
**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

LIANA ANTUNES

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO TA₆/TA₇ NA REGIÃO
PROMOTORA DO GENE UGT1A1 EM PACIENTES
COM ANEMIA E TRAÇO FALCIFORME DE DOIS
HOSPITAIS DA CIDADE DE PORTO ALEGRE-RS**

**PORTO ALEGRE
2011**

**PONTÍFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

LIANA ANTUNES

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO TA₆/TA₇ NA REGIÃO PROMOTORA DO
GENE UGT1A1 EM PACIENTES COM ANEMIA E TRAÇO FALCIFORME
DE DOIS HOSPITAIS DA CIDADE DE PORTO ALEGRE-RS**

Porto Alegre
2011

LIANA ANTUNES

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO TA₆/TA₇ NA REGIÃO PROMOTORA DO
GENE UGT1A1 EM PACIENTES COM ANEMIA E TRAÇO FALCIFORME
DE DOIS HOSPITAIS DA CIDADE DE PORTO ALEGRE-RS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Medicina e Ciências da Saúde como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre pela Faculdade de Medicina da
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dra. Denise Cantarelli Machado

Porto Alegre
2011

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

A636a Antunes, Liana

Análise do polimorfismo TA₆/TA₇ na região promotora do gene UGT1A1, em pacientes com anemia e traço falciforme de dois hospitais da cidade de Porto Alegre – RS / Liana Antunes. Porto Alegre: PUCRS, 2011.

43 f.: tab. Inclui artigo de periódico submetido à publicação.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Cantarelli Machado.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Clínica Médica.

1. POLIMORFISMO GENÉTICO. 2. ANEMIA FALCIFORME/genética. 3. HIPERBILIRRUBINEMIA. 4. VARIAÇÃO GENÉTICA. 5. PACIENTES INTERNADOS. 6. ESTUDOS TRANSVERSAIS. I. Machado, Denise Cantarelli. II. Título.

C.D.D. 616.152
N.L.M. QU 500

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia
Bibliotecária CRB 10/196

LIANA ANTUNES

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO TA₆/TA₇ NA REGIÃO PROMOTORA DO
GENE UGT1A1 EM PACIENTES COM ANEMIA E TRAÇO FALCIFORME
DE DOIS HOSPITAIS DA CIDADE DE PORTO ALEGRE-RS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Medicina e Ciências da Saúde como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre pela Faculdade de Medicina da
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovado em _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Helena Schirmer – FEEVALE

Dr. Luiz Carlos Bodanese - PUCRS

Dra. Clarice Sampaio Alho - PUCRS

Porto Alegre
2011

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus maiores incentivadores,
meus pais Aquino e Rosmeri Antunes, que sempre
torceram e me apoiaram para que eu vencesse todas as
dificuldades e chegasse até aqui.*

AGRADECIMENTOS

A professora Dra. Denise Cantarelli Machado por ter acreditado no meu potencial e por ter me proporcionado um vasto aprendizado científico e humano ao seu lado e dos demais pesquisadores do laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS – IPB.

Ao Biólogo Daniel Marinowic, por não ter medido esforços e tempo para me auxiliar na parte técnica e científica. Um grande amigo e colega, ao qual agradeço de coração.

A Farmacêutica Bioquímica Mara Lane Zardin, que abriu as portas do Hospital Nossa Senhora da Conceição de maneira acolhedora.

A Farmacêutica Bioquímica Lilian que separou as amostras utilizadas e mostrou-se sempre disposta a me ajudar.

Agradeço aos bolsistas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do IPB, em especial, a Vanessa Esteves e Luciana Fraga da Costa que abriram mão de suas atividades para me ajudar, e que junto comigo acreditaram na realização desse projeto.

Agradeço também ao Laboratório de Parasitologia Molecular do IPB e ao CTBMF, que me auxiliaram com o empréstimo de materiais para a realização de alguns experimentos.

Um agradecimento especial aos meus familiares, Aquino, Rosmeri, Douglas e Glauber pelo carinho, apoio e compreensão. Essa conquista é nossa, porque sem o amor de vocês, nada seria possível.

RESUMO

A doença de células falciformes é uma anemia hemolítica crônica de caráter autossômico recessivo, causada por uma mutação pontual no cromossomo 11. Esta mutação provoca a substituição de um ácido glutâmico por uma valina na posição seis da cadeia β da hemoglobina, fazendo com que ocorra a formação da hemoglobina S dentro dos eritrócitos.

A síndrome de Gilbert é causada pela inserção de um dinucleotídeo “TA” na região promotora do gene UGT1A1, ocasionando uma redução na atividade da UDP-glucuronosil transferase, enzima responsável pela conjugação da bilirrubina. Autores descrevem uma possível relação entre a anemia falciforme e a síndrome de Gilbert, todavia faltam dados na literatura para confirmar esta hipótese.

O presente estudo avaliou o dinucleotídeo TA₆ e TA₇ na região promotora do gene UGT1A1 em pacientes com anemia falciforme e traço falciforme. Participaram do estudo 65 pacientes, destes, 61 possuíam traço falciforme, sendo 14 homozigotos (TA)₆/(TA)₆ (19,6%), 32 homozigotos (TA)₇/(TA)₇ (54%) e 16 heterozigotos (TA)₆/(TA)₆ (26,2%). Dos quatro pacientes com anemia falciforme três eram homozigotos para (TA)₇/(TA)₇ e um heterozigoto (TA)₆/(TA)₇.

Os resultados encontrados nos pacientes com anemia falciforme são semelhantes aos dados descritos na literatura, todavia, estudos adicionais são necessários para verificar se essa relação pode interferir nos níveis de bilirrubina indireta, principalmente em pacientes com traço falciforme.

Palavras-chave: polimorfismo UGT1A; anemia falciforme; síndrome de Gilbert.

ABSTRACT

Sickle cell disease is a chronic hemolytic anemia, recessive autosomal, caused by a mutation on chromosome 11. This mutation causes a substitution of a valine for a glutamic acid at position six of hemoglobin β -chain, leading the formation of hemoglobin S inside the red cells.

Gilbert's syndrome is caused by the insertion of a dinucleotide "TA" in the UGT1A1 gene promoter region, causing a reduction in the activity of UDP-glucuronosyl-transferase, the enzyme responsible for bilirubin conjugation. Several authors have described a possible relationship between sickle cell anemia and Gilbert's syndrome, however, consistent data to support this hypothesis are not available in the literature.

This study evaluated the dinucleotide TA₆ and TA₇ in the promoter region of the UGT1A1 gene in patients with sickle cell anemia and sickle cell trait. This study included 65 patients. Sixty one patients had sickle cell trait, 14 were homozygous (TA)₆/(TA)₆ (19.6%), 32 were homozygous (TA)₇/(TA)₇ (54%), and 16 heterozygote (TA)₆/(TA)₆ (26.2%). Between the four patients with sickle cell anemia, three were homozygous for (TA)₇/(TA)₇ and one heterozygous (TA)₆/(TA)₇.

The results obtained with patients with sickle cell anemia are similar to data described in the literature; however, additional studies are needed to verify if this relationship may interfere with bilirubin levels, especially in patients with sickle cell trait.

Keywords: UGT1A1 polymorphism; sickle cell anemia; Gilbert's syndrome.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência do genótipo (TA) ⁷ /(TA) ⁷ em alguns estudos realizados avaliando a relação entre anemia falciforme (AF) e a síndrome de Gilbert (SG).....	19
Tabela 2 - Distribuição das frequências genotípicas.....	26
Tabela 3 - Distribuição da frequência alélica.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Anemia falciforme
AVC	Acidente vascular cerebral
CAR	República Centro – Africana
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
G6PD	Deficiência de glucose-6-fosfato desidrogenase
Hb	Hemoglobina
Hb A	Hemoglobina A
Hb F	Hemoglobina fetal
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IR	Insuficiência renal
MS	Ministério da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salina
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
SG	Síndrome de Gilbert
SAT	Síndrome Aguda do Toráx
UGT1A1	UDP-glucoronosil transferase-1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 ANEMIA FALCIFORME E TRAÇO FALCIFORME	12
1.1.1 Manifestações clínicas dos pacientes com Anemia Falciforme	15
1.1.2 Diagnóstico laboratorial da anemia falciforme	17
1.2 SÍNDROME DE GILBERT (SG).....	18
1.3 POLIMORFISMO DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA UDP- GLUCORONOSIL TRANSFERASE (UGT1A1)	20
1.4 CÁLCULO BILIAR E INTERVENÇÃO CLÍNICA NOS PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4 RESULTADOS	26
5 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXO	34
ANEXO I - ARTIGO ORIGINAL.....	35
ANEXO II - SUBMISSÃO DO ARTIGO	48
ANEXO III - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANEMIA FALCIFORME E TRAÇO FALCIFORME

