MARCELO MOREIRA TAVARES DE SOUZA

**Frequência do alelo UGT1A1*28 (Síndrome de Gilbert)
em pacientes portadores de hepatite crônica C e em
controles sadios**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Gastroenterologia Clínica
Orientadora: Profa. Dra. Suzane Kioko Ono-Nita

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Marcelo Moreira Tavares de

Frequência do alelo UGT1A1*28 (Síndrome de Gilbert) em pacientes portadores de hepatite crônica C e em controles saudáveis / Marcelo Moreira Tavares de Souza. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Gastroenterologia.

Área de concentração: Gastroenterologia Clínica.

Orientadora: Suzane Kioko Ono-Nita.

Descritores: 1.Bilirrubina 2.Icterícia 3.Doença de Gilbert 4.Hepatite C 5.Polimorfismo genético 6.Hiperbilirrubinemia

USP/FM/SBD-321/09

Errata

Marcelo Moreira Tavares de Souza. Frequência do alelo UGT1A1*28 (Síndrome de Gilbert) em pacientes portadores de hepatite crônica C e em controles sadios (dissertação). São Paulo. FMUSP. 10 de setembro de 2009.

Página	tabela/figura/gráfico	Linha	Onde se lê	Leia-se
10		20	sobretudopor	sobretudo por
10		22	dirréia	diarréia
14		4	50	5
22		2	6.000 rpm	3,3 g
22		17	8.000 rpm	5,9 g
22		20	8.000 rpm	5,9 g
23		1	14,000 rpm	16,1 g
25		12	pmolar	pmoles
25		13	pmolar	pmoles
27		18	13.000 rpm	11,3 g
27		21	13.000 rpm	11,3 g
28		5	13.000 rpm	11,3 g
29		22	3.700 rpm	10,2 g
31	Figura 7		letroferogramas	eletroferogramas
39	Tabela 2		219/494 (45)	219/494 (44)
40		6	freqüência	frequência
40		7	freqüência	frequência

40		9	13%	13,5%
47		8	mair	maior
48		7	45%	44%
49	Gráfico 4		freqüência	frequência
50		4	freqüência	frequência
54		12	tabela 3	tabela 5
54		14	tabela 5	tabela 3
			influenciar, embora	influenciar de
60		5	de maneira não estatisticamente significante,	maneira estatisticamente significante,

DEDICATÓRIA

***A meus pais, Roberto (in memorium) e Cida,
pelo incondicional amor, incentivo e paciência.***

***A meus irmãos, Marcos e Marcio,
pela amizade ao longo desses anos.***

A minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus por essa etapa cumprida.

A meus pais, Roberto e Cida, pelo amor, carinho e apoio. Mesmo sem entenderem a metodologia ou o trabalho no laboratório, sempre se mostraram interessados e participativos ao longo desta jornada.

À família, minha avó Delza, tios, tias, primos e primas, pelas festas nas férias de final de ano em Juiz de Fora (MG).

Ao professor Doutor Flair José Carrilho, pelo incentivo à pesquisa científica que sempre o acompanha, um exemplo de liderança.

À professora Doutora Suzane Kioko Ono-Nita, pela valiosa orientação, paciência e apoio no laboratório. Sempre aberta a novas ideias, desafios e empenhada em melhorar cada vez mais nosso grupo de pesquisa.

Ao Doutor Marcelo Eidi Nita, pela amizade, ajuda estatística e entusiasmo à pesquisa.

Ao professor Doutor Venâncio Avancini Ferreira Alves, pelo incentivo e entusiasmo nas reuniões científicas.

Aos Doutores Alberto Queiroz Farias, Dulce Reis Guarita e Wanda Regina Caly, pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

Aos amigos dos laboratórios LIM-07 e LIM-14, Helena Scavone Paschoale, Eliane P. do Carmo, Jeronimo de Alencar Nogueira, Camila da Silva Ferreira, Paulo D. Nasser, Cinthia Zanini, Fernanda R. Barbosa, Carolina Aguilar, Fábio Payão, Marianges Z. Gouvêa, Maria Luiza da Nova, Dra. Sueli Nakatami, Dra. Alda Wakamatsu, Rodrigo Réssio e Cinthya Cirqueira. Sem eles, esta dissertação não poderia ser concluída.

Ao serviço de sequenciamento multiusuário do LIM-56, Professor Doutor Alberto Duarte, Fábio Silva, Doutora Erika Fujihara e Doutora Karen Brunialti, pela ajuda nos sequenciamentos e análises de fragmentos.

Ao Departamento de Gastroenterologia, Renato, Claudia, D. Fátima, Nalva e Fabiana, pela ajuda e atenção.

Aos Doutores Carlos Eduardo Winter e Itamar R. Garcia Ruiz, pelos primeiros estágios em biologia molecular.

Aos amigos Augusto Ferraiol, Bruno Souza, Vinicius Silva, Alexandre Machado, Denis Quental, Fabio Aniello, Fabio Lanzaletti, Rodrigo Ramalho, Guilherme Francisco e amigos do Limão Bonera.

A, José Ferreira Neto, Ronaldo Giovanelli e Marcelo P. Surcin.

Aos pacientes e doadores que participaram desta pesquisa.

A todos que participaram diretamente ou indiretamente deste trabalho.

A FAPESP, CNPq e Fundação Família Alves de Queirós pelo apoio financeiro.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento da publicação:

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Sueli C. Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Esta dissertação está conforme as regras do Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, de janeiro de 2009.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas e gráficos

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Metabolismo da Bilirrubina	3
1.2 Síndrome de Gilbert	6
1.3 Glicuronidação	9
1.4 Nomenclatura a organização genômica das famílias UGTs	11
1.5 Distribuição das UGTs em diferentes tecidos	12
1.6 Hepatite Crônica C	13
2. OBJETIVOS	17
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	19
3.1 Seleção dos pacientes	20
3.2 Preparo do creme leucocitário	22
3.3 Extração de DNA genômico	22
3.4 Avaliação da extração de DNA genômico (DNAg)	23
3.5 Desenho dos <i>primers</i>	24
3.6 Amplificação por PCR	25
3.7 Eletroforese	27
3.8 Purificação de fragmentos de PCR	27
3.9 Padronização da reação de PCR	28
3.10 Sequenciamento de DNA	29
3.11 Análise de fragmentos	31
3.12 Padronização da Técnica de Análise de Fragmentos	33
3.13 Análise estatística	35
3.13.1 Cálculo da equação de Hardy e Weinberg e frequência gênica	36

4. RESULTADOS	37
4.1 Casos genotipados (Grupo A)	38
4.2 Distribuição entre os grupos raciais	40
4.3 Grupos controles sadios (Grupo B).	41
4.4 Análise da dosagem de bilirrubina total no Grupo A (dados laboratoriais)	44
4.5 Comparação entre os genótipos UGT1A1 encontrados nos Grupos A e B	48
4.6 Comparações entre os alelos encontrados nos Grupos A e B	49
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES	59
7. ANEXOS	61
ANEXO A	62
ANEXO B	70
8. REFERÊNCIAS	71

LISTAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Metabolismo da bilirrubina. FONTE: modificado de Bosma e cols.(2003).....	5
Figura 2 -	Estrutura da família UGT1A. Organização genômica dos 13 genes. UGTs e processamento dos genes UGT1A1 e 1A5 (Innocent e Ratain, 2004)	12
Figura 3 -	Extração de DNA genômico. Gel de agarose 1,5%. (p/v) M: <i>Low mass DNA ladder</i> (Invitrogen, Carlsbad, EUA). M: <i>DNA mass ladder</i> (Invitrogen, Carlsbad, EUA)	24
Figura 4 -	Região promotora do gene UGT1A1 (em vermelho).....	24
Figura 5 -	Região do gene UGT1A1 sequenciada pelos <i>primers</i> UGT1A1 direto e reverso. Região promotora em destaque	26
Figura 6 -	PCR região promotora UGT1A1. Tamanho do fragmento: 404 pb (seta) M: <i>100 bp DNA mass ladder</i> . (Invitrogen, Carlsbad, EUA). C-: controle negativo, Gel de agarose 1,5% (p/v)	28
Figura 7 -	Padrões de eletroferogramas obtidos. Setas indicam a adição da TA	31
Figura 8 -	Genotipagem de um paciente TA6/6 pela técnica de Análise de fragmentos.....	33
Figura 9 -	Análise de fragmentos e o respectivo sequenciamento. A. TA5/6, B. TA6/6 (selvagem), C. TA6/7, D. TA7/7 (UGT1A1*28), E. TA7/8, F. TA8/8	34

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Distribuição entre o sexo masculino e feminino nos pacientes HC-FMUSP estudados (Grupo A).....	38
Gráfico 2-	Distribuição entre o sexo masculino e feminino nos controles sadios estudados (Grupo B).	41
Gráfico 3 -	Comparação entre as frequências dos genótipos UGT1A1 entre o Grupo A e Grupo B.....	48
Gráfico 4 -	Comparação da frequência dos alelos encontrados nos pacientes e doadores	49
Gráfico 5 -	Frequência dos alelos do gene UGT1A1 encontrados no Grupo A.	50
Gráfico 6 -	Frequência dos alelos do gene UGT1A1 encontrado no Grupo B.....	51
Tabela 1 -	Relação tamanho de fragmento obtido X Genótipo.....	35
Tabela 2 -	Frequência dos genótipos, TA5/6, TA6/6, TA6/7, TA7/7, TA7/8 e TA8/8, encontrados no Grupo A, $p = 0,255$	39
Tabela 3 -	Classificação por raça do Grupo A, $p = 0.006$	40
Tabela 4 -	Frequência dos genótipos TA5/6, TA6/6, TA6/7, TA7/7, TA7/8 e TA5/7 no Grupo B	42
Tabela 5 -	Classificação por raça do Grupo B	43
Tabela 6 -	Avaliação da bilirrubina nos pacientes divididos por idades (em anos) e sexo	45
Tabela 7 -	Avaliação dos genótipos versus bilirrubina total no Grupo A com $p < 0,0000$	46
Tabela 8 -	Frequência do genótipos encontrados de acordo com a dosagem de bilirrubina total n (%), $p < 0,001$	47

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

>	maior que
≤	menor ou igual que
<	menor que
%	porcentagem
μg	microgramas
μL	microlitros
μM	micromolar
A	adenina
ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
CAPPesq	Comissão de ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cm	centímetros
cols.,	colaboradores
DNA	ácido desoxiribonucléico
DNAg	ácido desoxiribonucléico genômico
dNTP	deoxinucleotídeos
DP	desvio padrão
EUA	Estados Unidos da América
fem	feminino
g	gramas
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	vírus da imunodeficiência humana
kb	kilo base (1000 pares de base)
LIM	Laboratório de Investigação Médica

M	molar
masc	masculino
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	minutos
mL	militros
mM	milimolar
mmol	milimols
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>
ng	nanograma
°C	Graus Celcius
<i>p</i>	significância estatística
p/v	peso/volume
pb	pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pM	pico molar
rpm	rotação por minuto
SG	Síndrome de Gilbert
T	timina
TBE	Tris Borato EDTA
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Tween20	Monolaurato de Sorbitan Etoxilado 20
U	unidade
UGT	UDP-glicuronil transferase
v/v	volume/volume
VHB	vírus hepatite B
VHC	vírus hepatite C
γGT	gama glutamil transferase

RESUMO

Souza MMT. *Frequência do alelo UGT1A1*28 (Síndrome de Gilbert) em pacientes portadores de hepatite crônica C e em controles sadios* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 77 p.

A Síndrome de Gilbert é caracterizada por uma hiperbilirrubinemia indireta benigna que ocorre na ausência de hemólise ou doença estrutural do fígado. Manifesta-se por episódios intermitentes de icterícia, desencadeados por exposição a estressores físicos, baixa ingestão calórica, entre outros. A base genética da redução da atividade da enzima UDP - Glucuroniltransferase foi descoberta em 1995: em uma população caucasiana. Todos os pacientes estudados apresentaram uma adição dos nucleotídeos Timina-Adenina (TA) na região TATA *box* presente no promotor do gene UGT1A1, em ambos os alelos. Embora considerada uma condição benigna, a síndrome de Gilbert tem sido recentemente associada à hiperbilirrubinemia e a outros efeitos colaterais na utilização de algumas drogas como o Indinavir e Irinotecan. Outro ponto importante diz respeito ao nível de bilirrubina sérica como um indicador da severidade do acometimento de hepatopatas. A presença de mutação no gene UGT1A1 em pacientes hepatopatas pode levar ao aumento da bilirrubina sérica, supervalorizando o acometimento hepático da condição patológica. O objetivo deste estudo foi verificar a frequência do alelo UGT1A1*28 em doadores de sangue da Fundação Pró-sangue Hemocentro de São Paulo HC-FMUSP e em pacientes portadores de hepatite crônica C atendidos no ambulatório de Gastroenterologia Clínica da FMUSP. Relacionar o genótipo TA7/7 com o aumento de bilirrubina sérica nos pacientes com hepatite crônica C e avaliar a técnica de análise de fragmento no rastreamento e genotipagem da Síndrome de Gilbert. A frequência encontrada para o genótipo TA7/7 no grupo doador foi de 9% (30/313) e no grupo de pacientes VHC, de 10% (51/494). O genótipo TA7/7 parece estar relacionado com o aumento de bilirrubina. A técnica de análise de fragmentos mostrou-se rápida, sendo possível para fazer uma análise em grande escala. A herança genética da população brasileira é muito heterogênea. É constituída de caucasianos, africanos, índios, orientais e outros. Os dados sugerem que a variação genética da região promotora do gene UGT1A1 é alta entre pacientes com bilirrubina maior que 1mg/dL, e que a genotipagem para UGT1A1*28 deve ser considerada na avaliação dos pacientes com hepatite C crônica com hiperbilirrubinemia.

Descritores: 1.Bilirrubina 2.Icterícia 3.Doença de Gilbert 4.Hepatite C 5.Polimorfismo genético 6.Hiperbilirrubinemia

SUMMARY

Souza MMT. *Frequency of UGT1A1*28 (Gilbert's Syndrome) in patients with chronic hepatitis C virus and healthy donors* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009.77 p.

