão de aplicação, desnaturados a 95°C durante 4 minutos e em seguida colocados directamente no gelo para evitar a renaturação dos produtos. As amostras foram posteriormente aplicadas em géis de acrilamida não desnaturante MDETM (BMA

products, Nottingham, UK) num sistema manual de géis verticais *Techware* (Sigma-Aldrich, St. Luis, EUA) em que o tampão utilizado foi de 0,6X TBE.

Foram testadas diferentes condições, nomeadamente diferentes concentrações e altura do gel, assim como diferentes temperaturas (temperatura ambiente e 4°C). As condições em que se conseguiu uma melhor separação dos fragmentos, foram: concentração de MDE 0,6X, altura do gel de 22 cm e temperatura ambiente. Para um volume final de 25 ml misturámos: 17,2 ml de água destilada, 1,5 ml de TBE (10X), 6,25 ml de MDETM, 125 µl de persulfato de amónia a 10% e 12,5 µl de tetrametil-etilenodiamina.

Para revelação dos géis foi utilizado o método de coloração pelo nitrato de prata⁸².

3.5 - Análise de Restrição

Análises de restrição foram efectuadas para o rastreio populacional e/ou pesquisa de portadores da mutação c.923G>A e do polimorfismo c.1-1126C>T.

A mutação c.923G>A localizada ao nível do exão 2 cria um novo local de corte com o enzima *HinfI* (New England Biolabs, Beverly, EUA). O polimorfismo c.1-1126C>T localizado na região promotora do gene cria também um novo local de corte para o enzima *Cac8I* (New England Biolabs, Beverly, EUA). Após a amplificação dos respectivos fragmentos, estes foram digeridos na presença do tampão da respectiva enzima, num volume final de 25 µl, a 37°C durante a noite. Os fragmentos resultantes da digestão foram analisados em géis de agarose a 2% em tampão 1X TAE.

3.6 – Exclusão de contaminação materna

Para exclusão de contaminação materna na amostra fetal, foram analisados 12 marcadores polimórficos (D5S640, D5S2077, D5S673, D5S410, D13S232, D13S292,

D13S1243, D13S1285, DMDSTR44, DMDSTR45, DMDSTR49 e DMDSTR50) por PCR-*multiplex*. Os respectivos oligonucleotídeos iniciadores, cujas sequências foram descritas por Richard et al⁸³, foram marcados com fluorocromos (tabela III). De acordo com o tamanho dos fragmentos foi possível combinar a marcação fluorocromática dos oligonucleotídeos iniciadores de modo a executar apenas 3 reacções de PCR (perfil 1, perfil 2 e perfil 3 da tabela III).

As PCR-*multiplex* foram optimizadas nas seguintes condições: 100 ng de DNA, 1X tampão de reacção (100 mM de Tris-HCl, pH 8,3 e 500 mM de KCl), 0,5 mM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 10% de DMSO, 4 µl de uma mistura de oligonucleotídeos iniciadores e 0,5 UI de *Taq Gold Polymerase*, num volume total de reacção de 20 µl. A mistura de oligonucleotídeos iniciadores foi preparada previamente a partir de soluções a 10 pmol/µl, e a proporção de cada oligonucleotídeo iniciador na mistura foi optimizada de acordo com o tamanho do fragmento e/ou da molécula fluorescente. Após várias tentativas ficou estabelecida a proporção 1:2:3 (fragmentos inferiores a 200 pb marcados com Ned ou Fam: fragmentos superiores a 200 pb com Ned ou Fam: fragmentos marcados com Hex), as reacções de PCR-*multiplex* foram sujeitas ao seguinte ciclo de temperaturas: uma desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, uma rampa de descida de 2 minutos até 55°C e 1 minuto a 72°C, com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Para reacção de PCR-*multiplex*, 1 µl dos produtos amplificados foi adicionado a 12 µl de uma mistura de formamida com um marcador de peso molecular (ROXTM – 500 *size standard*), desnaturados durante três minutos a 96°C e arrefecidos em gelo de imediato. A mistura foi então submetida a electroforese capilar e o tamanho dos fragmentos

determinado no programa *GeneScan* (ABI 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Tabela III – Características dos marcadores estudados para excluir contaminação materna.

Nome do marcador	Molécula fluorescente	Tamanho do fragmento (pb)	Localização cromossômica
Perfil 1			
D5S640	FAM	70 – 116	
D5S2077	Ned	89 – 97	Cromossoma 5
D5S673	Hex	260 – 294	
D5S410	Hex	309 - 333	
Perfil 2			
D13S232	Fam	104 – 126	
D13S292	Ned	133 – 139	Cromossoma 13
D13S1243	Ned	244 – 260	
D13S1285	Fam	197 - 219	
Perfil 3			
DMDSTR44	Ned	174 – 204	
DMDSTR45	Fam	156 – 184	Cromossoma X
DMDSTR49	Hex	227 – 257	
DMDSTR50	Fam	233 - 251	

IV- Resultados

- 1- Rastreio de mutações nos doentes com SG
- 2- Estudos familiares nos doentes com SG
- 3- Rastreio de mutações no doente com SCN tipo II
- 4- Diagnóstico pré-natal
- 5- Polimorfismos
- 6- Relação genótipo/fenótipo nos doentes com SG

IV- Resultados

1- Rastreo de mutações nos doentes com SG

Dos 120 doentes referenciados com diagnóstico clínico de SG, 110 (91,66 %) revelaram-se homozigóticos e 9 heterozigóticos para a inserção dinucleotídica TA na região promotora do gene UGT1A1 ([TA]7/[TA]7). O outro doente revelou-se heterozigoto composto para uma e duas inserções ([TA]7/[TA]8) (Fig. 6).

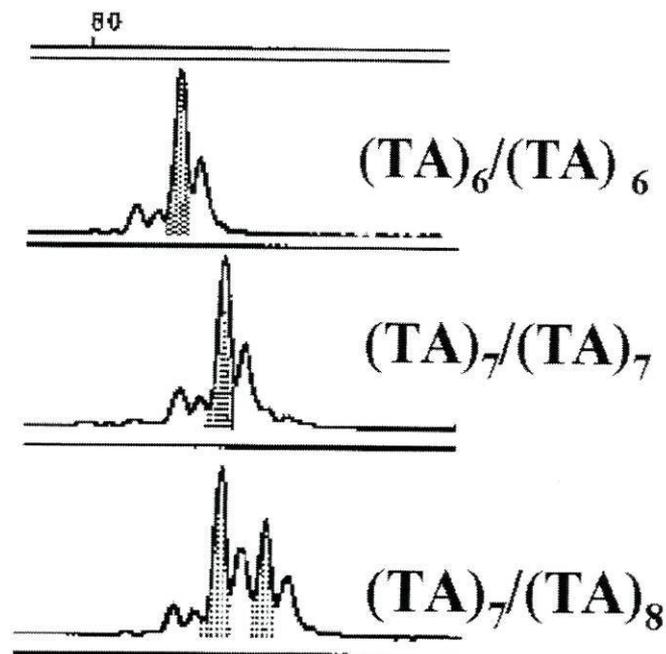


Fig. 6- Exemplos de resultados obtidos na genotipagem da região A(TA)nTAA do gene UGT1A1.

Estudos adicionais efectuados nos 9 doentes heterozigóticos para o alelo [TA]7, revelaram heterozigotia para as mutações c.923G>A (Fig. 7) em 4, heterozigotia para a mutação c.674T>G (Fig. 8) em um e heterozigotia para a mutação c.488_491dupACCT num outro (Fig. 9). Os estudos adicionais efectuados nos restantes 3 doentes não revelaram a presença de outras alterações.

As mutações c.674T>G, c.488_491dupACCT e c.923G>A não foram encontradas nos 100 indivíduos controlo. Dada a sua alta prevalência encontrada da mutação c.923G>A, esta foi pesquisada em 30 dos doentes homozigóticos para o alelo [TA]7, não tendo sido encontrada em nenhum deles.