O primeiro relato de um paciente com anemia falciforme (AF) ocorreu em 1910, através da observação de hemácias na forma de foice no esfregaço sanguíneo de um jovem negro chamado Walter Clement Noel, natural de Granada e estudante de odontologia do Chicago College of Dental Surgery. No ano de 1917, um pesquisador chamado Emmel, visualizou, *in vitro*, a alteração da forma esférica da hemácia para a forma de foice.^{1,2}

O gene que causa a doença falciforme é o gene S, originado no continente africano há aproximadamente 100 mil anos atrás, com maior predomínio na África Equatorial, onde atinge até 3% da população. Este gene encontra-se amplamente distribuído em todos os continentes em função da grande mistura étnica, mas as causas que levaram a mutação da hemoglobina A (HbA) para hemoglobina S (HbS) ainda não foram totalmente esclarecidas.^{3,4}

A AF é caracterizada como uma doença de caráter hereditário, com padrão de herança autossômico recessivo, e é a doença hematológica mais comum no mundo e mais prevalente na população brasileira, principalmente em regiões localizadas ao norte e nordeste do nosso país.⁴⁻¹¹

Atualmente muitas pessoas ao redor do mundo são portadoras dessa hemoglobinopatia. Na África, nascem aproximadamente 300.000 crianças por ano com mutações na síntese das cadeias globínicas, sendo que em torno de 200.000 são portadoras da doença de células falciformes. Já nos Estados Unidos, 72.000 crianças apresentam clinicamente esta patologia e 2.000.000 de pessoas são portadoras deste gene. A incidência de AF no mundo é tão grande que ultrapassa outras desordens

genéticas de caráter e sintomatologias importantes, como a fibrose cística e a hemofilia.¹² A AF é uma patologia que acomete com mais frequência a população afrodescendente, todavia não é uma doença exclusiva desta raça, em função da grande miscigenação existente em nosso país. Essa mistura de raças no Brasil provocou uma grande mudança cultural, social, e principalmente mudanças de caráter genético em nossa população. A prevalência na população brasileira como um todo é de 0,04 %.^{3, 13, 14}

Em nosso país, estima-se que a doença de células falciformes acometa em torno de 0,3% da população negra, todavia, devido à grande miscigenação, valores mais significativos podem ser observados em determinadas regiões. Na cidade de Salvador, por exemplo, 7,4 % das crianças afrodescendentes apresentam traço falciforme, sendo esta prevalência maior do que em todo estado da Bahia, onde 5,5% da população em geral são portadoras do traço.¹⁵

Em 1947, Accioly, no Brasil, levantou a hipótese de que a falcização ocorria em virtude de mecanismos genéticos. Apenas em 1949 é que classificaram a doença em homozigose e heterozigose através das pesquisas realizadas por Nell e Beet. Em 1956, um pesquisador chamado Ingram, revelou o mecanismo bioquímico desta patologia através da técnica de “fingerprint”, descrevendo que a anemia falciforme ocorria em virtude da substituição de aminoácidos.¹

Atualmente a AF constitui um problema de saúde pública, em virtude da grande prevalência e da morbimortalidade que esta doença representa. No Brasil, o Ministério da Saúde estima que existam mais de 2 milhões de pessoas portadoras do gene da HbS, e mais de 8.000 pacientes apresentam a forma homozigota da hemoglobina. Além disso, estima-se um nascimento anual de aproximadamente 700 à 1.000 novos portadores desta hemoglobinopatia.¹⁶⁻¹⁹ A forma heterozigótica da doença falciforme, isto é, o traço falciforme, ocorre com uma frequência de 6,9 – 15,4 % da população brasileira, dependendo da região analisada.²⁰

1.1.2 Fisiopatologia da Anemia Falciforme

A hemoglobina é a proteína responsável pela oxigenação dos tecidos. Sua estrutura é formada pelo grupamento heme que possui a capacidade de deter ou liberar o oxigênio, quatro subunidades de cadeias globínicas, um par de cadeias do tipo α , outro par de cadeias do tipo β e um átomo de ferro. Cada cadeia globínica é constituída por uma seqüência de aminoácidos, sendo que as cadeias α possuem 141 aminoácidos e as cadeias β possuem 146 aminoácidos.^{1, 21}

A produção das cadeias de hemoglobina é controlada por um determinado grupo de genes que estão localizados nos cromossomos 11 e 16. O cromossomo 16 é responsável pela produção da cadeia α e o cromossomo 11 pela síntese da cadeia β .^{1, 2, 21}

Entre as hemoglobinas que o nosso organismo produz podemos citar a HbF ($\alpha_2\gamma_2$) que está presente durante a vida intra-uterina e que após o nascimento, vai sendo substituída pela HbA ($\alpha_2\beta_2$) e pela HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$), sendo que a HbA₂ encontra-se em pequena quantidade na vida adulta.^{1, 2}

Na AF ocorre uma mutação pontual no cromossomo 11 que provoca a substituição de uma base nitrogenada, onde uma adenina é trocada por uma timina no sexto códon do gene da hemoglobina β , provocando o surgimento de uma hemoglobina de caráter patológico. Essa troca de bases provoca a codificação errônea do aminoácido que, ao invés de codificar o ácido glutâmico, um ácido carregado negativamente, irá codificar uma valina, um aminoácido neutro. A valina por sua vez, irá se incorporar na posição seis da cadeia β da hemoglobina, ocasionando mudanças na sua estrutura molecular, e conseqüentemente, o surgimento da HbS.^{1, 2, 4-6, 20, 21}

A HbS, através de alterações bioquímicas em função de mudanças na sua estrutura, perde duas cargas elétricas por molécula de hemoglobina, apresentando estabilidade e solubilidade prejudicada, além de uma grande tendência a formação de polímeros, quando se encontra na forma desoxigenada. A partir destas alterações ocorre a deformação da hemácia em forma de foice e o enrijecimento da sua

membrana, provocando o surgimento de crises vaso-oclusivas nos mais variados órgãos, dor, e muitas vezes, lesões dos tecidos.^{1, 4, 10, 12, 20, 22, 23}

A transformação da hemácia da sua forma clássica para a forma de foice ocorre na presença de baixas concentrações de oxigênio. A oxi-HbS perde o oxigênio transformando-se em deoxi-HbS. Essa por sua vez, formará pontes de hidrogênio entre a valina que pertence à posição 1 da globina β , e a valina mutante, que está no lugar do ácido glutâmico. Estas pontes de hidrogênio fazem com que ocorra uma interação entre o aminoácido valina com o receptor fenilalanina e leucina na molécula da globina β S. Esta interação causa a formação de polímeros de deoxi-hemoglobina em um processo de enucleação, formando uma estrutura multipolimérica no interior do eritrócito, e conseqüentemente, seu afoiçamento.^{1, 3, 4}

O processo de polimerização da hemoglobina S sofre interferências em relação ao oxigênio, a concentração da HbS, temperatura e outras variantes de hemoglobinas, sendo a HbA e a HbF as que possuem maior potencial inibitório da polimerização da HbS.³

A HbS pode apresentar-se na população de duas formas, na forma homozigota ou heterozigota. Os pacientes heterozigotos são chamados de portadores do traço falciforme, sendo, na maioria das vezes, assintomáticos. Nestes pacientes, a concentração de HbS é de aproximadamente 40%, sendo os outros 60 % constituídos de HbA. Essa quantidade HbA impede que a hemácia adquira a forma de foice, salvo em casos de hipóxia acentuada.^{2, 7, 12, 24}

Os pacientes que apresentam AF são homozigotos para a HbS e apresentam sintomas clínicos característicos da doença.

