

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO  
ADOLESCENTE

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM NEONATOS  
HIPERBILIRRUBINÊMICOS COM MAIS DE 35  
SEMANAS DE IDADE GESTACIONAL**

CLARISSA GUTIÉRREZ CARVALHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO  
ADOLESCENTE

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM NEONATOS  
HIPERBILIRRUBINÊMICOS COM MAIS DE 35  
SEMANAS DE IDADE GESTACIONAL**

CLARISSA GUTIERREZ CARVALHO

Orientador: **Prof. Dr. Roberto Giugliani**

Co-orientadora: **Profa. Dra. Simone Martins Castro**

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO  
ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

19/05/2009

E FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Ernani Miura

Departamento de Pediatria da UFCSPA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Silveira

PPG em Saúde da Criança e do Adolescente

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Themis Reverbel da Silveira

PPG em Saúde da Criança e do Adolescente

**C331p** Carvalho, Clarissa Guterrez

Polimorfismos genéticos em neonatos hiperbilirrubinêmicos com mais de 35 semanas de idade gestacional / Clarissa Gutierrez Carvalho ; orient. Roberto Giugliani ; co-orient. Simone Martins Castro. – 2009.

106 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Hiperbilirrubinemia neonatal 2. Polimorfismo genético 3. Icterícia neonatal 4. Deficiência de glucofosfato desidrogenase 5. Glucuronosiltransferase I. Giugliani, Roberto II. Castro, Simone Martins III. Título.

NLM: WS 421

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

*Dedico este trabalho a meus pais –  
Maria Ester e Paulo,  
ao meu irmão Felipe,  
aos amigos verdadeiros e  
a quem acreditou em mim*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Giugliani, pela sua confiança permanente.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Simone Martins Castro, pelo grande apoio e manhãs de revisão intensa da dissertação.

A Ana Paula Santin, acadêmica da Faculdade de Farmácia, que tratou de grande parte da logística laboratorial de modo sério e competente.

A Laura Azevedo e Carina Zaleski, acadêmicas da faculdade de Farmácia, pela dedicação na extração exaustiva do DNA, entre outros procedimentos.

A Dra. Úrsula Matte e equipe do Centro de Terapia Gênica, pela orientação e bancada no primeiro ano do projeto.

A Dra Maria Luiza Saraiva e equipe da Biologia Molecular, pela orientação e auxílio na padronização final da PCR da UGT1A1.

A Equipe do Banco de Sangue, especialmente a Dra. Clarice e secretária Mari, por disponibilizar as amostras de sangue de cordão.

Ao Serviço de Neonatologia do HCPA, pela minha formação como neonatologista, pelos bons exemplos e por disponibilizar os pacientes e o espaço.

Aos pais e responsáveis pelos pacientes, que concordaram com a inclusão de seus recém-nascidos no projeto.

Ao meu pai, que foi meu “co-orientador informal” em diversas fases deste projeto e à minha mãe, que também deu muitas sugestões.

A todos os meus colegas e amigos do Serviço de Genética Médica, Serviço de Pediatria, Serviço de Neonatologia, Programa de Pós-Graduação da Pediatria.

A todas as pessoas que passaram na minha vida neste período, de forma mais permanente ou temporária.

*A gente vai contra a corrente  
Até não poder resistir  
Na volta do barco é que sente  
O quanto deixou de cumprir  
Faz tempo que a gente cultiva  
A mais linda roseira que há  
Mas eis que chega a roda viva  
E carrega a roseira prá lá...*

*Roda mundo, roda gigante  
Roda moinho, roda pião  
O tempo rodou num instante  
Nas voltas do meu coração...*

Chico Buarque – Roda Viva

## RESUMO

A icterícia neonatal é geralmente benigna, mas desfechos desfavoráveis podem ocorrer e a identificação dos casos de maior risco seria muito útil. Alguns fatores de risco já conhecidos são prematuridade, desidratação, aleitamento materno, deficiência de G6PD e incompatibilidade sanguínea. As alterações na conjugação hepática de bilirrubina devido a polimorfismos da UGT1A1 também podem contribuir para esse maior risco. O objetivo deste estudo foi estimar a frequência da deficiência de G6PD e/ou das variantes polimórficas da UGT1A1 como fatores de risco para hiperbilirrubinemia grave em neonatos com mais de 35 semanas de idade gestacional e peso superior a 2000g em uma Unidade Neonatal do Sul do Brasil. Estudo prospectivo, observacional, de casos e controles, que incluiu 243 recém-nascidos admitidos para fototerapia no HCPA e 247 controles, entre março e dezembro de 2007. Foi realizada dosagem da atividade da G6PD e análises genético-moleculares do respectivo gene. Foi também realizado PCR para a UGT1A1 com eletroforese capilar em analisador genético ABI 3130xl e análise no programa GeneMapper®. Foram detectados genótipos polimórficos da UGT1A1 em 16% dos pacientes, com prevalência nos icterícos de 13,5% e nos normais de 18,2%, diferença não significativa. Identificada maior prevalência dos polimorfismos em negros e pardos (25%) em relação aos brancos (13%) ( $p=0,014$ ). A prevalência da deficiência de G6PD foi 4,6%, sem mostrar correlação com a icterícia. Concluimos que nesta amostra de recém-nascidos do sul do Brasil nem as variantes da UGT1A1, nem a deficiência de G6PD foram associadas à hiperbilirrubinemia grave, com prevalências semelhantes às verificadas em outras populações. Considerando a grande miscigenação presente nessa região, outros fatores e interações gênicas devem ser procurados, incluindo possivelmente o estudo de outros polimorfismos, identificando fatores de risco para explicar a doença, um importante problema de saúde a merecer a atenção dos pesquisadores.

**Palavras –Chave:** UGT1A1, icterícia neonatal, G6PD, polimorfismos, hiperbilirrubinemia



## **ABSTRACT**

Neonatal jaundice is usually benign, but unfavorable outcomes may happen; therefore, the identification of high-risk cases would be very useful. Some risk factors already known are prematurity, dehydration, breastfeeding, G6PD deficiency and blood incompatibility. Alterations in the hepatic conjugation of bilirubin due to UGT1A1 polymorphisms may also contribute to this higher risk. The objective of this study was to estimate the frequency of G6PD deficiency and the promoter region of UGT1A1 gene variants as risk factors to severe hyperbilirubinemia in newborns of over 35 weeks of gestational age and weighing above 2,000g in a Neonatal Service in Southern Brazil. This is a prospective and observational study of cases and controls which included 243 newborns admitted for phototherapy at HCPA and 247 controls, between March and December, 2007. G6PD activity was determined and the deficient cases were investigated by genetic analysis. PCR for the UGT1A1 variants was also performed, followed by capillary electrophoresis in genetic analyzer ABI 3130xl and the analysis in GeneMapper® program. Polymorphic genotypes were detected in 16% of the patients, prevalence in icteric patients was 13,5% and in normal individuals was 18,2%, a difference which was not significant. A higher prevalence of polymorphisms in blacks and mulattos (25%) was identified when compared to whites (13%) ( $p=0,014$ ). A prevalence of 4,6% of G6PD deficiency was found, without association to jaundice. We concluded that in this sample of newborns from the South of Brazil, polymorphic variants of UGT1A1 were not associated to severe hyperbilirubinemia as well as G6PD deficiency; being the prevalence similar to those found in other populations. Considering the high miscegenation that occurs in this area of Brazil, perhaps other factors and genic interactions should be sought in order to identify genetic risk factors, possibly including the study of further polymorphisms, as neonatal jaundice remains an important health problem to be approached by investigators.

**Keywords:** UGT1A1, neonatal jaundice, G6PD, polymorphisms, hyperbilirubinemia

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Estrutura do gene da Uridina-difosfato-Glucuronosil-Transferase Pág. 29
- Figura 2** - Proporção dos genótipos quanto ao risco entre afro-descendentes e brancos. Pág. 55
- Figura 3** - Média dos níveis de bilirrubina total na internação corrigida para 48h de vida em cada genótipo da UGT1A1 Pág. 56
- Figura 4** - Proporção de icterícia dentro dos genótipos da UGT1A1 Pág. 57

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Causas da hiperbilirrubinemia no recém-nascido conforme a idade de aparecimento Pág.17
- Tabela 2** - Protocolos da PCR e condições de migração para cada sistema investigado Pág.44
- Tabela 3** - Seqüências dos iniciadores e tamanho dos fragmentos amplificados. Pág.44
- Tabela 4** - Enzimas de restrição e condições de digestão. Pág.45
- Tabela 5** - Dados demográficos dos 490 neonatos analisados no período de março a dezembro de 2007 no HCPA - variáveis categóricas Pág.49
- Tabela 6** - Dados demográficos dos 490 neonatos analisados no período de março a dezembro de 2007 no HCPA – variáveis quantitativas Pág.49
- Tabela 7** – Características dos pacientes com seguimento neurológico Pág.51
- Tabela 8** - Frequência dos alelos UGT1A1 nos 464 pacientes com teste realizado Pág.53
- Tabela 9** - Genótipos no promotor do gene UGT1A1 nos 464 pacientes com teste realizado Pág.53
- Tabela 10** - Frequência alélica dos polimorfismos no promotor do gene da UGT1A1 em duas classificações étnicas, após agrupar negros e pardos Pág.54
- Tabela 11** Distribuição da atividade de G6PD em todos os neonatos da amostra de acordo com sexo e etnia Pág.59
- Tabela 12** - Aspectos da caracterização molecular dos pacientes com deficiência de G6PD Pág.59

## LISTA DE ABREVIATURAS

2q37	região 37 do braço longo do cromossomo 2
A	Tipagem Sanguínea ABO ou alelo polimórfico da G6PD
A-	Variante Africana deficiente da G6PD
AAP	<i>American Academy of Pediatrics</i> (Academia Americana de Pediatria)
AIG	Adequado para Idade Gestacional
ATP	Adenosina Trifosfato
B	Tipagem Sanguínea ABO ou alelo selvagem da G6PD
BD	Bilirrubina Direta
BIND	<i>bilirubin induced neurologic disfunction</i>
BT	Bilirrubina Total
CID-9	Classificação Internacional de Doenças versão 9
CO	Monóxido de Carbono
DNA	Acido Desoxirribonucléico
G6PD	glicose-6-fosfato desidrogenase
GIG	Grande para a Idade Gestacional
H2	Setor do hipocampo
Hb	Hemoglobina
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HO	heme-oxidase
IC	Intervalo de Confiança
IID	Fator de transcrição
MRP2	transportador dependente de ATP

n	Tamanho da amostra
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzida
OATP-2	proteína transportadora de anion orgânica 2
OATP1B1	polipeptideo hepático transportador de anions orgânicos
P	Nível de significância
p25	percentil 25
p75	percentil 75
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia de polimerase)
PIG	Pequeno para a Idade Gestacional
RS	Rio Grande do Sul
SNC	Sistema Nervoso Central
TA	Timina e Adenina
(TA)n	Alelos que codificam elementos TA a mais ou a menos na região promotora
TS	Tipagem Sangüínea
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UGT1 A1	uridina-difosfato-glucoronosiltransferase 1 A1
UGT1A1*28	Variante polimórfica da região promotora da UGT1A1 com (TA) <sup>7</sup> /(TA) <sup>7</sup>
vs	<i>Versus</i> (contra)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)
$\chi^2$	Símbolo da estatística qui-quadrado
Xq28	região 28 do braço longo do cromossomo X

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	Pág.14
<b>2 – REVISÃO DE LITERATURA</b>	Pág.16
<b>2.1 – ICTERÍCIA NEONATAL</b>	Pág.16
<b>2.1.1 – ICTERICIA FISIOLÓGICA</b>	Pág.20
<b>2.1.2 – ICTERÍCIA E PREMATURIDADE</b>	Pág.20
<b>2.1.3 – ICTERÍCIA E LEITE MATERNO</b>	Pág.21
<b>2.1.4 – ICTERÍCIA E INCOMPATIBILIDADE ABO</b>	Pág.22
<b>2.1.5 – ICTERÍCIA E ALGUMAS CONSIDERAÇÕES GENÉTICAS</b>	Pág.23
<b>2.1.5.1 – DEFICIENCIA DE G6PD</b>	Pág.24
<b>2.1.5.2 – AS VARIANTES POLIMÓRFICAS DA UGT1A1</b>	Pág.28
<b>2.1.6 – KERNICTERUS</b>	Pág.33
<b>2.1.7 – MANEJO DA ICTERÍCIA</b>	Pág.34
<b>3 – JUSTIFICATIVA</b>	Pág.37
<b>4 – OBJETIVOS</b>	Pág.38
<b>4.1 – OBJETIVO GERAL</b>	Pág.38
<b>4.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	Pág.38
<b>5 – CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>	Pág.39
<b>5.1 – DELINEAMENTO DA PESQUISA</b>	Pág.39
<b>5.2 – AMOSTRA</b>	Pág.39
<b>5.3 – CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO</b>	Pág.39

<b>5.4 – LOCAL</b>	Pág.39
<b>5.5 – LOGÍSTICA</b>	Pág.40
<b>5.6 – MÉTODOS</b>	Pág.42
<b>5.6.1 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA G6PD</b>	Pág.42
<b>5.6.2 – EXTRAÇÃO DE DNA</b>	Pág.43
<b>5.6.3 – GENOTIPAGEM G6PD</b>	Pág.43
<b>5.6.4 – QUANTIFICAÇÃO DO DNA</b>	Pág.45
<b>5.6.5 – AMPLIFICAÇÃO DA UGT1A1</b>	Pág.45
<b>5.6.6 – ANÁLISE DE FRAGMENTO POR ELETROFORESE CAPILAR</b>	Pág.46
<b>5.7 – CONSIDERAÇÕES ESTATÍSTICAS</b>	Pág.47
<b>5.8 – CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b>	Pág.47
<b>6 – RESULTADOS</b>	Pág.48
<b>6.1 – ICTERÍCIA</b>	Pág.48
<b>6.2 – UGT1A1</b>	Pág.52
<b>6.3 – DEFICIENCIA DE G6PD</b>	Pág.58
<b>7 – DISCUSSÃO</b>	Pág.60
<b>8 – CONCLUSÕES</b>	Pág.71
<b>9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	Pág.73
<b>10 – ANEXO I: ARTIGO</b>	Pág.85
<b>11 – ANEXO II: ILUSTRAÇÕES DE GENÓTIPOS</b>	Pág.105
<b>12 - ANEXO III: FIGURA DA INDICAÇÃO DE FOTOTERAPIA</b>	Pág.106

## **1. Introdução:**

A icterícia neonatal é uma condição geralmente benigna, mas, devido ao potencial de toxicidade da bilirrubina, os bebês devem ser monitorizados para identificação daqueles com maior risco de desfechos desfavoráveis (AAP 2004).

Nos neonatos o metabolismo da bilirrubina é ainda uma transição do estágio fetal para o adulto. A hiperbilirrubinemia não conjugada fisiológica encontrada em neonatos a termo, na primeira semana de vida, é usualmente atribuída à imaturidade da atividade da enzima hepática de conjugação de bilirrubina uridina-difosfato-glucoronosiltransferase 1 A1 (UGT1 A1) e à sobrecarga de bilirrubina, causada pela degradação da hemoglobina fetal (MARUO et al., 1999).

Os valores limites para bilirrubinas na icterícia fisiológica, anteriormente baseados no valor do percentil 95 do *Collaborative Perinatal Project* e do *National Collaborative Study*, tornaram-se mais elevados em populações de neonatos alimentados no seio – 15 mg/dL a 17,5 mg/dL (BHUTANI et al., 1999).

Em aproximadamente 50% dos casos não se identificam as causas da icterícia, sendo bem estudados diabete mérito materno, origem asiática, prematuridade, baixo peso, irmão com hiperbilirrubinemia, incompatibilidade ABO, infecção, céfalo-hematoma, asfixia, deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Alguns fatores associados à bilirrubinemia maior que 20 mg/dL foram amamentação, polimorfismos do gene da UGT1A1 e/ou da proteína transportadora de anion orgânica 2 (OATP-2), relacionada com a captação hepática da bilirrubina indireta (HUANG et al., 2004, WATCHKO 2005).

O polimorfismo da UGT1A1 com homozigose do alelo (TA)<sub>7</sub> é relacionado com a Síndrome de Gilbert (KAPLAN e HAMMERMAN 2002). A freqüência gênica da variante é 30%, resultando em 9% da população homozigota e 42% heterozigota (BOSMA et al., 1995).



A deficiência de G6PD é uma doença genética com distribuição mundial, envolvendo de 2 a 400 milhões de pessoas (BEUTLER 1994), e listada no passado entre os 10 fatores mais importantes que contribuem com icterícia neonatal não hemolítica (JOHNSON e BHUTANI 2002). Atualmente se valoriza não apenas a deficiência de G6PD como causa de icterícia grave, mas sua combinação com polimorfismos da UGT1A1 (KAPLAN et al., 1997).

Na maioria das vezes, a bilirrubinemia não excederá os níveis fisiológicos, mas pode chegar a níveis suficientemente elevados para entrar no sistema nervoso central (SNC) e causar kernicterus, em geral com dano neurológico irreversível (KAPLAN e HAMMERMAN 2005b). Kernicterus, embora raro, tem mortalidade significativa em 10% dos casos e morbidade em longo prazo em 70% (BHUTANI et al., 2004a) e é uma doença caracterizada pela impregnação com bilirrubina nos núcleos da base e cerebelo, em crianças que manifestaram sinais de encefalopatia aguda ou crônica. A Academia Americana de Pediatria (AAP) orienta o uso do termo encefalopatia aguda para descrever manifestações agudas da toxicidade pela bilirrubina, enquanto kernicterus seria usado para a seqüela neurológica e crônica (AAP 2004).

A icterícia é fonte de preocupação para os pais, e poucos bebês necessitarão de investigação ou tratamento, mas mesmo nos casos sem morbidade pode haver prejuízo do vínculo e da amamentação. A maior atenção da equipe médica quanto às crianças de risco evitaria re-internações hospitalares e desfechos com morbidade. O melhor conhecimento dos fatores responsáveis pela icterícia, através do estudo das suas prevalências nos possibilita planejar a investigação desses pacientes visando prevenção da encefalopatia hiperbilirrubinêmica.

## **2. Revisão da Literatura:**

### **2.1. Icterícia Neonatal**

A bilirrubina é o produto final do catabolismo da heme, com a formação de uma molécula de CO e de bilirrubina para cada molécula de heme degradada (MAISELS e KRIG 2006). Essa bilirrubina livre se liga a albumina plasmática e, posteriormente, é captada pela membrana celular hepática. No interior do hepatócito ocorre o processo de conjugação com ácido glucorônico, possibilitando a excreção da bilirrubina conjugada por um processo de transporte ativo nos canalículos biliares.

O significado da ocorrência quase universal de icterícia em recém-nascidos permanece um mistério, mas uma boa explicação é a bilirrubina ser um poderoso anti-oxidante (MIRELES et al, 1999). Baixos níveis de marcadores de estresse oxidativo, bem como aumento de enzimas anti-oxidantes, foram encontrados em neonatos ictericos; o nascimento impõe um estresse oxidativo considerável uma vez que o feto sai de um ambiente de hipoxemia *in utero* para um ambiente externo rico em oxigênio. Os bebês têm mecanismos de defesa anti-oxidantes ainda inadequados, e a bilirrubina pode servir como um anti-oxidante de transição nos primeiros dias de vida, antes que os outros mecanismos se desenvolvam totalmente (KUMAR et al., 2006).

A icterícia neonatal resolve-se entre o sétimo e décimo dia de vida e o desfecho é geralmente benigno, mas existe o risco de hiperbilirrubinemia grave e, em raros casos, encefalopatia (AAP 2004). É a razão mais comum de readmissão hospitalar na primeira semana de vida pós-natal (MAISELS et al., 1998), pois mais de 60% dos neonatos saudáveis desenvolverão hiperbilirrubinemia nessa semana - e a maioria recebe a alta hospitalar pós-nascimento antes do pico usual da bilirrubina total (BT) entre 72 -120h.