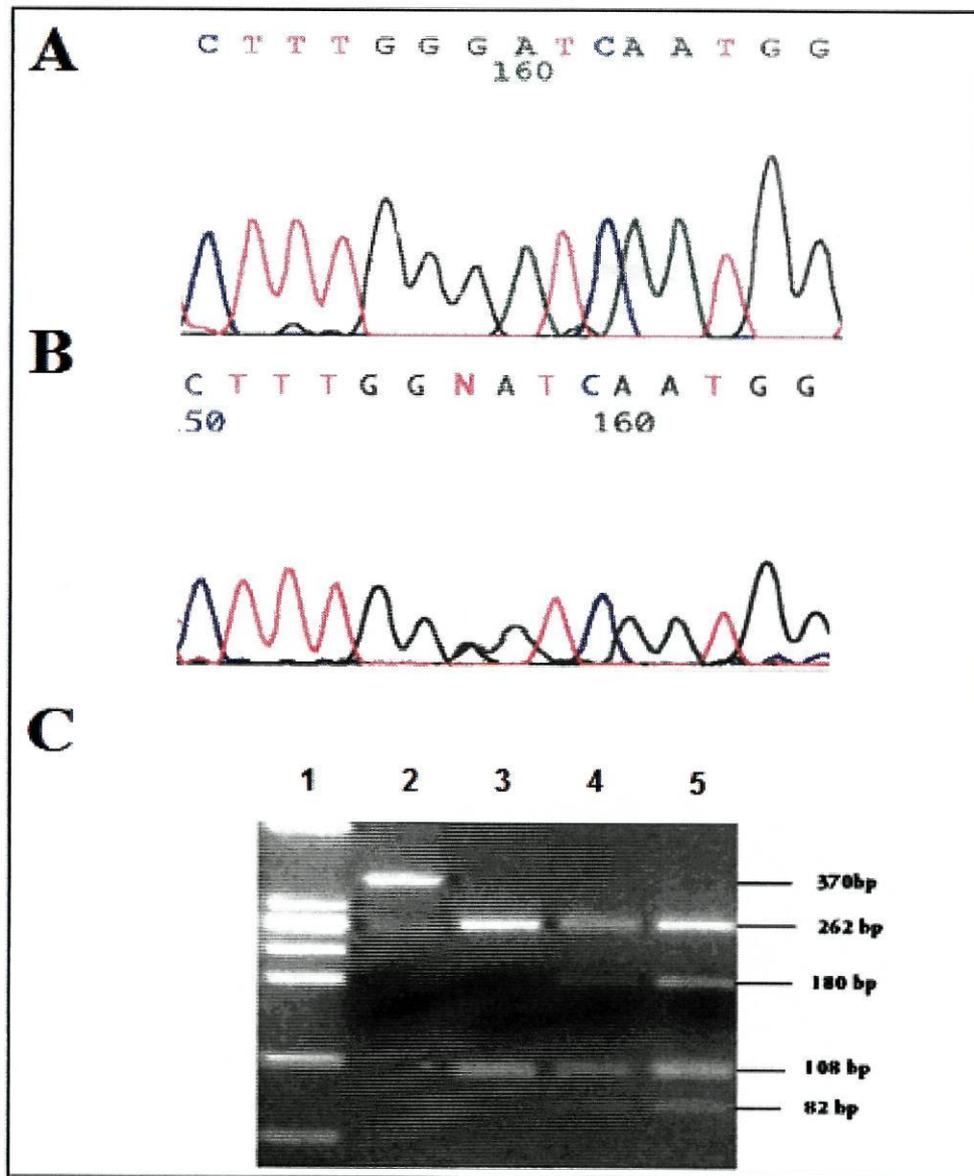


Fig. 7 – Mutação c.923G>A. A- Extracto da sequenciação do exão 2 de um indivíduo controlo. B- Extracto da sequenciação do exão 2 de um indivíduo heterozigótico para a mutação. C- Esta alteração cria um local reconhecido pelo enzima *Hinf I*: linha 1- marcador de peso molecular, linha 2 – fragmento não digerido (370 pb), linha 3- ausência da mutação (262pb + 108 pb) e linhas 4 e 5 – heterozigotia para o mutação (262 pb + 180 pb + 108 pb + 82 pb).

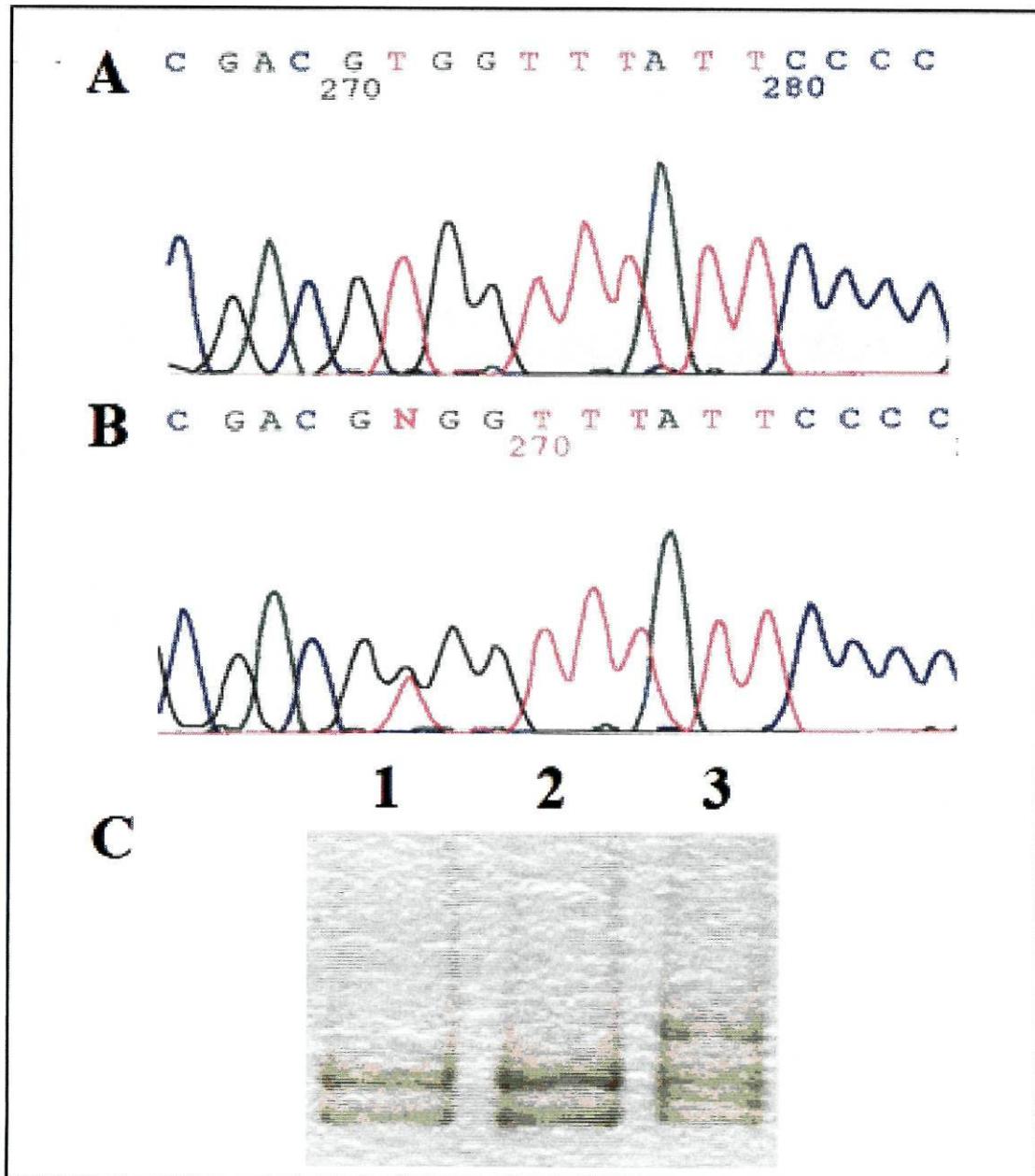


Fig. 8 – Mutação c.674T>G. A- Extracto da sequenciação do exão 1 de um indivíduo controlo. B- Extracto da sequenciação de um indivíduo heterozigótico para a mutação. C- Esta alteração condiciona uma alteração na mobilidade electroforética, na análise por PCR-SSCA: linhas 1 e 2 - padrão normal e linha 3 - padrão heterozigótico.