1.1.1 Manifestações clínicas dos pacientes com Anemia Falciforme

A AF causa anemia hemolítica crônica, em função do seqüestro esplênico das hemácias com morfologia alterada e conseqüentemente, a diminuição do tempo de meia-vida circulante da hemácia, aumento da suscetibilidade a infecções,

hiperbilirrubinemia indireta crônica, episódios vaso-oclusivos com lesões crônicas de coração, pulmão e rim, priapismo, úlcera de perna, síndrome aguda do tórax e cálculo biliar.^{7, 14, 20, 22, 25, 26}

As crises vaso-oclusivas seguidas de infecções são responsáveis pela maioria das internações dos pacientes portadores da doença falciforme e pela grande variedade de manifestações clínicas por eles apresentadas. Entre elas, acidente vascular cerebral (AVC) úlceras nas pernas, síndrome aguda do tórax (SAT), insuficiência renal (IR), dor óssea aguda, etc. No entanto, as principais manifestações são as dores nos ossos longos.^{2, 5, 13, 23, 26}

Aproximadamente 5,2 % dos pacientes com AF apresentam episódios de vaso-oclusão, variando de 3-10 crises por ano, e com tempo de duração de uma semana ou mais. Na presença de crises vaso-oclusivas deve-se considerar o genótipo do paciente, fatores hematológicos e endoteliais, pois juntos contribuem para o desencadeamento das crises.²⁷

A SAT é outra sintomatologia decorrente da AF que está envolvida em casos de insuficiência respiratória aguda e hipoxemia, além de trombozes e embolias gordurosas por infarto da medula óssea. Essa manifestação clínica nos pacientes com AF varia muito com a idade e conforme a causa que levou a esse quadro característico.^{5, 10, 20, 25, 28}

A anemia hemolítica crônica, proveniente do seqüestro esplênico, confere ao paciente uma Hb em torno de 6-9 g/dL. Esta anemia pode ser proveniente do seqüestro esplênico ou por uma infecção pelo parvovírus B19, o qual provoca uma aplasia em poucos dias. Esses pacientes, além de apresentarem uma diminuição no número das células vermelhas, também apresentam uma reticulocitopenia associada.²⁸

Muitos pacientes portadores da doença de células falciformes também apresentam variações nos níveis de bilirrubina. Esta variação pode estar relacionada com a anemia hemolítica crônica ou com outros fatores genéticos, como a presença do genótipo (TA)₇/(TA)₇, característico da Síndrome de Gilbert, que foi investigada por Kalotychou e colaboradores em 2003.²⁹

A formação de cálculo biliar é outra sintomatologia que pode ser observada em pacientes falciformes. Os cálculos são formados através da destruição prematura dos glóbulos vermelhos falcizados, acúmulo dos seus precursores e precipitação dos sais biliares.⁹

O genótipo (TA)₇/(TA)₇ é outro fator relacionado com o aumento dos níveis séricos de bilirrubina, mas não foi detectada uma relação com a formação de cálculo biliar em indivíduos mais jovens avaliados no estudo de Heverfield e colaboradores em 2005. Além disso, os autores sugeriram que a composição, o tamanho e outros fatores genéticos podem estar relacionados com a formação de cálculo biliar, e que estes mesmos fatores interagem com os níveis elevados de bilirrubina em indivíduos mais velhos que apresentam litíase biliar.³⁰

1.1.2 Diagnóstico laboratorial da anemia falciforme

Os exames laboratoriais utilizados para o diagnóstico da AF são teste de solubilidade, eletroforese em pH alcalino e ácido, eletroforese de hemoglobina, focalização isoelétrica e cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Individualmente, cada uma dessas técnicas apresenta vantagens e limitações uma sobre as outras na separação das hemoglobinas pesquisadas.^{5, 11, 21, 31}

Esses métodos diagnósticos permitem que as cadeias β globínicas possam ser detectadas a partir da 11^a e 12^a semana de gestação, auxiliando no diagnóstico pré-natal da AF.⁵

A AF é classificada em cinco diferentes genótipos, entre eles o genótipo Asiático ou Indiano, Senegal, Benin, Bantu/CAR e Camarões. Os genótipos estão relacionados com o prognóstico da doença. Senegal e Asiático apresentam grandes concentrações de HbF, conferindo um melhor prognóstico em relação aos pacientes que apresentam o genótipo Bantu/CAR e Benin.^{1, 3, 4}

Segundo Costa e colaboradores a incidência do genótipo Bantu representa 61% dos pacientes portadores da doença falciforme no estado de Alagoas. Nesse

mesmo estudo, onde os autores compararam o quadro clínico e laboratorial de um determinado número de pacientes com o genótipo Bantu, pode-se observar que houve uma variação dentro do mesmo subtipo, sendo que a idade, o sexo e os níveis de HbA e HbF são as variáveis que podem estar relacionadas.²⁶

No Brasil, os pacientes com anemia falciforme apresentam uma prevalência maior de heterozigotos, sendo 66% do tipo Bantu, 32% de Benin e 2% de Senegal.³

Em virtude de a anemia falciforme ser considerada um problema de saúde pública no nosso país, no ano de 2001 o MS (portaria n.822/01) incluiu a pesquisa de hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), o que caracterizou um grande avanço para a população brasileira, principalmente em relação ao tratamento precoce que pode ser instituído e a grande melhora na qualidade de vida dos pacientes.²⁴

1.2 SÍNDROME DE GILBERT (SG)

A SG é uma patologia benigna de caráter genético autossômico recessivo responsável pela diminuição da glucoronização da bilirrubina, e conseqüentemente, aumento da bilirrubina indireta. Esta patologia, segundo Bosman e colaboradores, atinge cerca de 3 à 10 % da população em geral, indo ao encontro dos achados de Monaghan e colaboradores que relataram uma prevalência de 2 à 12 % da população.³²⁻⁴² Na Tabela 1 estão apresentados os dados obtidos em alguns estudos que avaliaram a relação do polimorfismo no gene *UTGA1A1* com a SG.

Tabela 1- Prevalência do genótipo (TA)₇/(TA)₇ em alguns estudos realizados avaliando a relação entre anemia falciforme (AF) e a síndrome de Gilbert.

n	Idade (anos)	Prevalência (TA)₇/(TA)₇	Local	Autores	Ano
12	-	100%	Escócia	Monaghan e colaboradores	1996
4	3-8	0%	Itália	Iolascon e colaboradores	1999
115	3-19	46,1%	USA	Passon e colaboradores	2001
3	62-72	100%	Alemanha	Ehmer e colaboradores	2008
10	15-54	40 %	Alemanha	Bosma e colaboradores	2009

A bilirrubina é um metabólito tóxico que se origina através do catabolismo do grupamento heme das hemácias velhas, além de também poder provir de uma eritropoiese ineficaz das hemoproteínas. As hemácias velhas quando destruídas liberam a hemoglobina, sendo esta convertida em biliverdina, monóxido de carbono e ferro pela enzima heme-oxigenase. Em seguida, a biliverdina redutase converte a biliverdina em bilirrubina, e esta se liga a albumina para ser transportada até o fígado onde será conjugada com o ácido glicurônico tornando-se hidrossolúvel e polar para posteriormente ser secretada na bile.^{30, 43}

As manifestações clínicas desta síndrome ocorrem com mais frequência depois da puberdade, onde se evidencia um aumento de bilirrubina indireta após jejum ou em associação com alguma outra patologia. Seu diagnóstico geralmente ocorre ao acaso em exames laboratoriais de rotina.^{36, 39}

O defeito molecular que caracteriza esta síndrome está relacionado com um polimorfismo na região promotora do gene UGT1A1. Nesta região ocorre a inserção de um dinucleotídeo “TA”, e conseqüentemente, a região promotora denominada “TATAA” com a inserção desta nova base irá originar sete repetições, isto é, (TA)₇, ao invés de 6 repetições, (TA)₆, o que é o mais comum. Esta inserção faz com que

ocorra uma diminuição da expressão do gene, assim como uma queda da atividade da UDP-glucuronosil transferase em torno de 30 % em pacientes homozigotos.^{34-42, 44, 45}

A redução da atividade da UDP-glucuronosil transferase, assim como as inserções de um dinucleotídeo na região promotora do gene UGT1A1, não explica suficientemente as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com SG. Alguns autores sugerem que a presença de outros fatores e desordens genéticas como a Esferocitose Hereditária, AF ou deficiência de G6PD, em associação com uma diminuição da glucoronização, seriam os responsáveis pelas manifestações clínicas desta síndrome.^{30, 32-34, 41, 45, 46}

1.3 POLIMORFISMO DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA UDP-GLUCORONOSIL TRANSFERASE (UGT1A1)

Os pacientes portadores da AF são pacientes que apresentam grande suscetibilidade a desenvolver litíase biliar, uma vez que esta hemoglobinopatia é caracterizada por uma hemólise crônica, e os cálculos biliares também são formados pela destruição dos eritrócitos e acúmulo dos seus precursores. Os pacientes mais acometidos por cálculos biliares são os portadores da AF e talassemia β pois são os indivíduos que apresentam os maiores níveis de bilirrubina indireta.⁹

Em algumas etnias, algumas mutações ou inserções relacionadas a região promotora do gene UGT1A1 que codifica a enzima UDP-glucuronosil transferase tem sido associada aos níveis elevados de bilirrubina e a formação de cálculos biliares em pacientes com AF e outras patologias.^{9, 34, 35, 41}