A hiperbilirrubinemia grave, definida como BT acima do percentil 95 para idade em horas, ocorre em 8-9% dos neonatos durante a primeira semana, com aproximadamente 4% de afetados após 72h de vida (BHUTANI et al., 1999, STEVENSON et al., 2001). Estudos em diversas populações definem o limite superior das bilirrubinas normais em 17 - 18mg/dL (MAISELS 1999, BHUTANI et al., 1999). Em geral, hiperbilirrubinemia grave de início precoce é associada a aumento na produção de bilirrubina, enquanto a tardia é associada com atraso na eliminação com ou sem produção aumentada, conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Causas da hiperbilirrubinemia no recém-nascido conforme a idade de aparecimento

Hiperbilirrubinemia de início precoce (idade <72h)	Hiperbilirrubinemia de início tardio (idade >72h e < 2 semanas)	
	Primeiras 24h	Primeira semana de vida
<i>Prova direta de coombs positiva:</i>	Icterícia idiopática benigna (fisiológica; < percentil 40)	Icterícia idiopática prolongada (leite materno; BT <13mg/dL)
Eritroblastose fetal isoimune:	Sepse viral ou bacteriana	Sepse
- doença Rh	Aumento circulação entero-hepática	Anormalidade funcional do trato gastrointestinal
- incompatibilidades por subgrupos	Desordens do metabolismo da bilirrubina:	Fibrose cística
- ABO (geralmente coombs -)	- polimorfismos da UGT1A1	Hipotireoidismo
<i>Prova direta de coombs negativa:</i>	- co-herança polimorfismo da UGT1A1 com deficiência de G6PD, incompatibilidade ABO, esferocitose	Colestase
- deficiência de G6PD	- Criegler-Najjar tipo I e II	Aleitamento materno
- defeito intrínscio da hemácea	- Síndrome de Gilbert	
- esferocitose	- outras	
- eliptocitose	Doenças metabólicas:	
- hemoglobinopatias	- galactosemia	
	- deficiência de alfa-1-anti-tripsina	
	- doenças de depósito	
	- outras	
	Hemorragias fechadas:	
	- cefalohematoma	

Fonte: adaptado de SMITHERMAN et al, 2006

Nos neonatos a termo, a icterícia é visualizada quando maior que 7 mg/dL (MARTIN e CLOHERTY 2004), mas muitas vezes, dependendo da etnia e do tipo de bilirrubina

aumentada, pode ser vista em níveis mais baixos. Para nível de BT igual ou menor que 5 mg/dL, a bilirrubina direta (BD) > 1 mg/dL é considerada anormal e, para valores maiores que 5 mg/dL, é alterada se houver nível maior que 20% da BT, devendo-se investigar outras causas como sepse, colestase, hipotireoidismo e galactosemia.

Nos neonatos o metabolismo da bilirrubina é ainda uma transição do estágio fetal para o adulto (MARUO et al., 1999); *in utero* o processo de conjugação é pouco desenvolvido, contudo é raro um bebê nascer clinicamente icterico, uma vez que a bilirrubina indireta é prontamente transferida para a mãe pela placenta, conjugada no fígado e depois excretada. Com a perda da placenta no nascimento, o fígado neonatal tem que lidar com o rápido aumento da carga de bilirrubina, e qualquer alteração na conjugação se tornará aparente (KAPLAN et al., 2001c). A enzima microsomal hepática UGT1A1 catalisa a conjugação da bilirrubina com o ácido glucurônico para formar o diglucuronídeo de bilirrubina, mais hidrossolúvel, que é excretado através do transportador dependente de adenosina trifosfato (ATP) através dos canalículos biliares. Essa é uma enzima limitante para a eliminação da bilirrubina (BURCHELL e HUME 1999).

BHUTANI et al (1999) classificaram a gravidade da bilirrubinemia de acordo com o percentil de BT para a hora de vida. Hiperbilirrubinemia é definida como qualquer valor acima do percentil 95, sendo **grave** quando no percentil 95 por hora de vida, **extrema** quando no percentil 99 ou igual a 25 mg/dL e **perigosa** quando acima do percentil 99,99, de 30 mg/dL ou ainda qualquer nível de BT associado a sinais clínicos de encefalopatia aguda.

Os níveis de bilirrubinas chegam ao máximo no terceiro e no quarto dia no bebê saudável a termo e vai reduzindo até tornar-se incomum na segunda semana. Considerava-se o valor de BT 12,9 mg/dL como limite para bilirrubinas na icterícia fisiológica, baseado no percentil 95 do *Collaborative Perinatal Project* e do *National Collaborative Study* (BHUTANI et al, 1999), mas neonatos com níveis até 15 mg/dL de BT (percentil 97)

pareciam não apresentar risco neurológico (KAPLAN e HAMMERMAN 1998). O percentil 95 na primeira semana de vida tornou-se mais elevado, e, em populações de neonatos alimentados no seio, é 15 - 17,5 mg/dL. Isso não significa, entretanto, que todos os neonatos com bilirrubinas séricas dentro desta faixa estejam seguros, devendo-se individualizar o risco e levar em conta outros fatores. Sinais fortemente sugestivos de hemólise, que é fator de risco maior, incluem icterícia precoce (dentro de 24h), assim como valores de bilirrubinas com aumento rápido, como  $> 0,25$  mg/dL/h ou 6 mg/dL/dia (KAPLAN e HAMMERMAN 2005b).

As diretrizes da AAP de 1994 recomendavam dosar a BT sérica quando a icterícia fosse considerada clinicamente significativa pelo julgamento médico. Já as diretrizes de 2004 recomendavam avaliações para icterícia a cada 8-12h, com uso de bilirrubina trans-cutânea ou coleta sérica se parecesse excessiva para a idade em horas ou se dúvidas na sua graduação. Em julho de 2004, o subcomitê em hiperbilirrubinemia da AAP publicou diretrizes de práticas clínicas no que tange ao manejo da icterícia em neonatos  $\geq 35$  semanas de idade gestacional ao nascimento (AAP 2004), sendo isso baseado na revisão das evidências disponíveis pela *United States Department of Health e Human Services' Agency for Health Care Research and Quality, New England Medical Center Evidence-based Practice Center* (IP et al., 2003).

A bilirrubina sérica total representa um equilíbrio entre produção e eliminação, primeiramente pela conjugação. Algumas condições associadas à redução da conjugação incluem prematuridade, polimorfismos da UGT1A1 como visto na Síndrome de Gilbert, ou as síndromes de Crigler-Najjar. Entretanto um bebê com hemólise importante pode não tornar-se icterício, dependendo da sua capacidade de conjugação (KAPLAN e HAMMERMAN 2005b). Em aproximadamente 50% dos casos não se sabem as causas da icterícia, sendo bem estudados diabete mérito materno, origem asiática, prematuridade, baixo peso, irmão com hiperbilirrubinemia, incompatibilidade ABO, infecção, céfalo-hematoma, asfixia, deficiência de G6PD (HUANG et al, 2004). Alguns fatores associados à BT  $> 20$  mg/dL foram a

amamentação, polimorfismos da UGT1A1 e/ou da OATP-2, relacionada com a captação hepática da bilirrubina indireta (WATCHKO 2005).

### **2.1.1. Icterícia Fisiológica**

A hiperbilirrubinemia não conjugada nos primeiros dias de vida é chamada de icterícia fisiológica porque os bebês geralmente tem atraso na maturação da expressão da UGT1A1, com atividade de conjugação hepática inferior a 1% do adulto, normalizando aos 3 meses (CHOWDURRY et al., 1995). Além disso a duração das hemácias é menor, com conseqüente produção de mais bilirrubina originada de hemoglobina fetal, sobrecarregando os processos hepáticos (MAISELS 1999).

### **2.1.2. Icterícia e Prematuridade**

Os chamados prematuros tardios (nascidos com 35 - 37 semanas de idade gestacional) são mais suscetíveis a hiperbilirrubinemia do que neonatos a termo. Menor idade gestacional e perda excessiva de peso aumentam o risco: há dificuldade na eliminação da bilirrubina por redução da captação hepática, diminuição da conjugação e aumento da circulação entero-hepática de bilirrubina, que ocorrem no prematuro de modo mais prevalente e grave do que no neonato a termo (WATCHKO 2005). Os glucoronídeos de bilirrubina estão presentes na bile fetal com 22 semanas de gestação e aumentam de concentração com a maturação da UGT1A1 (BLUMENTHAL et al., 1980). Os níveis da enzima não chegam a níveis adultos antes de 14 semanas de vida (KAWADE e ONISHI 1981).

Os prematuros são mais vulneráveis aos efeitos neuro-tóxicos deletérios das altas concentrações de bilirrubina, contudo alguns poderiam se beneficiar das propriedades antioxidantes das baixas concentrações (BHUTANI et al., 2004b). Além disso, a bilirrubina não conjugada é transportada ao fígado através da ligação a albumina, e em prematuros freqüentemente se encontra uma fração baixa da mesma, reduzindo a capacidade de ligação (KAPLAN e HAMMERMAN 2005a).

### **2.1.3. Icterícia e Leite Materno**

Em um terço dos bebês do *US Pilot Kernicterus Registry* não se encontrou outra causa para a doença além do aleitamento materno (JOHNSON et al., 2002).

A icterícia do leite materno é caracterizada pela hiperbilirrubinemia não conjugada prolongada em neonatos inicialmente saudáveis, relacionada à ingestão do leite materno, resultando em BT > 10 mg/dL (MARUO et al, 2000). É sabido que no leite materno há níveis elevados circulantes de atividade de lipase lipoprotéica, caracterizada pela atividade aumentada de  $\beta$ -glucuronidase e contendo 3- $\alpha$ -20- $\beta$ -pregnanediol. Além disso, a liberação dos ácidos graxos dos triglicerídeos, catalisada pela lipase, pode interferir com a captação hepática e conjugação da bilirrubina. O 3- $\alpha$ -20- $\beta$ -pregnanediol pode também inibir a conjugação de bilirrubinas, enquanto a  $\beta$ -glucuronidase induz aumento de absorção intestinal (HUANG et al., 2004).

A circulação entero-hepática de bilirrubina é aumentada no período neonatal pelo intestino do neonato ainda não ter sido colonizado pelas bactérias que convertem bilirrubina conjugada em urobilirrubinogênio e pela alta atividade de  $\beta$ -glucuronidase. Além disso, lactação inadequada e ingestão enteral pobre atuam na reabsorção intestinal de bilirrubina indireta, contribuindo para a origem da hiperbilirrubinemia grave. É importante, contudo,

ênfatizar que os benefícios do aleitamento superam de longe o risco relatado de hiperbilirrubinemia. O desenvolvimento de kernicterus em neonatos que mamam foi associado à ingestão inadequada e variáveis graus de desidratação e perda de peso (WATCHKO 2005). Sugere-se também interação com a variante polimórfica da UGT1A1 na hiperbilirrubinemia por leite materno (MARUO 2000, MONAGHAN et al, 1999).

#### **2.1.4. Icterícia e Incompatibilidade ABO**

A incompatibilidade sanguínea por ABO é a causa mais freqüente de doença hemolítica imune neonatal, onde mães de grupo tipo O têm títulos elevados de anticorpos anti-A ou anti-B naturais, mesmo antes de gravidez, ao contrário da isoimunização Rh, que requer mais exposições para aumentar os níveis de anticorpos. Como esses anticorpos são IgG, atravessam a placenta, ligam-se aos antígenos específicos nas hemácias A ou B dos neonatos e causam hemólise.

Esses anticorpos podem ser detectados pela prova de *Coombs* direta; um terço dos neonatos nascidos com tipagem sanguínea (TS) A ou B de mães tipo O podem ter o exame positivo. Nem todos com a prova positiva desenvolverão hemólise ou hiperbilirrubinemia, sugerindo que fatores adicionais, como conjugação hepática reduzida, podem mediar a hiperbilirrubinemia entre neonatos com hemólise aumentada. Alguns pacientes com teste negativo desenvolvem hiperbilirrubinemia e podem evidenciar sinais de doença hemolítica. É possível que alguns deles tenham uma quantidade de anticorpos insuficientes para serem detectados no teste, mas suficiente para uma hemólise leve; sugere-se haver interação com a mesma variante polimórfica da UGT1A1 encontrada na Síndrome de Gilbert (KAPLAN et al, 2000b).



A contagem de reticulócitos era freqüentemente usada como reflexo da hemólise, por ser considerada uma medida de compensação da medula óssea para anemia. Esta contagem pode ser inadequada em recém-nascidos porque depende da capacidade de resposta da medula óssea, do tempo entre o evento hemolítico e a resposta, e do efeito de causas não hemolíticas como a hipoxemia crônica estimulando reticulocitose (JAVIER et al, 2003). É difícil obter documentação laboratorial de graus leves de hemólise nos neonatos, pois é incomum - além de inespecífico e insensível - haver níveis de hemoglobina em queda, contagens altas de reticulócitos ou anormalidades no esfregaço periférico (NEWMAN e EASTERLING 1994 apud MAISELS e KRING 2006).

#### **2.1.5. Icterícia e algumas Considerações Genéticas**

É reconhecido que tanto fatores genéticos como ambientais contribuem para o desenvolvimento da hiperbilirrubinemia. Diversos autores citam a deficiência da G6PD (BEUTLER 1994, KAPLAN et al., 1997), variantes da enzima de conjugação hepática UGT1A1 (KAPLAN et al., 1997, BOSMA 2003, KADAKOL et al., 2000), e proteína transportadora de anion orgânica 2 (OATP-2) (HUANG et al., 2005, HUANG et al., 2004, WATCHKO 2005).

Mutações do gene da G6PD podem predispor a hiperbilirrubinemia neonatal através de um evento hemolítico agudo, com ou sem um desencadeante ambiental identificado, ou uma hemólise de baixo grau associada aos polimorfismos da UGT1A1. Variações na seqüência codificadora da UGT1A1 ou na região promotora podem levar a hiperbilirrubinemia neonatal por uma redução na conjugação hepática da bilirrubina. Os polimorfismos da OATP-2 podem limitar a captação da bilirrubina hepática.

### 2.1.5.1. Deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

A deficiência de G6PD, uma doença recessiva ligada ao cromossomo X, é descrita como a doença genética mais comum mundialmente, envolvendo de 2 a 400 milhões de pessoas (BEUTLER 1994, WENG et al., 2003, COMPRI et al., 2000).

O gene da G6PD está localizado na região telomérica do braço longo do cromossomo X (banda Xq28), perto dos genes da hemofilia, disceratose congênita e cegueira para cores (TRASK et al., 1991 apud CAPPELINI e FIORELI 2008). O gene foi clonado em 1986, é formado por 13 *exons* e 12 *introns* - com tamanho de 20kb e codifica 515 aminoácidos. Todas as mutações que resultam em deficiência da enzima ocorrem na região de códon; não há nenhuma na região promotora do gene (VULLIAMY et al., 1997). Mais de 140 mutações já foram identificadas, sugerindo heterogeneidade genética (BEUTLER 1991). A deficiência enzimática pode ser causada por redução no número de moléculas e/ou diferença estrutural, levando a mudança qualitativa.

A enzima G6PD, encontrada em todas as células, catalisa o primeiro passo na via da pentose fosfato, protegendo as células do dano oxidativo. Essa via gera poder de redução a todas as células sob forma de NADPH (forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), a qual permite às células preservar a forma reduzida da glutatona. Uma vez que as hemácias não têm mitocôndria, a via da pentose fosfato é sua única fonte de NADPH, portanto a defesa contra dano oxidativo é dependente da G6PD. A forma reduzida da glutatona é essencial para a redução de peróxido de hidrogênio e radicais de oxigênio, e a manutenção da hemoglobina e outras proteínas da hemácia no estado reduzido (LUZZATO et al., 2001). A principal alteração metabólica decorrente da ausência dessa enzima é hemólise, determinada pela precipitação da hemoglobina e formação de corpúsculos de Heinz, pela oxidação dos grupos tiol das enzimas citoplasmáticas e da membrana celular e,

secundariamente, pela oxidação de lipídeos da membrana eritrocitária. Portanto na ausência da G6PD as pessoas são mais suscetíveis a desenvolver anemia hemolítica aguda.

Devido à associação entre essa deficiência e episódios hemolíticos desencadeados por drogas, a hemólise aguda é freqüentemente implicada na patogênese da icterícia neonatal, mas essa icterícia aparece mesmo na ausência dos fatores desencadeantes de hemólise, encontrando-se produção aumentada de bilirrubinas tanto naqueles que desenvolvem icterícia quanto nos anictéricos (KAPLAN et al., 1998c). Outras causas genéticas menos comuns que podem predispor ao aumento da degradação da heme incluem defeitos de enzimas do metabolismo de hemácias como a deficiência de piruvato kinase, defeitos de membrana de hemácias como a esferocitose hereditária e hemoglobinopatias (WATCHKO 2000).

A variante genética B é o alelo selvagem. Estudo na África mostrou que além da B, a variante não deficiente A e a deficiente Africana (A<sup>-</sup>) são as mais comuns, ambas com freqüência de 20% no continente e em populações descendentes (VULLIAMY et al., 1991).

A deficiência de G6PD foi dividida em 5 classes pela OMS (WHO 1989):

- Classe I: Deficiência grave, associação com anemia hemolítica não-esferocítica crônica, 97 variantes, sendo apenas uma polimórfica; exemplos Andaloris, Campinas, Sumaré
- Classe II: Deficiência grave (1-10% atividade residual), associado com anemia hemolítica aguda, 122 variantes, sendo 37 polimórficas, exemplos Mediterrânea e União.
- Classe III: Deficiência moderada (10-60% de atividade residual), 103 variantes, sendo 22 polimórficas, exemplos Africana, Cantão e Seattle.
- Classe IV: Atividade normal (60-150%), 52 variantes, sendo 12 polimórficas, exemplo variante A
- Classe V: Atividade aumentada (>150%) duas variantes, nenhuma polimórfica, exemplo Verona.

As duas variantes polimórficas consideradas mais comuns da doença são a Mediterrânea (C563T) e a Africana (G202A, A376G). A primeira, de classe II, afeta descendentes de italianos, gregos, espanhóis, árabes, judeus curdos, podendo desencadear icterícia neonatal (às vezes grave), ou hemólise na presença de drogas oxidativas. A variante africana é de classe III, originária da África, e também pode desencadear icterícia neonatal e hemólise com oxidantes (FRANK 2005).

Nas regiões tropicais a variante G6PD A<sup>-</sup> responde por 90% da deficiência. Essa variante é freqüente nas Américas, na Índia e áreas onde pessoas de origem africana estão presentes. Sobretudo é bastante prevalente na Itália, Ilhas Canárias, Espanha e Portugal, assim como no Oriente Médio - Irã, Egito e Líbano (CAPPELLINI e FIORELLI 2008). Outras variantes polimórficas nas regiões tropicais são a Seattle e a União, descritas no Sul da Itália, Sardenha, Grécia e Ilhas Canárias, Algéria, Alemanha, Irlanda. A União também foi reportada na China.

Nas meninas heterozigotas há duas populações celulares - uma com enzima deficiente, outra normal. Devido à inativação do X ser aleatória, ou um ou o outro clone é selecionado preferencialmente, podendo haver vários fenótipos e as hemácias exibindo atividade normal, intermediária, ou grosseiramente deficiente (KAPLAN et al., 1999). De acordo com a OMS, as heterozigotas têm atividade enzimática suficiente para proteger dos perigos da deficiência enzimática.

É estimado que 7,5% da população sejam portadores de um ou dois genes para a condição (BEUTLER 1994); por ser ligada ao X, a freqüência de deficiência é expressa como a proporção de homens hemizigotos. A OMS (WHO 1989) sugeria triagem em áreas onde a prevalência fosse de 3 - 5% em meninos. O teste seletivo baseado na ascendência dos pais é uma opção, e deve-se investigar a deficiência em casos de icterícia não explicada (KAPLAN e ABRAMOV 1992). Deve ser ressaltado que a triagem de rotina dos neonatos de risco pode

não identificar todos os pacientes deficientes: os masculinos serão identificados, mas muitas meninas heterozigotas serão perdidas (KAPLAN et al., 2001b).