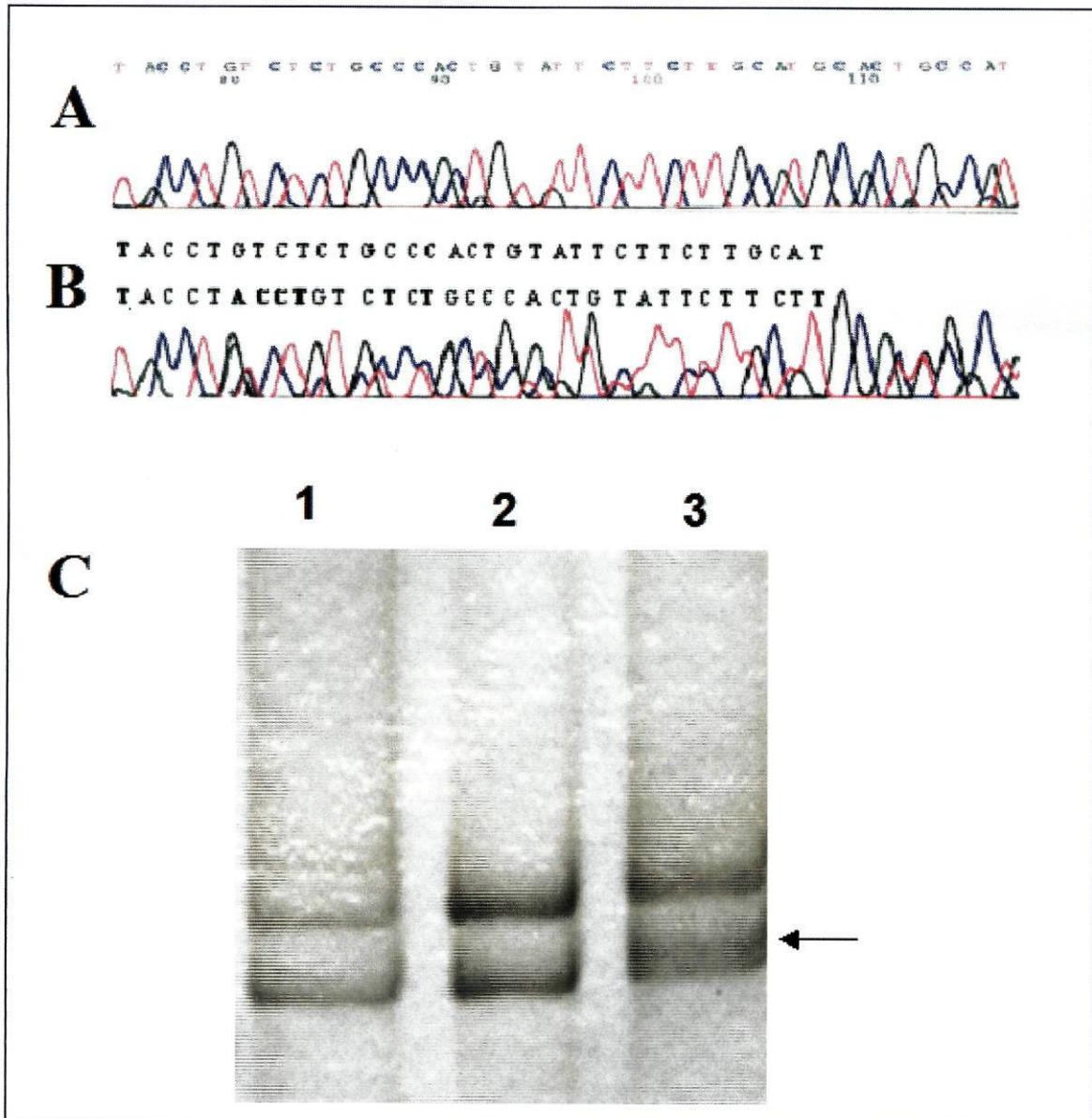


Fig. 9 – Mutação c.488_491dupACCT. A- Extracto da sequenciação do exão 1 de um indivíduo controlo. B- Extracto da sequenciação de um indivíduo heterozigótico para a mutação. C- Esta alteração condiciona uma alteração na mobilidade electroforética, na análise por PCR-SSCA: linhas 1 e 2 - padrão normal e linha 3 - padrão heterozigótico.

2 – Estudos familiares nos doentes com SG

Foi possível efectuar estudos familiares em 6 dos doentes com SG heterozigóticos para a inserção [TA] e em que foram detectadas alterações adicionais. Destas 6 situações, apenas uma apresentava história familiar sugestiva de forma de transmissão autossómica dominante (Fig. 10).

No doente heterozigoto composto para uma e duas inserções ([TA]7/[TA]8), os pais apresentavam valores de bilirrubina total normais, tendo o pai revelado heterozigotia para o alelo [TA]8 e a mãe heterozigotia para o alelo [TA]7.

Nas 3 situações em que foi identificada a mutação c.923G>A e em que não existia referência a história familiar de hiperbilirrubinémia, os pais apresentavam valores de bilirrubina total normal. O estudo molecular efectuado, revelou nos 3 casos, heterozigotia para a mutação c.923G>A nas mães e heterozigotia para a inserção [TA] nos pais.

No doente com história familiar de SG, a mãe e um tio materno apresentavam valores de bilirrubina total aumentados (41 e 35 $\mu\text{mol/l}$, respectivamente), tendo o estudo molecular revelado heterozigotia para as mutações c.923G>A e inserção [TA] na mãe e homozigotia para a inserção [TA] no tio. O pai embora se tenha revelado homozigótico para a inserção [TA], apresentava valores de bilirrubina total normais (15 $\mu\text{mol/l}$).

No doente em que foi identificada a mutação c.674T>G, ambos os pais revelavam valores de bilirrubina total normais. O estudo molecular efectuado permitiu detectar a presença de heterozigotia para as mutações c.674T>G e inserção [TA] na mãe e ausência de ambas no pai.

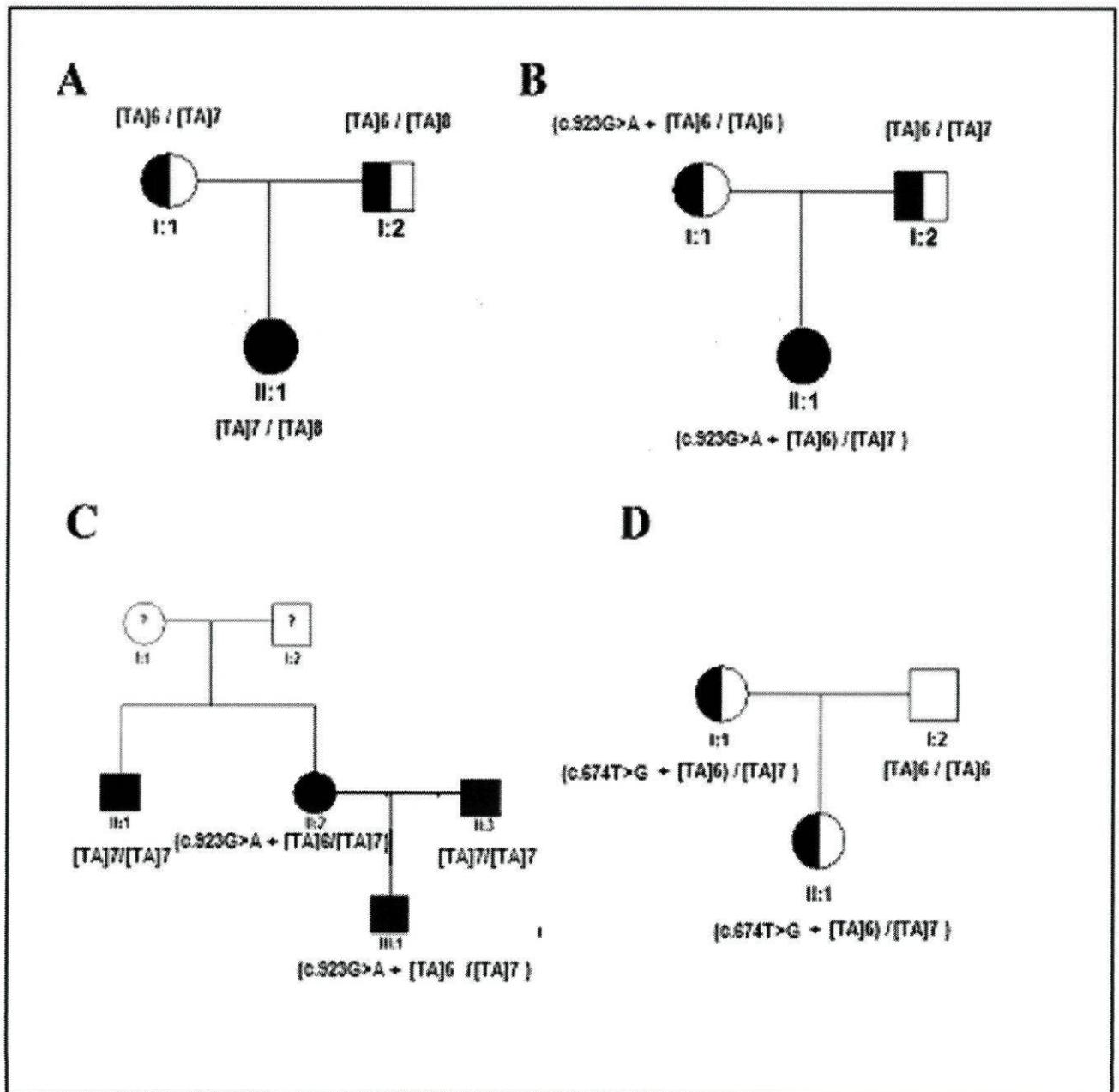


Fig. 10 – Árvores genealógicas das famílias estudadas. A – Doente heterozigótico composto para uma e duas inserções ([TA]7/[TA]8). B- Três doentes heterozigóticos compostos para as mutações c.923G>A e inserção [TA] revelaram um estudo familiar semelhante. C- Estudo familiar do doente com história familiar sugestiva uma forma de transmissão autossômica dominante. D- Doente que revelou as mutações c.674T>G e inserção [TA] em *cis*.