Como descrito anteriormente, a SG apresenta alterações moleculares na região promotora do gene UGT1A1, mais especificamente, inserções de dinucleotídeos “TA” que alteram a estabilidade do gene, e conseqüentemente, diminuem a atividade enzimática da UDP-glucuronosiltransferase, o que leva a uma glucoronização ineficiente da bilirrubina e seu aumento sérico.³⁵⁻⁴²

Kalotychou e colaboradores em 2003, mostraram que os pacientes que apresentavam bilirrubina aumentada eram homozigotos (TA)₇/(TA)₇, genótipo

característico da SG. Dos 27 indivíduos estudados, seis apresentavam AF, sendo que os níveis de bilirrubina estavam aumentados nos indivíduos com genótipo (TA)₇/(TA)₇, e diminuídos naqueles com genótipo (TA)₆/(TA)₆. Além disso, os pesquisadores detectaram uma maior frequência de coledolitíase em pacientes com o genótipo (TA)₇/(TA)₇.²⁹ Esses autores concluíram que a associação da SG com a AF é decorrente da expressão aumentada do gene UGT1A1 quando o indivíduo é homozigoto para (TA)₇/(TA)₇, contribuindo para uma atividade reduzida da enzima UDP-glucuronosiltransferase, e conseqüentemente, um aumento da bilirrubina indireta, ou seja, que a hiperbilirrubinemia ocorreria em função não apenas da anemia hemolítica crônica, característica da doença falciforme, mas também da coexistência com a SG.²⁹

Haverfield e colaboradores em 2005, também analisaram a variação do gene UGT1A1 e a formação de cálculo biliar em pacientes jamaicanos com doença de células falciformes. Os mesmos relataram que, além de estar relacionada com altos níveis de bilirrubina sérica, a variação da região promotora também pode estar envolvida na formação de cálculo biliar em alguns pacientes mais velhos. Todavia, indivíduos mais jovens não apresentaram a formação de cálculo biliar relacionada à frequência do alelo UGT1A1. Esses autores ainda afirmaram que o tamanho e a composição dos cálculos biliares, além dos fatores genéticos, também poderiam influenciar nos níveis elevados de bilirrubina.³⁰

1.4 CÁLCULO BILIAR E INTERVENÇÃO CLÍNICA NOS PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Aproximadamente 50% dos pacientes com AF apresentam níveis elevados de bilirrubina indireta. Estes níveis elevados provocam a formação de cálculo biliar, sendo a colelitíase uma das conseqüências de crises abdominais e eventos de vaso-oclusão.³⁵

A principal intervenção nos pacientes com AF que desenvolvem cálculo biliar é a colecistectomia, todavia, há controvérsias na literatura quanto a sua aplicabilidade. Walker e colegas acompanharam pacientes assintomáticos ao longo

de 25 anos e concluíram que a intervenção cirúrgica deve ocorrer apenas nos pacientes sintomáticos, assim como a procura de cálculos biliares por ultrassonografia.⁴⁷

Alguns autores divergem quanto à aplicabilidade da colecistectomia em relação aos pacientes assintomáticos, uma vez que os mesmos estariam expostos a um procedimento cirúrgico, situação que pode provocar a falcização de eritrócitos, assim como o desenvolvimento de crises hemolíticas. Além disso, apesar de existir todo cuidado pré-operatório desses pacientes, ainda existem 25 % de chances de esses pacientes irem a óbito.⁴⁸⁻⁵²

Holcomb e Holcomb são a favor da colecistectomia em pacientes assintomáticos, devido ao risco de migração desses cálculos para outros tecidos. Os autores alegam que a morbidade desses pacientes que são submetidos ao procedimento cirúrgico é baixa em relação às situações de urgência que os mesmos já observaram.⁵³

A destruição aumentada dos eritrócitos nas anemias hemolíticas, como é o caso das hemoglobinopatias resulta na hiperbilirrubinemia crônica. Como consequência desse aumento na produção de bilirrubina, uma proporção significativa dos pacientes com anemia falciforme desenvolve colelitíase. Alguns autores sugerem uma possível associação entre o polimorfismo do gene UGT1A1 e a ocorrência de colelitíase nos pacientes com AF.^{29, 54} Embora, estes estudos sugiram que a SG esteja relacionada à apresentação da coledolitíase, faltam trabalhos na literatura que elucidem seu papel na formação e na manifestação clínica deste processo ou achado clínico na AF.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever a prevalência do polimorfismo TA₆, TA₇ e da Síndrome de Gilbert em pacientes com Anemia Falciforme que freqüentam o ambulatório de Hematologia do Hospital São Lucas da PUCRS e do Hospital Nossa Senhora da Conceição, assim como em pacientes com Traço Falciforme que possuem registro no Banco de Sangue dos mesmos hospitais, ambos da cidade de Porto Alegre.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Descrever as frequências gênicas e genotípicas da região promotora do gene UGT1A1 nos pacientes com Anemia e Traço Falciforme.
 - Verificar se há associação entre o polimorfismo da região promotora do gene UGT1A1, característico da Síndrome de Gilbert, nos pacientes com Anemia e Traço Falciforme;
-

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram incluídos 65 pacientes, quatro com anemia falciforme e 61 com traço falciforme, provenientes do ambulatório de hematologia e do banco de sangue do Hospital Nossa Senhora da Conceição e Hospital São Lucas da PUCRS, ambos da cidade de Porto Alegre. Destes, 44 pacientes eram do sexo masculino e 21 do sexo feminino, com idade entre 7 e 45 anos.

As amostras de sangue foram coletadas por punção periférica em tubos contendo EDTA e centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, a camada contendo os leucócitos foi transferida para tubos de 1,5 mL, seguido de lavagem com PBS. As células foram ressuspensas com 300 µL de PBS seguido da adição de 600 µL de Brazol™. Posteriormente, foram adicionados 120 µL de clorofórmio seguido por centrifugação a 20.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA presente na porção aquosa foi precipitado pela adição de 0,7 vezes o volume de isopropanol refrigerado, e incubado a -20 °C overnight. Após, a amostra foi centrifugada a 20.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o DNA ressuspenso com 50 µL de água ultra pura deionizada e esterilizada e armazenado à - 20°C.

A mistura da reação foi preparada com tampão de reação 10x, 3 mM de MgCl₂, 50 mM de dNTPs, 20 pmol do oligonucleotídeos direto: 5'-AAGTGAAGTCCCTGCTACCTT-3' e reverso: 5'-CCATCAGGAACACTGGTATCT-3', 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2 ng of DNA e ajustado para um volume final de 50 µL com água MilliQ. As amostras foram submetidas a 30 ciclos à 95°C por 30 segundos, 55°C por 40 segundos, 72°C por 40 segundos e um ciclo final à 72°C por 10 minutos. O produto da reação do PCR foi visualizado após eletroforese dos amplicons em gel de poliacrilamida à 18 % sob luz ultravioleta.

As frequências gênicas e genóticas do gene UGT1A1 nas amostras estudadas foram calculadas a partir da equação $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Para o cálculo das frequências gênicas foi utilizada a equação: $p+q=1$. Após o cálculo das respectivas frequências, foi verificado se a população estudada encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências genóticas observadas e as frequências genóticas esperadas foram avaliadas através do teste do qui-quadrado. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ com um intervalo de confiança de 95%.

4 RESULTADOS

Entre os 61 paciente com traço falciforme, 14 eram homozigotos para o alelo de 73pb (TA)₆/(TA)₆ (22,6%), 32 eram homozigotos para ao alelo de 75 pb (TA)₇/(TA)₇ (51,6%) e 16 pacientes heterozigotos (TA)₆/(TA)₇ (25,8%). Entre os quatro pacientes com anemia falciforme, três eram homozigotos para (TA)₇/(TA)₇ e um paciente heterozigoto (TA)₆/(TA)₇.

Na tabela 2 estão descritos a distribuição das frequências genotípicas encontradas nas amostras investigadas.

Tabela 2 – Distribuição das frequências genotípicas

Polimorfismo UGT1A1	Anemia falciforme (n = 4)	Traço Falciforme (n = 61)
	0/4	14/61
(TA) ₆ /(TA) ₆	(0%)	(21%)
	1/4	16/61
(TA) ₆ /(TA) ₇	(25%)	(26%)
	3/4	32/61
(TA) ₇ /(TA) ₇	(75%)	(52%)

A tabela 3 apresenta a distribuição alélica que foi observada na população em estudo.

Tabela 3 – Distribuição da frequência alélica

Polimorfismo UGT1A1	Anemia falciforme (n = 4)	Traço Falciforme (n = 61)
(TA)₇	12%	36%
(TA)₆	88%	64%
P	n.a	0,0005

n.a.: não se aplica

O alelo (TA)₆ foi o mais freqüente no grupo com anemia falciforme (88%) e traço falciforme (64%). Ao aplicar o teste de Hardy-Weinberg observou-se que a população com traço falciforme não se encontra em equilíbrio para o polimorfismo do gene UGT1A1. Em relação aos quatro pacientes com anemia falciforme, não se pode verificar se a população encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, uma vez que este teste não se aplica em estudos que apresentam menos do que cinco participantes por grupo.