A infecção é a causa mais comum de hemólise aguda nas pessoas com a deficiência de G6PD. Leucócitos podem liberar oxidantes durante a fagocitose que causam estresse oxidativo aos eritrócitos, contudo esta explicação sozinha não serve para a variedade de infecções com hemólise em deficientes da G6PD (FRANK 2005).

A deficiência de G6PD foi listada entre os 10 fatores mais importantes que contribuem com icterícia neonatal não hemolítica (KAPLAN e HAMMERMAN 2002), correspondendo a 22% dos casos no *US Pilot Kernicterus Registry* (BHUTANI et al, 2004a). A icterícia pela deficiência de G6PD difere da incompatibilidade Rh em alguns aspectos: raramente presente ao nascimento, com pico de incidência entre 2 e 3 dias, presença de mais icterícia do que anemia (essa última raramente significativa); de fato se sobrepõe a icterícia fisiológica. Por outro lado, pode ser muito grave em alguns bebês, especialmente em associação a prematuridade, infecção e fatores ambientais como uso de bolinhas de naftalina nas roupas, podendo levar a kernicterus (LUZZATTO 2006).

Uma vez que as hemácias não têm síntese de proteínas, a atividade da G6PD, como de todas as outras enzimas da célula, reduz gradualmente durante o envelhecimento; os reticulócitos tem 5 vezes mais atividade que 10% do resto das células velhas. Assim, durante um ataque hemolítico, as células velhas serão seletivamente destruídas. Com algumas variantes da G6PD isso é tão marcado que pacientes testados em período pós-hemolítico podem ser erroneamente classificados como normais. Dificuldades também são encontradas nos neonatos, que tem população importante de hemácias jovens (CAPPELLINI e FIORELLI 2008). Foi demonstrado que hematócrito e hemoglobina em queda, acompanhados de elevação dos reticulócitos, são às vezes encontrados em neonatos com deficiência de G6PD (BEUTLER 1994, KAPLAN e HAMMERMAN, 2002).

KAPLAN et al em 2000a e 2001a encontraram que um terço de todos os meninos recém-nascidos judeus sefarditas com icterícia neonatal teriam a deficiência de G6PD – que seria incomum nas meninas ictericas. Em neonatos afro-americanos que foram rastreados por ensaio enzimático, 12,8% tinham deficiência de G6PD e risco 3,27 maior de hiperbilirrubinemia em relação aos controles (KAPLAN et al., 2004).

Quanto à deficiência no Brasil, estudo em homens mostrou prevalência em afro-descendentes de 10% e em euro-descendentes de SP e RS, 1 - 3% (COMPRI et al., 2000). Foram demonstradas ausência da variante Mediterrânea e presença quase que exclusiva de mutação A<sup>-</sup> mesmo nos euro-descendentes. Nos anos 80, valores perto de 7% no Brasil eram sugeridos pela literatura (WEIMER et al., 1981).

Trabalhos no Sul do Brasil mostraram a presença de outras variantes além da Africana e da Mediterrânea, em frequência alélica mínima, como a Minas Gerais, a Porto Alegre, a Seattle, a São Borja, a Guaíba, a Farroupilha e a Anaheim (WEIMER et al, 1998). Recentemente foi estimada uma deficiência combinada de G6PD de 8% no Rio Grande do Sul, com pesquisa das mutações Africana e Mediterrânea (CASTRO et al, 2006).

#### 2.1.5.2. As variantes polimórficas da Uridina-difosfato-Glucuronosil-Transferase 1A1

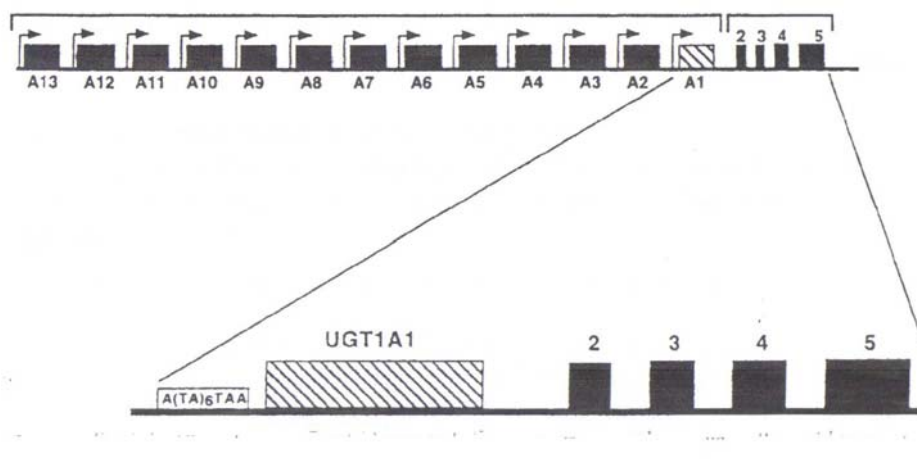
A síndrome de Gilbert foi descrita no início do século XX (GILBERT 1901 apud FACCHINI e ASSIS 2005) e é uma hiperbilirrubinemia benigna não conjugada que ocorre na ausência de doença hepática estrutural ou hemólise, caracterizada por episódios de icterícia leve intermitente. É a doença hepática herdada mais comum ocorrendo em 2-12% da população adulta, com deficiência na conjugação da bilirrubina, sendo reportadas mudanças na taxa de produção de bilirrubina, na produção hepática de heme e na captação de bilirrubina em alguns pacientes. A síndrome é benigna e tão prevalente que pode ser apropriado pensar

nela como uma variante genética da normalidade, o limite superior de uma curva de distribuição normal (MONAGHAN et al., 1996).

A conjugação hepática é aproximadamente 30% do normal em pacientes com Gilbert (BOSMA et al., 1995). É geralmente descoberto na vida adulta em exames de sangue de rotina ou jejum associado à cirurgia ou doença corrente; o diagnóstico se baseia num aumento leve consistente de bilirrubinas como única anormalidade em testes hepáticos e/ou icterícia intermitente e pode ser confirmado por um aumento de bilirrubinas de 1,2 mg/dL após uma dieta de 24h.

Embora a síndrome seja autossômica recessiva, muitas pessoas não têm uma história familiar clara. Mutação causando ausência da glucuronização hepática resulta em Criegler-Najjar tipo I, enquanto a mutação causando deficiência grave é a II.

A UGT1A1 é codificada pelos exons 1A1, 2, 3, 4 e 5 no locus localizado no cromossomo 2q37. Além do exon A1, o locus codifica mais 12 exons variáveis com outras isoformas de UGT e um agrupamento de exon 2-5 que é comum a todas isoformas (CLARKE et al., 1993). A expressão em humanos é modulada de uma maneira evolutiva, sendo que a atividade é 0,1% dos níveis adultos de 17 - 30 semanas de gestação, aumenta para 1% quando entre 30 e 40 semanas e atinge valores adultos com 14 semanas de idade pós-natal (KAWADE e ONISHI 1981).



**Figura 1:** Estrutura do gene da Uridina-difosfato-Glucuronosil-Transferase (UGT)

Genótipo polimórfico da UGT1A1 da síndrome de Gilbert é caracterizado por uma variante na seqüência do promotor da enzima, que contem a adição de um par de bases TA (timina e adenina) no elemento TATAA promotor do gene, originando o 7ATA7TAA em vez do usual 6ATA6TAA. O elemento TATAA é o local de ligação para o fator de transcrição IID, importante na iniciação do processo. Esse TA extra danifica a transcrição da mensagem e promove redução da atividade enzimática. Sujeitos com síndrome de Gilbert são homozigotos para esse promotor variante, o que determina um marcador exclusivo para a doença (WATCHKO 2005). A presença do TATAA longo é correlacionada com níveis elevados de bilirrubina em indivíduos normais e saudáveis, e nem todos os homozigotos apresentam clínica (BOSMA et al., 1995). O genótipo selvagem é chamado de (TA)6/(TA)6 e o variante, (TA)7/(TA)7 ou UGT1A1\*28 (BOSMA 2003).

MONAGHAN et al (1996) identificou indivíduos adultos escoceses com genótipo (TA)7/(TA)7 como tendo maior concentração de bilirrubinas em relação a heterozigotos ou (TA)6/(TA)6. A prevalência do genótipo variante nesta população foi 10-13%. BOSMA et al (1995) calculou uma freqüência para o alelo (TA)7 de 40%, prevalência de homozigose em 16%, ressaltando que apenas 3-10% da população teria diagnóstico clínico da doença. KADAKOL et al (2001) calcularam a freqüência em 30% resultando em 9% da população sendo homozigota para a variante polimórfica.

BANCROFT et al (1998) foram os primeiros a confirmar uma associação entre síndrome de Gilbert, como indexada pela marcação da variante do promotor, e icterícia neonatal. Encontraram que os homozigotos para (TA)7 têm maior aumento no índice de icterícia trans-cutânea nos dois primeiros dias de vida que homozigotos ou heterozigotos, mas a contribuição desse polimorfismo para graus extremos de icterícia neonatal permanecia desconhecido.



Estudo de MONAGHAN et al (1999) mostrou que 31% dos neonatos aleitados ao seio com icterícia prolongada tinham genótipo (TA)<sub>7</sub>/(TA)<sub>7</sub>, diferente daqueles com icterícia aguda (que foram 6%) e da população adulta controle (que foi 12%). Os autores sugerem triagem para a mutação em todos neonatos de etnia africana, norte-americana e européia que tenham icterícia prolongada.

Foram identificadas outras 3 variantes polimórficas associadas com a hiperbilirrubinemia: pessoas com o genótipo (TA)<sub>5</sub>/(TA)<sub>6</sub> teriam elevação leve da bilirrubina, aquelas com (TA)<sub>5</sub>/(TA)<sub>7</sub> mostrariam icterícia neonatal prolongada, e naquelas com o genótipo (TA)<sub>7</sub>/(TA)<sub>8</sub> haveria valores mais graves - assim, a inserção ou deleção da repetição TA no promotor TATA é associada com a hiperbilirrubinemia (BURCHELL e HUME 1999).

MARUO et al (1999) mostrou que 56% dos neonatos com hiperbilirrubinemia não fisiológica em Shiga tinham mutação de transição idêntica no nucleotídeo 211 no éxon 1, que muda o códon GGA para AGA, com substituição da glicina por arginina na posição 71 da proteína (G71R). Nenhum desses pacientes tinha a mutação no promotor TATA. Estudo em Taiwan com deficientes de G6PD mostrou que essa alteração de códon 211 G → A em homozigose é um fator aditivo para hiperbilirrubinemia neonatal (HUANG et al, 2002).

A origem étnica dos brasileiros é bastante heterogênea, compreendendo imigrantes da Europa, África, Ásia, grupos ameríndios; o resultado é uma complexa mistura de raças que é bem diferente de populações estudadas anteriormente. Estudo brasileiro mostrou frequência do (TA)<sub>7</sub> de 32,4% na população branca, 32,8% em índios Parakana, enquanto que em negros era 40,7%. Alelos (TA)<sub>5</sub> e (TA)<sub>8</sub> estavam presentes na população branca, sugerindo miscigenação (FERTRIN et al., 2002).

A associação do polimorfismo da UGT1A1 com outros fatores de risco é bem descrita na etiologia da hiperbilirrubinemia grave, como no caso da deficiência de G6PD, com redução da capacidade de conjugação (KAPLAN et al., 1997). Em outro estudo a interação predita

entre G6PD e o polimorfismo não foi aparente no primeiro momento, parecendo haver uma progressão relacionada ao tempo na interação genética (KAPLAN et al, 2001b). Alguns pesquisadores não encontraram associação da icterícia em deficiência de G6PD com as variantes da UGT (WENG et al, 2003).

O estudo clássico de KAPLAN et al (1997) mostrou 22,7% dos neonatos judeus sefarditas com deficiência de G6PD desenvolvendo hiperbilirrubinemia, e 9,2% dos controles, sendo a frequência alélica da variante da UGT1A1 similar em ambos grupos. Tanto incidência quanto risco relativo para desenvolver a hiperbilirrubinemia nos neonatos deficientes aumentaram de maneira dose-dependente, com a adição de um ou dois alelos da variante da UGT1A1. Logo a presença da variante é ativamente envolvida na patogênese da hiperbilirrubinemia neonatal associada à deficiência de G6PD e nem a deficiência sozinha, nem a variante alélica sozinha são suficientes para aumento de risco.

Em um banco de DNA nos Estados Unidos (LIN et al, 2008), com descendentes de todas maiores regiões do mundo, encontrou-se frequência alélica de 33,9% da variante (TA)<sub>7</sub>, com 12,4% homozigotos. A co-expressão das variantes da UGT1A1 com outros genes foi observada da seguinte forma: cerca de 70% dos indivíduos homozigotos para a (TA)<sub>7</sub> eram também homozigotos ou heterozigotos para o polimorfismo OATP1B1 A388G; aproximadamente 50% dos indivíduos G6PD A- co-expressaram a variante (TA)<sub>7</sub> em pelo menos 1 alelo. Sugere-se que variantes gênicas que limitam a conjugação da bilirrubina podem ser importantes moduladores do risco de hiperbilirrubinemia neonatal, particularmente quando acoplado a outras condições icterogênicas.

### 2.1.6. Kernicterus

A AAP (2004) recomenda que o termo **encefalopatia aguda por hiperbilirrubinemia** seja usado para descrever as manifestações agudas da toxicidade vistas nas primeiras semanas após o nascimento, e que *Kernicterus* seja reservado para as seqüelas clínicas crônicas e permanentes da disfunção neurológica induzida pela bilirrubina (*BIND*).

Essa doença era mais comum até os anos 70 pela isoimunização Rh; atualmente, embora seja rara, tem mortalidade de 10% e 70% de morbidade em longo prazo (BHUTANI et al., 2004a). Técnicas terapêuticas incluindo exsanguineotransfusão, fototerapia e imunoglobulina quase eliminaram essa condição; durante 2 décadas quase não se viu mais a doença com a administração de anti-Rhogam as mães. Recentemente, alta hospitalar precoce associada a aleitamento materno aumentaram a taxa de *kernicterus* prevenível (IP et al, 2004). Nem a hiperbilirrubinemia, nem o *kernicterus* são doenças notificadas, portanto não há fontes confiáveis de informação com estimativas anuais; muitos casos na América do Norte foram informados em um registro de *kernicterus* informal (JOHNSON et al, 2002).

A bilirrubina tem predileção por áreas específicas do cérebro como os núcleos dos nervos cranianos coclear, vestibular e oculomotor, núcleos da formação reticular da ponte, os núcleos olivares inferiores. Além disso, núcleos cerebelares - principalmente o denteado, os gânglios da base, o hipocampo, a substancia negra e vérmis cerebelar (AMIN 2004).

A encefalopatia aguda, na fase 1, se caracteriza por sucção pobre, letargia, estupor, hipotonia e convulsões em um neonato com icterícia evidente. Na fase 2, que inicia no meio da primeira semana, episódios de hipertonia incluindo espasmos dos músculos extensores, arqueamento das costas e pescoço e opistótonus podem alternar com hipotonia. Febre e choro agudo ocorrem freqüentemente, além da limitação do olhar para cima (sinal do sol poente). O aspecto característico da fase 3, começando após a primeira semana, é hipertonia. Isso tudo

pode ser acompanhado de respostas auditivas evocadas anormais ou ausentes, junto com achados característicos de ressonância nuclear magnética incluindo sinal hiperintenso no globo pálido. Sinais de dano avançado da fase aguda (quase que irreversível nesse momento) incluem cessação da alimentação, apnéia, extremos de letargia, choro inconsolável, opistótonus, irritabilidade, às vezes convulsões, pedalagem, febre, coma e morte (KAPLAN e HAMMERMAN 2005b, BHUTANI et al., 2004a, JOHNSON et al., 2002).

O quadro clássico do *kernicterus* é uma tétrede englobando anormalidades extrapiramidais: paralisia cerebral atetóide e espasticidade, surdez ou redução da audição, lesão na movimentação ocular, displasia do esmalte dentário. Embora algumas crianças possam ter retardo mental leve e distúrbios cognitivos sutis, em muitos casos o intelecto é normal.

Investigações de neurodesenvolvimento do final dos anos 60 e início dos 70 sugerem que graus moderados de hiperbilirrubinemia de 15– 24 mg/dL não teriam implicações maiores na audição ou dano motor em neonatos termo saudáveis (WATCHKO 2005). Muitos estudos demonstraram mudanças transitórias nos potenciais evocados de tronco, padrões de comportamento e de choro associados com níveis de 15 - 25 mg/dL; isso desapareceria com a normalização dos níveis com ou sem tratamento (AAP 2004).

#### **2.1.7. Manejo da icterícia:**

A retirada de sangue para dosagem de bilirrubina total é dolorosa, pode aumentar o risco de infecção e de perda de sangue especialmente no prematuro; para evitar isso, métodos de medida trans-cutânea foram desenvolvidos. Os bilirrubinômetros de primeira geração são limitados, pois a acurácia é dependente da idade gestacional, pigmentação da pele e luz ambiental (DE LUCA et al., 2007). Os aparelhos modernos são mais acurados, pois corrigem a influência de pigmentos cutâneos outros que a bilirrubina (RUBALTELLI et al., 2001).

As diretrizes para manejo da hiperbilirrubinemia em neonatos maiores de 35 semanas recomendam promover o aleitamento materno, estabelecer protocolos de enfermagem para identificação precoce da icterícia, medir bilirrubina em ictericos nas primeiras 24h de vida – reconhecendo que a estimativa visual leva a erros, principalmente em afro-descendentes, interpretar os níveis de bilirrubina de acordo com a idade em horas, reconhecer que aqueles com menos de 38 semanas apresentam maior risco – principalmente se aleitados ao seio. Deve-se promover avaliação sistemática antes da alta, fornecendo informação verbal e escrita aos pais sobre icterícia neonatal e fatores de risco, e tratar, quando indicado, com fototerapia ou exsanguineotransfusão (AAP 2004).

A redução do tempo de hospitalização é um objetivo buscado por médicos e administradores. A AAP (1994) recomendou que os neonatos não necessitam ser mantidos no hospital para repetir coleta após a suspensão da fototerapia. Um estudo demonstrou que essa medida é necessária apenas nos casos de doença hemolítica importante e naqueles que exigiram a fototerapia precocemente (MAISELS e KRING 2002).

A fototerapia tem sido bastante usada no tratamento da hiperbilirrubinemia neonatal, é segura e efetiva, mas são reconhecidos efeitos adversos tais como: perda aumentada de fluidos, aumento na frequência das evacuações, perda excessiva de calor, rashes cutâneos e hipocalcemia, além da separação da mãe (MARTIN e CLOHERTY 2004). Tem-se demonstrado que a fototerapia é um estresse fotodinâmico, podendo induzir peroxidação lipídica e dano oxidativo, com desenvolvimento de doenças graves no recém-nascido (GATHWALA e SHARMA 2000, AYCICEK e EREL 2007).

A diarreia na fototerapia ocorreria por deficiência de lactase intestinal temporária por dano na mucosa, redução no tempo de trânsito, secreção ativa de água e eletrólitos, efeito direto da bilirrubina na barreira epitelial com passagem de macromoléculas (INDRIO et al, 2007).

Como a icterícia neonatal resulta de um descompasso entre produção de bilirrubina e eliminação, a inibição da heme-oxidase pode ser utilizada no manejo por ser a enzima que atua na produção da bilirrubina. Inibidores da heme-oxidase (HO) como a Sn-mesoporfirina foram usados em ensaios clínicos na prevenção da bilirrubinemia grave em incompatibilidade ABO, prematuridade e deficiência de G6PD; foi usado também no manejo da hiperbilirrubinemia instalada em neonatos de termo e prematuros tardios com hiperbilirrubinemia não específica (KAPPAS et al, 2001). Essa droga ainda exige estudos e não é recomendada pela AAP (2004).

Morte associada com a exsanguineotransfusão foi descrita em 3 para cada 1000 procedimentos e morbidade significativa (apnéia, bradicardia, cianose, vasoespasma, trombose, enterocolite necrotizante) ocorreu em 5% de casos (AAP 2004). Assim, em neonatos a termo parece impossível fixar um nível de bilirrubina crítico no qual exsanguineotransfusão deva ser realizada; é razoável restringir àqueles que mostram hiperbilirrubinemia superior a 25 mg/dL e, no caso de falha da fototerapia, em níveis mais baixos, já que há tanto risco na realização do procedimento quanto de *kernicterus* (WATCHKO 2005).