3- Rastreio de mutações no doente com SCN tipo II

O doente que nos foi referenciado com diagnóstico de SCN tipo II, revelou a presença de heterozigotia para a inserção dinucleotídica [TA] e heterozigotia para a mutação c.923G>A. A sequenciação directa dos restantes fragmentos do gene UGT1A1, não revelou a presença de alterações adicionais neste doente.

O estudo familiar efectuado revelou na mãe um aumento ligeiro nos valores de bilirrubina total (22 µmol/l). O pai apresentava valores normais de bilirrubina total. O estudo molecular efectuado em ambos revelou homozigotia para a inserção [TA] na mãe e heterozigotia para a mutação c.923G>A no pai. Estes resultados permitem-nos concluir que o doente é heterozigótico composto para as mutações c.923G>A e inserção [TA].

4- Diagnóstico pré-natal

Na amostra de DNA extraído das vilosidades coriônicas não foi detectada a presença da mutação c.923G>A, quer por restrição enzimática com o enzima *HinfI*, quer por sequenciação directa do fragmento correspondente ao exão 2 do gene UGT1A1. Ambos os pais revelaram-se heterozigóticos para a mutação. A pesquisa da inserção dinucleotídica [TA] revelou heterozigotia na amostra das vilosidades coriônicas e na amostra de DNA extraído do sangue periférico da mãe. O pai revelou-se homozigótico normal.

Foi excluída contaminação materna na amostra de DNA extraído das vilosidades coriônicas, na base dos resultados obtidos com os seguintes marcadores polimórficos: D5S640, D5S2077, D5S673, D5S410, D13S232, D13S292, D13S1243, D13S1285, DMDSTR44, DMDSTR45, DMDSTR49 e DMDSTR50.

5- Polimorfismos

Foram encontrados dois polimorfismos no gene UGT1A1. Um deles, localizado na região promotora do gene, trata-se de uma transição C>T (Fig. 11) na posição c.1-1126 (c.1-1126C>T). O outro, localizado no intrão 2, trata-se de uma transição T>C (Fig. 12) na posição c.997-82 (c.997-82T>C).

Foi determinada a frequência com que estas alterações surgem na população portuguesa, tendo o primeiro polimorfismo sido encontrado em 4 % e o segundo em 30% dos 100 cromossomas estudados.

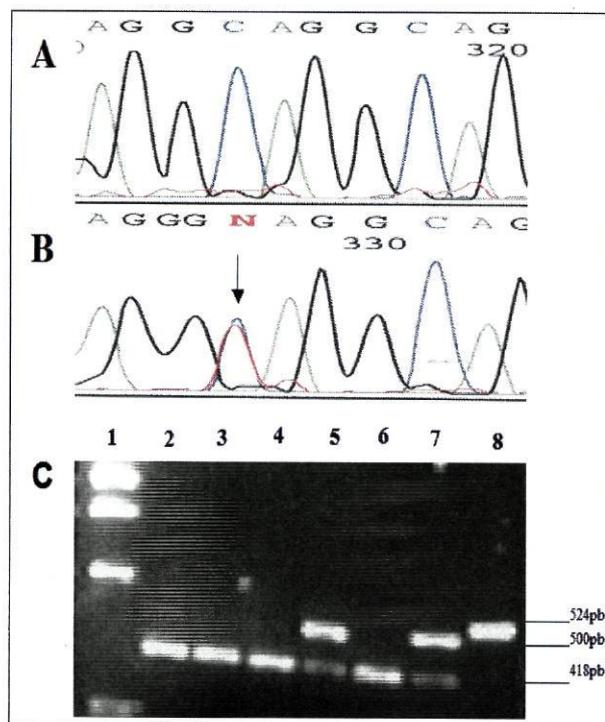


Fig. 11 – Polimorfismo c.1-1126C>T. A- Extracto da sequenciação da região promotora do gene de um indivíduo controlo. B- Extracto da sequenciação de um indivíduo heterozigótico para o polimorfismo. C- Esta alteração elimina um local reconhecido pelo enzima *Cac8I*: linha 1- marcador de peso molecular, linhas 2,3,4 e 6- ausência do polimorfismo (418pb + 82pb + 24pb), linhas 5 e 7 – heterozigotia para o polimorfismo (500pb + 24pb) e linha 8 – fragmento não digerido (524pb).

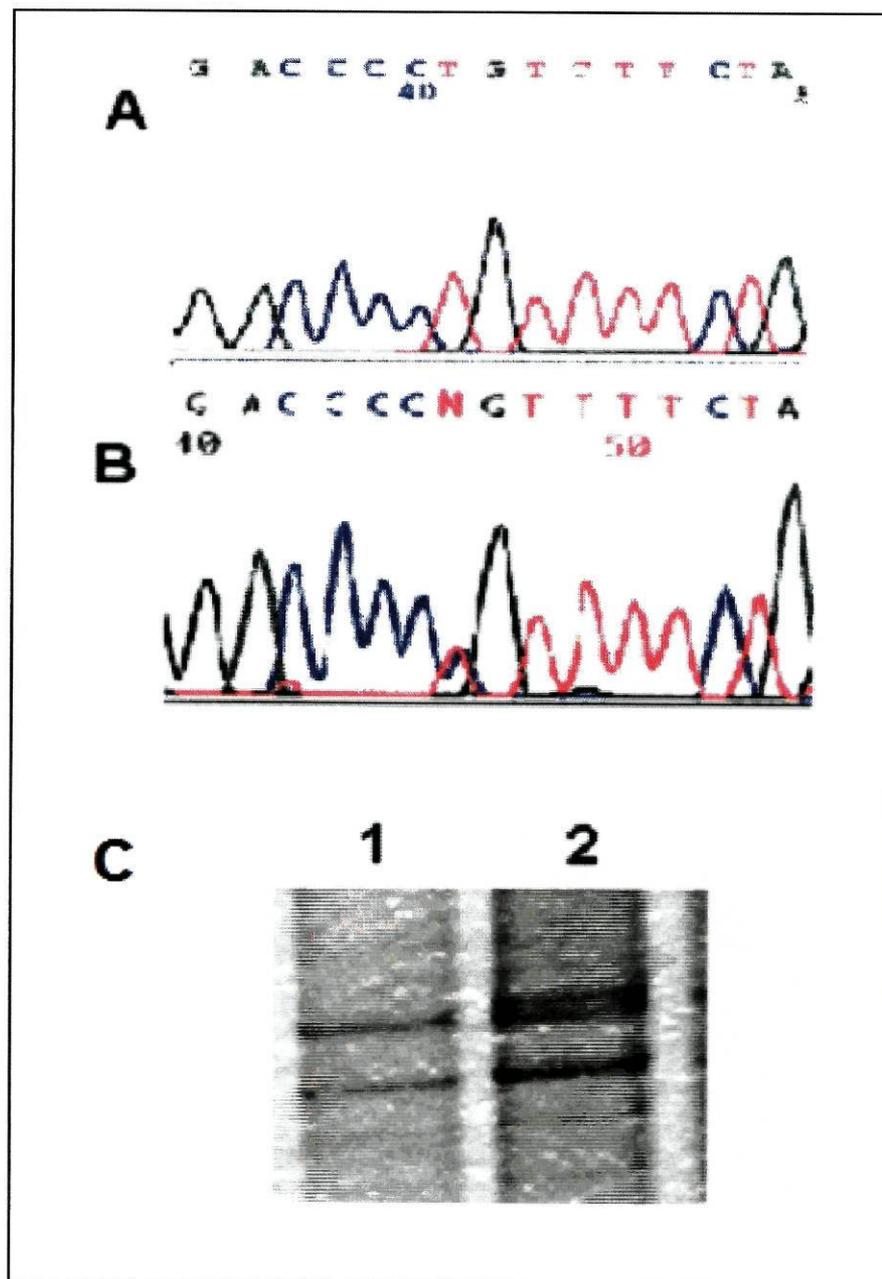


Fig. 12 – Polimorfismo c.997(-82T>C). A- Extracto do electroforograma da sequenciação do intrão 2 de um indivíduo controlo. B- Extracto do electroforograma da sequenciação de um indivíduo heterozigoto para o polimorfismo. C- Esta alteração condiciona uma alteração na mobilidade electroforética, na análise por PCR-SSCA: 1- padrão normal e 2- padrão heterozigótico.