Gilbert's syndrome is a benign condition characterized by unconjugated hiperbilirubinemia that occurs in the absence of hemolysis or liver chronic disease. It is clinically manifested by intermittently jaundice, triggered by exposition to physical stress, low calory diet, among others. The genetic base is the reduction of the activity of UDP-glucuronosyltransferase enzyme described in 1995: in a Caucasian population, all patients studied presented a Thymine Adenine (TA) addition in the TATA box region in both alleles of the UGT1A1 gene promoter. Although, Gilbert's syndrome has been considered a benign condition, recently it has been associated to hiperbilirubinemia and other adverse events during the utilization of some drugs such as Indinavir and Irinotecan. Another important issue to consider is that bilirubin is used to evaluate the severity of liver dysfunction in chronic liver diseases. The presence of this mutation in those patients could increase bilirubin levels, overestimating liver damage. The aim of this study were: 1) to verify the frequency of the genotype UGT1A1*28 (TA7/7) in blood donors and in chronic hepatitis C patients from the Gastroenterology outpatients clinics of the University of São Paulo School of Medicine; 2) to establish a relationship with TA7/7 genotype and bilirubin elevation in chronic hepatitis C patients and 3) to evaluate the fragment analysis technique to screening and genotyping the Gilbert syndrome. The frequencies of TA7/7 genotype found in blood donors group were 9.6% (30/313) and in the chronic hepatitis C group were 10% (51/494). The TA7/7 genotype seems to be related with increase of bilirubin. The fragment analysis technique is fast and able to a large scale screening approach. The genetic background of Brazilian population is highly heterogeneous. It is comprised of Caucasians, Africans, Indians, Orientals and others. The data suggests that genetic variation of promoter region of UGT1A1 gene is high among patients with bilirubin levels greater than 1 mg/dl, and UGT1A1*28 genotypes should be considered when evaluating chronic hepatitis C patients with hiperbilirubinemia.

Descriptors: 1.Bilirubin 2.Jaundice 3.Gilbert Syndrome 4.Hepatitis C virus 5.Polymorphism 6.Hiperbilirubinemia.

DEDICATÓRIA

***A meus pais, Roberto (in memorium) e Cida,
pelo incondicional amor, incentivo e paciência.***

***A meus irmãos, Marcos e Marcio,
pela amizade ao longo desses anos.***

A minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus por essa etapa cumprida.

A meus pais, Roberto e Cida, pelo amor, carinho e apoio. Mesmo sem entenderem a metodologia ou o trabalho no laboratório, sempre se mostraram interessados e participativos ao longo desta jornada.

À família, minha avó Delza, tios, tias, primos e primas, pelas festas nas férias de final de ano em Juiz de Fora (MG).

Ao professor Doutor Flair José Carrilho, pelo incentivo à pesquisa científica que sempre o acompanha, um exemplo de liderança.

À professora Doutora Suzane Kioko Ono-Nita, pela valiosa orientação, paciência e apoio no laboratório. Sempre aberta a novas ideias, desafios e empenhada em melhorar cada vez mais nosso grupo de pesquisa.

Ao Doutor Marcelo Eidi Nita, pela amizade, ajuda estatística e entusiasmo à pesquisa.

Ao professor Doutor Venâncio Avancini Ferreira Alves, pelo incentivo e entusiasmo nas reuniões científicas.

Aos Doutores Alberto de Queirós Farias, Dulce Reis Guarita e Wanda Regina Calli, pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

Aos amigos dos laboratórios LIM-07 e LIM-14, Helena Scavone Paschoale, Eliane P. do Carmo, Jeronimo de Alencar Nogueira, Camila da Silva Ferreira, Paulo D. Nasser, Cinthia Zanini, Fernanda R. Barbosa, Carolina Aguilar, Fábio Payão, Marianges Z. Gouvêa, Maria Luiza da Nova, Dra. Sueli Nakatami, Dra. Alda Wakamatsu, Rodrigo Réssio e Cinthya Cirqueira. Sem eles, esta dissertação não poderia ser concluída.

Ao serviço de sequenciamento multiusuário do LIM-56, Professor Doutor Alberto Duarte, Fábio Silva, Doutora Erika Fujihara e Doutora Karen Brunialti, pela ajuda nos sequenciamentos e análises de fragmentos.

Ao Departamento de Gastroenterologia, Renato, Claudia, D. Fátima, Nalva e Fabiana, pela ajuda e atenção.

Aos Doutores Carlos Eduardo Winter e Itamar R. Garcia Ruiz, pelos primeiros estágios em biologia molecular.

Aos amigos Augusto Ferraiol, Bruno Souza, Vinicius Silva, Alexandre Machado, Denis Quental, Fabio Aniello, Fabio Lanzelotti, Rodrigo Ramalho, Guilherme Francisco e amigos do Limãobonera.

A, José Ferreira Neto, Ronaldo Giovanelli e Marcelo P. Surcin.

Aos pacientes e doadores que participaram desta pesquisa.

A todos que participaram diretamente ou indiretamente deste trabalho.

A FAPESP, CNPq e Fundação Família Alves de Queirós pelo apoio financeiro.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento da publicação:

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Sueli C. Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Esta dissertação está conforme as regras do Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, de janeiro de 2009.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas e gráficos

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Metabolismo da Bilirrubina	3
1.2 Síndrome de Gilbert	6
1.3 Glicuronidação	9
1.4 Nomenclatura a organização genômica das famílias UGTs	11
1.5 Distribuição das UGTs em diferentes tecidos	12
1.6 Hepatite Crônica C	13
2. OBJETIVOS	17
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	19
3.1 Seleção dos pacientes	20
3.2 Preparo do creme leucocitário	22
3.3 Extração de DNA genômico	22
3.4 Avaliação da extração de DNA genômico (DNAg)	23
3.5 Desenho dos <i>primers</i>	24
3.6 Amplificação por PCR	25
3.7 Eletroforese	27
3.8 Purificação de fragmentos de PCR	27
3.9 Padronização da reação de PCR	28
3.10 Sequenciamento de DNA	29
3.11 Análise de fragmentos	31
3.12 Padronização da Técnica de Análise de Fragmentos	33
3.13 Análise estatística	35
3.13.1 Cálculo da equação de Hardy e Weinberg e frequência gênica	36

4. RESULTADOS	37
4.1 Casos genotipados (Grupo A)	38
4.2 Distribuição entre os grupos raciais	40
4.3 Grupos controles sadios (Grupo B).	41
4.4 Análise da dosagem de bilirrubina total no Grupo A (dados laboratoriais)	44
4.5 Comparação entre os genótipos UGT1A1 encontrados nos Grupos A e B	48
4.6 Comparações entre os alelos encontrados nos Grupos A e B	49
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES	59
7. ANEXOS	61
ANEXO A	62
ANEXO B	70
8. REFERÊNCIAS	71

LISTAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Metabolismo da bilirrubina. FONTE: modificado de Bosma e cols.(2003).....	5
Figura 2 -	Estrutura da família UGT1A. Organização genômica dos 13 genes. UGTs e processamento dos genes UGT1A1 e 1A5 (Innocent e Ratain, 2004)	12
Figura 3 -	Extração de DNA genômico. Gel de agarose 1,5%. (p/v) M: <i>Low mass DNA ladder</i> (Invitrogen, Carlsbad, EUA). M: <i>DNA mass ladder</i> (Invitrogen, Carlsbad, EUA)	24
Figura 4 -	Região promotora do gene UGT1A1 (em vermelho).....	24
Figura 5 -	Região do gene UGT1A1 sequenciada pelos <i>primers</i> UGT1A1 direto e reverso. Região promotora em destaque	26
Figura 6 -	PCR região promotora UGT1A1. Tamanho do fragmento: 404 pb (seta) M: <i>100 bp DNA mass ladder</i> . (Invitrogen, Carlsbad, EUA). C-: controle negativo, Gel de agarose 1,5% (p/v)	28
Figura 7 -	Padrões de eletroferogramas obtidos. Setas indicam a adição da TA	31
Figura 8 -	Genotipagem de um paciente TA6/6 pela técnica de Análise de fragmentos.....	33
Figura 9 -	Análise de fragmentos e o respectivo sequenciamento. A. TA5/6, B. TA6/6 (selvagem), C. TA6/7, D. TA7/7 (UGT1A1*28), E. TA7/8, F. TA8/8	34

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Distribuição entre o sexo masculino e feminino nos pacientes HC-FMUSP estudados (Grupo A)	38
Gráfico 2-	Distribuição entre o sexo masculino e feminino nos controles sadios estudados (Grupo B).	41
Gráfico 3 -	Comparação entre as frequências dos genótipos UGT1A1 entre o Grupo A e Grupo B.....	48
Gráfico 4 -	Comparação da frequência dos alelos encontrados nos pacientes e doadores	49
Gráfico 5 -	Frequência dos alelos do gene UGT1A1 encontrados no Grupo A.	50
Gráfico 6 -	Frequência dos alelos do gene UGT1A1 encontrado no Grupo B.....	51
Tabela 1 -	Relação tamanho de fragmento obtido X Genótipo.....	35
Tabela 2 -	Frequência dos genótipos, TA5/6, TA6/6, TA6/7, TA7/7, TA7/8 e TA8/8, encontrados no Grupo A, $p = 0,255$	39
Tabela 3 -	Classificação por raça do Grupo A, $p = 0.006$	40
Tabela 4 -	Frequência dos genótipos TA5/6, TA6/6, TA6/7, TA7/7, TA7/8 e TA5/7 no Grupo B	42
Tabela 5 -	Classificação por raça do Grupo B	43
Tabela 6 -	Avaliação da bilirrubina nos pacientes divididos por idades (em anos) e sexo	45
Tabela 7 -	Avaliação dos genótipos versus bilirrubina total no Grupo A com $p < 0,0000$	46
Tabela 8 -	Frequência do genótipos encontrados de acordo com a dosagem de bilirrubina total n (%), $p < 0,001$	47

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

>	maior que
≤	menor ou igual que
<	menor que
%	porcentagem
μg	microgramas
μL	microlitros
μM	micromolar
A	adenina
ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
CAPPesq	Comissão de ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cm	centímetros
cols.,	colaboradores
DNA	ácido desoxiribonucléico
DNAg	ácido desoxiribonucléico genômico
dNTP	deoxinucleotídeos
DP	desvio padrão
EUA	Estados Unidos da América
fem	feminino
g	gramas
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	vírus da imunodeficiência humana
kb	kilo base (1000 pares de base)
LIM	Laboratório de Investigação Médica

M	molar
masc	masculino
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	minutos
mL	militros
mM	milimolar
mmol	milimols
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>
ng	nanograma
°C	Graus Celcius
<i>p</i>	significância estatística
p/v	peso/volume
pb	pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pM	pico molar
rpm	rotação por minuto
SG	Síndrome de Gilbert
T	timina
TBE	Tris Borato EDTA
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Tween20	Monolaurato de Sorbitan Etoxilado 20
U	unidade
UGT	UDP-glicuronil transferase
v/v	volume/volume
VHB	vírus hepatite B
VHC	vírus hepatite C
γGT	gama glutamil transferase

RESUMO

Souza MMT. *Frequência do alelo UGT1A1*28 (Síndrome de Gilbert) em pacientes portadores de hepatite crônica C e em controles sadios* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 77 p.

A Síndrome de Gilbert é caracterizada por uma hiperbilirrubinemia indireta benigna que ocorre na ausência de hemólise ou doença estrutural do fígado. Manifesta-se por episódios intermitentes de icterícia, desencadeados por exposição a estressores físicos, baixa ingesta calórica, entre outros. A base genética da redução da atividade da enzima UDP - Glucoroniltransferase foi descoberta em 1995: em uma população caucasiana. Todos os pacientes estudados apresentaram uma adição dos nucleotídeos Timina-Adenina (TA) na região TATA *box* presente no promotor do gene UGT1A1, em ambos os alelos. Embora considerada uma condição benigna, a síndrome de Gilbert tem sido recentemente associada à hiperbilirrubinemia e a outros efeitos colaterais na utilização de algumas drogas como o Indinavir e Irinotecan. Outro ponto importante diz respeito ao nível de bilirrubina sérica como um indicador da severidade do acometimento de hepatopatas. A presença de mutação no gene UGT1A1 em pacientes hepatopatas pode levar ao aumento da bilirrubina sérica, supervalorizando o acometimento hepático da condição patológica. O objetivo deste estudo foi verificar a frequência do alelo UGT1A1*28 em doadores de sangue da Fundação Pró-sangue Hemocentro de São Paulo HC-FMUSP e em pacientes portadores de hepatite crônica C atendidos no ambulatório de Gastroenterologia Clínica da FMUSP. Relacionar o genótipo TA7/7 com o aumento de bilirrubina sérica nos pacientes com hepatite crônica C e avaliar a técnica de análise de fragmento no rastreamento e genotipagem da Síndrome de Gilbert. A frequência encontrada para o genótipo TA7/7 no grupo doador foi de 9% (30/313) e no grupo de pacientes VHC, de 10% (51/494). O genótipo TA7/7 parece estar relacionado com o aumento de bilirrubina. A técnica de análise de fragmentos mostrou-se rápida, sendo possível para fazer uma análise em grande escala. A herança genética da população brasileira é muito heterogênea. É constituída de caucasianos, africanos, índios, orientais e outros. Os dados sugerem que a variação genética da região promotora do gene UGT1A1 é alta entre pacientes com bilirrubina maior que 1mg/dL, e que a genotipagem para UGT1A1*28 deve ser considerada na avaliação dos pacientes com hepatite C crônica com hiperbilirrubinemia.

Descritores: 1.Bilirrubina 2.Icterícia 3.Doença de Gilbert 4.Hepatite C 5.Polimorfismo genético 6.Hiperbilirrubinemia

SUMMARY

Souza MMT. *Frequency of UGT1A1*28 (Gilbert's Syndrome) in patients with chronic hepatitis C virus and healthy donors* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009.77 p.

Gilbert's syndrome is a benign condition characterized by unconjugated hiperbilirubinemia that occurs in the absence of hemolysis or liver chronic disease. It is clinically manifested by intermittently jaundice, triggered by exposition to physical stress, low calory diet, among others. The genetic base is the reduction of the activity of UDP-glucuronosyltransferase enzyme described in 1995: in a Caucasian population, all patients studied presented a Thymine Adenine (TA) addition in the TATA box region in both alleles of the UGT1A1 gene promoter. Although, Gilbert's syndrome has been considered a benign condition, recently it has been associated to hiperbilirubinemia and other adverse events during the utilization of some drugs such as Indinavir and Irinotecan. Another important issue to consider is that bilirubin is used to evaluate the severity of liver dysfunction in chronic liver diseases. The presence of this mutation in those patients could increase bilirubin levels, overestimating liver damage. The aim of this study were: 1) to verify the frequency of the genotype UGT1A1*28 (TA7/7) in blood donors and in chronic hepatitis C patients from the Gastroenterology outpatients clinics of the University of São Paulo School of Medicine; 2) to establish a relationship with TA7/7 genotype and bilirubin elevation in chronic hepatitis C patients and 3) to evaluate the fragment analysis technique to screening and genotyping the Gilbert syndrome. The frequencies of TA7/7 genotype found in blood donors group were 9.6% (30/313) and in the chronic hepatitis C group were 10% (51/494). The TA7/7 genotype seems to be related with increase of bilirubin. The fragment analysis technique is fast and able to a large scale screening approach. The genetic background of Brazilian population is highly heterogeneous. It is comprised of Caucasians, Africans, Indians, Orientals and others. The data suggests that genetic variation of promoter region of UGT1A1 gene is high among patients with bilirubin levels greater than 1 mg/dl, and UGT1A1*28 genotypes should be considered when evaluating chronic hepatitis C patients with hiperbilirubinemia.

