

# DÉFICE DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE, ICTERICIA NEONATAL E SINDROMA DE GILBERT

ELÍSIO COSTA, EMILIA VIEIRA, ESMERALDA CLETO, JOSÉ M. CABEDA, LUCIANA PINHO, EDUARDA COIMBRA, ROSÁRIO DOS SANTOS, JOSÉ BARBOT

Serviço de Hematologia. Hospital Maria Pia. Serviços de Hematologia Clínica e Pediátrica do Hospital Geral de Santo António. Unidade de Genética Molecular do Instituto de Genética Doutor Jacinto de Magalhães. Porto

## RESUMO/SUMMARY

Neste trabalho procuramos avaliar a interferência de variantes do gene da UDP-glucuronosyltransferase -1 (UGT1A1) na incidência e gravidade da hiperbilirrubinemia neonatal, em recém nascidos com défice de Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Nesse sentido estudamos a região A(TA)<sub>n</sub>TAA do gene da UGT1A1 em 20 crianças com défice de G6PD, 14 com a variante do tipo Africana (G6PD<sup>A-</sup>) e 6 com diferentes variantes (G6PD<sup>Nara</sup>, G6PD<sup>Guadalajara</sup>, G6PD<sup>Durham</sup>, G6PD<sup>Tomah</sup>, G6PD<sup>Aveiro</sup> e G6PD<sup>Nashville</sup>), relacionadas com anemia hemolítica não esferocítica crónica (AHNEC). Foi ainda registado em cada caso a existência ou não de história de icterícia neonatal, assim como a sua gravidade.

A incidência de icterícia neonatal foi elevada neste grupo de doentes revelando-se independente da associação com variantes do gene da UGT1A1. Relativamente à sua gravidade, em doentes com variantes relacionadas com AHNEC, 5 dos 6 doentes estudados apresentaram icterícia neonatal, que condicionou recurso a transfusão permuta sem que nenhum deles apresentasse em homo ou heterozigotia para variantes do promotor do gene da UGT1A1. Concluimos que nesta última situação a gravidade da icterícia neonatal resultará do aporte exagerado de bilirrubina resultante do processo hemolítico concomitante.

*Palavras Chave:* G6PD, hiperbilirrubinemia, UGT1A1, promotor, icterícia neonatal.

## GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE DEFICIENCY, NEONATAL HYPERBILIRUBINEMIA AND GILBERT'S SYNDROME

The aim of this work was to evaluate the influence of abnormal UDP-glucuronosyltransferase-1 (UGT1A1) gene variant, on the incidence and severity of neonatal hyperbilirubinemia, in glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficient newborns.

The A(TA)<sub>n</sub>TAA region in the promoter of the UGT1A1 gene was analysed in 20 children with G6PD deficiency. Fourteen of these children had the African type variant (G6PD<sup>A-</sup>) and 6 had different variants (G6PD<sup>Nara</sup>, G6PD<sup>Guadalajara</sup>, G6PD<sup>Durham</sup>, G6PD<sup>Tomah</sup>, G6PD<sup>Aveiro</sup> e G6PD<sup>Nashville</sup>) related to chronic nonspherocytic haemolytic anaemia (CNSHA). The existence of a positive history of neonatal hyperbilirubinemia, as well as its severity was registered.

The incidence of neonatal hyperbilirubinemia was increased in this group of children (90%) and was not associated with abnormal alleles of the UGT1A1 gene. It was not possible to assess the influence of abnormal alleles in the severity of the neonatal hyperbilirubinemia. However, these abnormal alleles did not account for the severity of jaundice in children who presented variants related to CNSHA, since 5 were treated with an exchange transfusion and none presented abnormal alleles.

*Key words:* G6PD, Neonatal Hyperbilirubinemia, UGT1A1, TATA box, Jaundice, Polymorphism.

## INTRODUÇÃO

O défice de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é a enzimopatia eritrocitária conhecida mais comum, atingindo mais de 400 milhões de pessoas em todo o mundo<sup>1</sup>. Portugal é um país de baixa prevalência do gene mutado, sendo no entanto de registar uma crescente imigração para o nosso país de indivíduos oriundos de países de prevalência elevada. A hiperbilirrubinemia neonatal é uma das complicações associadas ao défice de G6PD, podendo mesmo nas situações mais graves originar *kernicterus* e morte<sup>2</sup>. A etiopatogenia desta hiperbilirrubinemia não está, no entanto, ainda completamente esclarecida.

O síndrome de Gilbert (SG) é caracterizado por uma hiperbilirrubinemia, ligeira e crónica, não conjugada, com função hepática normal e diminuição da actividade da enzima *UDP-glucuronosyltransferase-1* (UGT1A1)<sup>3</sup>. Recentemente foi identificado um polimorfismo na região promotora do gene da UGT1A1, que lhe diminui a expressão e cuja relação com a hiperbilirrubinemia neonatal tem vindo a ser investigada<sup>4,5,6,7,8,9</sup>.