6 – Relação genótipo/fenótipo nos doentes com SG

Os níveis de bilirrubina total encontrados nos indivíduos do sexo masculino homocigóticos para a inserção [TA] eram estatisticamente superiores ($p=0,009$, *t*-test) aos encontrados nos indivíduos do sexo feminino com o mesmo genótipo: $39,6 \mu\text{mol/l}$ (DP: $24,07 \mu\text{mol/l}$) versus $26,96 \mu\text{mol/l}$ (DP: $10,98 \mu\text{mol/l}$), (fig. 13).

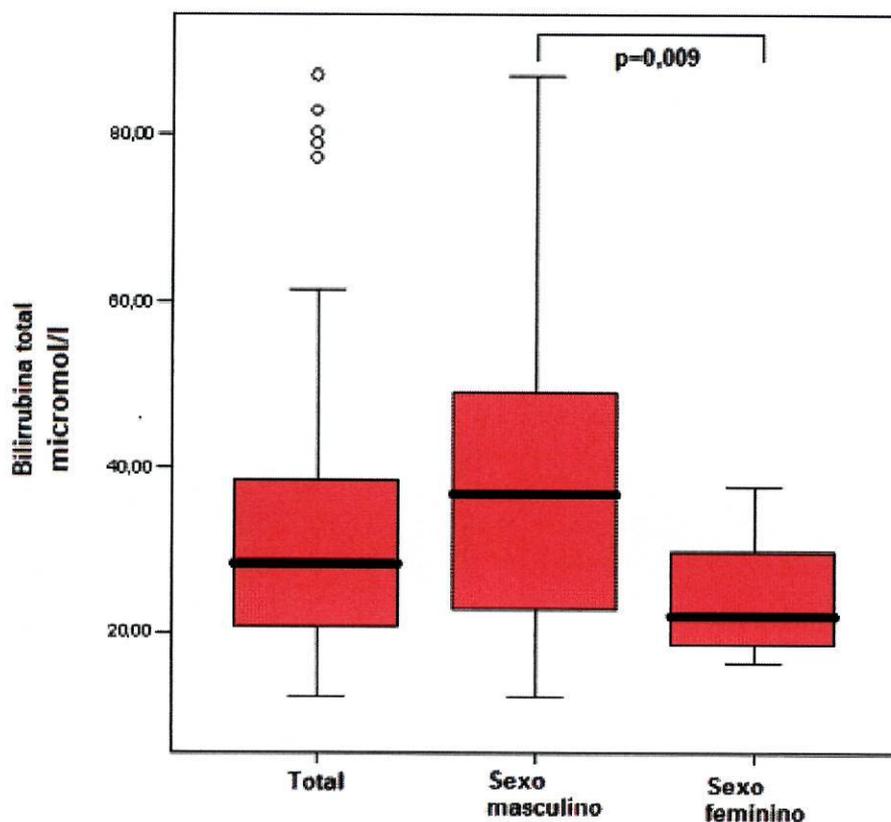


Fig. 13 – Comparação, por sexo, dos níveis de bilirrubina total encontrados nos indivíduos homocigóticos para a inserção [TA].

Nos quatro doentes heterocigóticos compostos para as mutações c.923G>A e inserção [TA], a média de bilirrubina total foi de $61,3 \mu\text{mol/l}$ (DP: $23,6 \mu\text{mol/l}$). Embora o número de doentes com este genótipo seja reduzido, parece-nos que estes doentes

apresentam valores de bilirrubina superiores aos dos doentes com o genótipo [TA]7/[TA]7. O valor médio de bilirrubina encontrado na doente com a mutação c.674T>G foi de 48 $\mu\text{mol/l}$. Este valor é superior à média encontrada nos doentes do sexo feminino homocigóticos para o alelo [TA]7. O valor de bilirrubina total médio do doente com a mutação c.488_491dupACCT foi de 39 $\mu\text{mol/l}$, que é um valor sobreponível à média dos valores encontrados nos doente do sexo masculino homocigóticos para o alelo [TA]7. A doente com o alelo [TA]8, apresenta doseamento médio de bilirrubina total de 60 $\mu\text{mol/l}$, que é um valor superior ao encontrado em todos os doentes do sexo feminino homocigóticos para a inserção [TA], o que sugere uma maior gravidade desta mutação (Quadro IV).

Quadro IV- Resumo das mutações encontradas e respectivos valores de bilirrubina total.

Número de doentes	Fenótipo	Alelo 1	Alelo 2	Bilirrubina total ($\mu\text{mol/l}$) (média \pm DP)
110	SG	[TA]7	[TA]7	32,12 \pm 18,1
4	SG	[TA]7	c.923G>A	61,3 \pm 23,6
3	SG	[TA]7	?	46,6 \pm 29,95
1	SG	[TA]7 + c.674T>G	-	48
1	SG	[TA]7 + c.488_491dupACCT*		39
1	SG	[TA]7	[TA]8	60
1	SCN	[TA]7	c.923G>A	108

*Neste caso o estudo familiar não foi possível, o que nos dificultou a conclusão quanto à presença de ambas as mutações em *cis* ou *trans*.

V- Discussão

V- Discussão

O diagnóstico de SG foi durante muitos anos feito por exclusão, dada a dificuldade no estudo bioquímico do enzima UGT1A1. A localização do seu gene e posteriormente a identificação de mutações relacionadas com o SG, veio alterar de forma significativa este panorama, pois permitiu encontrar marcadores genéticos para a doença⁸⁴⁻⁸⁷. Embora o SG seja uma patologia benigna, o seu diagnóstico pode ser importante, dado que estes doentes no decurso da investigação etiológica da hiperbilirrubinémia, podem vir a ser sujeitos a um número significativo de exames, mais ou menos invasivos^{38,39}.

Na nossa população de doentes com SG, a homozigotia para a inserção dinucleotídica [TA] na região promotora do gene UGT1A1, revelou-se como a sua principal causa. A alta frequência desta mutação é sobreponível ao descrito na literatura para outras populações caucasianas⁸⁴⁻⁸⁷. Isto tem condicionado que a pesquisa deste alelo, efectuada por técnicas de biologia molecular simples, se tenha transformado num exame de extrema utilidade na confirmação do diagnóstico de SG, particularmente das suas formas mais ligeiras.

Beutler et al⁵⁹ baseados em diferentes estudos publicados na literatura, calcularam para a população caucasiana uma prevalência de 15% de homozigotia para o alelo [TA]7. Esta prevalência é significativamente superior à de doentes com diagnóstico de SG calculada na base dos níveis plasmáticos de bilirrubina^{88,89}, o que reflecte a existência de outros factores adquiridos e/ou hereditários que possam, adicionalmente ao défice de glucuronidação hepática provocado pela existência da inserção [TA], afectar o metabolismo da bilirrubina.

No grupo de doentes do sexo masculino com SG, homozigóticos para a inserção [TA], encontramos níveis de bilirrubina significativamente superiores (1,5 vezes) aos

encontrados nos indivíduos do sexo feminino com o mesmo genótipo. Isto deve-se possivelmente à maior quantidade de bilirrubina produzida pelos indivíduos do sexo masculino e/ou à inibição do enzima responsável pela glucuronidação da bilirrubina por esteróides androgénicos^{38,39}. Estes níveis de bilirrubina mais elevados nos indivíduos do sexo masculino poderá explicar o facto de eles nos serem referenciados em maior número (66%).

A presença do alelo [TA]8 não foi descrita anteriormente em nenhum outro doente português com SG. Do nosso conhecimento, existe na literatura, apenas duas descrições de doentes caucasianos com SG, que apresentam este alelo. O primeiro caso é o de uma rapariga de Taranto (Itália), heterozigota composta para uma e duas inserções ([TA]7[TA]8), tal como o nosso caso⁹⁰. Este caso tem um grau elevado de semelhança com o nosso, já que são ambos do sexo feminino, com a mesma idade e níveis de bilirrubina total muito semelhantes (60 e 57,9 $\mu\text{mol/l}$). Estes dois casos, analisados em conjunto, dão alguma evidência da existência de algum tipo de correlação genótipo/fenótipo. O segundo caso, refere-se a um rapaz de 3 anos de idade de origem grega, heterozigoto para este alelo ([TA]6/[TA]8)⁹¹.