5 CONCLUSÃO

Na literatura existem muitas publicações relacionando o polimorfismo do gene UGT1A1 em pacientes com anemia falciforme, mas não há nada em relação aos pacientes com traço falciforme, que também podem apresentar complicações clínicas.

Os pacientes com traço falciforme normalmente não são alvo de estudo e pesquisa por não serem considerados pacientes clinicamente comprometidos, e pouco se sabe sobre polimorfismos ou alterações genéticas que os mesmos podem apresentar. Talvez a associação com a Síndrome de Gilbert ou qualquer outra patologia de base genética possa contribuir para a manifestação ou complicações clínicas que esses pacientes possam vir a apresentar em determinadas situações ao longo da vida. Todavia, estudos adicionais são necessários para melhor compreender esse mecanismo nos pacientes com traço e anemia falciforme.

A comparação de dados clínicos com os genótipos, como o realizado neste estudo, seria o ideal para verificar se realmente existe alguma relação entre o genótipo do paciente e as manifestações clínicas, sejam elas mais evidentes ou não. Caso comprovada esta relação, a investigação genotípica poderá auxiliar na conduta clínica destes pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Neto G, Pitombeira M. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2003;39(1):51-6.
 2. Frenette PS, Atweh GF. Sickel cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *The Journal of clinical Investigation*. 2007;117(4):850-8.
 3. Naoum P. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2000;22(1):05-22.
 4. Silva M, Shimauti E. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2006;28(2):144-8.
 5. Nuzzo D, Fonseca S. Anemia falciforme e infecções. *Jornal de Pediatria*. 2004;80(5):347-54.
 6. Reis P, Araújo L, Penna K, et.al. A importância do diagnóstico precoce na prevenção de anemias hereditárias. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2006;28(2):149-52.
 7. Ducatti R, Teixeira A, Galão H, et.al. Investigação de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de recém nascidos do Hospital de São José do Rio Preto. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2001;23(1):23-9.
 8. Júnior J, Rodrigues AC, Buck P, et.al. Coronary Flow Reserve in Sickel Cell Anemia. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*2007. p. 488-93.
 9. Gumiero APS, Brandão MÂB, Pinto EALC, Anjos ACd. Colelitíase no paciente pediátrico portador de doença falciforme. *Revista Paulista de Pediatria*. 2007;25(4):377-81.
 10. Loureiro M, Rozenfeld S. Epidemiologia da internações por doença falciforme no Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 2005;39(6):943-9.
 11. Pinheiro L, Gonçalves R, Tomé C. Prevalência de Hemoglobina S em recém nascidos de Fortaleza: importância da investigação neonatal. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2006;28(2):122-5.
-

12. Genetics Co. Health Supervision for Children With Sickel Cell Disease. American Academy of Pediatrics. 2002;109(3):526-31.
 13. Creary M, Williamson D, Kulkarni R. Sickle Cell Disease: Current Activities, Public Health Implications, and Future Directions. Journal of Women's Health. 2007;16(5):575-82.
 14. Day SW. Development and Evaluation of a Sickle Cell Disease Assessment Instrument. Pediatric Nursing. 2004;30(6):451-8.
 15. Silva WdS, Lastra A, Oliveira SFd, Klautau-Guimarães N, Grisolia CK. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baio, Brasil. Caderno de Saúde Pública. 2006;22(12):2561-6.
 16. Filho I, Gonçalves M, Adorno E, et.al. Triagem de hemoglobinopatias e avaliação da degeneração oxidativa da hemoglobina em trabalhadores portadores do traço falciforme. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2005;27(3):183-7.
 17. Diniz D, Guedes C, Trivelino A. Educação para a genética em saúde pública: um estudo de caso sobre anemia falciforme. Ciência e Saúde Coletiva. 2005;10(2):365-72.
 18. Lyra I, Gonçalves M, Braga J, et.al. Caracterização clínica e molecular de crianças portadores de anemia falciforme em duas diferentes cidades do Brasil. Caderno de Saúde Pública. 2005;21(4):1287-90.
 19. Neto F, Lourenço DM, Noguti MAE. The clinical impact of MTHFR polymorphism on the vascular complications of sickel cell disease. Brazil Journal of Medical em Biology Research. 2006;39(10):1291-5.
 20. Gonçalves MS, Cardoso SA, Strapazoni AC. Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickel cell disease. Brazil Journal of Medical em Biology Research. 2001;34(10):1309-13.
 21. Zamaro P, Canalli A, Júnior A, Domingues C. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias semelhantes à HbS. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2002;38(4):261-6.
 22. Ballas SK. Sickle Cell Anaemia Progress in Pathogenesis and Treatment. Drugs. 2002;62(8):1143-72.
 23. Anderson N. Hydroxyurea Therapy: Improving the Lives of Patients With Sickle Cell Disease. Pediatric Nursing. 2006;32(6):541-3.
 24. Sommer C, Goldbeck A, Wagner S, et.al. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: experiência de um ano na rede de saúde pública do Rio Grande do Sul, Brasil. Caderno de Saúde Pública. 2006;22(8):1709-14.
-

25. Yoo H, Pelegriño N, Carlos AL. Síndrome aguda do toráx como primeira manifestação de anemia falciforme em adulto. *Jornal de Pneumologia*. 2002;28(4):237-40.
 26. Costa P, Vilela R, Cipolotti R. Diversidade clínica e laboratorial no haplótipo bantu na anemia falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2006;28(1):40-4.
 27. Yale SH, Nahed N, Guthrie T. Approach to the Vaso-occlusive Crisis in Adults with Sickel Cell Disease. *American Family Phisician*. 2000;61:1349-56.
 28. Davies S. Haemoglobinopathies. *Paediatrics and Child Health*. 2007;17(8):311-6.
 29. Kalotychoú V, Antonatou K, Tzanetea R, et.al. Analysis of the A(TA)_n TAA configuration in the promoter region of the UGT1 A1 gene in Greek patients with thalassemia intermedia and sickel cell disease. *Blood cells, Molecular and Disease*. 2003;31:38-42.
 30. Haverfield E, Mckenzie C, Forrester T. UGT1A1 variation and gallstone in sickle cell disease. *Blood*. 2005;105(3):968-72.
 31. Wethers D. Sickel Cell Disease in Childhood: Part I. Laboratory Diagnosis, Pathophysiology and Health Maintenance. *American Family Phisician*. 2000;62(1113-1120).
 32. Kaplan M, Renbaum P, Levy-Lahad E, et.al. Gilbert syndrome and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A dose-dependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia. *Proc Natl Academy Sci*. 1997;94:12128-32.
 33. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, et.al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's Syndrome. *The New England Journal od Medicine*. 2009;333(18):1171-5.
 34. Giundice EMD, Perrotta S, Nobili B, et.al. Coinheritance of Gilbert Syndrome Increases the Risk for Developing Gallstones in Patients With Hereditary Spherocytosis. *Blood Journal*. 1999;94:2259-62.
 35. Passon RG, Howard TA, Zimmerman SA, et.al. Influence of Bilirubin Uridine Diphosphate-Glucoronosyltransferase 1A Promoter Polymorphisms on Serum Bilirubin Levels and Cholelithiasis in Children With Sickel Cell Anemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 2001;23(7):448-51.
 36. Bancroft JD, Kreamer B, Gourley GR. Gilbert syndrome accelerates development of neonatal jaundice. *The Journal of Pediatrics*. 1998;132(4):656-60.
-