### **3. Justificativa**

A icterícia, apesar de freqüente, é fonte de preocupação para os pais. Dos muitos pacientes ictericos, apenas uma fração necessitará investigação ou tratamento, mas torna-se uma das principais causas de internação em unidades de neonatologia. É um dos fatores que contribui para a separação precoce mãe – bebê, prejudicando o estabelecimento de vínculo e da amamentação.

Parte das ictericias não-fisiológicas é atribuída à incompatibilidade sangüínea e à perda de peso, mas muitos casos permanecem sem causa definida, podendo estes tratar-se de pacientes com deficiência de G6PD ou ainda neonatos com as variantes polimórficas da UGT1A1. Embora o risco de hiperbilirrubinemia grave seja baixo em relação à alta prevalência de internações, a morbidade da encefalopatia hiperbilirrubinêmica é significativa. Maior atenção da equipe médica para crianças de risco possibilitaria identificação adequada da icterícia grave, evitando situações de pacientes receberem alta hospitalar precoce e necessitarem retornar para tratamento.

Com o melhor conhecimento dos fatores responsáveis pela icterícia, através do estudo das suas prevalências, poderemos ter informações mais objetivas para manejar o problema. Além disso, poderemos planejar a investigação desses pacientes visando a prevenir a encefalopatia hiperbilirrubinêmica.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo Geral**

Estimar a frequência da deficiência de G6PD e/ou das variantes polimórficas da UGT1A1 como fatores de risco para hiperbilirrubinemia grave em neonatos com mais de 35 semanas de idade gestacional e peso superior a 2000g, em uma Unidade Neonatal do Sul do Brasil.

### **4.2. Objetivos Específicos**

- Estimar o risco de hiperbilirrubinemia em pacientes com deficiência de G6PD em relação aos controles;
- Estimar o risco de hiperbilirrubinemia em pacientes com variantes polimórficas da UGT1A1 em relação aos controles;
- Estimar a prevalência das mutações mais comuns da G6PD nessa amostra, bem como estudar possíveis correlações com outros fatores de risco;
- Estimar a prevalência das variantes polimórficas nessa amostra, bem como buscar correlações com outros fatores de risco;
- Descrever uma amostra de recém-nascidos internados para tratamento de icterícia neonatal e compará-los com os outros bebês que não tenham a mesma condição;
- Identificar outros fatores de risco potenciais para hiperbilirrubinemia, tais como incompatibilidade ABO e aleitamento materno;
- Estimar o risco de ocorrerem casos de maior morbidade (encefalopatia) nos pacientes icterícos com deficiência de G6PD e/ou variante polimórfica da UGT1A1;



## **5. Casuística**

### **5.1. Delineamento**

Foi realizado um estudo prospectivo e observacional de casos e controles.

### **5.2. População**

Foram incluídos no estudo todos os recém-nascidos admitidos para fototerapia no Serviço de Neonatologia do HCPA, com mais de 35 semanas de idade gestacional e peso superior a 2000g, entre março e dezembro de 2007, os quais foram avaliados em relação à presença de deficiência de G6PD e polimorfismos da UGT1A1.

### **5.3. Critérios de Exclusão**

Foram excluídos pacientes que internassem para investigação de colestase neonatal e aqueles cuja causa para icterícia fosse céfalo-hematoma ou sepse.

### **5.4. Local**

O Serviço de Neonatologia do HCPA tem capacidade para admitir até 47 recém-nascidos, atendendo desde casos de menor complexidade como a grande parte das icterícias neonatais até bebês com necessidade de suporte ventilatório, entre outras patologias que exigem alta capacidade tecnológica e de recursos humanos. É centro de referência para cuidado de prematuros de alto risco, neonatos em investigação genética ou de outras especialidades pediátricas. Os pacientes são divididos em 5 equipes chefiadas por professores de pediatria e avaliados diariamente por acadêmicos e internos da Faculdade de Medicina da UFRGS, médicos residentes de Pediatria e Neonatologia, supervisionados pelos professores e por médicos plantonistas neonatologistas. Faz parte deste complexo o setor de alojamento conjunto, com capacidade de até 40 duplas de mãe e bebê, com recém-nascidos normais.

Esses recém-nascidos normais são avaliados diariamente por internos da faculdade e um médico residente de Pediatria, supervisionados por um professor ou médicos contratados preceptores. Conforme indicado pela estimativa visual e/ou uso de bilirrubinômetro Minolta®, são solicitados exames de laboratório para confirmar ou excluir necessidade de internação em unidade de neonatologia para tratamento de icterícia por fototerapia. Os resultados são interpretados pelo médico plantonista e, conforme o caso, se interna o bebê para fototerapia. Os pacientes são então avaliados diariamente nas equipes, solicitando-se exames e investigações adicionais conforme rotinas estabelecidas no serviço.

### **5.5. Logística**

Os pacientes elegíveis foram avaliados pela investigadora ou por acadêmico da Faculdade de Medicina da UFRGS treinado pela mesma que, após a verificação dos critérios de inclusão e exclusão, realizava entrevista com pais e/ou responsáveis pelos pacientes para obtenção do consentimento para participação no estudo. Através do prontuário foram obtidas as informações sobre gestação materna, dados de sala de parto, tipagem sanguínea, aleitamento materno, perda de peso. No caso de pacientes admitidos da emergência pediátrica, esses dados foram revisados por nota de alta do hospital de nascimento e dados do cartão da criança e carteira de gestante da mãe.

Foi solicitado ao setor de Hematologia ou Banco de Sangue o sangue excedente das coletas sofridas pelo recém-nascido ou da coleta de cordão umbilical (rotina em filhos de mãe com sangue tipo O ou Rh negativo neste hospital), para a quantificação da atividade da G6PD e extração de DNA para realização de PCR. Estas amostras (0,5 a 1,0ml) foram então armazenadas na Faculdade de Farmácia da UFRGS, onde foram realizados os procedimentos por acadêmicas dessa faculdade supervisionadas pela co-orientadora.

Para cada paciente internado foi escolhido um neonato controle no alojamento conjunto ou na neonatologia, que tivesse mais de 35 semanas de idade gestacional, com peso de nascimento superior a 2000g, sem níveis de bilirrubina suficientes para fototerapia, conforme estimativa visual, trans-cutânea ou laboratorial pela equipe assistente. A escolha era aleatória, mas tinha-se o cuidado de incluir apenas recém-nascidos com coleta de sangue para alguma outra razão, sem coletas exclusivas para o estudo. A mesma rotina de aplicação de consentimento informado era seguida.

Essas amostras eram então quantificadas para atividade enzimática da G6PD e naqueles com atividade enzimática inferior a 8 U/gHb foi realizada a investigação da mutação 202 como triagem por PCR, conforme métodos descritos a seguir. Em alguns pacientes a extração de DNA não foi possível devido a material insuficiente ou inadequado; nos demais casos foi realizada a PCR para polimorfismos na região promotora da UGT1A1.

Os pacientes foram revisados até a alta e posteriormente a mesma, a procura de desfechos como tempo de internação e fototerapia, necessidade de re-internação, re-intervenções ou exsangüineotransfusão, alterações neurológicas e óbito. Os controles também foram acompanhados via dados de prontuário e contato telefônico, a fim de verificar se esses não desenvolveram icterícia.

As variáveis procuradas foram a presença e nível de deficiência de G6PD, os tipos de mutação apresentada e a presença dos polimorfismos da UGT1A1. Registrou-se também idade gestacional, sexo, peso ao nascimento e, no caso de internação para a fototerapia, tipagem sangüínea, dados de pré-natal materno, idade em horas na internação, perda percentual de peso, níveis de bilirrubinas e hemoglobinas, se alimentação por leite materno ou fórmula, se precisou interromper amamentação e procedência do paciente (alojamento conjunto ou paciente externo).

## **5.6. Métodos:**

### **5.6.1. Determinação da atividade enzimática da G6PD**

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os indivíduos se classificam de acordo com a atividade da G6PD em 3 grupos: deficientes se atividade  $< 2$  U/g Hb, moderadamente deficientes se entre  $3.5 - 8.7$  U/gHb e normais se  $>8.8$  U/gHb (WHO 1989).

Para a dosagem da atividade enzimática da G6PD pelo método quantitativo utilizou-se o kit Neolisa G-6-PD (Interscientific Corporation, 2700 North 29<sup>th</sup> Avenue – Suite 220, Hollywood, FL - USA Cat. Nr 3570-050), que emprega o procedimento de Normalização da Hemoglobina.

O kit selecionado oferece uma medida rápida da atividade da G6PD contida na amostra, expressando os resultados diretamente em unidades por grama de hemoglobina (U/gHb). Foram utilizados controles normal, intermediário e deficiente fornecidos pela empresa Intercientífica. Foram pipetados  $5\mu\text{L}$  de amostra de sangue total e controles em microplacas de microtitulação com fundo em “U”. A estes foram adicionados  $75\mu\text{L}$  de reagente de eluição e agitados em um agitador orbital por 20 minutos. Foram transferidos  $15\mu\text{L}$  do eluído para outra microplaca de fundo chato juntamente com  $75\mu\text{L}$  de reagente de trabalho e agitados durante 10 minutos. Uma primeira leitura em  $405\text{nm}$  foi realizada para medida da concentração de hemoglobina das amostras e dos controles. Posteriormente foi adicionado  $100\mu\text{L}$  do reagente de cor, e efetuada uma segunda leitura, em  $550\text{nm}$ , em modo cinético. As alterações na densidade óptica por minuto foram registradas em 15 medidas tomadas no intervalo de 1 minuto. O método considera normal valor médio =  $15,8$  Ug/Hb, intermediário =  $4,7$  Ug/Hb e deficiente =  $1,3$  Ug/Hb, sendo utilizado o valor  $8$  Ug/Hb como ponto de corte, conforme conclusões de estudo prévio (Castro et al, 2007).

### 5.6.2. Extração de DNA

O DNA genômico foi purificado do sangue total pelo procedimento adaptado, descrito por LAHIRI e NURNBERGER (1991). O sangue total (0,5 - 1mL) foi hemolisado em tubo Falcon (15mL) com auxílio de 300uL do detergente Nonidet P-40 (Sigma, Catalogo N° H5141) em tampão fosfato (TKM 1 - 10mM Tris-HCl pH 7,6; 10mM KCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 2mM EDTA). Após centrifugar a 3200 rpm, 8 minutos e lavar o pellet 2x com 10ml de TKM1, adicionou-se 800µl de TKM2 (10mM Tris-HCl pH 7,6; 10mM KCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 2mM EDTA; 0,4M NaCl) e 50µl de SDS 10% (dodecil sulfato de sódio). A amostra permaneceu em banho-maria a 55°C por 1h. As proteínas foram precipitadas com 300µl de NaCl 6M e centrifugadas a 12000 rpm durante 5 minutos. O DNA presente no sobrenadante foi, então, precipitado em 2 volumes de etanol absoluto. O DNA seco a temperatura ambiente foi solubilizado em TE e mantido em freezer a -20°C.

### 5.6.3. Genotipagem G6PD

Foram analisadas três mutações mais frequentes na região do sul do Brasil: a A- (G202A, A376G) e a Mediterrânea (C563T). As regiões analisadas foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) conforme descrito na Tabela 2 e na Tabela 3. A PCR foi realizada em um volume final de 25µL com 100ng de DNA genômico, 1x tampão 500mM KCl (pH8.4), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM de dNTP, 20pmol de cada primer e 1 U Taq DNA polimerase - todos os reagentes foram adquiridos a partir de Invitrogen. Para todas as PCRs, 10% DMSO (Merck) foi adicionado para aumentar a especificidade. A reação foi realizada em um termociclador (Eppendorf Personal Cycler). Finalmente, 10µL do produto da PCR foram analisados em gel de agarose e os fragmentos amplificados foram digeridos *overnight* a 37°C utilizando as endonucleases (BioLabs) conforme descritos da Tabela 4.

**Tabela 2:** Protocolos da PCR e condições de migração para cada sistema investigado.

Região	Água	Tampão	DNTPs	Primers	Taq	DNA	Ciclos	Programas
		PCR-10x	1,25mM	1,25mM	5U/ml	100ng/ml		
								94°C
Éxon 4	16,5ml	2,5ml	2,0ml	1,5ml	0,2ml	1	35	56°C 72°C
								94°C
Éxon 5	16,5ml	2,5ml	2,0ml	1,5ml	0,2ml	1	35	63°C 72°C
								94°C
Éxon 6	16,5ml	2,5ml	2,0ml	1,5ml	0,2ml	1	35	60°C 72°C

**Tabela 3:** Seqüências dos iniciadores e tamanho dos fragmentos amplificados.

Denominação	Seqüências dos iniciadores	Fragmento	Referências
dos primers		Amplificado (pb)	
	5' GTG GCT GTT CCG GGA TGG CCT TCT G 3'		
202	5' CTT GAA GAA GGG CTC ACT CTG TTT G 3'	109	Castro <i>et al.</i> , 2006
	5' CTG TCTGTG TGT CTG TCT GTC C 3'		Vulliamy <i>et al.</i> , 1991
FOK I	5' GGC CAG CCT GGC AGG CGG GAA GG 3'	295	Cittadella <i>et al.</i> , 1997
	5' ACT CCC CGA AGA GGG GTT CAA GG 3'		Vulliamy <i>et al.</i> , 1991
Mbo II	5' CCA GCC TCC CAG GAG AGA GGA AG 3'	547	Cittadella <i>et al.</i> , 1997

**Tabela 4:** Enzimas de restrição e condições de digestão.

Regiões Digeridas	Mutações Investigadas	Enzimas	Água		Enzima	PCR	T¶	Fragmentos Resultantes (Pb)
Éxon 4	202G→A	Nla III	3,5ml	1,0ml	10U	5,0ml	37°C	63-46
Éxon5	376A→G	Fok I	7,0ml	2,0ml	4U	10,0ml	37°C	154-141
Éxon 6	563C→T	Mbo II	7,0ml	2,0ml	4U	10,0ml	37°C	277-119-100

¶ Temperatura de anelamento

#### 5.6.4. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA genômico obtido foi determinada por densidade óptica em espectrofotômetro BioPhotometer (Eppendorf, catalogo N° 6131000.012) em 260nm e a pureza pela relação da Absorbância 260/Absorbância 280 (A260/A280, equivalente a DNA/taxa de proteína). O procedimento possibilitou a obtenção de amostras com DNA nas concentrações de 20ng/μL, padronizada para técnica de amplificação.

#### 5.6.5. Amplificação da UGT1A1

O DNA genômico foi amplificado utilizando-se da PCR para a região promotora do gene da UGT1A1 humana, que se localiza no 2q37. A seqüência dos iniciadores (BEZERRA 2007) foi 5'- GTCACGTGACACAGTCAAAC -3' e 5'- TTTGCTCCTGCCAGAGGTT -3' marcado com FAM.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram dissolvidos em água tipo para injeção na concentração de 100pmol/μL, e as soluções mantidas em freezer a -20°C. A solução de uso foi preparada a partir da solução estoque de forma a produzir uma nova solução contendo

10pmol/ $\mu$ L. A reação foi realizada em um termociclador (*Veriti*<sup>TM</sup> 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems) adicionando-se os seguintes reagentes a um tubo de 0,2ml: buffer 1X (GeneAmp PCR Buffer I; Applied Biosystems), dNTPs 0,25mM (Applied Biosystems), MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, primers 10pM; 1U AmpliTaq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems); 20ng de DNA e água estéril para 25ul. A ciclagem utilizada foi de desnaturação inicial a 95°C/10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C/30 segundos, associação a 55°C/30 segundos, extensão a 72°C/30 segundos, com uma extensão final de 72°C durante 10 minutos.

#### **5.6.6. Análise de fragmento por eletroforese capilar**

Os produtos do PCR foram analisados através de eletroforese capilar em analisador genético ABI 3130xl (Applied Biosystems Inc.) com a identificação dos alelos. Foi adicionado 1 $\mu$ L do produto amplificado a 8,8 $\mu$ L de formamida (HiDye formamide, Applied Biosystems Inc.) e 0,2 $\mu$ L de marcador de peso molecular interno GS120-LIZ (Applied Biosystems Inc.), desnaturados a 95°C por 5 minutos e imediatamente colocados no gelo por, no mínimo, 5 minutos. As amostras foram injetadas no analisador genético ABI 3130xl (Applied Biosystems Inc.) usando um capilar de 36cm x 50 $\mu$ m com o polímero apropriado (Performance Optimized Polymer-7 – POP7, Applied Biosystems Inc.) nas seguintes condições: injeção por 23 segundos a 1,2 kV e corrida por 370 segundos a 15 kV na temperatura de 60°C. Os tamanhos das seqüências amplificadas foram calculadas por comparação com o padrão de peso molecular GS120-LIZ através do programa GeneMapper® (Applied Biosystems Inc.).



### **5.7. Considerações estatísticas:**

Baseado nas prevalências observadas em estudos anteriores (BANCROFT et al, 1998), foi calculada amostra (software PEPI, versão 2 - *Computer Programs for Epidemiologic Analysis*) com necessidade de pelo menos 218 pacientes em cada grupo, considerando estudo de caso-controle e diferença de 15% no percentual de presença do genótipo (TA)7/(TA)7 entre os grupos, nível de significância de 0,05 e poder estatístico de 80%. Considerando a taxa média mensal de admissões de 25 pacientes por icterícia, tinha-se uma previsão de que a amostra calculada fosse atingida em 8 meses, período que foi ampliado para dar margem de perdas de 10%.

Foi utilizado o pacote estatístico SPSS e realizados teste de  $\chi^2$  com ou sem correção de Yates para variáveis categóricas e cálculo do *odds ratio* entre os fatores em estudo e icterícia, e análise dos dados contínuos com o teste t de Student, ANOVA e Mann-Whitney (variáveis sem distribuição normal). O nível de significância estatística para qualquer caso foi considerado para um valor de alfa = 0,05.

### **5.8. Considerações éticas:**

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projeto nº 06-575). Foi solicitado consentimento dos pais ou responsáveis pelo paciente para participação no estudo, através da assinatura de termo de consentimento livre esclarecido.

## **6. Resultados:**

### **6.1. Icterícia:**

Um total de 494 neonatos com idade gestacional superior a 35 semanas e peso superior a 2000g foi incluído no estudo nos nove meses de coleta. Três recém-nascidos do grupo dos casos e um dos controles foram excluídos por extravio de amostra, e mais 26 resultaram em genotipagem inconclusiva ou material insuficiente. Durante o período, pelo menos 2 pacientes não foram elegíveis devido a icterícia provavelmente causada por cefalohematoma; alguns pacientes internaram no período para realização de antibióticos por suspeita de sepse e desenvolveram icterícia, não sendo incluídos; estes não foram contabilizados pela equipe de investigação. Dados demográficos estão apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Internaram para fototerapia 243 recém-nascidos, sendo os 247 restantes os controles, sem necessidade de tratamento. No grupo dos casos, 141 (58%) eram do sexo masculino e 102 (42%) do sexo feminino, com uma tendência a significância ( $p=0,055$ ). Dentre os controles foram 122 (49,4%) meninos e 125 (50,6%) meninas.

Foram classificados como brancos 376 (76,7%) indivíduos, 56 (11,4%) negros e 58 (11,8%) pardos. Não houve diferença entre estas proporções dentre grupos casos e controles. Em relação à adequação do tamanho na idade gestacional, 379 (77,3%) eram adequados para a idade gestacional (AIG), 84 (17,1%) eram pequenos (PIG) e 27 (5,5%) eram grandes para a idade (GIG), também sem diferença estatisticamente significativa.