Apesar da presença do alelo [TA]8 ser muito raro em indivíduos caucasianos, a sua frequência na população africana é estimada em 6,9 %⁵⁹. Iolascon⁹⁰ e Tsezou⁹¹ sugerem que o aparecimento deste alelo na população caucasiana é um evento genético recente, não sendo portanto o resultado de uma mutação ancestral comum. Este raciocínio é reforçado pelo facto de sequências repetitivas serem instáveis e poderem aumentar ou diminuir por diferentes mecanismos, nomeadamente por *crossing over* desigual durante a meiose.

Erps et al⁹² descreveu pela primeira vez em 1994 a mutação c.923G>A em homozigotia numa criança do sexo feminino com 7 anos de idade com diagnóstico de SCN tipo I.

Esta criança apresentava níveis de bilirrubina total que variavam entre 410 e 460 $\mu\text{mol/l}$ e que não diminuía com a administração de fenobarbital. Nesse mesmo artigo os autores referem que tanto os pais como um irmão eram heterozigóticos para a mutação, não referindo no entanto os seus valores de bilirrubina total. Esta mutação condiciona a substituição da glicina localizada na posição 308 por um ácido glutâmico, a qual se localiza num domínio altamente conservado da proteína, que vai da posição 298 até à posição 315⁹², relacionado com a ligação ao substrato.

Verificamos, inesperadamente, que esta mutação se veio a revelar como a segunda mutação mais frequentemente associada com SG na nossa população. No entanto, esta mutação só por si não parece suficiente para condicionar hiperbilirrubinémia, já que, por um lado, a encontramos nos doentes com SG sempre em heterozigotia composta com a inserção [TA] e por outro lado, os familiares que a apresentavam isoladamente não apresentavam hiperbilirrubinémia. Na literatura não encontramos referência a outros casos de SG associados a esta heterozigotia composta para podermos fazer uma melhor relação genótipo/fenótipo. No entanto, os 4 doentes por nós estudados apresentam valores médios de bilirrubina total significativamente superiores aos doentes homozigóticos para a inserção [TA].

Heterozigotia composta para as mutações c.923G>A e inserção [TA] também foi encontrada no doente com diagnóstico de SCN tipo II. Não encontramos na literatura qualquer referência a esta associação. Habitualmente o SCN tipo II está associado com homozigotia ou heterozigotia composta para mutações do tipo *missense* no gene UGT1A1. No entanto, mais raramente, têm vindo a ser descritas situações de heterozigotia composta de mutações relacionadas em homozigotia com SCN tipo I, com a inserção [TA].

O facto desta heterozigotia composta ter sido encontrada tanto em doentes com diagnóstico de SG, como no doente com diagnóstico de SCN tipo II, sugere-nos a existência de outros factores, adquiridos e/ou hereditários, que possam adicionalmente afectar os níveis plasmáticos de bilirrubina.

Iolascon et al⁹³ descreveu no ano 2000 pela primeira vez a mutação c.674T>G, numa criança do sexo masculino, com 8 anos de idade, com diagnóstico SCN tipo II. Esta mutação foi descrita em associação com a mutação c.239_240delAG e com homozigotia para a inserção [TA]. Este doente herdou da mãe a mutação c.674T>G associada à inserção [TA] e do pai a mutação c.239_240delAG, também associada à inserção [TA]. A mãe deste doente, assim como a doente por nós estudada e a sua mãe apresentam o mesmo genótipo. No entanto, a nossa doente tinha valores de bilirrubina bastante elevados que contrastavam com os encontrados na sua mãe e na mãe do doente descrito por Iolascon et al⁹³, que apresentavam valores de bilirrubina normais ou ligeiramente aumentados (15 e 18,7 $\mu\text{mol/l}$, respectivamente). As razões que nos levam a pensar que esta mutação é causal são: o aminoácido que é substituído é altamente conservado, nenhum dos 100 indivíduos controlo estudados apresenta esta alteração e a sequenciação directa das regiões codificadas do gene UGT1A1 não ter detectado a presença de alterações adicionais.

A mutação c.488_491dupACCT foi encontrada pela primeira vez no doente descrito por nós. Esta mutação do tipo *frameshift*, condiciona uma paragem prematura na síntese da proteína ao nível do aminoácido 183 (Fig. 14). Não foi possível o estudo familiar neste caso. No entanto, dado tratar-se de uma mutação que condiciona alterações tão drásticas a nível protéico, estar localizada no local de ligação da enzima ao substrato, não ter sido encontrada em nenhum dos 100 indivíduos controlo estudados e se associar à inserção [TA] podemos concluir tratar-se da alteração causal.

```

MAVESQGG RPLVLG LLLCVLGPVVSHAGKILLIPVDGSHWLSMLGAIQQLQQR
MAVESQGG RPLVLG LLLCVLGPVVSHAGKILLIPVDGSHWLSMLGAIQQLQQR

GHEIVVLAPDASLYIRDGAFYTLKTYVPPFQREDVKESFVSLGHNVFENDSFLQR
GHEIVVLAPDASLYIRDGAFYTLKTYVPPFQREDVKESFVSLGHNVFENDSFLQR

VIKTYKKIKKDSAMLLSGCSHLLHNKELMASLAESSFDVMLTDPFLPCSPIVAQY
VIKTYKKIKKDSAMLLSGCSHLLHNKELMASLAESSFDVMLTDPFLPCSPIVAQY

LSLPTVFFLHALPCSLEFEATQCPNPF SYVPRPLSSHSDHMTFLQRVKNMLIAFS
LPVSAHCILLACTAMQPGI Stop

QNFLCDVVYSPYATLASEFLQREVTVQDLLSSASVWLF RSD FVKDYPRPIMP N
MVFVGGINCLHQ NPLSQEF EAYINASGEHGIVVFSLGSMVSEIPEKKAMA IADA
LGKIPQTVLWRYTGTRPSNL ANNTILVKWLPQNDLLGHPMTRAFITHAGSHGV
YESICNGVPMVM MPLFGDQMDNAKRMETKGAGVTLNVLEMTSEDLENALKA
VINDKSYKENIMRLSSLHKDRPVEPLDLAVFWVEFVMRHKGAPHLRPA AHDLT
WYQYHSLDVIGFLLAVVLTVAFITFKCCAYGYRKCLGKKGRVKKAHKSKTH

```

Fig. 14- Sequência da proteína normal (letras pretas) e a sequência da proteína truncada resultante da mutação c.488_491dupACCT (letras vermelhas).

Em conclusão, a inserção [TA] na região promotora do gene UGT1A1 é a causa mais frequente de SG na população portuguesa. A presença de outras alterações podem também associar-se com SG. A mutação c.923G>A em heterozigotia revelou-se como a segunda causa mais frequente de SG na nossa população. Dado que se trata de uma mutação que anula a actividade do enzima, a sua pesquisa poderá ser de extrema importância tanto em termos de diagnóstico, como de aconselhamento genético e mesmo de diagnóstico pré-natal.

VI - Perspectivas Futuras

VI - Perspectivas Futuras

A contribuição da biologia molecular para o diagnóstico do SG revelou-se de extrema importância, particularmente quando foi identificada a inserção [TA] no promotor do gene UGT1A1 como o principal marcador genético desta patologia. Efectivamente, a pesquisa desta inserção, efectuada por técnicas de biologia molecular simples, permite-nos estabelecer o diagnóstico de SG de forma rápida, eficiente e económica. A identificação de outras mutações, eventualmente mais graves, pode ser útil não só para o diagnóstico, como também no aconselhamento genético. A identificação da alteração genética associada com SCN, para além da confirmação do diagnóstico, permite o aconselhamento genético e o diagnóstico pré-natal.

A identificação de outros factores, hereditários ou adquiridos, que possam influenciar a relação genótipo/fenótipo é sem dúvida a questão de maior importância a investigar no futuro. Neste sentido, a curto prazo pensamos tentar estudar a frequência do alelo c.1-3263T>C na nossa população e a sua influência nos níveis de bilirrubina tanto nos doentes com SG cujas alterações causais não tenham ainda sido identificadas, assim como a sua influência nos níveis de bilirrubina em doentes homozigóticos para a inserção [TA].