Descriptors: 1.Bilirubin 2.Jaundice 3.Gilbert Syndrome 4.Hepatitis C virus 5.Polymorphism 6.Hiperbilirubinemia.

1 INTRODUÇÃO

A bilirrubina ($C_{33}H_{36}NaO_6$) é um composto tetrapirrólico linear, sendo o principal componente dos pigmentos biliares.

Um indivíduo com o metabolismo normal produz cerca de 250 a 400 mg/dia de bilirrubina. Alguns distúrbios podem alterar a capacidade do fígado na transformação da bilirrubina indireta (não conjugada) em direta (conjugada) que será eliminada na urina e nas fezes. Esses distúrbios estão ligados à captação e/ou conjugação hepática.

Os níveis séricos da bilirrubina são determinados pela capacidade de excreção ou conjugação da bilirrubina pelo fígado, ou seja, pela integridade fisiológica do hepatócito e da permeabilidade das vias biliares intra e extra-hepáticas. Doenças que alteram essas funções causam um aumento da bilirrubina direta e, muitas vezes, da bilirrubina indireta. Assim, a bilirrubina é um importante fator na avaliação da função hepática. Considera-se o valor normal da bilirrubina total, níveis entre 0,2 a 1 mg/dL (3,42 e 17,1 $\mu\text{mol/L}$), sendo a fração direta correspondente a 0,3 mg/dL (5,13 $\mu\text{mol/L}$) e a indireta, entre 0,1 a 0,6 mg/dL (1,71 e 10,26 $\mu\text{mol/L}$) (Guyton e Hall, 2006).

O nível sérico de bilirrubina total, tem sido utilizado como um indicador da gravidade da doença hepática crônica. Os níveis de bilirrubina total refletem a função hepática e podem ser verificados níveis elevados da bilirrubina indireta na cirrose hepática (Doyama e cols., 2000). A presença de polimorfismos no gene UGT1A1 em pacientes hepatopatas pode levar ao

aumento da bilirrubina sérica, supervalorizando falsamente essa condição de aumento da disfunção hepática.

A bilirrubina como indicador de doença hepática é também utilizada como critério de inclusão/exclusão em diversos protocolos de estudos clínicos e níveis moderadamente elevados podem ser relacionados na verdade, com a apresentação da Síndrome de Gilbert, e sua identificação poderia sinalizar pacientes que não necessitariam ser excluídos da casuística nesses estudos.

Outro fator associado à hiperbilirrubinemia é o tratamento com antirretrovirais. A inibição da UGT1A1 por alguns antirretrovirais pode levar os pacientes tratados a desenvolverem vários graus de hiperbilirrubinemia, sobretudo os com Síndrome de Gilbert (Rotger e cols., 2005, Strassburg, 2008).

A síndrome de Gilbert (SG) é caracterizada por uma forma leve de hiperbilirrubinemia indireta, causada por uma deficiência da atividade da enzima Uridina Glicuronil Transferase 1A1 (UGT1A1), em ausência de doença do fígado ou hemólise excessiva (Burchell e Hume, 1999). Essa enzima cataliza a glicuronidação da bilirrubina indireta em direta (Bosma, 1995; Burchell e Hume, 1999).

1.1- Metabolismo da Bilirrubina

Na corrente sanguínea, os glóbulos vermelhos normalmente, exercem suas funções de transporte de oxigênio por aproximadamente 120 dias antes

de serem destruídos no sistema reticuloendotelial. Após esse período, o sistema metabólico das hemácias torna-se menos ativo e elas ficam susceptíveis a rupturas, liberando hemoglobina e porfirina. A hemoglobina é fagocitada pelas células de Küpffer, nos macrófagos do baço e medula. Sendo a bilirrubina é o produto final de destruição da porção “heme” da hemoglobina. O ferro é carregado até a medula óssea para a formação de novos glóbulos vermelhos ou para o fígado para armazenamento na forma de ferritina.

A porção protoporfirina é convertida pelos macrófagos em metabólitos intermediários pela ação das enzimas do citocromo p450 redutase e NADPH redutase. A ferribiliverdina é convertida em biliverdina pela ação da enzima biliverdina redutase. Por sua vez, a biliverdina é reduzida à bilirrubina por meio da enzima NADPH biliverdina redutase, dando origem à bilirrubina não conjugada insolúvel (Guyton e Hall, 2006, Martins e cols., 2009).

A bilirrubina não conjugada, recém-formada, circula no sangue ligada à albumina sérica com a qual possui grande afinidade. Assim, ela é transportada até o fígado onde penetra no hepatócito por dois mecanismos: difusão passiva e endocitose. Uma vez dentro do hepatócito, a bilirrubina desliga-se da albumina. É, então, transportada para o retículo endoplasmático liso onde se torna um substrato da enzima bilirrubina-uridina difosfato glicuronil transferase (B-UGT1A1 ou UGT1A1) que cataliza a conjugação da bilirrubina não conjugada com o ácido glicurônico, formando um composto solúvel, a bilirrubina conjugada (direta) (Figura 1). A bilirrubina direta solúvel pode ser excretada diretamente, sendo metabolizada pelas

bactérias da flora intestinal, formando os urobilinogênios. (Radu e Astmon, 2001, Guyton e Hall, 2006). Assim, a excreção biliar é a principal rota para a eliminação da bilirrubina e sua excreção prejudicada resulta em icterícia, um sinal bem definido de doença do fígado.

Figura 1- Metabolismo da bilirrubina

FONTE: modificado de Bosma e cols.(2003)

1.2- Síndrome de Gilbert

Em 1901, Gilbert e Lereboullet (1901)^{*} citados por Bosma (2003) identificaram pacientes com um ligeiro aumento de bilirrubina sérica. Mais tarde, outros pesquisadores, entre eles, Meulengrath (1946)[†] e Arias (1957)[‡] citados por Strassburg (2008) e Bosma (2003) redescreveram a mesma síndrome sob o nome de icterícia intermitente juvenil.

Assim, a Síndrome de Gilbert (SG) é considerada como uma forma branda de hiperbilirrubinemia às custas da fração indireta, ocorrendo na ausência de doença do fígado e/ou manifestações de hemólise. Clinicamente, é caracterizada por episódios de icterícia intermitente (Burchell e Hume, 1999). Também foram relatados casos de dor abdominal, intolerância à ingestão de gordura e queixas de fadiga, porém, de maneira inconsistente (Radu e Atsmon, 2001).

Em 1995, a base molecular da SG foi revelada (Bosma e cols., 1995). Estudos com pacientes caucasianos mostraram uma adição dos nucleotídeos Timina (T) e Adenina (A) na região promotora do gene hepático UDP-glicuroniltransferase (UGT1A1), polimorfismo denominado (UGT1A1*28) (TA7/7). A forma selvagem é caracterizada por seis repetições TA na região promotora do gene UGT1A1 (Bosma e cols., 1995, Monaghan e cols., 1996 e Lankisch e cols., 2006). Também foram encontradas as variantes TA5/6,

^{*} Gilbert A, Lereboullet P. La cholemie simple familiale. *Sem Med.* 1901; 21: 241–3.

[†] Meulengrath E. A review of chronic intermittent juvenile jaundice. *Q J Med.* 1946; 62: 83–98.

[‡] Arias IM, London IM. Bilirubin glucuronide formation in vitro; demonstration of a defect in Gilbert's disease. *Science* 1957; 126 3273:563–4.

TA6/7, TA7/8 e TA8/8, de acordo com a inserção/deleção da timina - adenina no promotor do gene UGT1A1.

A presença dessa inserção reduz a transcrição do gene em 20% do normal, resultando em uma diminuição da atividade da glicuronidação da bilirrubina hepática em 80% (Bosma, 2003). A região promotora TATAA é um sítio de ligação para o fator de transcrição IID. Esse processo pode ser interferido pela expansão dos nucleotídeos timina-adenina, resultando em uma redução da transcrição do UGT1A1 (Doyama e cols., 2000).

A SG afeta entre 3% a 10% da população caucasiana (Hasegawa e cols., 2006). A glicuronidação da bilirrubina está diminuída em aproximadamente 20% a 30% nos indivíduos com SG.

Por outro lado, não é só a SG que pode acarretar uma diminuição da atividade da enzima UGT1A1. Assim, a Síndrome de Crigler-Najjar (CN) é uma forma de hiperbilirrubinemia neonatal. É classificada em tipo I e II. A do tipo I, é mais grave e resulta na deficiência completa da enzima UGT1A1. Por outro lado, a síndrome de Crigler-Najjar do tipo II resulta em uma deficiência parcial dessa enzima, porém é mais grave que a SG. Tanto a CN tipo I como o tipo II podem levar a sequelas clínicas graves como o *kernicterus*, que é a necrose dos núcleos do tronco encefálico. Essa síndrome é causada por defeitos genéticos em qualquer um dos cinco éxons ou até em outras regiões do gene. Aproximadamente, 113 polimorfismos estão relacionados com a SG, CN I e II que variam do UGT1A1*1 (forma selvagem) até UGT1A1*113 (Anexo A). Entre eles pode-se destacar a substituição (211 G>A) de guanina por adenina na posição 211 da

sequência do éxon 1 do gene UGT1A1, resultando em uma troca do aminoácido glicina por arginina na posição 71 do códon (G71R), descrita por Aono e colaboradores, em 1993, e posteriormente, classificada como UGT1A1*6 (Mackenzie e cols., 1997). Essa mutação está associada com a SG em indivíduos asiáticos, porém outros autores relacionam essa mutação com a Síndrome de Crigler-Najjar (Aono e cols., 1993, Burchell e Hume, 1999, Radu e Atsmon, 2001).

A espécie humana divide-se em muitas subpopulações, das quais as maiores denominam-se comumente raças. Existem três divisões raciais básicas: caucasianos, afrodescendentes e asiáticos (amarelos). Cada uma delas apresenta numerosos subgrupos geneticamente diferentes; e com o passar dos anos, subdividiram-se em numerosas populações distintas, os grupos étnicos, com seus próprios conjuntos. Essa caracterização é frequentemente requerida para descrever populações em análises epidemiológicas (Anderson e Moscou, 1998).

A classificação por raça é apoiada sobretudo nas características fenotípicas, como cor da pele, porém outras também podem ser empregadas, como cor e tipo de cabelo. Premawardhena e colaboradores, em 2003, genotiparam 1.617 indivíduos de diferentes grupos étnicos (europeus, africanos, asiáticos e ameríndios). A frequência mais elevada para o alelo TA7/7 foi encontrada na Índia e no Quênia 19,3% e 17,9%, respectivamente. A mais baixa nas ilhas do Pacífico (Papua Nova Guiné, Tonga e Fiji) de 2,4%. Já nos indivíduos africanos, foram verificados os genótipos: TA5/5, TA5/6, TA5/7, TA5/8, TA6/8, TA7/8 e TA8/8

(Premawardhena e cols., 2003). No Brasil, a origem étnica da população é heterogênea, sendo composta de imigrantes provenientes da Europa, África, Ásia e de grupos indígenas. Fertrin e colaboradores, em 2002, genotiparam três grupos étnicos divididos em caucasianos, afrodescendentes e indígenas. A frequência encontrada para o genótipo TA7/7 nos grupos foi de 12,7%, 16,7 e 3,1%, respectivamente.

1.3- Glicuronidação

Para a maioria dos xenobióticos e muitos endobióticos, a glicuronidação constitui a principal via de eliminação desses compostos (Wells e cols., 2004, Nagar e cols., 2006). Estudos recentes têm revelado uma extensa família de UDP-glicuronil transferase (UGTs), também, conhecida como glicuronil transferases. As UGTs catalisam a conjugação do UDP-ácido glicurônico com substratos lipossolúveis para formar conjugados polares que são excretados na urina e fezes (Wells e cols., 2004). Alguns desses substratos endógenos endobióticos, como a bilirrubina, os hormônios esteróides e os tireoidianos, as vitaminas lipossolúveis e os ácidos da bile. Os substratos exógenos (xenobióticos) são: drogas, carcinógenos químicos, poluentes ambientais e substâncias dietéticas (Kiang e cols., 2005). As UGTs presentes nas células e nos tecidos são os principais determinantes da resposta para aqueles componentes químicos primariamente eliminados por meio da conjugação com o ácido glicurônico. Uma glicuronidação deficiente pode resultar tanto em alterações da concentração nos tecidos como em toxicidade direta dos substratos, como a bilirrubina.

Alternativamente, também, pode levar a um aumento da bioativação de substratos intermediários tóxicos, como o acetaminofeno e benzo [a] pireno (Wells e cols., 2004).

A variação da glicuronidação na Síndrome de Gilbert tem um impacto importante na terapia à base de drogas. Recentes estudos sugerem que os indivíduos afetados podem estar predispostos à toxicidade no fígado quando submetidos ao tratamento com algumas drogas com exemplos bem definidos como o uso do irinotecan e atazanavir (Burchell, 2003). O irinotecan (CPT-11), é derivado da árvore chinesa *Camptotheca acuminata* e utilizado sobretudo no tratamento do câncer colorretal. A pró-droga irinotecan é convertida em 7-etil-10-hidroxicamptotensina (SN-38). Esse subproduto é um potente inibidor da topoisomerase I. Durante a replicação celular, a topoisomerase I produz quebras em uma fita DNA e permite o giro da fita quebrada sobre a fita intacta e depois utiliza energia para restaurar a ligação fosfodiéster e selar a quebra. Assim, o irinotecan liga-se ao complexo DNA - topoisomerase I e interfere na religação dessas quebras de maneira irreversível induzindo a uma parada do ciclo celular e, consequente, morte da célula (Xu e Calero, 2002; Smith e cols, 2006,).

O passo final do metabolismo é a inativação do SN-38 por glicuronidação sobretudo por meio da UGT1A1 e eliminação através da bile (Innocent e Ratain, 2004, Perera e cols., 2008). No tratamento com irinotecan, a mielossupressão e diarreia estão relacionados aos efeitos colaterais. A mielossupressão manifesta-se, em especial, por meio da neutropenia (graus 3 e 4) (Nagar e Blanchard, 2006). Indivíduos que

possuem o polimorfismo UGT1A1*28 têm toxicidade aumentada quando submetidos ao tratamento (dose de 250mg/m² *odds ratio* de 8,07 e para a dose de 100 mg/m² *odds ratio* de 1,28) (Innocent e Ratain, 2004, Perera e cols., 2008).