**Tabela 5:** Dados demográficos dos 490 neonatos analisados no período de março a dezembro de 2007 no HCPA - variáveis categóricas:

<b>Características</b>	<b>Ictéricos N (%)</b>	<b>Não ictéricos N (%)</b>	<b>p</b>
Sexo Masculino	141 (58%)	122 (49,4%)	0,055
Feminino	102 (42%)	125 (50,6%)	
Etnia Branco	185 (76,1%)	191 (77,3%)	NS
Negro	29 (11,9%)	27 (10,9%)	
Pardo	29 (11,9%)	29 (11,7%)	
Tamanho AIG *	187 (77%)	192 (77,7%)	NS
PIG	44 (18,1%)	40 (16,2%)	
GIG	12 (4,9%)	15 (6,1%)	
Incompatibilidade ABO	73 (30%)	47 (19%)	0,005
Incompatibilidade Rh	23 (9,5%)	26 (10,5%)	NS
Parto vaginal	164 (67,5%)	160 (64,8%)	NS
cesariana	79 (32,5%)	87 (35,2%)	
Necessidade de reanimação	18 (7,4%)	28 (11,3%)	NS
Deficiência de G6PD	13 (5,5%)	9 (3,7%)	NS

\* Adequado para Idade Gestacional, Pequeno para Idade Gestacional, Grande para Idade Gestacional

**Tabela 6:** Dados demográficos dos 490 neonatos analisados no período de março a dezembro de 2007 no HCPA – variáveis quantitativas

<b>Características</b>	<b>Ictéricos média ± desvio padrão</b>	<b>Não ictéricos média ± desvio padrão</b>	<b>P</b>
Peso nascimento (g)	3073 ± 530	3217 ± 460	0,001
Idade gestacional (semanas)	38,4 ± 1,7	39,5 ± 1,3	0,000
Idade da mãe (anos)	25,4 ± 6,6	26 ± 6,8	NS
Número de consultas pré-natal	7 ± 3,1	6,5 ± 3,3	NS
Apgar no 5´	9 ± 1	9 ± 1	NS
Atividade da G6PD (U/gHb)	17,2 ± 5,9	17,2 ± 5,6	NS

Quanto à presença de incompatibilidade ABO, 120 (24,5%) neonatos no total da amostra eram incompatíveis; 73 (30%) eram do grupo dos ictericos ( $p=0,005$ ); os demais 370 neonatos não apresentavam a característica. Quanto à incompatibilidade Rh, 49 (10%) do total de participantes eram incompatíveis e 441 (90%) não o eram; essas proporções não diferiram entre os grupos caso e controle.

Dentre os nascimentos, 324 (66,1%) foram por parto vaginal e 166 (33,9%) por cesariana, com peso médio de nascimento de  $3146 \pm 490$ g. A idade gestacional média de toda essa amostra foi  $39 \pm 1,5$  semanas, com escore de Apgar médio de 9, sendo que 46 bebês necessitaram de alguma forma de reanimação neonatal. A idade materna média foi de 25 anos e o número de consultas pré-natal de 6,5 consultas. Todas essas variáveis não diferiram entre grupo icterico e anictérico.

No grupo dos ictericos, o peso médio de internação foi de  $2876 \pm 506$ g, houve perda do peso média em relação ao peso de nascimento de  $6,5 \pm 3,1\%$  e a idade mediana na internação, em horas, foi de 70 ( $p_{25}$  50h -  $p_{75}$  84h).

No total de ictericos, 147 (64,6%) pacientes internaram até 72h após o nascimento, 76 (31,3%) de 72h a 1 semana e 10 (4,1%) com mais de 1 semana de vida. Internaram na primeira semana de vida 233 (96%) neonatos. Considerando o valor de bilirrubinas corrigido para 48h de vida, o grupo com até 72h apresentou valores mais elevados de BT (14,9 vs 13,5 vs 12,7 mg/dL),  $p=0,01$ .

Houve 21 pacientes internando com mais de 20 mg/dL de BT (8,6%), 2 pacientes com mais de 25 mg/dL (0,8%) e 3 com mais de 30 mg/dL (1,2%). Seis neonatos (23%) desses pacientes tinham menos de 37 semanas de idade gestacional.

Apenas 6 recém-nascidos entre os ictericos não estava em aleitamento materno, e houve 8 pacientes com interrupção da amamentação; nenhum apresentava variante polimórfica da UGT1A1 ou deficiência de G6PD.

O tempo de fototerapia mediano, em dias, foi de 1,5 (*p*25 1 dia - *p*75 2 dias), com tempo de internação mediano, em dias, de 3 (*p*25 2 dias - *p*75 4 dias) e a bilirrubina média na admissão de 16,5±3,3 mg/dL. Fototerapia simples foi utilizada em 135 (55,6%) neonatos, fototerapia dupla em 81 (33,3%) e fototerapia tripla em 27 (11,1%).

Houve três pacientes que seguiram acompanhamento neurológico por alterações atribuídas a hiperbilirrubinemia. Não temos registro de kernicterus nessa amostra.

**Tabela 7:** Características dos pacientes com seguimento neurológico

	<b>Paciente 142</b>	<b>Paciente 46</b>	<b>Paciente 196</b>
<b>Sexo</b>	Masculino	Feminino	Masculino
<b>Etnia</b>	Pardo	Negro	Branco
<b>Peso (g)</b>	2755	2870	2830
<b>Idade Gestacional (sem)</b>	37	39	37
<b>Incompatibilidade ABO</b>	Sim	Não	Não
<b>Idade na internação (h)</b>	24	132	192
<b>Tempo de foto (dias)</b>	7	2	2
<b>Bilirrubina na internação (mg/dL)</b>	11,3	34	32
<b>Atividade da G6PD</b>	Normal	Normal	Normal
<b>Genótipo da UGT1A1</b>	(TA)6/(TA)8	(TA)6/(TA)7	(TA)6/(TA)6

As re-internações ocorreram em 8 (3,3%) casos, e 16 (6,6%) necessitaram reiniciar a fototerapia na mesma internação; 1 caso de exsanguíneotransusão seguida de óbito em menos de 24h de evolução ocorreu em paciente com incompatibilidade sanguínea por grupo **c pequeno**, desfecho esse atribuído a hemólise e não ao procedimento em si. Esse recém-nascido não tinha outras incompatibilidades do tipo ABO, Rh ou outras possibilidades de deficiência de conjugação hepática como a deficiência de G6PD e polimorfismos da UGT1A1 – o genótipo era (TA)6/(TA)7.

De 23 recém-nascidos ictericos com incompatibilidade Rh apenas 2 tinham variantes polimórficas, o que não permitiu análise estatística.

Entre os pacientes ictericos, 37 dos que apresentavam incompatibilidade ABO tinham o exame de *Coombs* positivo, sendo 5 (13,5%) com variantes de risco da UGT1A1, e 36 com o exame de *Coombs* negativo, sendo 5 (15,1%) com as variantes. Dos anictéricos, 11 com o exame de *Coombs* positivo, 1 (10%) com as variantes polimórficas, e 36 com o exame de *Coombs* negativo, sendo 4 (11%) com as alterações da UGT1A1. Essas diferenças não foram significativas do ponto de vista estatístico ( $p=0,7$ ).

Em nossa amostra de pacientes com incompatibilidade ABO, a sensibilidade do exame de *Coombs* positivo para o desfecho icterícia foi 51% e a especificidade foi 77%, já o valor preditivo positivo foi 77% e o negativo 50%.

A média de tempo de vida na internação nos ictericos com incompatibilidade foi de 68h, com valor de hemoglobina mínima durante a internação de 14,1 ( $\pm 1,8$ mg/dL), tendendo a significância ( $p=0,061$ ). Não houve diferença quanto a tempo de internação ou necessidade de repetição de fototerapia.

## **6.2. UGT1A1:**

Foram identificados os 4 alelos previamente descritos para o promotor do gene UGT1A1, nas respectivas frequências: 1,6% para (TA)5, 63,4% para (TA)6, 34% para (TA)7 e 1% para (TA)8, conforme Tabela 8.

Com relação aos genótipos UGT1A1 foram identificados 7 dos 10 possíveis em toda a amostra de neonatos, conforme Tabela 9. Genótipos relacionados com a hiperbilirrubinemia presentes em 15,7% dos pacientes, sendo 54 (11,6%) homozigotos (TA)7, 5 (1%) heterozigotos (TA)7/(TA)8, 9 (1,94%) heterozigotos (TA)5/(TA)6 e 6 (1,3%) heterozigotos (TA)5/(TA)7.

**Tabela 8:** Frequência dos alelos UGT1A1 nos 464 pacientes com teste realizado (229 com icterícia em tratamento e 235 neonatos controles):

Alelos UGT1A1	n¶	%
(TA)5	15	1,6
(TA)6	588	63,4
(TA)7	316	34
(TA)8	9	1

¶ n total = 928, considerando que cada indivíduo tem 2 alelos para cada condição genética

Em toda a amostra foram 74 (16%) pacientes com genótipos polimórficos e 390 (84%) homo ou heterozigotos normais. A prevalência de genótipos polimórficos nos ictericos foi de 31 (13,5%) e nos normais foi de 43 (18,2%), mas essa diferença não foi significativa ( $p=0,08$ ). Não houve diferença entre os sexos. Não foram determinadas diferenças significativas quanto aos desfechos da hiperbilirrubinemia. Quanto à incompatibilidade ABO, o grupo incompatível ( $n=120$ ) apresentou genótipo normal em 99 (87%) recém-nascidos e variantes polimórficas em 15 (13%); essa proporção genotípica se mantém nos sem incompatibilidade.

**Tabela 9:** Genótipos na região promotora do gene UGT1A1 nos 464 pacientes com teste realizado (229 com icterícia em tratamento e 235 neonatos controles):

Genótipo UGT1A1	n¶	%
(TA)5/(TA)6	9	1,94
(TA)5/(TA)7	6	1,3
(TA)6/(TA)6	189	40,7
(TA)6/(TA)7	197	42,4
(TA)6/(TA)8	4	0,8
(TA)7/(TA)7	54	11,6
(TA)7/(TA)8	5	1

¶ O n nesta tabela é de 464 indivíduos genotipados

Esses pacientes foram divididos em 2 grupos de acordo com seus genótipos UGT1A1: Grupo A - homozigotos (TA)6/(TA)6, heterozigotos (TA)6/(TA)7 e (TA)6/(TA)8, e Grupo B - homozigotos (TA)7/(TA)7, heterozigotos (TA)7/(TA)8, (TA)5/(TA)6 e (TA)5/(TA)7, considerados, respectivamente, como “baixo risco” e “polimórficos”. Dentre os 229 recém-nascidos em tratamento para icterícia a média da bilirrubina total no grupo A foi mais alta que a média do grupo B (16,5 mg/dL vs 15,5 mg/dL,  $p=0,02$ ).

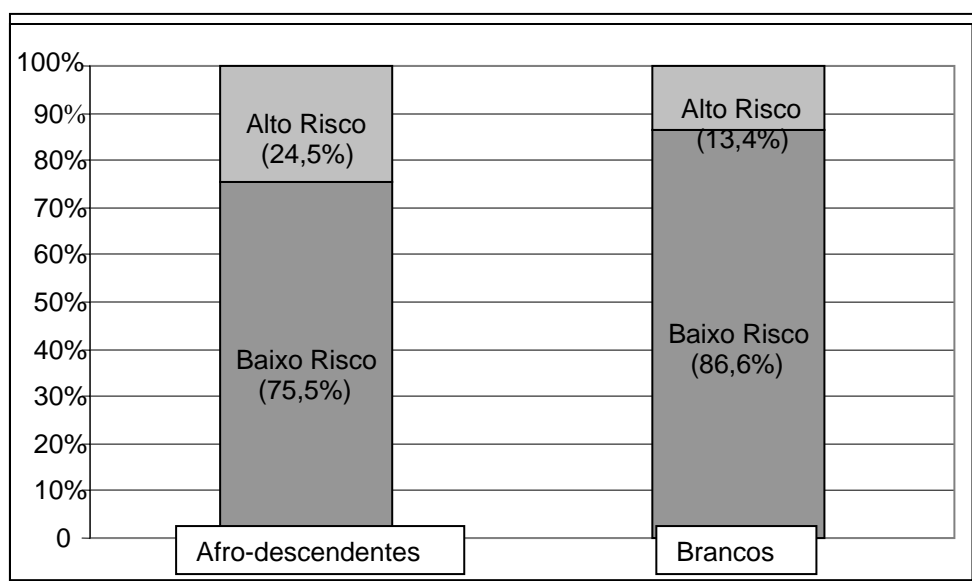
Em relação aos grupos étnicos, entre os brancos 310 (86,6%) dos neonatos apresentaram genótipos do grupo A ou baixo risco e 48 (13,4%) genótipos do grupo B; entre os negros, 18 (34%) apresentaram genótipos do grupo B ou polimórficos e 35 (76%) os do grupo A, com  $p=0,001$ . Agrupando negros e pardos numa categoria única, esses genótipos polimórficos encontraram-se em 24,5% dos bebês ( $n=26$ ), superior ao encontrado entre os brancos ( $p=0,014$ ), conforme figura 1. Entre os pacientes negros anictéricos, 12 (48%) apresentaram os genótipos polimórficos (grupo B),  $p=0,000$ , e 22 dos ictéricos (78,6%) apresentaram genótipos de baixo risco. A frequência dos alelos dos polimorfismos no promotor do gene da UGT1A1 em brancos e afro-descendentes encontra-se na Tabela 10.

**Tabela 10:** Frequência alélica dos polimorfismos no promotor do gene da UGT1A1 em duas classificações étnicas, após agrupar negros e pardos

Alelo	Branços§ n (%)	Afro-descendentes¶ n (%)	<i>p</i>
(TA)5	10 (1,4%)	5 (2,3%)	<i>NS</i>
(TA)6	477 (66,6%)	111 (52,3%)	<0,001
(TA)7	225 (31,4%)	91 (43%)	<0,001
(TA)8	4 (0,6%)	5 (2,4%)	<0,001

§Total de alelos 716 / ¶Total de alelos 212 n = número de alelos

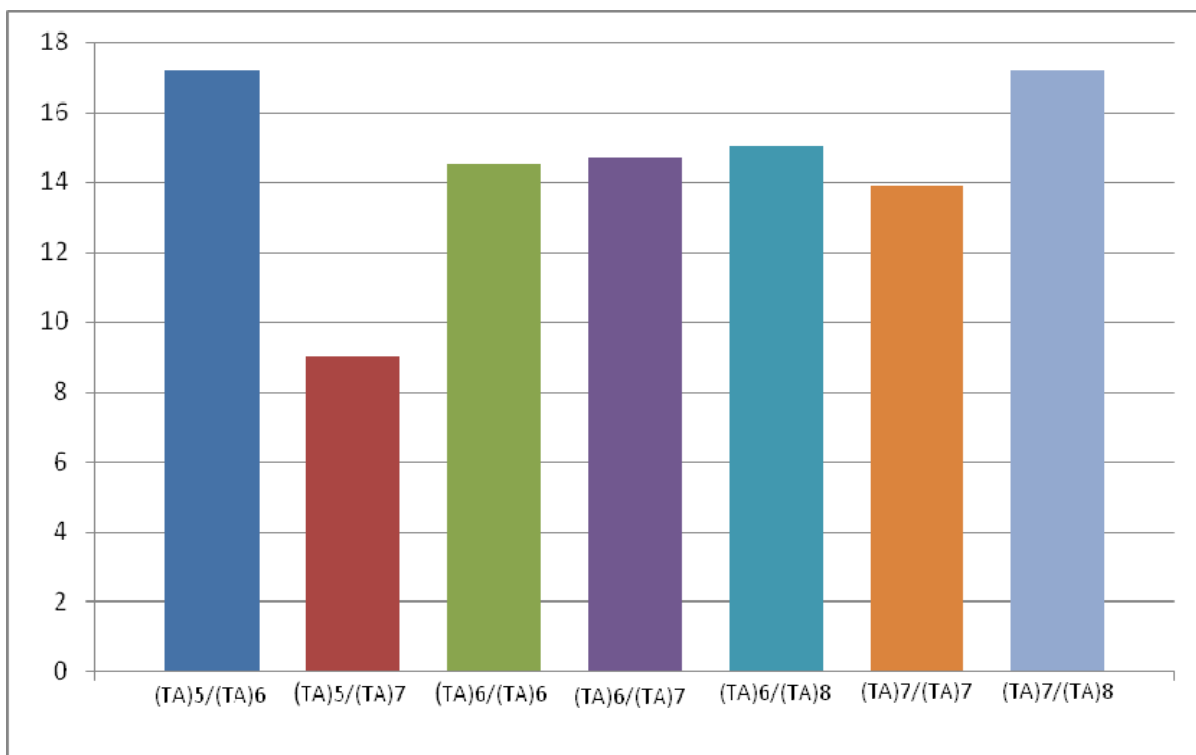




**Figura 2:** Proporção dos genótipos quanto ao risco entre afro-descendentes e brancos.

Posteriormente, esses pacientes foram divididos em 3 grupos de acordo com seus genótipos UGT1A1: Grupo I - homozigotos (TA)6/(TA)6, Grupo II - heterozigotos (TA)6/(TA)7 e (TA)6/(TA)8, e Grupo III - homozigotos (TA)7/(TA)7, heterozigotos (TA)7/(TA)8, (TA)5/(TA)6 e (TA)5/(TA)7, na possibilidade de haver um risco intermediário de hiperbilirrubinemia no grupo II. Não houve diferença entre as médias de bilirrubinas totais nos três grupos (16,5 vs 16,4 vs 15,5 mg/dL,  $p=0,25$ ). Na amostra analisada, houve 156 (44,4%) bebês de etnia branca que apresentaram o genótipo (TA)6/(TA)6 e 18 (34%) de etnia negra com genótipos polimórficos (grupo III) ( $p= 0,001$ ).

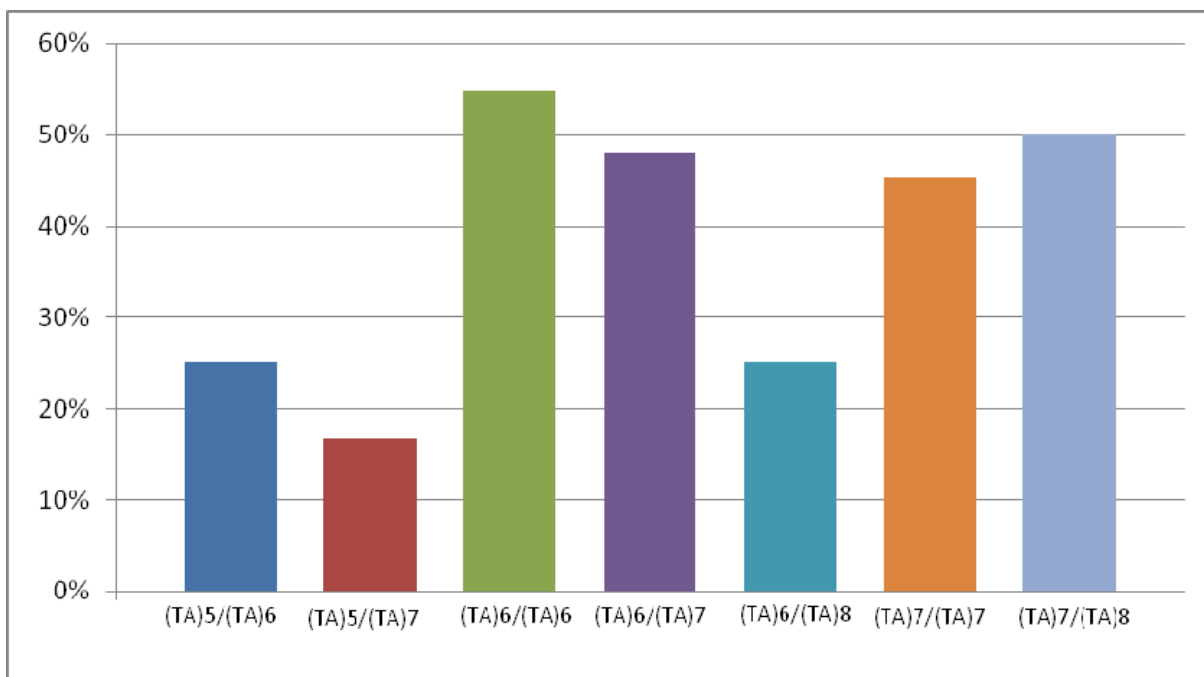
Ao corrigirmos o valor da bilirrubina total na internação para uma estimativa com 48h de vida em todos os neonatos em tratamento com fototerapia (para isto foi utilizada como ferramenta a figura de indicação de fototerapia das diretrizes da AAP de 2004), encontraram-se valores mais altos nos neonatos com genótipo (TA)5/(TA)6 e (TA)7/(TA)8, mas o n foi muito pequeno em alguns grupos para aplicar um teste estatístico (figura 2).