37. Galanello R, Cipollina MD, Carboni G, Perseu L, Barella S, Corrias A, et al. Hyperbilirubinemia, glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency and Gilbert's syndrome. *European Journal Pediatric*. 1999;158:914-6.
 38. Iolascon A, Faienza MF, Perrota S, Meloni GF. Gilbert's syndrome and jaundice in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient neonates. *Haematologica*. 1999;84:99-102.
 39. Monaghan G, Ryan M, Seddon R, et.al. Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *The Lancet*. 1996;347:578-81.
 40. Ehmer U, LanKisch TO, Erichsen TJ, et.al. Rapid Allelic Discrimination by TaqMan PCR for the Detection of the Gilbert's Syndrome Marker UGT1A1*28. *Journal of Molecular Diagnosticis*. 2008;10(6):549-52.
 41. Huang M-J, Kua K-E, Teng H-C, et.al. Risk Factors for Severe Hyperbilirubinemia in Neonates. *Pediatric Research*. 2004;56(5):682-9.
 42. Jansen PLM, Bosma PJ, Bakker C, et.al. Persistent unconjugated hyperbilirubinemia after liver transplantation due to an abnormal bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter sequence in the donor. *Journal of Hepatology*. 1997;27:1-5.
 43. Barbosa F, Santos S, Costa J. Anestesia em Paciente com Síndrome de Gilbert. Relato de caso. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 2004;54(3).
 44. Farheen S, Sengupta S, Santra A, et.al. Gilbert's syndrome: High frequency of the (TA)₇ TAA allele in India and its interaction with a novel CAT insertion in promoter of the gene for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 gene. *World Journal of Gastroenterology*. 2006;12(14):2269-75.
 45. Sato H, Adachi Y, Koiwai O. The genetic basis of Gilbert's syndrome. *The Lancet*. 1996;347:557-8.
 46. Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: A balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism ? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95.
 47. Walker TM, Hambleton IR, Serjeant GR. Gallstones in sickel cell disease: Observations from The Jamaican Cohort Study. *The Journal of Pediatrics*. 2000;136:80-5.
 48. Buck J, SC D. Surgery in sickel cell disease. *Hematology Oncology Clinical North American*. 2005;19:897-902.
 49. Bottura A, Hessel G, AM.Tomasso. Colelitíase não hemolítica na infância e na adolescência. *Revista Paulista de Pediatria*. 2007;25:90-7.
-

-
50. Meshikhes A. Asymptomatic gallstones in the laparoscopic era. *Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh* 2002;47(6):742-8.
 51. Roberts-Thomson I. The management of bile duct stones. *Indian Journal Gastroenterology*. 2004;23:102-6.
 52. Serjeant G, Serjeant B. The management of sickel cell disease: lessons from the Jamaican Cohort Study. *Blood*. 1993;7:137-45.
 53. Jr GWH, Holcomb GW. Cholelithiasis in infants, children, and adolescents. *American Academy of Pediatrics*. 1990;11:268-74.
 54. Adekile A, Kutlar F, Mckie K. The influence of uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A promoter polymorphisms, beta-globin gene haplotype, co-inherited alfa-talassemia trait and Hb F on steady-state serum bilirubin levels in sickel cell anemia. *European Journal of Haematology*. 2005;75(2):150-5.
-

ANEXOS

ANEXO I – ARTIGO ORIGINAL

**Analysis of the UGT1A1 gene polymorphism in patients
with sickle cell anemia and sickle cell trait**

Liana Antunes^{a,b}, Denise Cantarelli Machado^{a,b}, Daniel Marinowic^{a,b}, Vanessa Esteves^b, Mara Alani Zardin^c

^aPostgraduate Program in Medicine and Health Sciences, Faculty of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6990, Jardim Botânico, Porto Alegre – RS, Zip Code: 90610-000, Brazil.

^bLaboratory of Cellular and Molecular Biology, Biomedical Research Institute, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6990, Jardim Botânico, Porto Alegre – RS, Zip Code: 90610-000, Brazil.

^cPharmaceutical Biochemistry Hospital Conceição Group, Av. Francisco Trein 596 , Cristo Redentor, Porto Alegre - RS, Zip Code: 91350-200, Brazil

Corresponding author:

Denise Cantarelli Machado e-mail: dcm@pucrs.br

Address: Biomedical Research Institute – IPB, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6990, Jardim Botânico, Porto Alegre – RS, Brazil, Zip Code: 90610-000.

Phone: 55 5133202364 ext. 2364 Fax:55 5133203312

Abstract

Gilbert's syndrome is a pathology characterized by the insertion of a TA dinucleotide in promoter region of the UGT1A1 gene, causing a deficiency in bilirubin conjugation and consequently, and increased serum levels. This study evaluated the insertion of a TA dinucleotide in patients with sickle cell anemia (SCA) and sickle cell trait (SCT) by PCR. From the 65 patients included, 61 had sickle cell trait, and from these, 14 were homozygous (TA)₆/(TA)₆ (19.6%), 32 homozygous (TA)₇/(TA)₇ (54%) and 16 heterozygous (TA)₆/(TA)₇ (26.2%). Of the four patients with SCA, three were homozygous for (TA)₇/(TA)₇ and one heterozygous for (TA)₆/(TA)₇. The results showed that patients with SCT may also exhibit polymorphism for the UGT1A1 gene, and the findings in patients with sickle cell anemia corroborate with data from the literature. Additional studies are needed to determine if these findings are related to the increased serum levels of bilirubin, especially heterozygous patients for this hemoglobinopathy.

Keywords: UGT1A1 polymorphism, sickle cell anemia, Gilbert's syndrome, hemoglobinopathy.

Introduction

Hemoglobin is the protein responsible for tissue oxygenation. Its structure is formed by the heme group which has the ability to retain or release oxygen. It has four subunits of globin chains, a pair of α -chains, a pair of β - chains and an iron atom. Each globin α -chain contains 141 amino acids each, and the β -chain have 146 amino acids.[1]

Among all the hemoglobins produced by the human body we can mention fetal hemoglobin ($\alpha_2\gamma_2$) which is present during intrauterine life. After birth, fetal hemoglobin is replaced by Hb A ($\alpha_2\beta_2$) and Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$), but Hb A₂ is only found in small amounts in adults. Hemoglobin S ($\alpha_2\beta^S_2$) is typical of sickle cell anemia and it is a mutation of Hb A that occurred thousands of years ago.[1, 2]

Sickle cell disease affects more frequently the African descent ethnicity however; it is not exclusive to this ethnicity.[3-8]

Currently, sickle cell anemia is a public health problem due to its high prevalence and morbidity. The Ministry of Health estimates there are more than 2 million people carrying Hb S gene, and in Brazil, more than 8,000 patients are homozygous. Moreover, it is estimated that one in every 700-1000 births per year have this hemoglobinopathy.[4, 9-11]

Sickle cell anemia is characterized as an autosomal recessive pattern and it is the most common and prevalent hematologic disorder in Brazilian population, especially in the north and northeast regions.[10, 12-18] It is estimated that sickle cell disease affects around 0.3% of black population; however, because of the great miscegenation higher frequencies can be observed in some locations. In Salvador city, for example, 7.4% of African descent children have sickle cell trait, and this prevalence is greater than the whole state of Bahia, where 5.5% of the general population are carriers of the sickle cell trait.[19]

The mutation which causes SCA occurs on chromosome 11 due to a single base replacement, an adenine by a thymine at the sixth codon of hemoglobin β gene, leading to the expression of the pathological hemoglobin. This missense mutation causes a substitution of a glutamic acid, a negatively charged amino acid, by a valine, a neutral amino acid [1, 10, 18, 20-22] in the sixth position of the hemoglobin β -chain causing changes in molecular structure. [2, 7, 15, 17, 22] Through biochemical

and structural changes, hemoglobin S loses two electric charges per hemoglobin molecule, affecting its stability and solubility, and a great tendency to polymer formation when it is at the deoxygenated form. These changes cause red blood cells deformation and harden its membrane, causing vaso-occlusive crises in various organs, pain and often, tissue damage.[1, 10, 18, 20-23]

The Hb S can be presented in two forms in the population: as homozygous or heterozygous. The heterozygous, or carriers of the sickle cell trait, are most often asymptomatic. There are an estimated 300 million people around the world carrying the sickle cell trait. In the U.S.A 6-9% of the African descendents has a mutated gene for hemoglobin S, and other ethnic groups it varies between 0.01% to 0.05%.[6] In these patients, the concentration of Hb S is approximately 40%, and the remaining 60% consists of Hb A which prevents the red blood cells to acquire sickle-shaped, except in situations as high altitudes and physical activity that can increase the sickling process.[3, 24-27]

The diagnosis of patients with sickle cell trait was considered so important that in June 2009 the "National Collegiate Athletic Association" from The U.S.A has determined that all members should be submitted to a blood test to diagnose sickle cell trait, on account of the clinical complications that they may present in situations of intense exercise.[6]

Sickle cell anemia is classified into five different haplotypes, among them are the Asian or Indian, Senegal, Benin, Bantu/CAR, and Cameroon. The haplotypes are associated with disease prognosis. Senegal and Asian have higher concentrations of fetal hemoglobin, with a better prognosis when compared to patients with the Bantu/CAR, and Benin haplotypes.[1, 18, 28] In Brazil, patients with sickle cell anemia have a higher prevalence of heterozygous haplotypes, 66% of the Bantu type, 32% Benin, and 2% Senegal.[28]

Patients with sickle cell anemia are homozygous for hemoglobin S and they show clinical symptoms, such as chronic hemolytic anemia, susceptibility to infections, vaso-occlusive episodes with heart, lung and kidney chronic damage, priapism, gallstones, etc.[12, 21, 22, 29-31] Many patients with sickle cell disease present variable bilirubin levels, which variation may be related to chronic hemolytic anemia and other genetic factors such as the presence of (TA)₇/(TA)₇

genotype, a characteristic of Gilbert's syndrome, a benign disorder that affects 3-12% of the population.[32]

The aim of our study was to evaluate the prevalence of genotype (TA)₇/(TA)₇, (TA)₆/(TA)₆ and (TA)₆/(TA)₇ in patients with sickle cell anemia and sickle cell trait.