1.4- Nomenclatura e Organização Genômica das Famílias UGTs

A superfamília UGT é composta por duas famílias (UGT1 e UGT2) e três subfamílias (UGT1A, UGT2A e UGT2B) (Mackenzie e cols., 1997); sua nomenclatura consiste em um numeral arábico, representando a família por exemplo: (UGT1), uma letra designando a subfamília (UGT1A) e um segundo numeral arábico indicando o gene (UGT1A1) (Tukey e Strassburg, 2000). O *locus* gênico UGT1A está fisicamente localizado no cromossomo 2q37 e codifica nove proteínas funcionais: UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9 e UGT1A10. Esta subfamília apresenta quatro *éxons* comuns que são transcritos com o *éxon* variável. A nomenclatura dos genes UGT1A é baseada na posição relativa do primeiro *éxon* variável. Assim, a família UGT1A apresenta quatro *éxons* comuns localizados na região C-terminal e 13 *éxons* variáveis na região N-terminal. O *UGT1A1* é o mais próximo e o *UGT1A12* o mais distante em relação aos *éxons* comuns, compreendendo, aproximadamente, 160 kb (Figura 2).

Figura 2- Estrutura da família UGT1A. Organização genômica dos treze genes UGTs e processamento dos genes UGT1A1 e 1A5.

Fonte: Modificado de Innocent e Ratain (2004)

1.5- Distribuição das UGTs em diferentes tecidos

Com o desenvolvimento das técnicas de transcrição reversa, PCR e sequenciamento de DNA foi possível distinguir as diferenças entre sequências altamente homólogas, como no caso da família UGT. Com isso também foi possível identificar o padrão de expressão no fígado, como em outros tecidos extra-hepáticos (Tukey e Strassburg, 2000). O fígado é o mais importante órgão que faz a glicuronidação e, portanto, está exposto ao influxo de drogas pela veia porta durante a absorção oral. Existem cinco isoformas da UGT1A expressas no fígado: UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6 e UGT1A9. E sete isoformas UGT2B: UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B17 e UGT2B28 (Strassburg e cols., 1997, Tukey e Strassburg, 2000, Fisher e cols., 2001). Em 1992, Ritter e colaboradores isolaram do fígado dois clones de cDNAs, com atividade de

glicuronidação da bilirrubina, denominados UGT1A e UGT1D, renomeados mais tarde UGT1A1 e UGT1A4, respectivamente (Bosma, 2003).

1.6- Hepatite Crônica C

A hepatite crônica C é um grave problema de saúde mundial afetando mais de 170 milhões de pessoas em todo o mundo (Wasley e Alter, 2000, Nature, 2005). A maioria das infecções torna-se crônica, uma condição incurável para muitos pacientes, podendo levar à cirrose e ao carcinoma hepatocelular.

Atualmente, o vírus da hepatite C (VHC) está classificado no gênero *Hepacivirus* da família *Flaviviridae*, foi descoberto e identificado, em 1989 (Choo e cols., 1989). Hoje, o VHC corresponde a uma epidemia silenciosa, já que não apresenta sintomatologia bem definida, representando, assim, um grave problema de saúde pública em todo o mundo, afetando 3% da população mundial, com 170 milhões de portadores crônicos (Silva, 2003).

No Brasil, alguns estudos mostram uma prevalência de 2,6% da população e a OMS estima que aproximadamente oito milhões de pessoas estejam infectadas. A infecção aguda é usualmente assintomática, dificultando o diagnóstico precoce. Uma característica da infecção por VHC é a tendência à cronicidade, assim, quase 70% das infecções agudas tornam-se persistentes e os casos crônicos estão com frequência associados a doenças do fígado, como o carcinoma hepatocelular. O VHC é transmitido principalmente pelo sangue e por seus derivados e a utilização

de drogas injetáveis é hoje o principal meio de contaminação. A transmissão por meio de relação sexual, bem como a transmissão entre mãe e filho e entre familiares é pouco frequente (Silva, 2003).

Existem seis genótipos principais e mais de 50 subtipos de VHC. O genótipo 1, subtipos 1a e 1b, representam aproximadamente 75% das infecções nos Estados Unidos da América (Silva, 2003).

No Brasil, o genótipo 1 representa 75%. O subtipo 1b é mais frequente nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste do País, e que o genótipo 3a possui maior prevalência na região Sul. A taxa de mutação viral é alta, 10^3 por nucleotídeo por geração, bem como a replicação, aproximadamente, 10^{12} vírions por dia em humanos. Isso resulta em uma expansão, após a infecção viral, e na evolução de *quasispecies* no indivíduo infectado, o que pode influenciar na eficácia da resposta imunológica (Nature Insight, 2005).

O conceito mais aceito para definir hepatite crônica é o conjunto de manifestações clínicas, bioquímicas, sorológicas e anatomopatológicas com inflamação hepática não resolvida no prazo de 6 meses (Silva, 2003).

A avaliação bioquímica dos pacientes com hepatite C é frequentemente realizada pela dosagem das aminotransferases (alanina aminotransferase - ALT e aspartato aminotransferase – AST) por serem marcadores da lesão hepática. Estudos mostram também que a gama glutamil transferase (γ GT) está relacionada aos graus mais intensos de fibrose. Já o diagnóstico imunoenzimático de segunda e terceira geração é utilizado para pesquisa de anticorpos contra proteínas do vírus (anti-VHC),

sendo útil na triagem indicando, também, contaminação passada ou presente.

O diagnóstico molecular é feito por meio da Reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR qualitativa é útil como teste confirmatório, nos casos de hepatite aguda ou fulminante e no diagnóstico de imunossuprimido, em que o anti-VHC pode ser negativo, sendo também fundamental no controle de resposta ao tratamento. Um recurso utilizado é a genotipagem do vírus e seu relacionamento com tratamento. Os genótipos 1a e 1b parecem ser mais resistentes ao tratamento do que os genótipos 3a, 2a, 2b e 2c, respectivamente (Silva, 2003).

No diagnóstico, outro fator importante é a biópsia hepática. As lesões inflamatórias encontradas com degeneração do epitélio ductal são consideradas, como um valioso marcador da hepatite crônica C (Silva, 2003).

A hepatite crônica evolui lentamente, podendo progredir para cirrose e, em casos mais graves, evoluir para o carcinoma hepatocelular necessitando, muitas vezes, de transplante hepático (Silva, 2003).

A associação entre a SG e o vírus da hepatite C é pouco relatada na literatura e não existem estudos suficientes em nossa população, de origem multiétnica, da frequência do polimorfismo UGT1A1*28. Essa informação é importante e poderá ser relevante na avaliação da intensidade do acometimento hepático.

Assim, a genotipagem para a Síndrome de Gilbert deve ser considerada nos pacientes com hepatite C crônica com hiperbilirrubinemia.

2 OBJETIVOS

- a) Verificar a frequência do alelo mutante UGT1A1*28 (TA7/7) em amostra populacional saudável e em pacientes portadores de hepatite C, atendidos no ambulatório de Gastroenterologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP);
- b) Relacionar o alelo mutante UGT1A1*28 com o nível sérico da bilirrubina total nos indivíduos com hepatite C crônica;
- c) Avaliar a técnica de análise de fragmentos no rastreamento da genotipagem do polimorfismo UGT1A1*28.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Estudo prospectivo caso-controle. Tanto o projeto de pesquisa como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram aprovados pela CAPPesq nº056/06 (ANEXO B), atendendo à resolução ANVISA196/96, que normatiza a pesquisa em seres humanos.

3.1- Seleção de pacientes

População caso (Grupo A): pacientes de ambos os sexos, portadores de hepatite C atendidos no ambulatório do Departamento de Gastroenterologia do HC-FMUSP.

Critérios de inclusão:

Idade superior a 18 anos;

Diagnóstico comprovado de hepatite C por sorologia e PCR.

Critérios de exclusão:

Diagnóstico de hepatite B;

Vírus da imunodeficiência adquirida HIV;

coinfecção VHB/VHC.

População controle (Grupo B): doadores de sangue aceitos nos critérios utilizados pela Fundação Pró-sangue Hemocentro de São Paulo - HC-FMUSP.

Critérios de inclusão:

idade superior a 18 anos;

acima de 50 quilos, descansado e alimentado.

Fatores de exclusão:

estar gripado;

gravidez;

tatuagem realizada nos últimos 12 meses;

fatores de risco em geral (vários parceiros sexuais, não usar preservativo e nem drogas injetáveis).

No momento anterior à coleta, tanto os pacientes como os doadores, foram instruídos a respeito da pesquisa e assinaram o TCLE. Os grupos foram submetidos a uma breve entrevista com o objetivo de obter informações como sexo, idade e raça. Também foi utilizado o sistema informatizado do HC-FMUSP (HCMED) para obtenção dos dados laboratoriais bioquímicos e sorológicos dos pacientes.

Como o objetivo em manter a confidencialidade das amostras e dos dados, tanto os casos como os controles foram codificados. Os casos foram codificados com a sigla BR, seguida do número da amostra. Os controles foram codificados da mesma forma, utilizando a sigla BRC.

3.2- Preparo do creme leucocitário

Foram coletadas amostras de sangue total em tubo contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). As amostras foram centrifugadas a 6000 RPM por 10 minutos à temperatura ambiente e separadas em creme leucocitário e plasma, em seguida, foram estocadas em microtubos de 1,5 mililitros (mL) (Axygen, CA, EUA) em *freezer* -20° C até o momento da extração do DNA genômico.

3.3- Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído, conforme o *QIAmp® DNA Blood mini kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha). Em resumo, 200 microlitros (µL) de creme leucocitário equilibrado em temperatura ambiente foram adicionados a um microtubo de 1,5 mL contendo 20 µL de proteinase K. A seguir, foram adicionados 200 µL de buffer AL e misturou-se por agitação em vórtex (Vortexgenie, Bohemia, EUA) por 15 segundos. Essa solução foi incubada a 56° C por 10 minutos (min) e após breve centrifugação, foram adicionados 200 µL de etanol 100% (v/v) à amostra, misturando-se por agitação. Novamente, após breve centrifugação, transferiu-se a solução para a coluna de centrifugação e foi centrifugado por 1 min a 8.000 rpm (centrífuga *Eppendorf* modelo 5415R, Hamburgo, Alemanha). A coluna foi transferida para um novo microtubo de 2 mL, foram adicionados 500 µL de *buffer* AW1 e centrifugado a 8.000 rpm por 1 min. Foram adicionados 500 µL de *buffer*

AW2 e, então, centrifugado a 14.000 rpm por 3 min. Transferida a coluna para um microtubo de 1,5 mL e adicionam-se 200 µL de *buffer* AE. Por fim, a amostra foi incubada à temperatura ambiente por 1 min e centrifugada a 8.000 rpm por 1 min. O DNA obtido, de acordo com o fabricante, é livre de proteínas, nucleases e outros contaminantes e inibidores. A qualidade e quantidade de DNA genômico obtido foi resolvido em gel de agarose 1,5% (p/v) (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Sendo usado como marcador *Low DNA mass Ladder* (Invitrogen, Carlsbad, EUA) corado com brometo de etídeo (Etbr) e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

3.4- Avaliação da extração de DNA genômico (DNAg)

Após a extração de DNAg, as amostras dos grupos estudados foram resolvidas em gel de agarose 1,5%(p/v). Foram aplicados 2µl de DNAg, 1µl de *Blue Juice* 10X (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e 6µl de água milliQ. O padrão de peso molecular *Low DNA mass ladder* (Invitrogen, Carlsbad, EUA) foi utilizado. À corrida eletroforética, foi aplicada uma tensão de 100V por 45 minutos. Ao final das corridas, os géis foram corados em uma cuba contendo brometo de etídeo por aproximadamente 10 minutos. O rendimento foi calculado de forma empírica, comparando a intensidade das bandas do marcador de massa conhecida com as de DNAg. As extrações foram avaliadas quanto ao rendimento médio em nanogramas, presença de contaminantes e pureza. Em todas as extrações de DNAg, foi obtido um rendimento médio de 6 µg eluído em 200 µL de *Elution Buffer* concentração média de 30 ng/µL (Figura 3).

Figura 3 - Extração de DNA genômico. Gel de agarose 1,5%. (p/v) M: *Low mass DNA ladder* (Invitrogen, Carlsbad, EUA). **M**: *DNA mass ladder* (Invitrogen, Carlsbad, EUA)

3.5- Desenho dos *primers*

Os pares de *primers* que flanqueiam a região promotora do gene UGT1A1 foram utilizados. Os *primers* publicados por Bosma e cols., (1995) foram selecionados para amplificar um fragmento de 404 pb, contendo a região promotora TATAA Box (Figura 4).

Figura 4 - Região promotora do gene UGT1A1 (em vermelho)

3.6- Amplificação por PCR

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase*), foi utilizada, tendo como fita molde o DNA genômico extraído anteriormente. Foram empregados *primers* (Invitrogen, Carlsbad, EUA) correspondentes à parte do *intron 1* do gene *UGT1A1* até o *éxon 1*. As reações de PCR foram feitas utilizando o termociclador *Mastercycler Eppendorf* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Primers:

UGT1A1 direto: 5' gag gtt ctg gaa gta ctt tgc 3'

UGT1A1 reverso: 5' cca agc atg ctc agc cag 3'

Condições do PCR suficiente para uma reação:

1,2 U de *Taq platinum* (Invitrogen, Carlsbad, EUA);

5 pmolar de *primers* direto e reverso

5 pmolar de dNTP

1,5 mM de MgCl₂;

Tampão 1X;

água MilliQ autoclavada em quantidade suficiente para 50 uL

Condições de ciclagem:

94° C - 5 min. Pré aquecimento da enzima;

95° C - 1 min	} 30 ciclos
58° C - 1 min.	
72° C - 2 minutos	

Após o fim dos 35 ciclos, os produtos de PCR foram estocados a -20°C.

De acordo com o desenho do experimento, foi amplificado um fragmento de 404 pb compreendendo a região promotora do gene UGT1A1 (Figura 5).