O estabelecimento do perfil mutacional dos doentes com SG na população portuguesa possibilitará estudar a sua associação com outras patologias, nomeadamente oncológicas.

VII- Bibliografia

VII- Bibliografia

- 1- Bonnet R, Davies JE, Hursthouse MB. Structure of bilirubin. *Nature* 1976;262:327.
- 2- Hutchinson DW, Johnson B, Knell AJ. Tautomerism and hydrogen bonding in bilirubin. *Biochem J* 1971; 123:483.
- 3- Ostrow JD, Celic L, Mukerjee P. Molecular and micellar associations in the pH-dependent stable and metastable dissolution of unconjugated bilirubin by bile salts. *J Lipid Res* 1988;29:335.
- 4- Zucker SD, Goessling W. Mechanism of hepatocellular uptake of albumin-bound bilirubin. *Biochim Biophys Acta* 2000;1463:197.
- 5- Zucker SD, Goessling W, Hoppin AG. Unconjugated bilirubin exhibits spontaneous diffusion through model lipid bilayers and native hepatocyte membranes. *J Biol Chem* 1999;274:10852.
- 6- Berk PD, Howe RB, Bloomer JR, et al. Studies of bilirubin kinetics in normal adults. *J Clin Invest* 1969; 48:2176.
- 7- Robinson SH. The origins of bilirubin. *N Eng J Med* 1968;279:143.
- 8- Israels LG. The bilirubin shunt and shunt hyperbilirubinemia. *Prog Liver Dis* 1970;3:1.
- 9- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal heme oxygenase: characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1969;244:6388.
- 10- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J Lab Clin Med* 1970;75:410.

- 11- Rodgers PA, Vreman HJ, Dennery PA, et al. Sources of carbon monoxide (CO) in biological systems and applications of CO detection technologies. *Semin Perinatol* 1994;18:2.
- 12- Yoshinaga T, Sassa S, Kappas A. A comparative study of heme degradation by NADPH-cytochrome c reductase alone and by the complete heme oxygenase system. Distinctive aspects of heme degradation by NADPH-cytochrome c reductase. *J Biol Chem* 1982;257:7794.
- 13- Yoshinaga T, Sassa S, Kappas A. The occurrence of molecular interactions among NADPH-cytochrome c reductase, heme oxygenase, and biliverdin reductase in heme degradation. *J Biol Chem* 1982;257:7786.
- 14- Felsher BF, Carpio NM. Caloric intake and unconjugated hyperbilirubinemia. *Gastroenterology* 1975;69:42.
- 15- Maines MD. Multiple forms of biliverdin reductase: age-related change in pattern of expression in rat liver and brain. *Mol Pharmacol* 1990; 38:481.
- 16- Maines MD, Trakshel GM. Purification and characterization of human biliverdin reductase. *Arch Biochem Biophys* 1993;300:320.
- 17- Brandes JM, Berk PD, Urbach J, et al. Transport of bilirubin and glucose by the isolated perfused human placenta. *Contrib Gynecol Obstet* 1985;13:147.
- 18- Berk PD, Martin JF, Blaschke TF, et al. Unconjugated hyperbilirubinemia. Physiologic evaluation and experimental approaches to therapy. *Ann Intern Med* 1975;82:552.
- 19- Poland RL, Odell GB. Physiologic jaundice: the enterohepatic circulation of bilirubin. *N Eng J Med* 1971;284:1.
- 20- Jacobsen J, Brodersen R. Albumin-bilirubin binding mechanism. *J Biol Chem* 1983;258:6319.

- 21- Berk PD, Bradbury M, Zhou SL, et al. Characterization of membrane transport processes: lessons from the study of BSP, bilirubin, and fatty acid uptake. *Semin Liver Dis* 1996;16:107.
- 22- Fleischner GM, Arias IM. Structure and functions of ligandin (Y protein, GSH transferase B) and Z protein in the liver: a progress report. *Prog Liver Dis* 1976;5:172.
- 23- Theilmann L, Stollman YR, Arias IM, et al. Does Z-protein have a role in transport of bilirubin and bromosulfophthalein by isolated perfused rat liver? *Hepatology* 1984;4:923.
- 24- Zucker SD, Storch J, Zeidel ML, et al. Mechanism of the spontaneous transfer of unconjugated bilirubin between small unilamellar phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry* 1992;31:3184.
- 25- Zucker SD, Goessling W, Zeidel ML, et al. Membrane lipid composition and vesicle size modulate bilirubin intermembrane transfer. Evidence for membrane –directed trafficking of bilirubin in the hepatocyte. *J Biol Chem* 1994;269:19262.
- 26- Fevery J, Van Damme B, Michiels R, et al. Bilirubin conjugates in bile of man and rat in the normal state and in liver disease. *J Clin Invest* 1972;51:2482.
- 27- Burchell B, Coughtrie MW. UDP-glucuronosyltransferases. *Pharmacol Ther* 1989;43:261.
- 28- Fevery J, Blanckaert N, Heirwegh KP, et al. Unconjugated bilirubin and an increased proportion of bilirubin monoconjugates in the bile of patients with Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar disease. *J Clin Invest* 1977;60:970.
- 29- Wolkoff AW, Ketley JN, Waggoner JG, et al. Hepatic accumulation and intracellular binding of conjugated bilirubin. *J Clin Invest* 1978;61:142.

- 30- Crawford JM, Berken CA, Gollan JL. Role of the hepatocyte microtubular system in the excretion of the bile salts and biliary lipid: implications for intracellular vesicular transport. *J Lipid Res* 1988;29:144.
- 31- Verkade HJ, Havinga R, Gerding A, et al. Mechanism of the bile acid-induced biliary lipid secretion in the rat: effect of conjugated bilirubin. *Am J Physiol* 1993;264:G426.
- 32- Gartner LM, Lee KS, Vaisman S, et al. Development of bilirubin transport and metabolism in the newborn rhesus monkey. *J Pediatr* 1977;90:513.
- 33- Lester R, Schmid R. Intestinal absorption of bile pigments. Bilirubin absorption in man. *N Eng J Med* 1963;269:178.
- 34- Watson CJ. Composition of the urobilin in urine, bile and feces and the significance of variations in health and disease. *J Lab Clin Med* 1959;1:54.
- 35- Schmid R. Some aspects of the bile pigment metabolism. *Clin Chem* 1957;3:394.
- 36- Schmid R. Direct-reacting bilirubin glucuronide, in serum, bile, and urine. *Science* 1956;124:76.
- 37- Billing BH, Cole PG, Lathe GH. The excretion of bilirubin as diglucuronide giving the direct van den Bergh reaction. *Biochem J* 1957;65:774.
- 38- Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. *Wintrobe's clinical haematology 9th ed.* Lea and Febiger. Philadelphia 1993.
- 39- Nathan DG, Orking SH. *Nathan and Oski's haematology of infancy and childhood 5th ed.* WB Sanders Company. Philadelphia 1998.
- 40- Black M, Billing BH. Hepatic bilirubin UDP-glucuronyltransferase activity in liver disease and Gilbert's syndrome. *N Eng J Med* 1969;280:1266.

- 41- Sieg A, Stiehl A, Raedsch R, et al. Gilbert's syndrome: diagnosis by typical serum bilirubin pattern. *Clin Chim Acta* 1986;154:41.
- 42- Thomsen HF, Hardt F, Juhl E. Diagnosis of Gilbert's syndrome. Reliability of the caloric restriction and Phenobarbital stimulation tests. *Scand J Gastroenterol* 1981;16:699.
- 43- Rollinghoff W, Paumgartner G, Preisig R. Nicotinic acid test in the diagnosis of Gilbert's syndrome: correlation with bilirubin clearance. *Gut* 1981;22:663.
- 44- Schmid R, Hammaker L. Metabolism and disposition of C14-bilirubin in congenital nonhemolytic jaundice. *J Clin Invest* 1963;42:1720.
- 45- Van der Veere CN, Sinaasappel M, McDonagh AF, et al. Current therapy for Crigler-Najjar syndrome type 1: report of a world registry. *Hepatology* 1996;24:311.
- 46- Arrowsmith WA, Payne RB, Littlewood JM. Comparison of treatments for congenital nonobstructive nonhaemolytic hyperbilirubinemia. *Arch Dis Child* 1975;50:197.
- 47- Arias IM, Chronic unconjugated hyperbilirubinemia without overt signs of hemolysis in adolescents and adults. *J Clin Invest* 1962; 41:2233.
- 48- Arias IM, Gartner LM, Cohen M, Ben-Ezzer J, Levi AJ. Chronic nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with glucuronyl transferase deficiency: clinical, biochemical, pharmacologic and genetic evidence for heterogeneity. *Am J Med* 1969;47:395.
- 49- Berk PD, Noyer CM. The familial unconjugated hyperbilirubinemias. *Semin Liver Dis* 1994;14:356.