**Figura 3:** Média dos níveis de bilirrubina total (mg/dL) na internação corrigida para 48h de vida em cada genótipo da UGT1A1

Entre os 229 pacientes ictericos, 103 (45%) apresentaram genótipo (TA)6/(TA)6, e entre os 235 pacientes controles, 103 (44%) apresentaram o (TA)6/(TA)7. Essas proporções não apresentaram diferença estatística em relação aos outros genótipos nos dois grupos icterícia e não icterícia ( $p=0,21$ ). Uma análise da figura da proporção de pacientes ictericos dentro de cada genótipo mostra valores altos no genótipo (TA)7/(TA)8, mas o n também foi muito pequeno em alguns grupos para aplicar um teste estatístico (figura 4).

No grupo dos ictericos, os neonatos com genótipos polimórficos de risco da UGT1A1 (grupo III) apresentaram internação ligeiramente mais precoce que os dois grupos de risco baixo ou intermediário (68h, 74h, 76h respectivamente), mas isso não foi significativo ( $p=0,65$ ). O peso deles na internação não foi diferente, tampouco a perda porcentual.



**Figura 4:** Proporção de icterícia dentro dos genótipos da UGT1A1

Quanto ao tratamento dos pacientes icterícios, 21 (68%) dos pacientes do grupo III foram submetidos à fototerapia simples, não ocorrendo diferenças significativas com os bebês sem os polimorfismos. Nenhum paciente do grupo III, em fototerapia re-internou, mas 3 (9,6%) repetiram a fototerapia, o que acabou não sendo significativo em relação aos outros genótipos.

O tempo mediano de fototerapia foi de 36h, com variação de 12h a 7 dias. O bebê com genótipo (TA)6/(TA)8 ficou 7 dias em tratamento, seguido dos 3 bebês com (TA)7/(TA)8, com 60h, e 3 com (TA)5/(TA)6, com 50h. Este bebê (TA)6/(TA)8 tinha incompatibilidade ABO e ficou em acompanhamento neurológico, posteriormente

Os pacientes foram estratificados em três faixas de idade gestacional de interesse, sendo 12% prematuros tardios (35 - 36+6 sem), 11,4% com 37- 37+6 sem (que ainda apresenta maior risco para icterícia) e 76,3%  $\geq$  38 sem. Os 2 grupos A e B de genótipos da UGT1A1 se encontraram nas mesmas proporções nas três faixas, mesmo estratificando para icterícia.

Apenas 2 (2,8%) dos pacientes com os genótipos de grupo B (polimórficos) da UGT1A1 também tinham deficiência de G6PD, sendo um icterico e um controle. O icterico tinha a mutação Africana em homozigose e o outro neonato não teve mutação detectável pelo método; ambos tinham a mutação (TA)<sub>7</sub>/(TA)<sub>7</sub> da UGT1A1.

### **6.3. Deficiência de G6PD:**

Um total de 22 pacientes com deficiência de G6PD foi encontrado, mostrando uma prevalência nesta população de 4,6%. Entre os ictericos, 13 (5,5%) tinham a deficiência, e nos controles a prevalência foi de 9 (3,7%) pacientes, embora a *odds ratio* fosse de 1,5, não houve diferença estatística ( $p=0,35$  e IC= 0,63 - 3,6). A atividade média de G6PD foi 17,2 U/gHb, em ambos os grupos.

A deficiência de G6PD foi determinada em 16 (6,2%) de todos os meninos e 6 (2,7%) meninas, com  $p = 0,06$ , o que apresenta uma relação 2,2 meninos para 1 menina, conforme tabela 11. Do total de meninos ictericos da amostra ( $n=138$ ), 10 (7,2%) tinham deficiência de G6PD e do total de meninas ictericas ( $n=99$ ), 3 (3%) tinham a deficiência, relação 3:1.

Quando comparados incompatibilidade ABO com deficiência de G6PD, foi visto que nenhum dos incompatíveis tinha a deficiência quando no grupo ictericia, com  $p=0,045$ .

Não houve diferença entre as três faixas de idade gestacional de interesse quanto a deficiência de G6PD - no grupo caso há 2 neonatos prematuros tardio e no controles há apenas 1; no caso há 4 neonatos na faixa menor que 38 sem e no controle 1, mas esses dados não foram significativos ( $p=0,56$ ).

Considerando o total de neonatos, tinham a deficiência de G6PD 15 (4%) dos brancos, 4 (7%) dos negros e 3 (5,4%) dos pardos,  $p= 0,5$ . Nos 237 bebês icterícos analisados encontrou-se, em brancos, 7 deficientes (3,8%), em negros 3 (10,3%) e em pardos 3 (10,3%), com  $p=0,046$ .

**Tabela 11:** Distribuição da atividade de G6PD em todos os neonatos da amostra de acordo com sexo e etnia

Atividade	sexo		<i>p</i>	etnia			<i>p</i>
	Masculino	feminino		branco	negro	pardo	
Deficiente	16 (6,2%)	6 (2,7%)	0,06	15 (4%)	4 (7%)	3 (5,4%)	0,5
Normal	242 (93,8%)	216 (97,3%)		353 (96%)	52 (93%)	53 (94,6%)	
Total	258	222		368	56	56	

Dos 22 casos de deficiência de G6PD da amostra, 3 foram diagnosticados pela PCR e não tiveram medida da atividade. Não foi encontrado nenhum neonato com mutação Mediterrânea e em 8 pacientes não foi encontrada nenhuma das duas mutações em estudo, embora tivessem baixa atividade enzimática detectada pela triagem - dados na tabela 12.

**Tabela 12:** Aspectos da caracterização molecular dos pacientes com deficiência de G6PD

	Casos com Icterícia (n)	Controles (n) §
<b>Atividade Média de G6PD (U/gHb)</b>	5,81 (n=12)	5,54 (n=7)
<b>PCR – mutação 202/376</b>		
<b>Homozigotos</b>	6	3
<b>Heterozigotos</b>	2	3
<b>Sem mutação detectável</b>	5	3

§ 13 pacientes com icterícia e 9 pacientes controle

## **7. Discussão:**

A icterícia neonatal pode levar a desfechos desfavoráveis como a encefalopatia e, apesar de alguns fatores de risco ser bem conhecidos, mais recentemente passou a se propor a associação com alterações na conjugação hepática (KAPLAN et al, 1997, BANCROFT et al, 1998).

Nossa amostra de casos e de controles foi bastante homogênea, mas mostrou predomínio de neonatos com incompatibilidade ABO no grupo com icterícia. Devido ao fato de boa parte dos neonatos do grupo controle ser filhos de mães com sangue tipo O (e por isso terem sangue de cordão coletado, como rotina do serviço), poderia se esperar que houvesse mais casos de incompatibilidade neste grupo, o que não ocorreu, tornando-se um possível viés que foi controlado.

No registro piloto de BHUTANI et al (2004a), as causas para kernicterus foram atribuídas em 3 categorias em proporções iguais: doenças hemolíticas (isoimunização ABO principalmente), deficiência de G6PD (associada com hemólise e conjugação reduzida) e causas idiopáticas (presumidamente do atraso de conjugação hepática do sistema enzimático da UGT1A1), em conjunto com aleitamento materno e ingestão inadequada. Segundo KAPLAN e HAMMERMAN (2005b), a incompatibilidade ABO é a causa mais freqüente de doença hemolítica imune. SGRO et al (2006) no Canadá identificaram em 51% dos neonatos que internavam por hiperbilirrubinemia grave a incompatibilidade ABO. Já TIKER et al (2006) na Turquia identificaram em 20,4% dos neonatos com hiperbilirrubinemia extrema, sendo que 65,6% foram atribuídos a causa idiopática. No mesmo país ATAY et al (2006) publicaram uma prevalência de 26,9% em hiperbilirrubinemia grave. HUANG et al (2004) identificaram em 25%, mas sem significância estatística em relação a prevalência de 19% nos controles.

Fatores como etnia, adequação para idade gestacional, tipo de parto e asfixia também não diferiram entre os grupos, bem como peso, idade gestacional, idade materna e número de consultas de pré-natal.

No total de ictericos, 147 pacientes (64,6%) internaram até 72h após o nascimento, 31,3% de 72h a 1 semana e 4,1% com mais de 1 semana de vida. Internaram na primeira semana de vida 233 neonatos (96%). Em geral a hiperbilirrubinemia grave de início precoce é associada ao aumento na produção da bilirrubina, enquanto a tardia é associada a uma eliminação reduzida com ou sem aumento de produção (SMITHERMAN et al, 2006), o que é compatível com o achado de maior prevalência de incompatibilidade ABO nos pacientes ictericos da nossa amostra. Considerando o valor de bilirrubinas corrigido para 48h de vida, aqueles com internação mais precoce apresentaram valores mais elevados de BT (grupo que internou até 72h após nascimento).

A hiperbilirrubinemia grave é prevalente na população neonatal, com BT > 20 mg/dL em 1:70 bebês, mas aproximadamente 1 em 650-1000 neonatos com idade gestacional > 35 semanas desenvolvem valores séricos de bilirrubinas  $\geq$  25 mg/dL e cerca de 1 em 10000 tem níveis maiores que 30 mg/dL (BHUTANI et al, 2004b, NEWMAN et al, 2000). Na nossa amostra de ictericos, 21 (8,6%) pacientes internaram com mais de 20 mg/dL de BT, o que corresponde a 1 paciente para cada 23 da amostra total (n=490) de neonatos, 2 pacientes com mais de 25 mg/dL (0,8%) e 3 com mais de 30 mg/dL (1,2%). Esses dados reforçam a alta prevalência de hiperbilirrubinemia grave na nossa população analisada, apesar de não representar a prevalência no universo de recém-nascidos totais do hospital naquele período.

Seis neonatos (23%) desses 21 pacientes com BT > 20 mg/dL tinham menos de 37 semanas de idade gestacional; isso é relevante mas diferente do encontrado no Registro de Kernicterus dos EUA, que encontrou uma prevalência de 50% de prematuros tardios nos casos de hiperbilirrubinemia extrema (BHUTANI e JOHNSON 2006). Neste registro foi

verificado também que, uma vez que terapêutica agressiva fosse instituída para a encefalopatia aguda, os prematuros tardios tinham uma taxa de sucesso mais baixa para recuperação com mínima ou nenhuma seqüela (3,45%) em comparação com os de termo (8%). A AAP (2004) preconiza a vigilância dos neonatos de menos de 38 semanas de idade gestacional ao nascimento, particularmente aqueles amamentados ao seio materno, pelo maior risco de desenvolver hiperbilirrubinemia.

Dentre os ictericos, 6 pacientes não estavam em aleitamento materno e 8 necessitaram interromper a amamentação, sendo que nenhum dos 8 apresentava variante polimórfica da UGT1A1 ou deficiência de G6PD, contrariando estudo que mostrou associação de icterícia por leite materno e presença da variante polimórfica (MARUO et al, 2000).

Nossos pacientes tiveram tempos medianos de fototerapia e internação rápidos, com níveis médios de bilirrubinas não muito graves e uso predominante de fototerapia simples, com poucas re-internações e re-intervenções. Houve 1 caso de exsanguineotransfusão seguida de óbito em um paciente com incompatibilidade sanguínea por grupo **c pequeno**. Morte associada a exsanguineotransfusão ocorre em 3 a cada 1000 procedimentos e o risco é menor em maiores de 35 semanas (IP et al, 2004). Esse caso não foi considerado como diretamente relacionado ao procedimento e sim a hemólise maciça da doença de base. Estudo na Holanda (KOELEWIJN et al, 2008) encontrou uma prevalência de 8,5% de exsanguineotransfusão por **c pequeno** entre neonatos com outros anticorpos que não ABO ou Rh, perdendo em prevalência para o anti-K. A aloimunização materna por outros antígenos não pode ser prevenida de rotina e esses anticorpos também causam hemólise.

Houve três pacientes que seguiram acompanhamento neurológico por alterações atribuídas a hiperbilirrubinemia, dois deles com níveis extremos de bilirrubinas na internação. Os dados são compatíveis com a literatura quanto a altos valores de bilirrubina (WATCHKO 2005), e sugere-se que testes de triagem do desenvolvimento ainda estariam alterados com um



ano de idade (IP et al, 2004), mas infelizmente não dispomos desses dados nos pacientes descritos. O bebê (TA)6/(TA)8 foi um dos pacientes com acompanhamento neurológico posteriormente e tinha incompatibilidade ABO; neonatos com etiologia hemolítica para icterícia parecem estar em risco maior de encefalopatia pela bilirrubina que aqueles sem hemólise. Nível de BT de 20-23 mg/dL pode se associar com kernicterus num neonato isoimunizado Rh, e o bebê saudável a termo sem hemólise raramente estará a perigo com esses valores (KAPLAN e HAMMERMAN 2005b).

Apenas 2 pacientes entre os 23 com incompatibilidade Rh apresentaram genótipo polimórfico, diferentemente de relato de caso no Brasil que observou níveis altos de bilirrubinas por várias semanas em um paciente com incompatibilidade Rh e síndrome de Gilbert (FACCHINI e ASSIS 2005).

Dentre os pacientes ictericos e com incompatibilidade ABO houve 15,1% dos pacientes com exame de *Coombs* negativo e variante polimórfica da UGT1A1 contra 13,5% daqueles com exame de *Coombs* positivo. Apesar de ser uma amostra pequena e dos valores não terem diferença estatística, essa predominância de variante polimórfica de risco da UGT1A1 nos bebês com exame de *Coombs* negativo é uma possível explicação para pacientes que não tem níveis de anticorpos o suficiente para serem detectados no teste, mas devido a uma conjugação alterada levaria a icterícia (KAPLAN e HAMMERMAN 2005b). Em nossa amostra de pacientes com incompatibilidade ABO, a sensibilidade do teste de *Coombs* positivo para o desfecho icterícia foi 51% e a especificidade foi 77%, já o valor preditivo positivo foi 77% e o negativo 50%. Isso é compatível com a literatura (WAINER S et al, 2007). Mais uma vez, o atraso de conjugação oferece uma explicação porque nem todos os pacientes com incompatibilidade ABO e teste de *Coombs* negativo permanecem de fato anictéricos.

Foram identificados os 4 alelos previamente descritos para o promotor do gene UGT1A1 e 7 dos 10 genótipos possíveis. Os genótipos relacionados com risco de hiperbilirrubinemia e Síndrome de Gilbert estiveram presentes em 16% dos pacientes, sendo 11,6% homozigotos (TA)<sup>7</sup>. Identificaram-se prevalências de (TA)<sup>7</sup>/(TA)<sup>7</sup> de 10-13% numa população adulta de escoceses e 16% em holandeses (MONAGHAN et al, 1996, BOSMA et al, 1995). Na Espanha é descrita em 10% numa população adulta (SALAZAR et al, 2000) e 14% em neonatos ictericos (SECO et al, 2002), muito semelhante a Portugal, onde é relatado 9,9% (GONÇALVES et al, 2001) e menor que no Sul da Itália, onde um grupo descreveu 15% (IOLOSCAN et al, 2000). Nos EUA foi encontrada a prevalência de 12,4% de homozigose (LIN et al, 2008) e, em outro estudo brasileiro, foi de 12,5% (FERTRIN et al, 2002). Por outro lado, em asiáticos é apenas 3- 5% (BEUTLER et al, 1998), sendo mais comum a mutação no códon com troca de aminoácidos na formação da proteína (MARUO et al, 1999).

No nosso estudo, os genótipos com maior nível de hiperbilirrubinemia foram o (TA)<sup>5</sup>/(TA)<sup>6</sup> e o (TA)<sup>7</sup>/(TA)<sup>8</sup>; outros estudos também identificaram o (TA)<sup>5</sup>/(TA)<sup>7</sup> como responsável por icterícia neonatal prolongada (BURCHELL e HUME 1999), o que não ocorreu na nossa amostra. Estes resultados podem ter ocorrido pelo pequeno número de bebês com estas variantes polimórficas entre os indivíduos analisados. Os alelos (TA)<sup>5</sup> e (TA)<sup>8</sup> também foram descritas por BANCROFT et al (1998) e por BEUTLER et al (1998), sendo que esse encontrou na população negra uma frequência de 3,5% e 6,9%, respectivamente, maior que na nossa amostra analisada. É possível que estas diferenças nas frequências nos estudos possam estar associadas também às diferenças metodológicas empregadas na caracterização genotípica dos pacientes.

Alguns alelos polimórficos - como o (TA)<sup>5</sup> e o (TA)<sup>8</sup> - associados a um risco aumentado de hiperbilirrubinemia não foram encontrados em indivíduos de etnia branca em

Portugal (GONÇALVES et al 2001), mas foram bem caracterizados em outros estudos na população brasileira, tanto em indivíduos brancos quanto em negros e pardos (FERTRIN et al 2002). Os alelos polimórficos foram mais frequentes nos recém-nascidos com afro-descendência na nossa amostra também.

Analisando os três grupos genotípicos de risco da UGT1A1, houve mais negros no grupo III - variantes polimórficas ( $p= 0,001$ ). A frequência dos alelos (Tabela 9) foi bastante semelhante a outro estudo brasileiro que demonstrou maior prevalência do genótipo (TA)7/(TA)7 em negros e pardos do que em brancos (FERTRIN et al 2002). Estudo de KAPLAN et al (2008) em uma população de neonatos nigerianos apresentou frequência alélica de (TA)5 7%, (TA)6 46%, (TA)7 44% e (TA)8 2%; neste caso a frequência de (TA)7 foi parecida com a dos nossos bebês negros e pardos, mas as demais foram diferentes, provavelmente devido a miscigenação da nossa população no RS, colonizado por índios, negros, portugueses, espanhóis, alemães e italianos, seguidos de poloneses, judeus, sírios, libaneses e japoneses (PESAVENTO 1993).

A média da bilirrubina total no grupo B foi mais baixa que a média do grupo A (baixo risco). O mesmo aconteceu na criação de um grupo de risco intermediário, ou seja, os heterozigotos (TA)6/(TA)7 e (TA)6/(TA)8. Esses resultados são o inverso do descrito por MONAGHAN et al (1996), mas estão de acordo com estudos na Turquia, em que não se encontrou relação entre a variante polimórfica e hiperbilirrubinemia (BABBAOGLU et al 2006). A análise de um grupo de risco intermediário se dá devido aos achados do estudo clássico de KAPLAN et al (1997), que sugeriu um efeito aditivo de risco conforme surgia o alelo (TA)7 no genótipo, mas isso não ocorreu nesta amostra de recém-nascidos. Houve uma maior proporção de genótipo (TA)6/(TA)6 nos ictericos e (TA)6/(TA)7 nos anictéricos, sem significância, justificável pela maior prevalência desses genótipos em relação aos outros descritos.

No grupo dos ictericos, os neonatos com genótipos polimórficos da UGT1A1 apresentaram internação ligeiramente mais precoce que os dois grupos de risco baixo ou intermediário, com 68h, mas isso não foi significativo. Estudo de BANCROFT et al (1998) sugeriu que a Síndrome de Gilbert acelera o desenvolvimento da icterícia neonatal nos dois primeiros dias de vida.

Os pacientes com os genótipos polimórficos (como grupo B ou III) não apresentaram desfechos piores que o pacientes com genótipos de menor risco, tampouco tempo de internação ou fototerapia mais prolongados que fossem estatisticamente significativos. Isso é diferente dos resultados de um estudo com maior prevalência do genótipo (TA)7/(TA)7 em neonatos com icterícia prolongada em relação aos com icterícia aguda (MONAGHAN et al 1999). Contudo, o bebê com genótipo (TA)6/(TA)8 ficou 7 dias em fototerapia, seguido dos 3 bebês (TA)7/(TA)8 e 3 (TA)5/(TA)6 com 60 e 50h, respectivamente. O genótipo (TA)6/(TA)8 não foi descrito como associado a hiperbilirrubinemia grave ou prolongada no estudo de BURCHELL e HUME (1999), não é descrito no estudo clássico de KAPLAN et al (1997), e, analisando o estudo de BEUTLER et al (1998), poder-se-ia inferir que este genótipo levaria a baixa atividade da UGT1A1 pela adição do alelo (TA)8 ao selvagem. No nosso estudo este genótipo foi mais prevalente nos anictéricos; como o número de indivíduos com o genótipo foi pequeno para maiores conclusões, sugere-se novas observações.