Figura 5 - Região do gene UGT1A1 sequenciada pelos *primers* UGT1A1 direto e reverso. Região promotora em destaque

3.7- Eletroforese

A eletroforese foi usada, tanto para quantificação de DNA genômico como para resolver os fragmentos amplificados. Foram utilizados cuba de eletroforese horizontal e gel de agarose 1.5 % (p/v) (Invitrogen, Carlsbad, EUA) 12,5 cm X 12 cm em tampão TEB 10 X (tris 108 gramas (g); 40 mL de EDTA 0,5 M e ácido bórico 55 g e H₂O em quantidade suficiente para 1000 mL). As corridas foram realizadas sob uma tensão de 10 V/cm. O gel de agarose foi corado com brometo de etídeo (EtBr) e fotografado com uma câmera fotográfica Olympus C 4000 (Olympus, Tóquio, Japão) sob luz Ultra Violeta. O marcador de peso molecular *Low DNA mass ladder* (Invitrogen, Carlsbad EUA) foi empregado para a avaliação e quantificação da extração do DNA genômico. Para a análise do fragmento de PCR, foi utilizado 100bp *DNA mass ladder* (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

3.8- Purificação de fragmentos de PCR

Para purificar os fragmentos de PCR, o *kit QIAquick PCR purification kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) foi utilizado. Resumidamente, de acordo com o fabricante, foram adicionados ao produto de PCR, cinco volumes da solução PB para cada volume de reação de PCR. A solução foi colocada em uma coluna à base de sílica e centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm em temperatura ambiente. O que passou pela coluna é descartado e a coluna é novamente colocada no tubo coletor. Em seguida, são aplicados 750 µL da solução PE no centro da coluna e essa mistura centrifugada a 13.000 rpm

por 1 min., assim, o que passou pela coluna é novamente descartado e a coluna é colocada em um microtubo de 1,5 mL estéril. Na coluna, são adicionados, 50 μ L de solução EB (*Elution Buffer*, 10mM Tris-Cl, pH 8,5). Essa mistura é incubada por 1 min à temperatura ambiente e centrifugada a 13.000 rpm por 1 min. A solução EB tem mais afinidade pelo DNA e deslocará o fragmento de PCR que está na coluna de sílica. A amostra purificada é armazenada em *freezer* -20° C até o momento da reação de sequenciamento.

3.9- Padronização da reação de PCR

Os géis contendo os PCRs foram realizados utilizando 6 μ L do produto de PCR, com 1,5 μ L de *Blue Juice* 10X (Invitrogen, Carlsbad, EUA) (Figura 6).

Figura 6 - PCR região promotora UGT1A1. Tamanho do fragmento: 404 pb (seta) M: 100 bp DNA mass ladder. (Invitrogen, Carlsbad, EUA). C-: controle negativo, Gel de agarose 1,5% (p/v)

No gel de agarose, a presença do gene UGT1A1 amplificado por PCR foi observada, formando um fragmento de 404 bp. Também foi verificada a presença de bandas inespecíficas, dímeros de *primers* e contaminantes. Em todos os PCRs, também, foi colocado um controle negativo (C-) que consistiu dos mesmos reagentes de um PCR normal, porém, sem a presença do DNAg, ou seja, da fita molde.

3.10- Sequenciamento de DNA

Os sequenciamentos dos fragmentos de PCR foram feitos com o *kit Big Dye Terminator Mix v3.2*, utilizando o sequenciador automático ABI377 (Applied Biosystem, Foster City, EUA). A reação de sequenciamento foi feita no *termociclador Mastercycler Eppendorf* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando 40 ng a 80 ng de fragmento de PCR purificado. 2,5 pmol de *primer* UGT1A1 Direto e Reverso, 6 µL de Tampão de sequenciamento, 4 µL de *Big Dye terminator* e água *MilliQ* estéril em quantidade suficiente para 20 µL. As reações de sequenciamento foram feitas nas seguintes condições:

95° C -20 seg;	} 25 ciclos
50° C -15 seg;	
60° C -1 minuto.	

Após o término dos ciclos, as reações foram precipitadas com 80 µl de isopropanol 95 % (v/v), incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e submetidas à centrifugação por 3.700 rpm por 60 minutos à

temperatura ambiente na centrífuga *Eppendorf* modelo 5804R. O sobrenadante foi descartado por inversão, e o precipitado foi lavado com 100 µL de etanol 75 % (v/v) e centrifugado novamente nas mesmas condições acima. O sobrenadante foi novamente descartado por inversão e o *precipitado* seco a 55° C por aproximadamente 40 minutos no termociclador Mastercycler *Eppendorf* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Após a precipitação, as reações de sequenciamento secas foram ressuspensas em 3 µL de *loading buffer* (5:1- formamida/Dextran *Blue*) (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e levadas para o sequenciamento. As sequências obtidas foram comparadas e analisadas utilizando o programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999) e Codoncode (Codoncode Corporation). O programa *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*), também, foi utilizado para pesquisa em banco de dados (Altschul e cols., 1990).

O sequenciamento de DNA foi realizado em 4h30. A análise do polimorfismo na região promotora do gene UGT1A1 foi realizada visualmente utilizando o programa Bioedit (Hall e cols., 1999) e Codoncode (Codoncode Corporation), conforme os eletroferogramas obtidos: TA5/6, TA5/7, TA6/6, TA6/7, TA7/7, TA7/8 e TA8/8 (Figura 7).

Figura 7 – Padrões de eletroferogramas obtidos. Setas indicam a adição ou deleção da TA

3.11- Análise de fragmentos

A técnica da análise de fragmentos baseia-se em uma corrida eletroforética em capilar MegaBace 1000 (GE-Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) de um PCR realizado com um *primer*

marcado com um fluoróforo. Na eletroforese, em conjunto com o fragmento, correm padrões de peso molecular marcados. A fluorescência é captada pelo sensor do aparelho e um programa de computador específico que interpreta os dados. Para análise de fragmentos, foi utilizado o *primer* UGT direto: 5' gag gtt ctg gaa gta ctt tgc 3' marcado com o fluoróforo FAM e *primer* UGT1A1 reverso: 5' cca agc atg ctc agc cag 3' (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Uma PCR convencional foi realizada em placa de 96 poços como descrito acima, porém o volume final foi de 25 µL. A placa para análise de fragmento foi elaborada do seguinte modo:

7,75 µL de Tween 20 a 0,1% (v/v);

0,25 µL de ET Rox 550;

1,5 µL de produto do PCR

A operação do Mega Bace 1000 foi realizada por técnicos do LIM-56: Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica e Experimental – FMUSP e durou aproximadamente 80 minutos.

Os resultados foram analisados no programa de computador *Fragment Profiler* (GE-Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

A validação foi feita do seguinte modo: amostras conhecidas foram submetidas à análise de fragmento da qual foi obtido um perfil eletroforético do tamanho do fragmento. Após essa primeira etapa, amostras de genótipos conhecidos foram codificadas por um observador e submetidas à análise de fragmentos por outro observador. Em um terceiro teste, amostras codificadas foram seqüenciadas e submetidas à análise de fragmentos e comparadas por dois observadores. A partir do segundo

experimento, controles de genótipos conhecidos foram colocados nas placas. As codificações foram realizadas por um observador e os testes, e a análise dos resultados por outro. Em todos os testes os genótipos foram estabelecidos primeiro e os resultados comparados.

3.12- Padronização da Técnica de Análise de Fragmentos

Para a padronização da técnica de análise de fragmento, o DNA genômico dos casos já sequenciados foi submetido a um novo PCR com o *primer* UGT1A1 direto marcado com FAM. Os resultados foram obtidos por meio de gráficos de intensidade de sinal fluorescente (eixo X) pelo tamanho do fragmento (eixo Y). O marcador ET ROX 550 (GE-Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) de tamanho e fluorescência conhecida foi comparado com o fragmento amplificado marcado (Figura 8).

Figura 8- Genotipagem de um paciente genótipo TA6/6 pela técnica de Análise de fragmentos

Os resultados foram comparados com os genótipos já sequenciados a fim de validar o método (Figura 9).

Figura 9- Análise de fragmentos e o respectivo sequenciamento. A. TA5/6, B. TA6/6 (selvagem), C. TA6/7, D. TA7/7 (UGT1A1*28), E. TA7/8, F. TA8/8.

Figura 9 – Análise de fragmentos e o respectivo sequenciamento. A. TA5/6, B. TA6/6 (selvagem), C. TA6/7, D. TA7/7 (UGT1A1*28), E. TA7/8, F. TA8/8

Nesse experimento, foi possível traçar um perfil do tamanho de fragmento relacionando-o com o genótipo. Os fragmentos variaram em um intervalo de 401 a 402.9 pb para o genótipo TA5/6, 403 a 403.9 pb para o genótipo TA6/6, 403 a 405.3 pb para o genótipo TA6/7, 404.2 a 406.9 pb para o genótipo TA7/7, 405.1 a 407.4 pb para o genótipo TA7/8 e 407 pb para o genótipo TA8/8 (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação tamanho de fragmento obtido X Genótipo

fragmentos (pb)	Genótipo
401 – 402.9	TA5/6
403 - 403.9	TA6/6
403 – 405.3	TA6/7
404.2 - 406.9	TA7/7
405.1 - 407	TA7/8
407.4	TA8/8

3.13 - Análise estatística

As informações colhidas foram codificadas e digitadas em planilha de dados. As variáveis contínuas tiveram suas médias e respectivos desvio-padrões calculados. Os dados nominais foram descritos por meio de frequências absolutas e relativas.

Análise de variância foi usada para comparar a média da dosagem de bilirrubina total. Foi utilizado o teste de Qui-quadrado em tabelas de contingência e verificar a significância estatística entre os grupos.

O programa de computador Stata10 (Stata Corp., College Station, EUA) foi utilizado nas análises estatísticas. Os valores calculados para o p foram bicaudados, sendo considerado estatisticamente significativo $p \leq 0,05$.

3.13.1 – Cálculo da equação de Hardy e Weinberg e frequência gênica

A equação do equilíbrio de Hardy e Weinberg foi estabelecida de acordo com Beiguelman (2008). Obedecendo à seguinte distribuição:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Sendo que $p=A$ ou TA6, $pq = Aa$ ou TA6/7 e $q= a$ ou TA7. O cálculo das frequências do alelo TA6 (dominante – A) e o alelo TA7 (recessivo – a) foram realizados da seguinte forma:

$$p = AA + 1/2 Aa \text{ ou } p = TA6/6 + 1/2 TA6/7$$

$$q = aa + 1/2 Aa \text{ ou } q = TA7/7 + 1/2 TA6/7$$

As análises envolvendo os genótipos e a concordância com o equilíbrio de Hardy e Weinberg foram realizadas em planilha Excell®, utilizando a função Qui-quadrado com 1 grau de liberdade. Se $p < 0,05$, não é consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

4 RESULTADOS

4.1- Casos genotipados (Grupo A)

Foram genotipados 494 pacientes infectados com hepatite crônica C (Grupo A) atendidos nos ambulatórios da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do HC-FMUSP, sendo 228 do sexo masculino e 266 do feminino, 46 e 54%, respectivamente (Gráfico 1). A média de idade variou entre 48 ± 12 e 53 ± 12 anos, respectivamente.

Gráfico 1- Distribuição entre o sexo masculino e feminino nos pacientes HC-FMUSP estudados (Grupo A)

O genótipo TA6/6 foi encontrado em 212/494 pacientes (43%). Os pacientes heterozigotos TA6/7 corresponderam a 219/494 (44%) dos casos estudados. O genótipo TA7/7 (UGT1A1*28) foi encontrado em 51/494 (10%). Ainda foram verificados os genótipos TA5/6 7/494 (1,4%), TA7/8 4/494 (0,8%) e TA8/8 1/494 (0,2%), com $p = 0,255$ (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequência dos genótipos, TA5/6, TA6/6, TA6/7, TA7/7, TA7/8 e TA8/8, encontrados no Grupo A, $p = 0,255$

genótipo	masc n =228 (%)	fem n =266 (%)	total N= 494 (%)
TA5/6	1/228 (0,4)	6/266 (2,2)	7/494 (1,4)
TA6/6	92/228 (40)	120/266 (45)	212/494 (43)
TA6/7	110/228 (48)	109/266 (41)	219/494 (45)
TA7/7	24/228 (10,5)	27/266 (10)	51/494 (10)
TA7/8	1/228 (0,4)	3/266 (1)	4/494 (0,8)
TA8/8		1/266 (0,4)	1/494 (0,2)

Para estabelecer a relação de equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram selecionados os genótipos com suas respectivas frequências: TA6/6 (0,43), TA6/7 (0,45) e TA7/7 (0,1) (Tabela 2). A variância encontrada foi de 0,33 com $p = 0,97$. A população estudada encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

4.2 – Distribuição entre os grupos raciais

A distribuição da mutação UGT1A1 foi avaliada, estratificando-se a população total em quatro grupos raciais: brancos, negros, pardos e orientais, no Grupo A, atendidos no ambulatório da Disciplina de Gastroenterologia Clínica HC-FMUSP.

Para o genótipo TA6/6, os pacientes classificados como brancos apresentaram uma frequência de 46,6%, negros 20%, os pardos 42%. A frequência do genótipo TA6/7 nos pacientes brancos foi de 43,4%, nos pardos de 61% e nos negros de 43%. Para os pacientes com o genótipo TA7/7 foram encontrados 8% nos pacientes brancos, 13% nos pardos e 11% nos negros, com $p = 0,006$ (Tabela 3).

Tabela 3 - Classificação por raça do Grupo A, $p = 0,006$

raça/genótipo	brancos (%)	negros(%)	pardos(%)	orientais(%)	total(%)
TA5/6	3/311 (1)	3/54(5,5)			6/480(1)
TA6/6	145/311(46,6)	11/54(20)	43/103(42)	7/12(58)	206/480(43)
TA6/7	135/311(43,4)	33/54(61)	44/103 (43)	3/12(25)	215/480(45)
TA7/7	26/311 (8)	6/54(11)	14/103(13,5)	2/12(16)	48/480(10)
TA7/8	2/311 (0,6)		2/103 (2)		4/480(1)
TA8/8		1/54(2)			1/480 (0,2)
Total	311/480(65)	54/480(11)	103/480(21)	12/480(2,4)	480 (100)

Observação: Dados raciais disponíveis de 480 pacientes

Observou-se que 14 pacientes com os genótipos: TA5/6 ($n=1$), TA6/6 ($n=6$), TA6/7 ($n=4$) e TA7/7 ($n=3$) não foram relacionados nos dados da Tabela 2 acima, já que não foi possível obter a raça pela vontade imposta pelos entrevistados em não expressar sua ascendência durante a entrevista.

4.3- Grupos controles sadios (Grupo B)

Foram genotipados 313 doadores de sangue recrutados na Fundação Pró-sangue - Hemocentro de São Paulo (Grupo B), sendo 180 do sexo masculino e 133 do feminino, representando 58% e 42%, respectivamente (Gráfico 2). A média de idade variou entre $33,7 \pm 10,7$ e $33,7 \pm 10,6$ anos, respectivamente.

Gráfico 2- Distribuição entre o sexo masculino e feminino nos controles sadios estudados (Grupo B)

O genótipo TA5/6 foi encontrado em 5/313 (1,6%). O genótipo TA6/6 foi verificado em 156/313 (50%). Os doadores heterozigotos com o genótipo TA6/7 corresponderam a 119/313 (38%). O genótipo TA7/7 a 30/313 (9,6%). Nos genótipos TA7/8 e TA5/7, a frequência encontrada foi de 0,3%, somente um doador para cada genótipo foi analisado (Tabela 4).