- 50- Ritter JK, Crawford JM, Owens IS. Cloning of two human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNAs with expression in COS-1 cell. *J Biol Chem* 1991;266:1043.
- 51- Ritter JK, Chen F, Sheen YY, et al. A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes with identical carboxyl termini. *J Biol Chem* 1992; 267:3257.
- 52- Vanstapel F, Blanckaert N. Topology and regulation of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in sealed native microsomes from rat liver. *Arch Biochem Biophys* 1988;263:216.
- 53- Vanstapel F, Hammarker L, Pua K, et al. Properties of membrane-bound bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in rough and smooth endoplasmic reticulum and in the nuclear envelope from rat liver. *Biochem J* 1989;259:659.
- 54- Seppen J, Steenken E, Lindhout D, et al. A mutation which disrupts the hydrophobic core of the signal peptide of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase, an endoplasmic reticulum membrane protein, causes Crigler-Najjar type II. *FEBS Lett* 1996;390:294.
- 55- Bosma PJ, Chowdhury NR, Goldhoorn BG et al. Sequence of exons and the flanking regions of human bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase gene complex and identification of a genetic mutation in a patient with Crigler-Najjar syndrome type I. *Hepatology* 1992;15:941.
- 56- The Human Gene Mutation Database (HGMD). www.hgmd.org, consultada em 20 de Agosto de 2004.
- 57- Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1995;333:1171.

- 58- Burchell B, Hume R. Molecular genetic basis of Gilbert's syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14:960.
- 59- Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:8170.
- 60- Galanello R, Perseu L, Melis MA, Cipollina L, Barella S, Giagu N, Turco MP, Maccioni O, Cao A. Hyperbilirubinaemia in heterozygous beta-talassaemia is related to co-inherited Gilbert's syndrome. *Br J Haematol* 1997;99:433.
- 61- Borgna-Pignatti C, Rigon F, Merlo L, et al. Thalassemia minor, the Gilbert mutation, and risk of gallstones. *Haematologica* 2003;88:1106.
- 62- Passon RG, Howard TA, Zimmerman SA, Schultz WH, Ware RE. Influence of bilirubin uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A promoter polymorphisms on serum bilirubin levels and colelithiasis in children with sickle cell anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001;23:448.
- 63- Kaplan M, Hammarman C, Renbaum P, Klein G, Levy-Lahad E. Gilbert's syndrome and hyperbilirubinaemia in ABO-incompatible. *Lancet* 2000; 356:652.
- 64- Kaplan M, Beutler E, Vreman HJ, Hammarman C, Levy-Lahad E, Renbaum P, Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient heterozygotes. *Pediatrics* 1999; 104:68.
- 65- Costa E, Vieira E, Cleto E, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, neonatal hyperbilirubinemia and Gilbert syndrome. *Acta Med Port* 2002;15:409.

- 66- Iolascon A, Faienza MF, Giordani L, Perrotta S, Ruggiu G, Meloni GF, del Giudice EM. Bilirubin levels in the acute hemolytic crisis of G6PD deficiency are related to Gilbert's syndrome. *Eur J Haematol* 1999; 62:307.
- 67- Giudice EM, Perrotta S, Nobili B, Specchia C, d'Urzo G, Iolascon A. Coinheritance of Gilbert syndrome increases the risk for developing gallstones in patients with hereditary spherocytosis. *Blood* 1999;94:2259.
- 68- Schilling RF. Spherocytosis, splenectomy, stroke, and heart attacks. *Lancet* 1997;350:1677.
- 69- Costa E, Pinto R, Vieira E, et al. Influence of Gilbert's syndrome on serum bilirubin levels and gallstone formation in children with chronic hemolytic disease *An Esp Pediatr* 2002;57:529.
- 70- Bancroft JD, Kreamer B, Gourley GR. Gilbert syndrome accelerates development of neonatal jaundice. *J Pediatr* 1998; 132:656.
- 71- Alexandrino AM, Carvalho C, Costa E, Vieira E, Oliveira P, Duarte C, Barbot J, dos Santos R, Areias A. TATA box polymorphism in the UDP-glucuronosyltransferase 1 gene promoter and neonatal hyperbilirubinemia. *Prenatal and Neonatal Medicine* 2001; 6:133.
- 72- Odell GB. Neonatal hiperbilirubinemia. Grund and Stratton. New York. 1980.
- 73- Kaplan M, Renbaum P, Levy-Lahad *et al.* Gilbert syndrome and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a dose-dependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12128.
- 74- Monaghan G, Mclellan A, Mcgeehan A *et al.* Gilbert's syndrome is a contributory factor in prolonged unconjugated hyperbilirubinemia of the newborn. *J Pediatr* 1999; 134: 441.

- 75- Maruo Y, Nishizawa K, Sato H *et al.* Association of neonatal hyperbilirubinemia with bilirubin UDP-glucuronosyltransferase polymorphism. *Pediatrics* 1999; 103: 1224.
- 76- Guillemette C, De Vito I, Hankinson SE, *et al.* Association of genetic polymorphisms in UGT1A1 with breast cancer and plasma hormone levels. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2001;10:711.
- 77- Adegoke OJ, Shu XO, Gao Y, *et al.* Genetic polymorphisms in uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) and risk of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2004;85:239.
- 78- Mayer M. Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease. *Clinical Chemistry* 2000;46:1723.
- 79- Hopking PN, Wu LL, Hunt SC, *et al.* Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1996;16:250.
- 80- Bancroft JD, Kreamer B, Gourley GR. Gilbert syndrome accelerates development of neonatal jaundice. *J Pediatr* 1998; 132: 656-60.
- 81- Ueyama H, Koiwai O, Soeda Y, *et al.* Análisis of the promoter of human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene (UGT1*1) in relevance to Gilbert's syndrome. *Hepatology Research* 1997;9:152.
- 82- Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. *Am J Hum Genet* 1991;48:134-144.
- 83- Richard I, Bourg N, Marchand S, *et al.* A diagnostic fluorescent marker kit for six limb girdle muscular dystrophies. *Neuromuscular disorders* 1999;9:555-563.
- 84- Sampietro M, Iolascon A. Molecular pathology of Crigler-Najjar type I and II and Gilbert's syndrome. *Haematologica* 1999;84:150.

- 85- Biondi ML, Turri O, Dilillo D, Stival G, Guagnellini E. Contribution of the TATA-box genotype (Gilbert syndrome) to serum bilirubin concentrations in Italian population. *Clinical Chemistry* 1999;45:897.
- 86- Pirulli D, Giordano M, Puzzer D, Crovella S, Rigato I, Tiribelli C, et al. Rapid method for detection of extra (TA) in the promoter of the bilirubin-UDP-glucuronosyl transferase 1 gene associated with Gilbert syndrome. *Clinical Chemistry* 2000;46:129.
- 87- Costa E, Vieira E, Santos-Siva E, et al. TATA-box polymorphism in the uridine diphosphate glucuronosyl transferase gene in Portuguese patients with a clinical diagnosis of Gilbert's syndrome. *Haematologica* 2002; 87:(04)ELT21.
- 88- Sieg A, Arab L, Schlierf G, Stiehl A, Kommerell B. Prevalence of Gilbert's syndrome in Germany. *Dtsch Med Wochenschr* 1987;112:1206-1208.
- 89- Owens D, Evans J. Population studies on Gilbert's syndrome. *J Med Genet* 1975;12:152.
- 90- Iolascon A, Faienza MF, Centra M, Storelli S, et al. (TA)₈ allele in the UGT1A1 gene promoter of a caucasian with Gilbert's syndrome. *Haematologica* 1999;84:106.
- 91- Tsezou A, Tzetis M, Kitsiou S, et al. A Caucasian boy with Gilbert's syndrome heterozygous for the (TA)₈ allele. *Haematologica* 2000;85:319.
- 92- Erps LT, Ritter JK, Hersh JH, Blossom D, Martin NC, Owens IS. Identification of two single base substitutions in the UGT1 gene locus which abolish bilirubin uridine diphosphate glucurinosyltransferase activity in vitro. *J Clin Invest* 1994;93:564.
- 93- Iolascon A, Meloni A, Coppola B, Rosatelli MC. Crigler-Najjar Syndrome type II resulting from three different mutations in the bilirubin uridine 5'-

diphosphate-glucuronosyltransferase (UGT1A1) gene. J Med Genet
2000;37:712.