Neste trabalho procurou-se avaliar a interferência de variantes do gene da UGT1A1 na incidência e gravidade da hiperbilirrubinemia neonatal em recém nascidos com défice de G6PD.

## MATERIAL E MÉTODOS

### População estudada:

Foram estudadas 20 crianças, com idade compreendida entre os 4 meses e os 16 anos de idade, com défice de G6PD, seguidas na consulta de Hematologia do Hospital Maria Pia ou na consulta de Hematologia e/ou Pediatria do Hospital Geral de Santo António. Catorze destas crianças apresentavam variantes de G6PD pertencentes à classe III da classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), todas elas com a variante do tipo Africana (Variante A-). Duas são do sexo feminino, homocigóticas para a variante A-. As restantes 6 apresentavam diferentes variantes (G6PD<sup>Nara</sup>, G6PD<sup>Guadalajara</sup>, G6PD<sup>Durham</sup>, G6PD<sup>Tomah</sup>, G6PD<sup>Aveiro</sup> e G6PD<sup>Nashville</sup>) relacionadas com anemia hemolítica não esferocítica crónica (AHNEC). A partir da história clínica e dos elementos registados no boletim de saúde infantil foi registada a presença ou não de icterícia neonatal e o recurso ou não a fototerapia e a transfusão permuta. A doença hemolítica do recém nascido foi excluída enquanto factor etiológico da icterícia nos doentes que a apresentaram.

### Genotipagem da região A(TA)<sub>n</sub>TAA do gene da UGT1A1

A região A(TA)<sub>n</sub>TAA do promotor do gene da UGT1A1

foi amplificado por PCR (protein chain reaction), usando os *primers* descritos por Bancroft et al.<sup>5</sup>, sendo o *primer reverse* marcado com um fluorocromo. Os produtos de amplificação foram posteriormente separados por electroforese capilar e analisados no programa ABI GeneScan (Applied Biosystems) para determinação do tamanho do fragmento e respectivo número de repetições TA. Este número foi confirmado, por sequenciação automática, em duas amostras homocigóticas para (TA)<sub>6</sub> e para (TA)<sub>7</sub>.

## RESULTADOS

Nove dos doentes estudados revelaram-se homocigóticos normais [(TA)<sub>6</sub>/(TA)<sub>6</sub>] e 9 heterocigóticos (8 - [(TA)<sub>6</sub>/(TA)<sub>7</sub>] e 1 - [(TA)<sub>6</sub>/(TA)<sub>5</sub>]) para variantes da região A(TA)<sub>n</sub>TAA do promotor do gene da UGT1A1 (Fig. 1). Nestas 18 crianças foi documentada icterícia neonatal em 16. Oito não efectuaram tratamento, 3 efectuaram fototerapia e 5 efectuaram fototerapia e transfusão permuta. Estes 5 últimos doentes apresentavam variantes relacionadas com AHNEC (classe I da classificação da OMS).

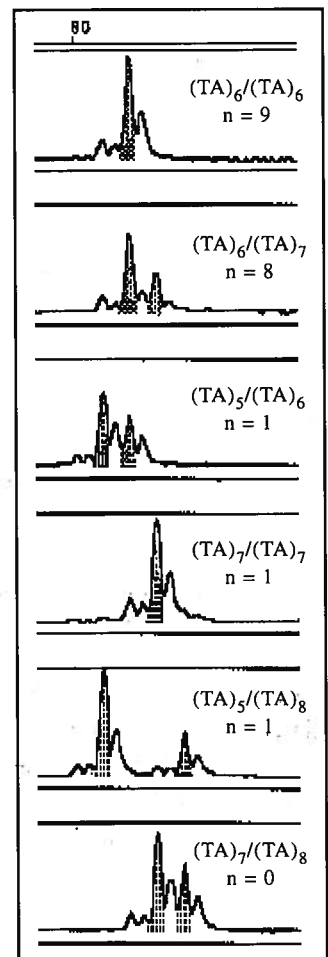


Fig. 1 - Exemplos de resultados obtidos da análise da região A(TA)<sub>n</sub>TAA do promotor do gene da UGT1A1. O genótipo (TA)<sub>7</sub>/(TA)<sub>8</sub> foi encontrado na mãe da criança que apresenta o genótipo (TA)<sub>5</sub>/(TA)<sub>8</sub>

Encontrou-se homozigotia para variantes do promotor em dois doentes, sendo um homoalélico ( $[(TA)_7/(TA)_7]$ ) e o outro heteroalélico ( $[(TA)_5/(TA)_8]$ ). Ambos apresentaram icterícia neonatal. Um não efectuou tratamento e o outro efectuou fototerapia (Quadro I).