Tabela 4 - Frequência dos genótipos TA5/6, TA6/6, TA6/7, TA7/7, TA7/8 e TA5/7 no Grupo B

genótipo	masc n= 180 (%)	fem n= 132 (%)	total N=313 (%)
TA5/6	4/180 (2)	1/133 (0,75)	5/313 (1,6)
TA6/6	88/180 (49)	68/133 (51)	156/313 (50)
TA6/7	67/180 (37)	52/133 (39)	119/313 (38)
TA7/7	20/180 (11)	10/133 (7,5)	30/313 (9,6)
TA7/8		1	1/313 (0,3)
TA5/7		1	1/313 (0,3)

No grupo B, também, foi estabelecida a relação de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foram selecionados os genótipos TA6/6, TA6/7 e TA7/7 com suas respectivas frequências: 0,50, 0,38 e 0,09 (Tabela 4). A variância encontrada foi de 0,29, com $p = 0,96$. A população estudada encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A distribuição da mutação UGT1A1 foi avaliada, dividindo-se a população estudada disponível (N= 311) em quatro grupos raciais: brancos, negros, pardos e orientais dos doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue Hemocentro e São Paulo (Grupo B). O genótipo TA5/6 foi encontrado em cinco doadores correspondendo a 1,6% do grupo estudado, sendo um branco (0,5%), dois negros (4,5%) e dois doadores pardos (3%). Para o genótipo TA6/6, os doadores classificados como brancos corresponderam a 101 (51%), os negros a 17 (38%) e os pardos a 29 doadores (50%) e 3 doadores orientais. Para o genótipo TA6/7, os doadores corresponderam a 75 (38%) brancos, a 22 (50%) negros e a 19 (33%) doadores pardos. O genótipo TA7/7 foi encontrado em 18 (9%) brancos, 3 (7%) negros e em 8 (14%) doadores pardos. Os indivíduos que durante a entrevista não se consideraram pertencentes aos grupos acima, foram denominados como “Outros” (Tabela 5). Foram excluídos dessa tabela os genótipos TA5/7, TA7/8 sendo um indivíduo da raça negra e um da raça parda, respectivamente.

Tabela 5 - Classificação por raça do Grupo B

raça/genótipo	brancos(%)	negros(%)	pardos(%)	orientais(%)	outros(%)	total(%)
TA5/6	1/194 (0,5)	2/44 (4,5)	2/68 (3)			5/311 (1,6)
TA6/6	100/194(51)	17/44(38,5)	34/68 (50)	3	2 /2(63)	157/311(50)
TA6/7	75/194 (38)	22/44 (50)	22/68 (32)			119/311(38)
TA7/7	18/194 (9)	3/44 (7)	9/68 (13)			30/311 (9)
Total	194/311(62)	44/311(14)	68/311(22)	3/311(1)	2/311(0,6)	311

Dados raciais disponíveis de 311 doadores

4.4- Análise da dosagem de bilirrubina total no Grupo A (dados laboratoriais)

A dosagem de bilirrubina total de 450 pacientes foi obtida por meio do sistema informatizado do HC-FMUSP, HCMED. De acordo com os resultados verificados, os pacientes do sexo masculino apresentaram a média de dosagem de bilirrubina total de $1,26 \pm 0,95$ mg/dL, e os pacientes do sexo feminino de $1 \pm 0,95$ mg/dL $p= 0,05$ (Tabela 6). Os pacientes também foram divididos segundo a idade. As seguintes idades foram escolhidas: 18 até 30 anos, 31 até 40 anos, 41 até 50 anos, 51 até 60 anos, 61 até 70 anos e 71 até 90 anos. Essa estratificação em idade foi feita, conforme o trabalho de Clementi e cols. (2007).

Nos pacientes de 18 até 30 anos, foram analisados 13 do sexo masculino, com $1,16 \pm 0,8$ mg/dL de bilirrubina total e 14 do sexo feminino, com $0,6 \pm 0,3$ mg/dL de bilirrubina total, $p= 0,21$. No grupo que compreendeu as idades, entre 31 a 40 anos, foram analisados 18 pacientes do sexo masculino e encontrado $1,31 \pm 1,4$ mg/dL de bilirrubina total, e 26 do sexo feminino com $0,78 \pm 0,5$ mg/dL de bilirrubina total, $p= 0,21$. No grupo de 41 a 50 anos, foram analisados 59 pacientes do sexo masculino com $1,23 \pm 0,8$ mg/dL de bilirrubina total e 50 do sexo feminino com $1,1 \pm 1,2$ mg/dL de bilirrubina total, $p = 0,88$. No grupo com idade entre 51 a 60 anos, foram analisados 71 do sexo masculino com bilirrubina total de $1,4 \pm 1$ mg/dL e 71 pacientes do sexo feminino de $1 \pm 1,2$ mg/dL de bilirrubina total, $p = 0,01$. No grupo com idade entre 61 a 70 anos, foram analisados 29 pacientes do sexo masculino e encontrado $0,96 \pm 0,6$ mg/dL de bilirrubina total e 62 do

sexo feminino, com $1,1 \pm 1,2$ mg/dL de bilirrubina total, $p = 0,34$. No grupo com idade entre 71 até 90 anos, foram analisados 10 pacientes do sexo masculino com $1,2 \pm 0,7$ mg/dL de bilirrubina total e 24 do sexo feminino com $1,3 \pm 3,6$ mg/dL de bilirrubina total, $p = 0,96$ (Tabela 6).

Tabela 6 - Avaliação da bilirrubina nos pacientes divididos por idades (em anos) e sexo

sexo/idade	18-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-90	18-90
masc.	$1,16 \pm 0,8$	$1,31 \pm 1,4$	$1,23 \pm 0,8$	$1,4 \pm 1$	$0,96 \pm 0,6$	$1,2 \pm 0,7$	$1,26 \pm 0,95$
(n)	(13)	(18)	(59)	(71)	(29)	(10)	(202)
fem.	$0,6 \pm 0,3$	$0,78 \pm 0,5$	$1,1 \pm 1,2$	$1 \pm 0,3$	$1,1 \pm 1,2$	$1,3 \pm 3,6$	$1 \pm 0,95$
(n)	(14)	(26)	(50)	(71)	(62)	(24)	(248)
valor p	0,21	0,21	0,88	0,01	0,34	0,96	0,05

Dosagem de bilirrubina disponível de 450 pacientes/ idade disponível de 447 pacientes

Os genótipos encontrados foram relacionados com a dosagem de bilirrubina total nos pacientes portadores de hepatite C crônica (Grupo A).

No genótipo TA5/6, a média de bilirrubina total foi de $0,5 \pm 0,25$ mg/dL, para o TA6/6 foi de $1 \pm 0,76$ mg/dL, TA6/7 de $1,11 \pm 1$ mg/dL, TA7/7 de $1,51 \pm 0,87$ mg/dL e o genótipo TA7/8 $3,35 \pm 3,8$ mg/dL, com $p < 0,00000$ (Tabela 7). A dosagem de bilirrubina total referente ao paciente com o genótipo TA8/8 (n=1), foi de 2,52 mg/dL.

Tabela 7 - Avaliação dos genótipos versus bilirrubina total no Grupo A, $p < 0,0000$

genótipo	média BT (DP) mg/dL
TA5/6	$0,5 \pm 0,25$
TA6/6	$0,99 \pm 0,76$
TA6/7	$1,11 \pm 1,01$
TA7/7	$1,51 \pm 0,87$
TA7/8	$3,35 \pm 3,8$

Também foi verificada a frequência dos genótipos encontrados de acordo com a dosagem de bilirrubina total. Foram encontrados 315 pacientes com dosagem de bilirrubina total menor ou igual a 1 mg/dL e 175 pacientes com dosagem de bilirrubina total maior que 1 mg/dL. Os pacientes que apresentaram dosagem de bilirrubina total menor ou igual a 1mg/dL foram divididos de acordo com os genótipos encontrados: TA5/5 (2,2%), TA6/6 (45,7%), TA6/7 (45,7%), TA7/7 (6%) e TA7/8 (0,2%). Os pacientes com dosagem de bilirrubina total maior que 1 mg/dL também foram divididos de acordo com os genótipos encontrados: TA6/6 (37,1%), TA6/7 (41,7%), TA7/7 (18,3%), TA7/8 (1,7%) e TA8/8 (0,6%), com $p < 0,001$ (Tabela 8).

Tabela 8 – Frequência dos genótipos encontrados de acordo com a dosagem de bilirrubina total. n (%), $p < 0,001$

	TA5/6	TA6/6	TA6/7	TA7/7	TA7/8	TA8/8	Total
bilirrubina total $\leq$ 1 mg/dL	7 (2,2)	144 (45,7)	144 (45,7)	19 (6,0)	1 (0,2)	0	315
bilirrubina total $>$ 1 mg/dL	0	66 (37,1)	73 (41,7)	32 (18,3)	3 (1,7)	1 (0,6)	175

4.5- Comparação entre os genótipos UGT1A1 encontrados nos Grupos A e B

Os genótipos obtidos entre os pacientes portadores de hepatite crônica C (Grupo A), e os doadores de sangue sadio (Grupo B) foram comparados. Para o genótipo TA5/6, a frequência encontrada foi de 1,4% no Grupo A e 1,6% no Grupo B. O genótipo TA6/6 correspondeu a 43% e 50% nos Grupos A e B, respectivamente. O genótipo TA6/7 correspondeu a 45% no Grupo A e 38% no Grupo B, o genótipo TA7/7 correspondeu a 10% ao Grupo A e 9% ao Grupo B. O Somente nos doadores o genótipo TA5/7 foi encontrado e correspondeu a 0,3%. O genótipo TA7/8 correspondeu a 0,8% para o Grupo A e 0,3% para o Grupo B. O genótipo TA8/8 só foi verificado em um paciente portador de hepatite crônica C e correspondeu a 0,2% (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Comparação entre as frequências dos genótipos UGT1A1 entre o Grupo A e Grupo B

4.6- Comparações entre os alelos encontrados nos Grupos A e B

Os alelos também foram comparados entre os pacientes com hepatite crônica C e os controles sadios. No Grupo A, 988 alelos (494 x 2) foram analisados. No Grupo B, 626 alelos (313 x 2) foram analisados.

No grupo A, as frequências alélicas encontradas foram: TA5 0,7% (7/988), TA6 66% (650/988), TA7 33%(325/988) e TA8 0,6% (6/988). No Grupo B, as frequências verificadas foram: TA5 1% (6/626), TA6 70%, TA7 29% (181/626) e TA8 0,2% (1/626) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Comparação da frequência dos alelos encontrados nos pacientes e doadores

No Grupo A, os alelos foram divididos por raça. Os pacientes brancos apresentaram uma frequência para os alelos TA5 de 0,5% (3/622), TA6 de 70% (428/622), TA7 de 30% (189/622) e TA8 de 0,3% (2/622). Os pacientes negros apresentaram as frequências para os alelos TA5 de 3% (3/108), TA6 de 54% (58/108), TA7 de 41,5% (45/108) e TA8 de 2% (2/108). Os pardos apresentaram as frequências para os alelos TA6 de 62,5% (130/208), TA7 de 35,5% (74/208), TA8 de 1% (2/208). Os orientais apresentaram as frequências de 71% para os alelos TA6 (17/24) e TA7 29% (7/24) (gráfico 5).

Gráfico 5 - Frequência dos alelos do gene UGT1A1 encontrados no Grupo A

Já nos doadores divididos por raça, os brancos apresentaram as frequências para os alelos TA5 de 0,25% (1/390), TA6 de 71% (278/390) e TA7 de 28% (111/390). Os doadores negros apresentaram as frequências para os alelos TA5 de 3% (3/90), TA6 64% (58/90) e TA7 de 32% (29/90). Os doadores pardos tiveram as frequências para os alelos TA5 de 2% (2/118), TA6 de 67% (79/118), TA7 de 30% (36/118) e TA8 de 1% (1/118), respectivamente (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Frequência dos alelos do gene UGT1A1 encontrados no Grupo B

5 DISCUSSÃO

A figura clássica da Síndrome de Gilbert, usualmente, está associada à adição do dinucleotídeo Timina-Adenina (TA) na região promotora do gene (UGT1A1*28 - homozigoto TA7/7). A base molecular da SG fornece um modelo claro para o entendimento da diversidade.

O presente estudo verificou a distribuição do polimorfismo do gene UGT1A1*28 em dois tipos de população: portadora de hepatite crônica C (Grupo A) e outra saudável (Grupo B). A relação da bilirrubina total com o polimorfismo no grupo portador de hepatite crônica C também foi avaliada.

Em relação aos grupos estudados, a frequência do polimorfismo UGT1A1*28 encontrada na população de pacientes com hepatite crônica C foi de 10% (Tabela 2). Na população de doadores, a frequência UGT1A1*28 verificada foi de 9,6% (Tabela 4). Os resultados obtidos estão, conforme os encontrados na literatura que variam entre 3% a 10% (Radu e Atsmon, 2001).

Na distribuição entre o sexo masculino e feminino no Grupo B, foi encontrada uma frequência de polimorfismo UGT1A1*28 de 11,1% e 7,5%, respectivamente (Tabela 4). Os resultados encontrados estão de acordo com os publicados, indicando que a frequência do polimorfismo UGT1A1*28 é maior nos indivíduos do sexo masculino do que no feminino (Radu e Atsmon, 2001). Mas contrastam com os dados encontrados no Grupo A que foram de 10,5% e 10% para os sexos masculino e feminino indicando, que,

pelo menos, para esse grupo, a frequência do polimorfismo UGT1A1*28, não existe diferença.

Em relação à classificação por raça, os estudos populacionais indicam uma frequência para o polimorfismo UGT1A1*28 de 8,6% na Alemanha, 10% (7/69) na Islândia, 5% (5/59) no Reino Unido, 14,8% (4/27) em espanhóis bascos e 6,5% (3/46) em espanhóis catalães. Já em quenianos, a frequência é de 17,9% (16/81). Nos asiáticos, os indianos apresentaram 19,3% (23/119), os tailandeses 2,6% (2/76) e os chineses de Hong Kong 1% (2/50) (Beutler e cols., 1998, Premawardhema e cols. 2003).

No presente trabalho, o grupo doador (Grupo B) foi dividido em brancos, pardos e negros e foi encontrada a frequência UGT1A1*28 de 9%, 14% e 7%, respectivamente (Tabela 3). Já os pacientes com hepatite crônica C (Grupo A) classificados como brancos, pardos, negros e orientais apresentaram 8%, 13%, 11% e 16%, respectivamente (Tabela 5).