A prevalência dos genótipos polimórficos de risco da UGT1A1 nos ictericos foi de 13,5% e nos normais foi de 18,2%, mas essa diferença não foi significativa; o mesmo ocorreu em estudo italiano (GALANELLO et al 1999), que sugeriu que a variante (TA)7/(TA)7 não contribuía para a icterícia neonatal nessa população, devendo-se estudar outros fatores. Também em estudo espanhol essa associação não se confirmou (SECO et al 2002), nem em estudo na Turquia (MUSLU et al 2006). KAPLAN et al (1997) demonstraram que nem a variante, nem a deficiência de G6PD sozinhas desenvolveriam a icterícia, mas sim a

combinação de ambas e sob efeito do tempo.

Quanto à incompatibilidade ABO, o grupo incompatível apresentou genótipos de UGT1A1 normais em 87%, os polimórficos em 13% dos indivíduos; essa proporção genotípica se mantém nos sem incompatibilidade, e difere do proposto por KAPLAN et al (2000b), que atribuiu a hiperbilirrubinemia em incompatibilidade ABO a associação com a variante polimórfica na UGT1A1.

Havia prevalências de 12% de prematuros tardios e 11,4% na faixa até 38 semanas, com distribuição dos genótipos da UGT1A1 nas mesmas proporções nos grupos. Não houve diferença entre os grupos quanto à deficiência de G6PD – no grupo de ictericos havia 2 neonatos prematuros tardios e nos controles havia apenas 1; nos casos, 4 neonatos na faixa até 38 sem e nos controles 1, mas esses dados não foram significativos. A literatura descreve, nos prematuros com deficiência de G6PD, icterícia mais grave do que nos de termo (LOPEZ e COOPERMAN 1971, SEGEL 2004). Neonatos próximos do termo são mais suscetíveis pelo atraso na conjugação e dificuldade na alimentação, levando ao aumento da circulação entero-hepática (WATCHKO 2005), fração baixa de albumina e são mais vulneráveis aos efeitos neuro-tóxicos pela barreira hemato-encefálica mais permeável (BHUTANI e JOHNSON, 2006).

Apenas 2 (2,8%) dos pacientes com os genótipos de risco da UGT1A1 também tinha deficiência de G6PD, sendo um icterico e um controle. O icterico tinha a mutação Africana em homozigose e o outro neonato não teve mutação detectável pelo método. Esses dados são diferentes dos apresentados por estudo que relaciona a icterícia neonatal a co-existência da deficiência de G6PD a adição do alelo (TA)7 em hetero ou homozigose (KAPLAN et al, 1997). Vale ressaltar que naquele estudo os pacientes com a deficiência de G6PD apresentavam a mutação Mediterrânea, que não foi encontrada no nosso estudo - e também não foi encontrada em outro estudo com a população brasileira (COMPRI et al, 2000).

Encontrou-se prevalência de deficiência de G6PD de 4,6% nesta população. Estudo na Sicília encontrou 2-2,5%, na Sardenha 13% (CITTADELLA et al, 1997) e numa população de neonatos no Sul do Brasil, isso foi 8% (CASTRO et al, 2006). Uma explicação para a baixa prevalência neste momento poderia ser o fato de termos incluído pacientes com icterícia neonatal e talvez algum grau de reticulocitose que desconhecemos, o que pode ter levado a resultados falsos negativos. Por esse motivo, alguns autores (AAP 2004) sugerem uma nova dosagem aos 3 meses, quando o *turnover* das hemácias já estabilizou. Outra possibilidade é o fato de termos excluído na nossa amostragem de casos os pacientes com sepse, mesmo sabendo que isso pode ser um fator desencadeante de hemólise.

Houve 6,2% dos meninos com deficiência, dentre todos, parecido com a prevalência encontrada em estudo no Kwaiti de 6,5% (SAMILCHUCK et al, 2003). A OMS (WHO 1989) sugere triagem nas aéreas onde a prevalência seja de 3 a 5% em meninos.

No nosso estudo, 6,2% do total de afro-descendentes (somando os classificados como negros e os pardos) era deficiente em G6PD. Na América do Norte foi descrita uma prevalência de 11 a 13% em afro-descendentes (KAPLAN et al, 2004). COMPRI et al (2000) demonstrou uma prevalência em homens afro-descendentes de 10% e 1-3% em euro-descendentes, já nosso estudo mostrou 4% dos meninos brancos da amostra com deficiência de G6PD e 5,4 – 7% dos afro-descendentes com a alteração. Isso pode ser explicado pelo fato da classificação étnica nestes estudos ser estabelecida pelos coletores de dados, e talvez a cor da pele não ser um indicador verdadeiro da origem étnica no Brasil (PARRA et al, 2003).

Dentre os icterícos, 5,5% apresentaram a deficiência de G6PD e nos controles essa prevalência foi de 3,7%, embora o *odds ratio* seja de 1,5, não há diferença estatística. A atividade média de G6PD foi 17,2 U/gHb, em ambos grupos. KAPLAN et al (1998c) refere produção aumentada de bilirrubinas, tanto nos pacientes com icterícia quanto nos anictéricos; no nosso trabalho não medimos os níveis de bilirrubinas dos pacientes controles, portanto

perdemos esse importante parâmetro de estudo do papel da deficiência de G6PD e desenvolvimento de hiperbilirrubinemia. Nosso *odds ratio* de 1,5 para desenvolvimento de hiperbilirrubinemia grave foi mais baixo em relação aos encontrados por KAPLAN et al em 2000a e 1997 (3,4 e 2,4, respectivamente). Vale ressaltar que em ambos estudos a mutação de G6PD prevalente era a Mediterrânea, que não foi encontrada no nosso trabalho. Um estudo que eles conduziram em afro-americanos (KAPLAN et al, 2004) mostrou *odds ratio* de 3,2.

É possível que, na nossa população, os neonatos controles com a deficiência não tenham sido expostos *in utero* a algum agente que desencadeasse hemólise e/ou defeito na conjugação, portanto não atingindo níveis de bilirrubina suficientemente altos para serem considerados para tratamento. Um outro trabalho de KAPLAN et al (2001c) só observou a interação com a variante polimórfica da UGT1A1 após o efeito do tempo – este dado nosso grupo não pôde estudar de maneira uniforme, pois os recém-nascidos internaram com diferentes idades em horas.

Quando comparados incompatibilidade ABO com deficiência de G6PD, foi visto que nenhum dos incompatíveis tinha a deficiência quando no grupo icterícia, com  $p=0,045$ . Estudo nos judeus sefardi (KAPLAN et al, 1998a) mostrou que bebês com deficiência de G6PD e incompatibilidade ABO não tiveram maior evidência de hemólise do que aqueles apenas com a incompatibilidade; esses dados, talvez, dariam suporte a idéia de não ser necessário pesquisar a deficiência de G6PD quando a causa da icterícia sugere incompatibilidade ABO.

A relação meninos para meninas na deficiência de G6PD foi de 2,2:1, com  $p$  tendendo a significância. Estudo na Turquia (ATAY et al, 2006) mostrou relação 3:1, ambos dados vão ao encontro de observações de KAPLAN et al (2001b) da maior prevalência em meninos. Cabe ressaltar que se pode ter perdido meninas no nosso estudo, visto que a triagem era feita por método quantitativo e, infelizmente, existir risco de falsos negativos (KAPLAN e

HAMMERMAN 2000). Tendo em vista esses apontamentos e prevalências, e a orientação da WHO de triagem nas populações onde a prevalência em meninos é superior a 5%, poder-se-ia pensar em triagem para G6PD em todos pacientes sem incompatibilidade sanguínea, icterícos, sendo repetidos e confirmados os resultados posteriormente aos 3 meses de idade, que é quando a hemoglobina já estabilizou, e, segundo orientação da AAP (2004), nos casos de forte suspeita diante de exame neonatal normal (hiperbilirrubinemia acima do percentil 95 dentro das primeiras 24h de vida, pobre resposta à fototerapia ou naqueles com história de icterícia em irmãos)

O estudo de COMPRI et al (2000) também não encontrou a mutação Mediterrânea e presença quase exclusiva da Africana, mesmo em euro-descendentes. Número considerável de neonatos não teve mutação detectável, o que pode ser explicado pela presença de alguma mutação que não tenha sido investigada, pois atualmente já foram descritas mais de 140 mutações para G6PD (BEUTLER 1991).

Estudo nos EUA (LIN et al, 2008) demonstrou co-expressão das variantes da UGT1A1 com outros genes, como homozigotos para o alelo (TA)<sub>7</sub> que também eram homozigotos ou heterozigotos para o polimorfismo da OATP1B1 A388G em 70%. Essa variante da enzima transportadora não foi pesquisada na nossa amostra.

Assim, nesta amostra de recém-nascidos de Porto Alegre as variantes polimórficas da UGT1A1 e a deficiência de G6PD não foram associadas à hiperbilirrubinemia grave. Foram encontrados genótipos mais raros e com alguma relação com bilirrubinas mais altas e tempo maior de uso de fototerapia, mas o número de indivíduos foi muito pequeno. Apresentaram-se prevalências e frequências alélicas semelhantes a outras populações, com destaque dos genótipos de maior risco em negros e pardos. Talvez pela grande miscigenação no nosso estado, outros fatores e interações gênicas devam ser procurados para explicar a hiperbilirrubinemia neonatal grave, como o estudo de mais polimorfismos.



## **8. Conclusões:**

Nem a deficiência de G6PD, nem as variantes polimórficas da UGT1A1 foram mais prevalentes nesta amostra de neonatos em fototerapia por hiperbilirrubinemia grave em relação aos recém-nascidos sem necessidade de tratamento. Assim, talvez pelas limitações do tamanho amostral, não foram suficientes para explicar a icterícia.

No entanto, várias conclusões puderam ser tiradas deste estudo:

- Não foi observada frequência significativamente maior de deficiência de G6PD nos casos de hiperbilirrubinemia;

- A mutação mais comum na deficiência de G6PD nesta população foi a Africana, não tendo sido encontrados pacientes com a mutação Mediterrânea;

- Houve prevalência de deficiência de G6PD semelhante à observada em outras populações, especialmente em meninos, sendo compatível com a prevalência sugerida pela OMS como indicativa da necessidade de triagem neonatal;

- Não houve associação da deficiência de G6PD com incompatibilidade ABO; na verdade pacientes com incompatibilidade ABO, nesta amostra, não tinham a deficiência de G6PD;

- Não houve maior incidência de desfechos desfavoráveis nem nos casos com deficiência de G6PD, nem nos pacientes com as variantes polimórficas da UGT1A1.

- A presença simultânea dos dois fatores (deficiência de G6PD e variantes da UGT1A1) não acarretou maior risco de hiperbilirrubinemia;

- As variantes polimórficas da UGT1A1 nessa população apresentaram prevalências semelhantes às observadas em outras populações, com maior prevalência dos genótipos de maior risco em afro-descendentes;

- Foram encontrados os genótipos da UGT1A1 descritos anteriormente em etnias africanas;
- Não houve associação da variante polimórfica da UGT1A1 com incompatibilidade ABO.
- Não houve associação de deficiência de G6PD ou da variante polimórfica da UGT1A1 com prematuridade tardia;
- Houve um predomínio de neonatos com incompatibilidade ABO no grupo dos neonatos com icterícia em tratamento.
- Houve maior incidência de hiperbilirrubinemia grave em pacientes com incompatibilidade ABO e prova de *Coombs* positiva.
- Os recém-nascidos internados para fototerapia eram, na sua maioria, caucasianos, adequados para a idade gestacional, nascidos de termo, por parto vaginal.

Nosso estudo, ao mesmo tempo que permitiu uma série de conclusões relevantes em relação às condições pesquisadas, indicou que a identificação dos fatores genéticos que predis põem à icterícia neonatal será um processo complexo e que deverá exigir, além de tamanhos amostrais significativos, um grande esforço dos pesquisadores dedicados a este importante problema de saúde.

## **9. Referências:**

1. American Academy of Pediatrics Provisional Committee for quality improvement and Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Practice parameter: management of hyperbilirubinemia in the healthy term newborn. *Pediatrics* 1994; 94 (4): 558-565
2. American Academy of Pediatrics Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. *Pediatrics* 2004; 114 (1): 297–316
3. Amin SB. Clinical assessment of bilirubin-induced neurotoxicity in premature infants. *Semin Perinatol* 2004; 28 (5): 340-347
4. Atay E, Bozaykut A, Ipek IO. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency in neonatal indirect hyperbilirubinemia. *J Trop Pediatr* 2006; 52 (1): 56-58
5. Aycicek A, Erel O. Total oxidant/antioxidant status in jaundiced newborns before and after phototherapy. *J Pediatr (Rio J)* 2007; 83 (4): 319-322
6. Babbaoglu MO, Yigit S, Aynacioglu AS, Kerb R, Yurdakok M, Bozkurt A. Neonatal jaundice and bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 gene polymorphism in Turkish patients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 98 (4): 377-80
7. Bancroft JD, Kreamer B, Gourley GR. Gilbert syndrome accelerates development of neonatal jaundice. *J Pediatr* 1998; 132 (4): 656-60
8. Beutler E. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency. *N Engl J Med* 1991; 324 (3): 169-174
9. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood* 1994; 84 (11): 3613 - 3636
10. Beutler E. G6PD: population genetics and clinical manifestations. *Blood Rev* 1996; 10 (1): 45-52
11. Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1

(UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism?

Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95 (14): 8170-8174

12. Bezerra MAC. Aspectos clínicos, bioquímicos e moleculares das síndromes talassêmicas em população do estado de Pernambuco. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica. Campinas – SP, 2007.
13. Bhutani VK, Johnson L, Sivieri EM. Predictive ability of predischage hour-specific bilirubin for subsequent significant hyperbilirubinemia in healthy term and near-term newborns. Pediatrics 1999; 103 (1): 6-14
14. Bhutani VK, Johnson LH, Maisels MJ. Kernicterus: epidemiological strategies for its prevention through systems-based approaches. J Perinatol 2004; 24 (10): 650-662
15. Bhutani VK, Johnson LH, Shapiro SM. Kernicterus in sick and preterm infants (1999-2002): a need for an effective preventive approach. Semin Perinatol 2004; 28 (5): 3129-5
16. Bhutani VK, Donn SM, Johnson LH. Risk management of severe neonatal hyperbilirubinemia to prevent kernicterus. Clin Perinatol 2005; 32 (1): 125-39
17. Buthani VK, Johnson L. Kernicterus in late preterm infants cared for as term healthy infants. Semin Perinatol 2006; 30 (2): 89-97
18. Blumenthal SG, Stucker T, Rassmussen RD, Ikeda RM, Ruebner BH, Bergstrom DE et al. Changes in bilirubins in human prenatal development. Biochem J. 1980; 186 (3): 693-700
19. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantia S, de Boer A, Oostra BA et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. N Engl J Med 1995; 333 (18): 1171-5
20. Bosma PJ. Inherited disorders of bilirubin metabolism. J Hepatol 2003; 38 (1): 107 - 117
21. Burchell B, Hume R. Molecular genetic basis of Gilbert's syndrome. J Gastroenterol and Hepatol 1999; 14 (10): 960-66.

22. Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency. *Lancet* 2008; 371 (9606): 64-74
23. Castro SM, Dadalt V, Weber R, Tavares V, Giugliani R. Prevalence of G6PD deficiency in newborns in the South Brazil. *J Med Screen* 2006; 13 (2): 85-6
24. Castro SM, Weber R, Matte U, Reclos GJ, Pass KA, Tanyalcin T, Giugliani R. The use of LR values to check the best fit of cut-off values in G6PD deficient cases. *Clin Biochem* 2007; 40 (7): 496-498
25. Chowdhury RJ, Wolkoff A, Chowdhury RN, Arias IM. Hereditary jaundice and disorders of bilirubin metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AI, Sly WS, Valle D, Eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 1995: 2161-208
26. Cittadella R, Civitelli D, Manna I, Azzia N, Di Cataldo A, Schilirò G, Brancati C. Genetic heterogeneity of glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency in south-east Sicily. *Ann Hum Genet* 1997; 61 (Pt 3): 229-234
27. Clarke DJ, Moghrabi N, Monaghan G, Cassidy A, Boxer M, Hume R, Burchell B. Genetic defects of the UDP-glucuronosyltransferase gene (UGT1A1) to chromosome region 2q37. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 63 (3): 114-116
28. Compri MB, Saad STO, Ramalho AS. Investigação genético-epidemiológica e molecular da deficiência de G6PD em uma comunidade brasileira. *Cad Saúde Publica* 2000; 16 (2): 335-42
29. De Luca D, Zecca E, de Turrís P, Barbato G, Marras M, Romagnoli C. Using Bilicheck™ for preterm neonates in a sub-intensive unit: diagnostic usefulness and suitability. *Early Hum Dev* 2007; 83: 313-317
30. Facchini FP, de Assis AM. Hiperbilirrubinemia neonatal prolongada devido à associação entre síndrome de Gilbert e doença hemolítica por incompatibilidade RhD. *J Pediatr (Rio J)* 2005; 81 (5): 421-4.