Quadro I- Resumo das características dos 20 doentes estudados

Número de casos (n=20)	Variante de G6PD	Alelo do gene da UGT1A1	INN	Fototerapia	TP
2	A-	$(TA)_6/(TA)_6$	S	N	N
1	A-	$(TA)_6/(TA)_6$	S	S	N
1	A-	$(TA)_4/(TA)_6$	N	N	N
6	A-	$(TA)_6/(TA)_7$	S	N	N
2	A-	$(TA)_6/(TA)_7$	S	S	N
1	A-	$(TA)_7/(TA)_7$	S	S	N
1	A-	$(TA)_5/(TA)_8$	S	N	N
1	Nashville	$(TA)_6/(TA)_6$	S	S	S
1	Nara	$(TA)_6/(TA)_6$	S	S	S
1	Tonah	$(TA)_6/(TA)_6$	S	S	S
1	Aveiro	$(TA)_6/(TA)_6$	S	S	S
1	Durham	$(TA)_6/(TA)_6$	S	S	S
1	Guadalajara	$(TA)_6/(TA)_6$	N	N	N

INN- icterícia neonatal; TP – transfusão permuta; N- não; S- sim

## DISCUSSÃO

A incidência elevada de hiperbilirrubinemia neonatal em recém nascidos com défice de G6PD está bem documentada. Apesar disso a sua etiopatogenia não está completamente esclarecida<sup>10</sup>. Uma questão para a qual ainda não foi encontrada resposta é a de saber a razão pela qual, apenas alguns dos recém nascidos portadores do mesmo défice desenvolvem icterícia neonatal, que por sua vez pode atingir graus de gravidade muito variável. A explicação mais linear seria a existência de uma relação entre a variante do défice de G6PD com a incidência e gravidade da icterícia neonatal<sup>10</sup>. Os primeiros estudos realizados aquando da emergência do diagnóstico molecular vieram no entanto contrariar esta hipótese. Por exemplo na Sardenha verificou-se que o espectro da icterícia neonatal era semelhante nas 3 variantes polimórficas com incidência na região<sup>11</sup>. Também não foi demonstrada a interferência nesta variabilidade de outros factores genéticos adicionais, assim como de factores ambientais<sup>10</sup>. Entretanto, o facto da icterícia neonatal em contexto de

defício de G6PD não estar geralmente associada a evidência de hemólise, ao contrário do que acontece na doença hemolítica do recém nascido, veio colocar a questão da sua etiologia ter um componente essencialmente hepático, dado tratar-se de uma enzima ubiqüitária<sup>10</sup>.

A descoberta recente de variantes do promotor do gene da UGT1A1, como responsáveis por uma percentagem elevada de SG, em diferentes populações, constituiu uma possibilidade a investigar enquanto factor de risco genético adicional que explicasse a referida variabilidade. Esta questão tem vindo aliás a ser investigada face à icterícia neonatal não fisiológica, independentemente da presença de défice de G6PD. Um estudo efectuado recentemente na nossa população mostra que a inserção dinucleotídica (TA) no promotor do gene da UGT1A1, não interfere de forma estatisticamente significativa na ocorrência desta situação<sup>9</sup>. Relativamente à icterícia neonatal associada a défice de G6PD existem estudos com resultados contraditórios. O primeiro trabalho sobre este assunto publicado por Kuplan et al.<sup>4</sup> concluiu que a presença da referida inserção aumenta a incidência de hiperbilirrubinemia. Estudos posteriores não confirmaram no entanto essa conclusão<sup>8,12</sup>.

Relativamente ao presente estudo é de referir que a baixa incidência de défice de G6PD na nossa população não permite a realização de estudos prospectivos. Oitenta por cento dos diagnósticos dos doentes apresentados foram feitos não no período neonatal, mas sim face a manifestações posteriores da doença. Este facto dificultou o acesso aos processos clínicos referentes ao período neonatal e como tal a documentação pormenorizada do perfil da bilirrubinémia nos doentes que apresentaram icterícia. Os elementos obtidos mostram uma incidência significativa de hiperbilirrubinemia neonatal nos nossos doentes (92,8% com variantes da classe III e 83,3% com variantes da classe I). Relativamente aos doentes da classe III, a análise dos resultados mostra que dentro do grupo que fez icterícia (n=13), 3 eram homozigóticos normais, 8 heterozigóticos e 2 homozigóticos para variantes do gene da UGT1A1. Os doentes que fizeram fototerapia (n=4) encontramos 1 homozigótico normal, 2 heterozigóticos, e outro homozigótico para variantes do gene da UGT1A1. O único doente sem registo de icterícia neonatal era heterozigótico. Estes resultados não permitem tirar uma conclusão definitiva sobre a relação entre estas variantes do gene da UGT1A1 e a incidência e gravidade da icterícia neonatal, dado o reduzido de doentes estudados. De referir no entanto, que estes resultados parecem corroborar mais aqueles obtidos por Galanello R, et al<sup>8</sup> e Iolascon A et al<sup>12</sup>, dado a elevada incidência de icterícia neonatal neste grupo de doentes.