Além disso, foi verificado um indivíduo negro homozigoto TA8/8, genótipo considerado raro para os caucasianos e relacionado com a Síndrome de Crigler-Najjar tipo II. Em indivíduos de ascendência africana, a frequência do TA8/8 está em torno de 6,9% (Beutler e cols., 1998).

No presente estudo, a presença do genótipo TA7/7 parece estar relacionada com o aumento da bilirrubina nos pacientes do Grupo A ($1,51 \pm 0,87$) (Tabela 7). Assim, a adição de Timina e Adenina tem um importante papel funcional na transcrição do gene. Também foi verificada a frequência dos genótipos e a dosagem de bilirrubina. Indicando que 18% dos pacientes

com o genótipo TA7/7 apresentaram dosagem de bilirrubina total maior que 1mg/dL (tabela 8). Isso indica que, além do TA7/7, outros polimorfismos podem estar associados à Síndrome de Gilbert e devem ser investigados.

A bilirrubina é considerada um antioxidante, prevenindo contra o dano oxidativo, a enzima UGT1A1 está em sintonia fina com a conjugação da bilirrubina, fornecendo proteção contra os agentes oxidantes. Provavelmente, durante a evolução, houve uma seleção do genótipo contra o dano oxidativo sem a ocorrência da hiperbilirrubinemia (Beutler e cols., 1998).

Estudo realizado por Clementi e cols. (2007) sugere que o polimorfismo UGT1A1*28 levando à hiperbilirrubinemia deve ser considerado de origem multifatorial (genética e ambiental), como em algumas situações de estresse que afetam a atividade da heme-oxigenase. Sexo e idade são fatores adicionais que também podem estar envolvidos na regulação do metabolismo da bilirrubina.

De acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, os níveis de bilirrubina foram mais altos em homens do que em mulheres $1,25 \pm 0,95$ e $1 \pm 0,95$ mg/dL, com $p=0,05$, respectivamente (Tabela 6).

Os dados bioquímicos do grupo controle não foram disponibilizados conforme a política de confidencialidade dos dados da Fundação Pró-sangue–Hemocentro de São Paulo HC-FMUSP. Entretanto, por definição, os doadores não apresentaram qualquer alteração na atividade da bilirrubina.

Em relação à frequência dos alelos estudados, os resultados encontrados foram diferentes dos descritos na literatura. Bosma e colaboradores, em 1994, e mais tarde Clementi e colaboradores, em 2007, estimaram uma frequência de quase 40% para o alelo TA7. Nos resultados verificados em nosso trabalho, a frequência do alelo TA7 nos doadores e pacientes foi de 29% e 33%, respectivamente (Gráfico 4).

Quando os alelos foram divididos por raça, o alelo TA7 apresentou 28% no grupo de doadores brancos e 35% no grupo de pacientes brancos (média de 31,5%). Os dados contrastam com os apresentados por Beutler e colaboradores em 1998 que encontraram uma frequência de aproximadamente 40% para indivíduos brancos. Em relação aos indivíduos negros, os resultados indicam que a frequência do alelo TA7, também, é menor em nossa população (média de 31%) do que nos africanos encontrados por esse pesquisador, encontrando uma frequência de 42%. No grupo de pacientes, foi encontrado o alelo TA8 em pacientes brancos e pardos com a frequência de 0,3% e 1%, respectivamente (Tabela 3). Provavelmente, em razão de sua afroascendência. No grupo de doadores somente foi encontrado o alelo TA8 em um indivíduo pardo.

Embora o Brasil tenha uma grande influência de povos africanos com grande miscigenação, a frequência do alelo TA7 não apresenta uma distribuição semelhante como a encontrada em outras populações.

Outro fator interessante foi a presença do alelo TA5 (0,25%) em um indivíduo branco, genótipo TA5/6 considerado raro para esse tipo de indivíduo.

Tanto o Grupo A, como o Grupo B estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, apresentando $p = 0,97$ e $p = 0,96$, respectivamente. Ou seja, não há fatores agindo para afetar as frequências gênicas das populações estudadas. Tais fatores são: casamento consanguíneo, subdivisão da população em grandes isolados, seleção natural, fluxo gênico de populações migrantes, entre outros (Beiguelman, 2008).

O sequenciamento de DNA utilizado foi considerado o padrão ouro para a pesquisa do polimorfismo UGT1A1*28. Foi importante também para padronizar e validar a técnica de análise de fragmentos, pois foram usados o mesmo tamanho de fragmento e a sequência de *primers*. A diferença foi a marcação química do *primer* direto na análise de fragmentos. O método de análise de fragmentos realizado no aparelho MegaBace 1000 (GE-Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) mostrou-se rápido, pois depende de apenas uma reação de PCR com a duração de quase 120 minutos. A eletroforese em capilar no aparelho é de quase 80 minutos. Podendo ser empregado para rastrear um grande grupo de indivíduos em pouco tempo, até 96 amostras. No sequenciamento padronizado no ABI377 (Applied Biosystem, Foster City, EUA) em nosso laboratório, a reação de sequenciamento dura 60 minutos aproximadamente e o sequenciamento de DNA, para esse tamanho de fragmento é de 4h30s, realizando até 36 sequenciamentos.

A caracterização molecular da SG torna o polimorfismo UGT1A1*28 possível de ser rastreado. Atualmente, a Síndrome de Gilbert é diagnosticada por exclusão. O método é usualmente menos satisfatório para

o clínico do que uma confirmação positiva como em um exame laboratorial de rotina. A pesquisa do polimorfismo UGT1A1*28 tem potencial para fornecer o diagnóstico preciso e colaborar na direção do tratamento. Sobretudo, quando o paciente é tratado com drogas que são metabolizadas pelo UGT1A1, por exemplo, o irinotecan. O gene UGT1A1 exerce importante função na glicuronidação da bilirrubina e de algumas drogas. A evolução de sua diversidade gênica e a definição dos haplótipos ilustra a complexidade do entendimento desse gene.

Em razão de todos esses fatores envolvidos, a Síndrome de Gilbert não pode/deve ser considerada de natureza irrelevante. A compreensão dos mecanismos genéticos de glicuronidação e o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico molecular aumentarão a rastreabilidade dessa síndrome.

6 CONCLUSÕES

No presente estudo, foi possível concluir que:

- a) O polimorfismo UGT1A1*28 é um fator importante no aumento dos níveis da bilirrubina, estando presente em 10,5% (média dos casos e controles) das amostras estudadas;
- b) O genótipo TA7/7 parece influenciar, embora de maneira não estatisticamente significativa, os níveis de bilirrubina, à medida que os genótipos TA5/6 à TA8/8 vão sendo analisados, entre eles o genótipo TA7/7, os níveis de bilirrubina aumentam, indicando a relação da adição TA na região promotora do gene UGT1A1 e com sua transcrição;
- d) A técnica de análise de fragmento mostrou-se reprodutiva e rápida, podendo ser utilizada no rastreamento em larga escala na pesquisa de polimorfismos na região promotora do gene UGT1A1.

7 ANEXOS

ANEXO A - Polimorfismos encontrados no gene UGT1A1

Nome alelo	Proteína	Mudança nucleotídeo	Mudança amino ácido	Exon	efeito	fenótipo	Atividade enzimática		nota
							<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	
UGT1A1*1	UGT1A1.1				Wild-type				
UGT1A1*2	UGT1A1.2	877(T>A)/878-890del	Frameshift/Del	2	Frameshift	CN1	Ausente	Ausente	
UGT1A1*3	UGT1A1.3	1124(C>T)	S375F	4		CN1	Inativa	Inativa	
UGT1A1*4	UGT1A1.4	1069(C>T)	Q357X	3		CN1	Inativa	Inativa	
UGT1A1*5	UGT1A1.5	991(C>T)	Q331X	2	Exon 2 deletion	CN1	Ausente	Inativa	
UGT1A1*6	UGT1A1.6	211(G>A)	G71R	1			Reduzida	Reduzida	
UGT1A1*7	UGT1A1.7	1456(T>G)	Y486D	5		CN2	Reduzida	Reduzida	
UGT1A1*8	UGT1A1.8	625(C>T)	R209W	1		CN2	4.4%	Reduzida	
UGT1A1*9	UGT1A1.9	992(A>G)	Q331R	2		CN2	Reduzida	Reduzida	
UGT1A1*10	UGT1A1.10	1021(C>T)	R341X	3		CN1	Ausente	Ausente	
UGT1A1*11	UGT1A1.11	923(G>A)	G308E	2		CN1	Inativa	Ausente	
UGT1A1*12	UGT1A1.12	524(T>A)	L175Q	1		CN2	38.4%	Reduzida	
UGT1A1*13	UGT1A1.13	508-510del	F170del	1		CN1	Inativa	Inativa	
UGT1A1*14	UGT1A1.14	826(G>C)	G276R	1		CN1	Inativa	Inativa	
UGT1A1*15	UGT1A1.15	529(T>C)	C177R	1		CN1	Inativa	Inativa	
UGT1A1*16	UGT1A1.16	1070(A>G)	Q357R	3		CN1	Ausente	Ausente	
UGT1A1*17	UGT1A1.17	1143(C>G)	S381R	4		CN1	Ausente	Ausente	

continua

ANEXO A - Polimorfismos encontrados no gene UGT1A1 (continuação)

Nome alelo	Proteína	Mudança nucleotídeo	Mudança amino ácido	Exon	efeito	fenótipo	Atividade enzimática		nota
							<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	
UGT1A1*18	UGT1A1.18	1201(G>C)	A401P	4		CN1	Ausente	Ausente	
UGT1A1*19	UGT1A1.19	1005(G>A)	W335X	3		CN1	Ausente	Ausente	
UGT1A1*20	UGT1A1.20	1102(G>A)	A368T	4		CN1	Ausente	Ausente	
UGT1A1*21	UGT1A1.21	1223insG	Frameshift	4	Frameshift	CN1	Ausente	Ausente	
UGT1A1*22	UGT1A1.22	872(C>T)	A291V	2		CN1	Ausente	Ausente	
UGT1A1*23	UGT1A1.23	1282(A>G)	K426E	4		CN1	Ausente	Ausente	
UGT1A1*24	UGT1A1.24	1309(A>T)	K437X	5		CN1	Ausente	Ausente	
UGT1A1*25	UGT1A1.25	840(C>A)	C280X	1		CN1	Ausente	Ausente	
UGT1A1*26	UGT1A1.26	973delG	Frameshift	2	Frameshift	CN2	Ausente	Ausente	
UGT1A1*27	UGT1A1.27	686(C>A)	P229Q	1		GS	Reduzida	Reduzida	
UGT1A1*28	UGT1A1.28	A(TA)6TAA para A(TA)7TAA		Promotor		GS	Reduzida	Reduzida	UGT1A1 TATA box
UGT1A1*29	UGT1A1.29	1099(C>G)	R367G	4		GS	Reduzida	Reduzida	
UGT1A1*30	UGT1A1.30	44(T>G)	L15R	1		CN2	Reduzida	Reduzida	
UGT1A1*31	UGT1A1.31	1160(CC>GT)	P387R	4		CN1	Ausente	Ausente	
UGT1A1*32	UGT1A1.32	1006(C>T)	R336W	3		CN1	0-10%	Ausente	
UGT1A1*33	UGT1A1.33	881(T>C)	I294T	2		CN2	40-55%		

continua

ANEXO A - Polimorfismos encontrados no gene UGT1A1 (continuação)

Nome alelo	Proteína	Mudança nucleotídeo	Mudança amino ácido	Exon	efeito	fenótipo	Atividade enzimática		nota
							<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	
UGT1A1*34	UGT1A1.34	928(A>G)	M310V	2		CN2	26%-51%		
UGT1A1*35 ¹	UGT1A1.35	1292(T>C)	I431T	4		CN2	61%-81%		
UGT1A1*36	UGT1A1.36	A(TA)6TAA para A(TA)5TAA		Promotor			aumentada	aumentada	
UGT1A1*37	UGT1A1.37	A(TA)6TAA para A(TA)8TAA		Promotor		CN2	Reduzida	Reduzida	
UGT1A1*38	UGT1A1.38	1213(A>G)/A(TA)6TAA para A(TA)8TAA	N400D	4		CN2			originalmente designado UGT1A1*64
UGT1A1*39	UGT1A1.39	1201(G>C)/1309(A>T)	A401P/K437X	4; 5		CN1			
UGT1A1*40	UGT1A1.40	872(C>T)/1282(A>G)	A291V/K426E	2; 4		CN1			
UGT1A1*41	UGT1A1.41	120-121delCT	Frameshift	1	Frameshift	CN1			
UGT1A1*42	UGT1A1.42	1388(A>C)/N A(TA)7TAA	E463A	5		CN2			
UGT1A1*43 ¹	UGT1A1.43	698(T>G)	L233R	1		-			originalmente designado UGT1A1*35
UGT1A1*44	UGT1A1.44	115(C>G)	H39D	1		CN1			
UGT1A1*45	UGT1A1.45	222(C>A)	Y74X	1		CN1			
UGT1A1*46	UGT1A1.46	517delC	Frameshift	1	Frameshift	CN1			

continua

ANEXO A - Polimorfismos encontrados no gene UGT1A1 (continuação)

Nome alelo	Proteína	Mudança nucleotídeo	Mudança amino ácido	Exon	efeito	fenótipo	Atividade enzimática		nota
							<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	
UGT1A1*47	UGT1A1.47	722-723delAG	Frameshift	1	Frameshift	CN1			
UGT1A1*48	UGT1A1.48	674(T>G)/722-723delAG	V225G/Frameshift	1	Frameshift	CN2			
UGT1A1*49	UGT1A1.49	1043delA	Frameshift	3	Frameshift	CN1			
UGT1A1*50	UGT1A1.50	1220delA/N	Frameshift/N	4	Frameshift	CN1			
UGT1A1*51	UGT1A1.51	1127(A>G)/N	H376R/N	4		CN2			
UGT1A1*52	UGT1A1.52	1130(G>T)	G377V	4		CN2			
UGT1A1*53	UGT1A1.53	1448(G>A)	W483X	5		CN1			
UGT1A1*54	UGT1A1.54	1449(G>A)	W483X	5		CN1			
UGT1A1*55	UGT1A1.55	1487(T>A)/N	L496X/N	5		CN1			
UGT1A1*56	UGT1A1.56	Splice acceptor site	Intron 1	Intron 1		CN1			
UGT1A1*57	UGT1A1.57	Splice donor site	Intron 3	Intron 3		CN1			
UGT1A1*58	UGT1A1.58	145(C>T)	Q49X	1		CN1			
UGT1A1*59	UGT1A1.59	1186delG	Frameshift	4	Frameshift	CN2			
UGT1A1*60	UGT1A1.60	-3279(T>G)		Promotor		GS			Referred to - 3263(T>G)
UGT1A1*61	UGT1A1.61	Splice donor site (G>A)	Intron 3	Intron 3		CN1			

continua

ANEXO A - Polimorfismos encontrados no gene UGT1A1 (continuação)