Patients and Methods

It was included 65 patients, four with sickle cell anemia and 61 carriers of the sickle cell trait, from the outpatient hematology clinic and Blood Bank of Hospital Nossa Senhora da Conceição and Hospital São Lucas of PUCRS, both in Porto Alegre. From these, 44 patients were male and 21 female, aging between 7 to 45 years.

Blood samples were collected by peripheral vein puncture in tubes containing EDTA which were centrifuged at 5,000 rpm for 5 minutes. After centrifugation, the layer containing the leukocytes was transferred to 1.5 mL tubes and washed with PBS. Cells were resuspended with 300 μ L of PBS followed by the addition of 600 μ L of TRIzol® LS (Invitrogen, Carlsbad, CA). After 10 minutes incubation at room temperature, 120 μ L of chloroform was added followed by centrifugation at 20,000 g for 10 minutes. The supernatant was transferred to a new tube and the DNA present in the aqueous phase was precipitated by adding 0.7 times the volume of cold isopropanol and incubated at -20°C overnight. After the sample had been centrifuged at 20,000 g for 10 minutes, the supernatant was discarded and the DNA pellet was resuspended with 50 μ L ultrapure deionized and sterilized water and stored at -20°C.

The polymerase chain reaction mixture was prepared with 10x reaction buffer, 3mM of $MgCl_2$, 50 mM of dNTPs, 20 pmol of forward: 5'-AAGTGAACCTCCCTGCTACCTT-3' and reverse: 5'-CCATCAGGAACACTGGTATCT-3' primers, 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 2 ng of DNA and adjusted to a final volume of 50 μ L with ultrapure deionized and sterilized water. The samples were subjected to an initial cycle at 95°C for 5 minutes followed by 30 cycles at 95°C for 30 seconds, 55°C for 40 seconds, 72°C for 40 seconds and a final cycle at 72°C for 10 minutes. The amplicon was separated on 18% PAGE at 80 V for one hour and 45 minutes.

Genotypes frequencies of the UGT1A1 gene in the studied samples were calculated from the equation $p^2+2pq+q^2=1$. The gene frequencies were calculated according to the formulae: $p+q=1$. Observed and expected genotype frequencies were evaluated using the chi-square test according to Hardy-Weinberg equilibrium. Statistical differences were considered significant when $p < 0.05$ with a 95% confidence interval.

Results

Among the 61 patients with sickle cell trait, 14 were homozygous for the allele 73pb (TA)₆/(TA)₆ (22.6%), 32 were homozygous for the allele of 75bp (TA)₇/(TA)₇ (51.6%) and 16 were heterozygous (TA)₆/(TA)₇ (25.8%). Among the four patients with sickle cell disease, three were homozygous for (TA)₇/(TA)₇ and one patient was heterozygous (TA)₆/(TA)₇.

Table 1 shows the distribution of genotype frequencies found in patients with sickle cell anemia or trait.

Table 1. Distribution of genotype frequencies in patients with sickle cell anemia or trait.

UGT1A1 polymorphism	Sickle cell anemia (n = 4)	Sickle Cell trait (n = 61)
(TA) ₆ /(TA) ₆	0 (0%)	14 (21%)
(TA) ₆ /(TA) ₇	1 (25%)	16 (26%)
(TA) ₇ /(TA) ₇	3 (75%)	32 (52%)

Table 2 shows the allelic distribution observed in the studied population.

Table 2 - Distribution of allele frequency in patients with sickle cell anemia or trait.

UGT1A1 polymorphism	Sickle cell anemia (n = 4)	Sickle Cell trait (n = 61)
(TA) ₆	88%	64%
(TA) ₇	12%	36%
p	n.a.	0,0005

n.a.: not applicable.

The (TA)₆ allele was the most frequent one in sickle cell anemia group (88%) and in sickle cell trait (64%). By applying the test of Hardy-Weinberg equilibrium, it was observed that people with sickle cell trait are not in balance for the UGT1A1 polymorphism. In the four patients with sickle cell anemia we could not verify if the population was in Hardy-Weinberg equilibrium since this test should not be apply to studies with less than five samples.

Discussion

The molecular alteration that characterizes Gilbert's syndrome is related to the polymorphism in the promoter region of UGT1A1 gene, more specifically, in the "TATA-box" region, where there is an insertion of a "TA" dinucleotide. Instead of the usual six repetitions, there is two more bases TA which causes a decrease of UDP-glucuronosyltransferase gene expression and transcription, and consequently, around 30% decline of its activity in homozygous patients.[4, 9, 33-35] Often, the clinical manifestations of this syndrome occur after puberty which shows an increase in indirect bilirubin after fasting or in combination with some other pathology. Usually, Gilbert Syndrome diagnosis occurs by chance in routine laboratory tests.[11, 33]

Physiologically, UDP-glucuronosyltransferase catalyzes the transfer of a glucuronic acid to the bilirubin molecule, forming a monoglucuronide and later the diglucuronide bilirubin, that is secreted into bile.[25, 36] This enzyme is controlled by the promoter region of UGT1A1 gene, however, mutations that causes insertions in this region, in some ethnic groups, have been associated with high bilirubin levels and gallstone formation in patients with sickle cell anemia and other diseases, such as G6PD deficiency, hereditary spherocytosis and Crigler-Najjar type I and II. [9, 13, 26, 37] Decreased activity of the promoter region of UGT1A1 gene has been associated with increased TA repeats.[27, 38]

The genotype (TA)₇/(TA)₇ is observed in many ethnic groups, and its frequency in Caucasians is 0.36-0.43, 0.35-0.43 in Africans, and 0.15 in Japanese. Furthermore, homozygous individuals have decreased transcription levels, up to 1/3 of transcription levels found in homozygous for the genotype (TA)₆/(TA)₆. [38]

The genotype (TA)₆/(TA)₆ is typical of patients without the TA insertion. The analysis of 61 patients with sickle cell trait revealed that only 14 individuals did not have the TA insertion. This observation can also be considered in patients with sickle cell anemia, from the four patients who participated in this study none had genotype (TA)₆/(TA)₆. However care should be taken when considering our data regarding patients with sickle cell anemia due its small number.

The frequency of the genotype (TA)₆/(TA)₇ was similar in patients with sickle cell trait and sickle cell anemia. It would be interesting to evaluate whether the heterozygote form may contribute significantly to the increase of indirect bilirubin in

both groups and analyze whether there is a relationship between the polymorphism and this hemoglobinopathy.

The most prevalent polymorphism in sickle cell traits was (TA)₇/(TA)₇, representing 52% of patients included in this investigation, however it is still necessary to evaluate whether the presence of this polymorphism has any clinical implication, since these patients are usually asymptomatic. Although the number of patients with sickle cell anemia was relatively small when compared to patients with sickle cell trait, it has been observed that the genotype (TA)₇/(TA)₇ was the most frequent, corroborating with data described in the literature. This finding shows that these patients are not only carrier of the sickle cell disease but also they possess the dinucleotide insertion on the promoter region of UGT1A1 gene.

According to Bosma and Monaghan, individuals with (TA)₇/(TA)₇ have higher bilirubin levels than those with genotype (TA)₆/(TA)₇ and (TA)₆/(TA)₆. Furthermore, the presence of genotype (TA)₇/(TA)₇ is important to support the interpretation of this metabolite level which is also higher in patients with other genetic alterations, such as beta-thalassemia and G-6-PD-deficiency.[11, 39, 40]

Several studies have reported a higher levels of bilirubin in individuals with (TA)₇/(TA)₇ when compared to (TA)₆/(TA)₇ and (TA)₆/(TA)₆ genotype. Also, gallstones formation, as described by Passon and cols, and choledocholithiasis occurred more frequently in patients with (TA)₇/(TA)₇ genotype. [31, 32, 37]

Although these studies suggest that Gilbert's syndrome is related to the appearance of choledocholithiasis, there are few studies in the literature to elucidate its role in the formation of gallstones and symptoms in patients with sickle cell anemia. Indeed, there are many studies relating UGT1A1 polymorphism gene in patients with sickle cell anemia, but there is none available comparing patients with sickle cell trait, which may also have clinical complications.