Panorama diferente será o relativo às 6 situações relacionadas com AHNEC (classe I). Encontramos neste grupo uma incidência elevada de icterícia neonatal, assim como de recurso a transfusão permuta, sendo que todos os doentes eram homocigóticos normais. Este contraste permite-nos afirmar com maior consistência que variações na região A(TA)<sub>n</sub>TAA do promotor do gene UGT1A1 não tem interferência significativa na gravidade da hiperbilirrubinemia, sendo que esta será determinada fundamentalmente pelo tipo de variante de G6PD em causa e pelo aporte exagerado de bilirrubina consequente ao processo hemolítico concomitante. De referir que o facto de se tratar de variantes esporádicas e raras dificulta uma comparação com publicações descrevendo casos semelhantes. Não encontramos aliás na literatura estudos relacionando SG e icterícia neonatal neste tipo de variantes. A maior revisão que procura caracterizar retrospectivamente o quadro clínico de portadores destas variantes inclui 12 doentes, 3 dos quais estudados no presente trabalho (G6PD<sup>Nara</sup>, G6PD<sup>Tomah</sup> e G6PD<sup>Nashville</sup>)<sup>13</sup>. Icterícia neonatal ocorreu nestes 12 doentes, sendo que 44,4% realizaram transfusão permuta. Concluímos que nesta última situação a gravidade da icterícia neonatal resultará do aporte exagerado de bilirrubina resultante do processo hemolítico concomitante.

## BIBLIOGRAFIA

1. BEUTLER E: G6PD deficiency. *Blood* 1994;84:3613-3636
2. KAPLAN OM, BEUTLER E, VREMAN HJ, HARMMERMAN C, LEVY-LAHAD E, RENBAUM P, STEVENSON DK: Neonatal hyperbilirubinemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient heterozygotes. *Pediatrics* 1999; 104: 68-74
3. BURCHELL B, HUME R: Molecular genetic basis of Gilbert's syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 960-966.
4. KAPLAN M, RENBAUM P, LEVY-LAHAD E, HAMMERMAN C, LAHAD A, BEUTLER E: Gilbert syndrome and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a dose-dependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12128-12132
5. BANCROFT JD, KREAMER B, GOURLEY GR: Gilbert syndrome accelerates development of neonatal jaundice. *J Pediatr* 1998; 132: 656-660
6. MONAGHAN G, MCLELLAN A, MCGEEHAN A, LI VOLTI S, MOLLICA F, SALEMI I, DIN Z, CASSIDY A, HUMER, BURCHELL B: Gilbert's syndrome is a contributory factor in prolonged unconjugated hyperbilirubinemia of the newborn. *J Pediatr* 1999; 134: 441-446
7. AKABA K, KIMURA T, SASAKI A, TANABE S, WAKABAYASHI T, HIROI M, YASUMURA S, MAKI K, AIKAWA S, HAYSAKA K: Neonatal hyperbilirubinemia and a common mutation of the bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase gene in Japanese. *J Hum Genet* 1999; 44: 22-25
8. GALANELLO R, CIPOLLINA MD, CARBONI G, PERSEU L, BARELLA S, CORRIAS A, CAO A: Hyperbilirubinemia, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and Gilbert's syndrome. *Eur J Pediatr* 1999; 158: 914-916
9. 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: 133-136
10. NATHAN GN, ORKIN SH: Nathan and Oski's Hematology of infancy and Childhood. 5th Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia, 1998
11. TESTA U, MELONI T, LANIA A, BATTISTUZZI G, CUTILLO S, LUZZATTO L: Genetic heterogeneity of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency in Sardinia. *Hum Genet* 1980; 56: 99-105
12. IOLASCON A, FAIENZA MF, PERROTTA S, MELONI GF, RUGGIU G, DEL GIUDICE EM: Gilbert's syndrome and jaundice in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient neonates. *Haematologica* 1999; 84: 99-102
13. VULLIAMY TJ, KAEDA SK, AIT-CHAFA D, MANGERINI R, ROPER D, BARBOT J, MEHTA AB, ETHANASSIOU-METAXA M, LUZZATTO L, MASON PJ: Clinical and haematological consequences of recurrent G6PD mutations and a single new mutation causing chronic nonspherocytic haemolytic anaemia. *Br J Haematol* 1998; 101: 670-675