Nome alelo	Proteína	Mudança nucleotídeo	Mudança amino ácido	Exon	efeito	fenótipo	Atividade enzimática		nota
							<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	
UGT1A1*62	UGT1A1.62	247(T>C)	F83L	1		GS			
UGT1A1*63	UGT1A1.63	1091(C>T)	P364L	4		-	Reduzida	-	
UGT1A1*64	UGT1A1.64	488-491dupACCT	Frameshift	1	Frameshift	GS	Reduzida	-	
UGT1A1*65	UGT1A1.65	-1126(C>T)		Promotor		GS	-	-	
UGT1A1*66	UGT1A1.66	997-82(T>C)		Intron 2		GS	-	-	
UGT1A1*67	UGT1A1.67	-85 to -83 ins CAT		Promotor		GS	Reduzida	Reduzida	
UGT1A1*68	UGT1A1.68	-63(G>C)		Promotor		GS	Normal	-	
UGT1A1*69	UGT1A1.69	476(T>C)	I159T	1		GS	Normal	-	
UGT1A1*70	UGT1A1.70	962(C>G)	A321G	2		GS	Normal	-	
UGT1A1*71	UGT1A1.71	964(A>G)	I322V	2		-	Normal	-	
UGT1A1*72	UGT1A1.72	1075(G>A)	D359N	3		GS	Normal	-	
UGT1A1*73	UGT1A1.73	1091(C>T)	P364L	4		GS	Normal	-	
UGT1A1*74	UGT1A1.74	-3345 delC		Promotor		-	-	-	
UGT1A1*75	UGT1A1.75	1598(A>C)	H533P	5		-	-	-	
UGT1A1*76	UGT1A1.76	1813(C>T)		3'UTR		-	-	-	
UGT1A1*77	UGT1A1.77	2021(T>C)		3'UTR		-	-	-	
UGT1A1*78	UGT1A1.78	1941(C>G)		3'UTR		-	-	-	

continua

ANEXO A - Polimorfismos encontrados no gene UGT1A1 (continuação)

Nome alelo	Proteína	Mudança nucleotídeo	Mudança amino ácido	Exon	efeito	fenótipo	Atividade enzimática		nota
							<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	
UGT1A1*79	UGT1A1.79	2042 (C>G)		3'UTR		-	-	-	
UGT1A1*80	UGT1A1.80	-364(C>T)		Promotor		-	-	-	
UGT1A1*81	UGT1A1.81	-64(G>C)		Promotor		-	-	-	
UGT1A1*82	UGT1A1.82	IVS1-72 (T>G)		Intron 1		-	-	-	
UGT1A1*83	UGT1A1.83	IVS1-52 (T>C)		Intron 1		-	-	-	
UGT1A1*84	UGT1A1.84	IVS2+18 (C>T)		Intron 2		-	-	-	
UGT1A1*85	UGT1A1.85	IVS4-229 (A>C)		Intron 4		-	-	-	
UGT1A1*86	UGT1A1.86	IVS1-157 (C>A)		Intron 1		-	-	-	
UGT1A1*87	UGT1A1.87	IVS2+15 (T>C)		Intron 2		-	-	-	
UGT1A1*88	UGT1A1.88	IVS2-82 (T>C)		Intron 2		-	-	-	
UGT1A1*89	UGT1A1.89	-3440 (C>A)		Promotor		-	-	-	
UGT1A1*90	UGT1A1.90	-3401 (T>C)		Promotor		-	-	-	
UGT1A1*91	UGT1A1.91	-3177 (C>G)		Promotor		-	-	-	
UGT1A1*92	UGT1A1.92	-3175 (A>G)		Promotor		-	-	-	
UGT1A1*93	UGT1A1.93	-3156 (G>A)		Promotor		-	-	-	

continua

ANEXO A - Polimorfismos encontrados no gene UGT1A1 (continuação)

Nome alelo	Proteína	Mudança nucleotídeo	Mudança amino ácido	Exon	efeito	fenótipo	Atividade enzimática		nota
							<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	
UGT1A1*94	UGT1A1.94	1381 (T>C)	W461R	5		CN1	-	No detectable activity	
UGT1A1*95	UGT1A1.95	1007(G>A)	R336Q	3		CN1	-	-	
UGT1A1*96	UGT1A1.96	1007(G>T)	R336L	3		CN1	-	-	
UGT1A1*97	UGT1A1.97	1184(G>T)	G395V	4		CN1	-	-	
UGT1A1*98	UGT1A1.98	1159(C>T)	P387S	4		CN1	-	-	
UGT1A1*99	UGT1A1.99	801delC	Frameshift	1	Frameshift	CN1	-	-	
UGT1A1*100	UGT1A1.100	576(C>G)	Y192X	1		CN1	-	-	
UGT1A1*101	UGT1A1.101	1060(T>C)	W354R	3		CN2	-	-	
UGT1A1*102	UGT1A1.102	111(C>A)	P34Q	1		CN2	-	-	Referred to 101
UGT1A1*103	UGT1A1.103	1207(C>T)	R403C	4		CN2	-	-	
UGT1A1*104	UGT1A1.104	IVS1-1 (G>A)		Intron 1		CN2	-	-	Referred to 865(-1G>A)
UGT1A1*105	UGT1A1.105	IVS4+1 (G>T)		Intron 4		CN2	-	-	Referred to 1304(+1G>T)

continua

ANEXO A - Polimorfismos encontrados no gene UGT1A1 (conclusão)

Nome alelo	Proteína	Mudança nucleotídeo	Mudança amino ácido	Exon	efeito	fenótipo	Atividade enzimática		nota
							<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	
UGT1A1*106	UGT1A1.106	1433(C>A)	A478D	5		CN2	-	-	
UGT1A1*107	UGT1A1.107	118(T>C)	W40R	1		CN2	-	-	
UGT1A1*108	UGT1A1.108	396-401del CAACAA	H132Q ; N133_K134del	1		CN2	-	-	Referred to 397-402 del CAACAA
UGT1A1*109	UGT1A1.109	554(A>C)	Q185P	1		CN2	-	-	
UGT1A1*110	UGT1A1.110	1(A>G)		1		CN2	-	-	
UGT1A1*111	UGT1A1.111	470insT	Frameshift	1	Frameshift	CN2	Inactive	-	
UGT1A1*112	UGT1A1.112	-1353(C>A)		Promotor		-	-	Reduzida	
UGT1A1*113	UGT1A1.113	1477(G>C)	G493R	5		CN2	-	-	

Modificado de Universidade de UGT1A1 allele nomenclature. Anexo A. [cited 2008 oct 10] Université LAVAL. Quebec. Available from:
<http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/webdav/site/pharmacogenomics/shared/Nomenclature/UGT1A/UGT1A1.htm>

ANEXO B

Documento de aprovação Cappesq.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23.02.06, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 056/06, intitulado "Frequência do alelo UGT1A1*28 em pacientes portadores de hepatite C e em controles sadios," apresentado pelo Departamento de GASTROENTEROLOGIA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Profa Dra Suzane Kioko Ono-Nita

Pesquisador(a) Executante: Sr. Marcelo Moreira Tavares de Souza

CAPPesq, 23 de Fevereiro de 2006.

Certe
14/3/06

Prof. Dr. Euclides Ayres de Castilho
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ondino Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05410-010 - São Paulo - SP
Fone: (011) 3069-6442 Fax: (011) 3069-6492 e-mail: ccap@hcfmusp.usp.br / 155781@hcfmusp.usp.br
7/06

8 REFERÊNCIAS

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 5;215(3):403-10.

Anderson MR, Moscou S. Race and ethnicity in research on infant mortality. *Fam Med.* 1998; 30(3): 224-7.

Aono S, Yamada Y, Keino H, Hanada N, Nakagawa T, Sasaoka Y, Yazawa T, Sato H, Koiwai O. Identification of defect in the genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in a patient with Crigler-Najjar Syndrome Type II. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 3 (197): 1239-44.

Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter A balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *PNAS.* 1998; 95: 8170-74.

Beinguelman, B. Genética de populações humanas. [on-line] 2008. [citado em 2 maio 2009]. Disponível em <http://www.sbg.org.br>

Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra BA, Lindhout D, Tytgat GN, Jansen PL, Oude Elferink RP. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med.* 1995; 333 (18):1171-75.

Bosma PJ. Inherited disorders of bilirubin metabolism *J Hepatol.* 2003; 38: 107-117.

Burchell, B. Hume, R 1999. Molecular genetic basis of Gilbert's syndrome. *J Gastroenterol Hepatol.* 14(10): 960-6.

Burchell B. Genetic variation of human UDP-glucuronosyltransferase: implications in disease and drug glucuronidation. *Am J Pharmacogenomics*. 2003; 3(1):37-52.

Choo QK, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B hepatitis genome. *Science* 1989; 224:359-62.

Clementi M, Di Gianantonio E, Fabris L, Forabosco P, Strazzabosco M, Tenconi R, Okolicsanyi L. Inheritance of hyperbilirubinemia: evidence for a major autosomal recessive gene. *Dig Liver Dis*. 2007; 39(4):351-5.

Doyama, H, Okada T, Kobayashi T, Suzuki A, Takeda Y, Mabuchi H. Effect of bilirubin UDP glucuronosyltransferase 1 gene TATA box genotypes on serum bilirubin concentrations in chronic liver injuries. *Hepatology*. 2000; 32(3): 563-8

Farhenn S, Sengupta S, Santra A, Suparna P, Dhali GK, Chakravorty M, Majumder PP, Chowdhury A. 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 J Gastroenterology*. 2006; 12(14):2269-75.

Fertrin KY, Goncalves MS, Saad ST, Costa FF. Frequencies of UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) gene promoter polymorphisms among distinct ethnic groups from Brazil. *Am J Med Genet*. 2002;108 (2):117-9.

Fisher MB, Paine MF, Strelevitz TJ, Wrighton SA. The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism. *Drug Metab Rev*. 2001;33(3-4):273-97.

Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*. 11th ed. Philadelphia. Elsevier, 2006.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*. 1999; 41:95-8.

Hasegawa Y, Ando Y, Ando M, Hashimoto N, Imaizumi K, Shimokata K. Pharmacogenetic approach for cancer treatment-tailored medicine in practice. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1086:223–32.

Innocenti F, Ratain MJ. Irinogenetics and UGT1A: from genotypes to haplotypes. *Clin Pharmacol Ther*. 2004;75(6):495-500

Kiang TKL, Ensom MHH, Chang TKH. UDP-glucuroniltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther*. 2005; 106: 97-132.

Lankisch T O, Moebius U, Wehmeir M, Behrens G, Manns MP, Schmidt RE, Strassburg CP. Gilbert's disease and atazanavir: from phenotype to UDP-glucuronosyltransferase haplotype. *Hepatology*. 2006; 44(5): 1324-32.

Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Bélanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF, Nebert DW. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*. 1997;7(4):255-69.

Martins MA, Carrilho FJ, Alves VAF, Castilho EA, Cerri GG, Wen CL. Clínica Médica – vol. 4; 1a ed. São Paulo; Manole; 2009.

Monaghan G, Ryan M, Seddon R, Hume R, Burchell B. Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *Lancet* 1996;347(9001):578-81.

Nagar S, Blanchard RL. Pharmacogenomics of uridine diphosphoglucuronosyltransferase (UGT) 1A family members and its role in patient response to irinotecan. 2006; *Drug Metab Rev.*; 38(3): 393-403.

Nature Insight: Hepatitis C. 2005; *Nature* 436 (7053): 930-78.

Perera MA, Pharm D, Innocent F, Ratain MJ. Pharmacogenetic testing for uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 polymorphisms: are we there yet? *Pharmacotherapy*. 2008;28 (6): 755-68.

Premawardhena A, Fisher CA, Liu YT, Verma IC, Silva S, Arambepola M, Clegg JB, Weatherall DJ. The global distribution of length polymorphisms of the promoters of the glucuroniltransferase 1 gene (UGT1A1): hematological and evolutionary implications. *Blood Cells Mol Dis*. 2003; (31) 98-101.

Radu P, Atsmon J. Gilbert's Syndrome: clinical and pharmacological implications. *IMAJ*. 2001; 3:593-8.

Ritter JK, Chen F, Sheen YY, Tran HM, Kimura S, Yeatman MT, Owens IS. A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini. *J Biol Chem*. 1992; 267 (5):3257-61.

Rotger M, Taffe P, Bleiber G, Gunthard HF, Furrer H, Vernazza P, Drechsler H, Bernasconi E, Rickenbach M, Telenti A; Swiss HIV cohort study. Gilbert syndrome and the development of antiretroviral therapy-associated hyperbilirubinemia. *J Infect Dis*. 2005; 15;192(8):1381-6.

Shukla DD, Hoyne PA, Ward CW. Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. *Arch Virol*. 1995; 140(10): 1747-61.

Silva LC. *Hepatites agudas e crônicas*. 3a ed. São Paulo: Sarvier; 2003.

Smith NF, Figg WD, Sparreboom A. Pharmacogenetics of irinotecan metabolism and transport: An update. *Toxicology in Vitro*. 2006; 20: 163-75.

Strassburg CP, Oldhafer K, Manns MP, Tukey RH. Differential expression of the *UGT1A1* locus in human liver, biliary, and gastric tissue: identification of *UGT1A7* and *UGT1A10* transcripts in extrahepatic tissue. *Mol Pharmacol*. 1997; 52(2):212-20.

Strassburg CP. Pharmacogenetics of Gilbert's Syndrome. *Pharmacogenomics* 2008. 9(6), 703-15.

Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferase: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000; 40: 581-616.

Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis*. 2000; 20: 1-16.

Wells PG, Mackenzie PI, Chowdhury JR, Guilemette C, Gregory PA, Ishii Y, Hansen AJ, Kessler FK, Kim PM, Chowdhury NR, Ritter JK. Glucuronidation and the UDP-glucuronosyltransferases in health and disease. *Drug Metabolism Disposition*. 2004; 32(3): 281-90.

Xu Y, Calero-Villalona MA. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Ann Oncol*. 2002; 13:1841-51.

Zucker SD, Qin X, Rouster SD, Yu F, Green RM, Keshavan P, Feinberg J, Sherman KE. Mechanism of indinavir-induced hyperbilirubinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(22): 12671-6.

Endereços eletrônicos:

UGT1A1 allele nomenclature. Anexo A. [cited 2008 oct 10] Université LAVAL. Quebec. Available from:
<http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/webdav/site/pharmacogenomics/shared/Nomenclature/UGT1A/UGT1A1.htm>.