Patients with sickle cell trait are usually not subject to investigations because they are not considered clinically compromised; therefore little is known about its polymorphisms and the genetic alterations.

The comparison between clinical data and genotypes, as realized in our study, would be valuable to verify if there is any relationship between the patient genotype and the clinical manifestations, regardless its intensity, and the outcome could help patients clinical management.

Referências

- [1] G. Neto, M. Pitombeira, Aspectos moleculares da anemia falciforme, *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 39 (2003)51-6
 - [2] P.S. Frenette, G.F. Atweh, Sickel cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise, *The Journal of clinical Investigation*. 117 (2007)850-8
 - [3] D. Diniz, C. Guedes, A. Trivelino, Educação para a genética em saúde pública: um estudo de caso sobre anemia falciforme, *Ciência e Saúde Coletiva*. 10 (2005)365-72
 - [4] S. Farheen, S. Sengupta, A. Santra, et.al, Gilbert's syndrome: High frequency of the (TA)₇ TAA allele in India and its interaction with a novel CAT insertion in promoter of the gene for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 gene, *World Journal of Gastroenterology*. 12 (2006)2269-75
 - [5] P.L.M. Jansen, P.J. Bosma, C. Bakker, et.al, Persistent unconjugated hyperbilirubinemia after liver transplantation due to an abnormal bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter sequence in the donor, *Journal of Hepatology*. 27 (1997)1-5
 - [6] N.S. Key, V.K. Derebail, Sickle-cell trait: novel clinical significance, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010 (2010)418-22
 - [7] F. Neto, D.M. Lourenço, M.A.E. Noguti, The clinical impact of MTHFR polymorphism on the vascular complications of sickel cell disease, *Brazil Journal of Medical em Biology Research*. 39 (2006)1291-5
 - [8] R.G. Passon, T.A. Howard, S.A. Zimmerman, et.al, Influence of Bilirubin Uridine Diphosphate-Glucuronosyltransferase 1A Promoter Polymorphisms on Serum Bilirubin Levels and Cholelithiasis in Children With Sickel Cell Anemia, *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 23 (2001)448-51
 - [9] E.M.d. Giundice, S. Perrotta, B. Nobili, et.al, Coinheritance of Gilbert Syndrome Increases the Risk for Developing Gallstones in Patients With Hereditary Spherocytosis, *Blood Journal*. 94 (1999)2259-62
 - [10] M. Loureiro, S. Rozenfeld, Epidemiologia da internações por doença falciforme no Brasil, *Revista de Saúde Pública*. 39 (2005)943-9
 - [11] G. Monaghan, M. Ryan, R. Seddon, et.al, Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome, *The Lancet*. 347 (1996)578-81
 - [12] R. Ducatti, A. Teixeira, H. Galão, et.al, Investigação de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de recém nascidos do Hospital de São José do Rio Preto, *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 23 (2001)23-9
 - [13] A.P.S. Gumiero, M.Â.B. Brandão, E.A.L.C. Pinto, A.C.d. Anjos, Colelitíase no paciente pediátrico portador de doença falciforme, *Revista Paulista de Pediatria*. 25 (2007)377-81
 - [14] J. Júnior, A.C. Rodrigues, P. Buck, et.al. Coronary Flow Reserve in Sickel Cell Anemia. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*2007. p. 488-93.
 - [15] D. Nuzzo, S. Fonseca, Anemia falciforme e infecções, *Jornal de Pediatria*. 80 (2004)347-54
 - [16] L. Pinheiro, R. Gonçalves, C. Tomé, Prevalência de Hemoglobina S em recém nascidos de Fortaleza: importância da investigação neonatal, *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 28 (2006)122-5
-

-
- [17] P. Reis, L. Araújo, K. Penna, et.al, A importância do diagnóstico precoce na prevenção de anemias hereditárias, *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 28 (2006)149-52
- [18] M. Silva, E. Shimauti, Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme, *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 28 (2006)144-8
- [19] W.d.S. Silva, A. Lastra, S.F.d. Oliveira, N. Klautau-Guimarães, C.K. Grisolia, Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano, Brasil, *Caderno de Saúde Pública*. 22 (2006)2561-6
- [20] N. Anderson, Hydroxyurea Therapy: Improving the Lives of Patients With Sickle Cell Disease, *Pediatric Nursing*. 32 (2006)541-3
- [21] S.K. Ballas, Sickle Cell Anaemia Progress in Pathogenesis and Treatment, *Drugs*. 62 (2002)1143-72
- [22] M.S. Gonçalves, S.A. Cardoso, A.C. Strapazoni, Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickel cell disease, *Brazil Journal of Medical em Biology Research*. 34 (2001)1309-13
- [23] C.o. Genetics, Health Supervision for Children With Sickel Cell Disease, *American Academy of Pediatrics*. 109 (2002)526-31
- [24] A. Aloe, L. Krishnamurti, B. Kladny, Testing of collegiate athletes for sickle cell trait: what we, as genetic counselors should know, *J Genet Couns*. 20 (2011)337-40
- [25] E. Haverfield, C. Mckenzie, T. Forrester, UGT1A1 variation and gallstone in sickle cell disease, *Blood*. 105 (2005)968-72
- [26] M.-J. Huang, K.-E. Kua, H.-C. Teng, et.al, Risk Factors for Severe Hyperbilirrubinemia in Neonates, *Pediatric Research*. 56 (2004)682-9
- [27] A. Iolascon, M.F. Faienza, S. Perrota, G.F. Meloni, Gilbert's syndrome and jaundice in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient neonates, *Haematologica*. 84 (1999)99-102
- [28] P. Naoum, Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme, *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 22 (2000)05-22
- [29] P. Costa, R. Vilela, R. Cipolotti, Diversidade clínica e laboratorial no haplótipo bantu na anemia falciforme, *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 28 (2006)40-4
- [30] M. Creary, D. Williamson, R. Kulkarni, Sickle Cell Disease: Current Activities, Public Health Implications, and Future Directions, *Journal of Women's Health*. 16 (2007)575-82
- [31] S.W. Day, Development and Evaluation of a Sickle Cell Disease Assessment Instrument, *Pediatric Nursing*. 30 (2004)451-8
- [32] V. Kalotychou, K. Antonatou, R. Tzanetea, et.al, Analysis of the A(TA)_n TAA configuration in the promoter region of the UGT1 A1 gene in Greek patients with thalassemia intermedia and sickel cell disease, *Blood cells, Molecular and Disease*. 31 (2003)38-42
- [33] J.D. Bancroft, B. Kreamer, G.R. Gourley, Gilbert syndrome accelerates development of neonatal jaundice, *The Journal of Pediatrics*. 132 (1998)656-60
- [34] U. Ehmer, T.O. LanKisch, T.J. Erichsen, et.al, Rapid Allelic Discrimination by TaqMan PCR for the Detection of the Gilbert's Syndrome Marker UGT1A1*28, *Journal of Molecular Diagnosticis*. 10 (2008)549-52
-

-
- [35] R. Galanello, M.D. Cipollina, G. Carboni, L. Perseu, S. Barella, A. Corrias, A. Cao, Hyperbilirubinemia, glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency and Gilbert's syndrome, *European Journal Pediatric*. 158 (1999)914-6
- [36] F. Barbosa, S. Santos, J. Costa, Anestesia em Paciente com Síndrome de Gilbert. Relato de caso., *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 54 (2004)
- [37] R.G. Passon, T.A. Howard, S.A. Zimmerman, W.H. Schultz, R.E. Ware, Influence of bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A promoter polymorphisms on serum bilirubin levels and cholelithiasis in children with sickle cell anemia, *J Pediatr Hematol Oncol*. 23 (2001)448-51
- [38] K. Matsui, Y. Maruo, H. Sato, Y. Takeuchi, Combined effect of regulatory polymorphisms on transcription of UGT1A1 as a cause of Gilbert syndrome, *BMC Gastroenterol*. 10 (2010)57
- [39] P.J. Bosma, J.R. Chowdhury, C. Bakker, S. Gantla, A. de Boer, B.A. Oostra, D. Lindhout, G.N. Tytgat, P.L. Jansen, R.P. Oude Elferink, et al., The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome, *N Engl J Med*. 333 (1995)1171-5
- [40] E.M. del Giudice, S. Perrotta, B. Nobili, C. Specchia, G. d'Urzo, A. Iolascon, Coinheritance of Gilbert syndrome increases the risk for developing gallstones in patients with hereditary spherocytosis, *Blood*. 94 (1999)2259-62
-

ANEXO II – SUBMISSÃO DO ARTIGO