31. Fertrin KY, Gonçalves MS, Saad STO, Costa FF. Frequencies of UDP-glucuronosyltransferase 1 gene promoter polymorphisms among distinct ethnic groups from Brazil. *Am J Med Gen* 2002; 108 (2):117-119.
32. Frank JE. Diagnosis and Management of G6PD deficiency. *American Family Physician* 2005; 72 (7): 1277 – 82
33. Galanello R, Cipollina L, Carboni G, Perseu L, Barella S, Corrias A, Cao A. Hyperbilirubinemia, glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency and Gilbert's syndrome. *Eur J Pediatr* 1999; 158 (11): 914-916
34. Gathwala G, Sharma S. Oxidative stress, phototherapy and the neonate. *Indian J Pediatr* 2000; 67 (11): 805-808
35. Gilbert A, Lereboullet P. La cholemie simple familiale. *Semaine Medicine* 1901; 21:241-3
36. Gonçalves E, Bento MC, Relvas L, Ribeiro ML, Tamagnini GP. Síndrome de Gilbert - frequência do genótipo UGT1A1 (TA)<sub>7</sub>/(TA)<sub>7</sub> numa amostra da população portuguesa. *J Port Gastreterol* 2001, 8: 250-53
37. Huang YY, Huang CS, Yang SS, Lin MS, Huang MJ, Huang CS. Effects of variant UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene, glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency and thalassemia on cholelithiasis. *World J Gastenterol* 2005; 11 (36): 5710-13
38. Huang CS, Chang PF, Huang MJ, Chen ES, Chen WC. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency, the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene, and neonatal hyperbilirubinemia. *Gastroenterology* 2002; 123 (1): 127-133
39. Huang CS, Huang MJ, Lin MS, Yang SS, Teng HC, Tang KS. Genetic factors related to unconjugated hyperbilirubinemia amongst adults. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15 (1): 43-50
40. Huang MJ, Kua KE, Teng HC, Tang KS, Weng HW, Huang CS. Risk factors for severe hyperbilirubinemia in neonates. *Pediatr Res* 2004; 56 (5): 682- 689

41. Indrio F, Raimondi F, Laforgia N, Riezzo G, Polimeno L, Francavilla R. Effect of hyperbilirubinemia on intestinal permeability in healthy term newborns. *Acta Paediatrica* 2007; 96 (1): 73-75
42. Ioloscan A, Perrotta S, Coppola B, Carbone R, Miraglia del Giudice E. Frequency of Gilbert's syndrome associated with UGT1A1(TA)7 polymorphism in Southern Italy. *Haematologica* 2000; 85 (3): 335-6
43. Ip S, Glicken S, Kulig J, Obrien R, Serge R, Lau J. Management of neonatal hyperbilirubinemia. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, Agency for Healthcare research and quality, 2003. AHRQ Publication 03-EO11
44. Ip S, Chung M, Kulig J, O'Brien R, Sege R, Glicken S, Maisels MJ, Lau J, Subcommittee on Hyperbilirubinemia. An evidence-based review of important issues concerning neonatal hyperbilirubinemia. *Pediatrics* 2004; 114 (1); e130-153
45. Javier MC, Krauss A, Nesin M. Corrected end-tidal carbon monoxide closely correlates with the corrected reticulocyte count in Coombs' test positive term neonates. *Pediatrics* 2003; 112 (6 Pt 1): 1333-37
46. Johnson LH, Bhutani VK, Brown AK. System-based approach to management of neonatal jaundice and prevention of kernicterus. *J Pediatr* 2002; 140 (4): 396-403
47. Kadakol A, Ghosh SS, Sappal BS, Sharma G, Chowdhury JR, Chowdhury NR. Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: correlation of genotype to phenotype. *Hum Mutat* 2000; 16 (4): 297-306
48. Kadakol A, Sappal BS, Ghosh SS, Lowenheim M, Chowdhury A, Chowdhury S et al. Interaction of coding region mutations and the Gilbert-type promoter abnormality of the UGT1A1 gene causes moderate degrees of unconjugated hyperbilirubinemia and may lead to neonatal kernicterus. *J Med Genet* 2001; 38 (4): 244-249

49. Kappas A, Drummond GS, Valaes T. A single dose of Sn-Mesoporphyrin prevents development of severe hyperbilirubinemia in glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficient newborns. *Pediatrics* 2001; 108 (1): 25-30.
50. Kaplan M, Abramov A. Neonatal hyperbilirubinemia associated with glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency in Sephardic jewish infants: incidence, severity and the effect of phototherapy. *Pediatrics* 1992; 90 (3): 401-405
51. Kaplan M, Reunbaum P, Levy-Lahad E, Hammerman C, Lahad A, Beutler E. Gilbert syndrome and glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency: a dose-dependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94 (22): 12128 - 12132
52. Kaplan M, Vreman HJ, Hammerman C, Leiter C, Rudensky B, MacDonald MG et al. Combination of ABO blood group incompatibility and G6PD deficiency: effect on hemolysis and neonatal hyperbilirubinemia. *Acta Paediatr* 1998; 87 (4): 455-457.
53. Kaplan M, Hammerman C. Severe neonatal hyperbilirubinemia: a potential complication of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Clin Perinatol* 1998; 25 (3): 575-590
54. Kaplan M, Muraca M, Hammerman C, Vilei MT, Leiter C, Rudensky B, Rubaltelli FF. Bilirubin conjugation, reflected by conjugated bilirubin fractions, in G6PD deficient neonates: a determining factor in the pathogenesis of hyperbilirubinemia. *Pediatrics* 1998; 102 (3); E37
55. Kaplan M, Beutler E, Vreman HJ, Hammerman C, Levy-Lahad E, Renbaum P et al. Neonatal hyperbilirubinemia in glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficient heterozygotes. *Pediatrics* 1999; 104 (1 Pt 1): 68-74
56. Kaplan M, Hammerman C, Feldman R, Brisk R. PredischARGE bilirubin screening in glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficient neonates. *Pediatrics* 2000; 105 (3): 533-537
57. Kaplan M, Hammerman C, Renbaum P, Klein G, Levy-Lahad E. Gilbert's syndrome and



- hyperbilirubinemia in ABO-incompatible neonates. *Lancet* 2000, 356 (9230): 652-3
58. Kaplan M, Hammerman C. Glucose-6-Phosphate-dehydrogenase deficient neonates: a potential cause for concern in North America. *Pediatrics* 2000; 106 (6); 1478- 79
59. Kaplan M, Hammerman C, Vreman HJ, Stevenson DK, Beutler E. Acute hemolysis and severe neonatal hyperbilirubinemia in glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficient heterozygotes. *J Pediatr* 2001; 139 (1): 137-40
60. Kaplan M, Hammerman C, Renbaum P, Levy-Lahad E, Vreman HJ, Stevenson DK. Differing pathogenesis of perinatal bilirubinemia in G6PD deficient versus normal neonates. *Pediatr Res* 2001; 50 (4): 532-37
61. Kaplan M, Algur N, Hammerman C. Onset of jaundice in G6PD deficient neonates. *Pediatrics* 2001; 108 (4); 956-959
62. Kaplan M, Hammerman C. G6PD deficiency: a potential source of severe neonatal hyperbilirubinaemia and kernicterus. *Semin Neonatol* 2002; 7 (2): 121-128
63. Kaplan M, Herschel M, Hammerman C, Hoyer JD, Stevenson DK. Hyperbilirubinemia among African American, glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficient neonates. *Pediatrics* 2004; 114 (2): e213-e219
64. Kaplan M, Hammerman C. Bilirubin and the genome: the hereditary basis of unconjugated neonatal hyperbilirubinemia. *Curr Pharmacogenomics* 2005; 3 (1): 21-42
65. Kaplan M, Hammerman C. Understanding severe hyperbilirubinemia and preventing kernicterus: adjuncts in the interpretation of neonatal serum bilirubin. *Clin Chim Acta*, 2005; 356 (1-2): 9-21
66. Kaplan M, Slusher T, Renbaum P, Essiet DF, Pam S, Levy-Lahad E et al. (TA)n UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter polymorphism in Nigerian Neonates. *Pediatr Res* 2008; 63 (1): 109-111
67. Kawade N, Onishi S. The pre-natal and postnatal development of UDP-

- glucuronosyltransferase activity towards bilirubin and the effect of premature birth on this activity in human liver. *Biochem J* 1981; 196 (1): 257-260
68. Koelewijn JM, Vrijkotte TG, van der Schoot CE, Bonsel GJ, de Haas M. Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in Netherlands. *Transfusion* 2008, 48 (5): 941-52.
69. Kumar A, Pant P, Basu S, Rao GRK, Khanna HD. Oxidative stress in neonatal hyperbilirubinemia. *J Trop Pediatr* 2006; 53 (1): 69-70
70. Lahiri DK, Nurnberger Jr JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMV DNA from blood for RFLP studies. *Nuc Acids Res* 1991, 19 (19): 5444
71. Lin Z, Fontaine J, Watchko JF. Co-expression of gene polymorphisms involved in bilirubin production and metabolism. *Pediatrics* 2008; 122 (1): e156-e162
72. Lopez R, Cooperman JM. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency and hyperbilirubinemia in the newborn. *Am J Dis Child* 1971; 122 (1): 66-70
73. Luzzatto L, Metha A, Vulliamy T. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS et al, eds. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 8th ed. Columbus: McGraw-Hill, 2001: 4517-53
74. Luzzatto L. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency: from genotype to phenotype. *Haematologica* 2006; 91(10): 1303-1306
75. Maisels MJ, Kring E. Length of stay, jaundice and hospital readmission. *Pediatrics* 1998; 101 (6): 995-998
76. Maisels MJ: Jaundice, in Avery GB, Fletcher MA, MacDonald MG (Eds): *Neonatology: Pathophysiology and management of the newborn* (ed5). Philadelphia, PA, Lippincott Williams and Wilkins, 1999, 765-819
77. Maisels MJ, Kring E. Rebound in serum bilirubin level following intense phototherapy. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2002; 156 (7): 669-72

78. Maisels MJ, Kring E. The contribution of hemolysis to early jaundice in normal newborns. *Pediatrics* 2006; 118 (1): 276-279
79. Martin CR, Cloherty JP. Neonatal hyperbilirubinemia. In: Cloherty JP, Eichenwald EC, Stark AR (Eds). *Manual of neonatal care* (ed5). Philadelphia, PA, Lippincott Williams and Wilkins, 2004, 185-221
80. Maruo Y, Nishizawa K, Sato H, Doida Y, Shimada M. Association of neonatal hyperbilirubinemia with bilirubin UDP-Glucuronyltransferase polymorphism. *Pediatrics* 1999; 103 (6): 1224-1227
81. Maruo Y, Nishizawa K, Sato H, Sawa H, Shimada M. Prolonged unconjugated hyperbilirubinemia associated with breast milk and mutations of the bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase gene. *Pediatrics* 2000; 106 (5): E59
82. Meireles LC, Lum MA, Dennery PA. Antioxidant and cytotoxic effect of bilirubin on neonatal erythrocytes. *Pediatr Res* 1999; 45 (3): 355-62
83. 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): 578-581
84. Monaghan G, McLellan A, Mc Geehan A, Volti SL, Mollica F, Salemi I et al. Gilbert's syndrome is a contributory factor in prolonged unconjugated hyperbilirubinemia of the newborn. *J Pediatr* 1999; 134 (4): 441-446
85. Muslu N, Turhan AB, Eskandari G, Atici A, Ozturk OG, Kul S, Atik U. The frequency of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter region (TA) 7 polymorphism in newborns and its relation with jaundice. *J Trop Pediatr* 2006; 53 (1): 64-68
86. Newman TB, Easterling MJ. Yield of reticulocyte counts and blood smears in term infants. *Clin Pediatr (Phila)* 1994; 33 (2): 71-76
87. Newman TB, Xiong B, Gonzales VM, Escobar GJ. Prediction and prevention of extreme

- neonatal hyperbilirubinemia in a mature health maintenance organization. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000; 154 (11): 1140-1147
88. Newman TB, Liljestrand P, Escobar GJ. Infants with bilirubin levels of 30mg/dl or more in a large managed care organization. *Pediatrics* 2003; 111 (6 Pt 1): 1303-1311
89. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR. Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS* 2003; 100 (1): 177-82
90. Pesavento SJ. Gaúcho: a integração do múltiplo. In: Coutinho C. Eds. Rio Grande do Sul: Continente Múltiplo. Porto Alegre: editora gráfica Metrópole. 1993: 160p
91. Rubaltelli FF, Gourley GR, Loskamp N, Modi N, Roth-Kleiner M, Sender A et al. Transcutaneous bilirubin measurement: a multicenter evaluation of a new device. *Pediatrics* 2001; 107 (6): 1264-71
92. Salazar JMF, Sevilha AR, Conde ER, Bastus MB. Distribución del genotipo A(TA)7TAA asociado al síndrome de Gilbert en la población española. *Med Clin (Barc)* 2000; 115: 540-1
93. Samilchuk E, Al-Suliman I, Usanga E, Awadi SA. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase mutations and UDP-glucuronosyltransferase promoter polymorphism among G6PD deficient Kuwaitis. *Blood Cells Mol Dis* 2003; 31 (2): 201-205
94. Seco ML, Del Rio E, Barcelo MJ, Remavha A, Ginovart G, Moliner E, Baiget M. Interés del estudio de las variantes genéticas del promotor del gen UGT1A1 en la ictericia neonatal. *An Esp Pediatr* 2002; 56 (2): 139-143
95. Segel GB. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase and related deficiencies. In: Behrman RE, Kliegman RM, Eds. *Nelson textbook of pediatrics*. Philadelphia, PA. WB Saunders; 2004: 1636-38
96. Sgro M, Campbell D, Shah V. Incidence and causes of severe neonatal hyperbilirubinemia in Canada. *CMAJ* 2006; 175 (6): 587-90

97. Smitherman H, Stark AR, Bhutani VK. Early recognition of neonatal hyperbilirubinemia and its emergent management. *Semin in Fetal and Neonatal Med* 2006; 11 (3): 214-224
98. Stevenson DK, Fanaroff A, Maisels JM, Young BW, Wong RJ, Vreman HJ et al. Prediction of hyperbilirubinemia in term and near-term newborn infants. *Pediatrics* 2001; 108 (1): 31-39
99. Tiker F, Gulcan H, Kilicdag H, Tarcan A, Gurakan B. Extreme hyperbilirubinemia in newborn infants. *Clin Pediatr* 2006; 45 (3): 257-261
100. Trask BJ, Massa H, Kenwrick S, Gitschier J. Mapping of human chromosome Xq28 by two-color fluorescence in situ hybridization of DNA sequences to interphase cell nuclei. *Am J Hum Genet* 1991; 48 (1): 1-15
101. Vulliamy TJ, Othman A, Town M, Nathwani A, Falusi AG, Mason PJ, Luzzatto L. Polymorphic sites in the African population detected by sequence analysis of the glucose-6-phosphate-dehydrogenase gene outline the evolution of the variants A and A-. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88 (19): 8568-71
102. Vulliamy T, Luzzatto L, Hirono A, Beutler E. Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate-dehydrogenase. *Blood Cells Mol Dis* 1997; 23 (2): 302-313
103. Wainer S, Rabi J, Lyon M. Coombs' testing and neonatal hyperbilirubinemia. *CMAJ* 2007; 176 (7): 972 - 3
104. Watchko JF, Daodd MJ, Hansen TWR. Brain bilirubin content is increased in P-glycoprotein-deficient transgenic null mutant mice. *Pediatr Res* 1998; 44 (5): 763-66
105. Watchko JF. Indirect hyperbilirubinemia in the neonate. In Maisels MJ, Watchko JF(Eds) *Neonatal jaundice*. Amsterdam, the Netherlands: Harwood academic Publisher, 2000; 51-66
106. Watchko JF, Daood MJ, Biniwale M. Understanding neonatal hyperbilirubinaemia in the era of genomics. *Semin Neonatol* 2002; 7 (2): 143-152

107. Watchko JF. Genetics and the risk of neonatal hyperbilirubinemia. *Pediatr Res* 2004; 56 (5): 677-678
108. Watchko JF. Vigintiphobia Revisited. *Pediatrics* 2005; 115 (6): 1747-53
109. Weimer TA, Salzano FM, Hutz MH. Erythrocyte isozymes and hemoglobin types in a Southern Brazilian population. *J Hum Evol* 1981; 10 (4): 319-328
110. Weimer TA, Salzano FM, Westwood B, Beutler E. G6PD variants in three South American ethnic groups: population distribution and description of two new mutations. *Human Hered* 1998; 48 (2): 92-96
111. Weng YH, Chou YH, Lien RI. Hyperbilirubinemia in healthy neonates with G6PD deficiency. *Early Hum Dev* 2003; 71 (2): 129-136.
112. Wennberg RP, Ahlfors CE, Buthani VK, Johnson LH, Shapiro SM. Toward understanding kernicterus: a challenge to improve the management of jaundiced newborns. *Pediatrics* 2006; 117 (2): 474-485
113. WHO Working Group. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency. *Bull World Health Org.* 1989; 67: 601-611

## ANEXO I: ARTIGO

ADC ADC/2009/164640 - Manuscript Submission - Yahoo! Mail

Página 1 de 1



ADC ADC/2009/164640 - Manuscript Submission

Segunda-feira, 27 de Abril de 2009 14:33

De: "archdischild@bmjgroup.com" <archdischild@bmjgroup.com>  
Para: "Clarissa G Carvalho" <clarissagc@yahoo.com.br>

Ref: ADC/2009/164640 - Polymorphic variants of UGT1A1 in neonatal jaundice in Southern Brazil  
MS TITLE: Polymorphic variants of UGT1A1 in neonatal jaundice in Southern Brazil

Dear Dr. Carvalho,

This is an automatic message acknowledging your online submission to Archives of Disease in Childhood. You will receive more information when the Editorial Office has assigned an Editor to your paper.

To track the progress of your manuscript please visit [www.bmjgroup.com](#), enter your Author Area and click on Manuscripts Under Review (check status).\*

Thank you for giving ADC this opportunity to consider your work.

Yours sincerely

ADC Editorial Office

\* Please note: to track the status of your manuscript you must be registered with the journals online tracking system, Bench>Press.

Please visit: [www.bmjgroup.com](#)  
if you require assistance with registering.

The BMJ Group is one of the world's most trusted providers of medical information for doctors, researchers, health care workers and patients [www.bmjgroup.com](#). This email and any attachments are confidential. If you have received this email in error, please delete it and kindly notify us. The recipient should check this email and attachments for viruses because the BMJ Group accepts no liability for any damage caused by viruses. Emails sent or received by the BMJ Group may be monitored for size, traffic, distribution and content.

BMJ Publishing Group Limited

A private limited company, registered in England and Wales under registered number 03102371  
Registered office: BMA House, Tavistock Square, London WC1H 9JR, UK.

**Polymorphic variants of UGT1A1 in neonatal jaundice in Southern Brazil**

*Authors: Clarissa Gutiérrez Carvalho, Simone Martins Castro, Ana Paula Santin, Laura Alencastro de Azevedo, Maria Luiza Saraiva Pereira, Roberto Giugliani*

*Institutions: HCPA, Genetic Service, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; UFRGS, PPG Pediatrics, Porto Alegre, Brazil; UFRGS, Pharmacy Faculty, Porto Alegre, Brazil.*

*Running title: UGT1A1 polymorphism and neonatal jaundice in Brazil*

*Key words: UGT1A1, neonatal jaundice, hyperbilirubinemia, glucuronyl transferase, genetic variations*

*Corresponding author: Clarissa Gutiérrez Carvalho*

*Address: Avenida Itaquí 194/404. Porto Alegre-RS Brazil*

*Telephone/Fax: 55 51 33332125*

*Email: clarissagc@yahoo.com.br*



## **Abstract**

Neonatal jaundice is usually benign, but unfavorable outcomes may happen in some newborns; therefore, the identification of high-risk cases would be very useful. Some risk factors already known are: prematurity, dehydration, breastfeeding, blood incompatibility. Alterations in the hepatic conjugation of bilirubin due to UGT1A1 polymorphisms (the same involved in Gilbert's syndrome) may also contribute to this higher risk. In this condition, there is a variation in the sequence of the promoter region of the gene, with the addition or exclusion of TA base pairs. The objective of this study was to estimate the frequency of alleles and of genotypes of the promoter region of UGT1A1 gene in newborns with jaundice and to evaluate its association with severe hyperbilirubinemia. This was a prospective and observational study of cases and controls including all the newborns admitted for phototherapy at the Neonatology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, between March and December, 2007. Newborns of over 35 weeks of gestational age and weighing above 2,000g were enrolled. PCR was performed and analyzed in GeneMapper® program. Polymorphic genotypes were detected in 16% of the patients; 84% were classified as carriers of normal genotypes, and 7 of the 10 possible genotypes were identified. The prevalence of polymorphic genotypes in icteric patients was 13.5% and in normal individuals was 18.2%, not significant. A higher prevalence of polymorphisms in blacks and mulattos (25%) was identified when compared to whites (13%) ( $p=0.014$ ). Newborns with (TA)5/(TA)6 and (TA)7/(TA)8 presented higher bilirubinemia; there was 1 case of (TA)6/(TA)8 who had an extended hospitalization. *Conclusion:* In this sample of newborns from the South of Brazil, polymorphic variants of UGT1A1 were not associated to severe hyperbilirubinemia. Other factors and genic interactions should be sought in order to identify genetic risk factors to severe neonatal hyperbilirubinemia, possibly including the study of further polymorphisms, due to the high miscegenation that occurs in this area of Brazil.

## **Introduction**

Neonatal jaundice is usually a benign condition but, due to the potential toxicity of bilirubin, babies must be monitored in order to identify those who are at higher risk of unfavorable outcomes. Some risk factors are well-known, such as prematurity, blood incompatibility, deficiency of G6PD, breastfeeding, dehydration, asphyxia, and infection [1]. The association of these factors with abnormalities in hepatic conjugation of bilirubin was later proposed [15, 4].

UGT1A1 (TA)<sub>7</sub> polymorphism – the same found in Gilbert's syndrome – was described as being related to neonatal hyperbilirubinemia above 20mg/dL when in homozygosis [17]. This condition is characterized by an increase in indirect bilirubin with no structural hepatic disease or hemolysis, with light, intermittent episodes of jaundice and decreased hepatic conjugation (approximately 30% of normal) [7].

Polymorphic genotypes of UGT1A1 are characterized by variations in the promoter region sequence of the gene. In Gilbert's syndrome it contains the addition of one pair of TA bases in element TATAA of the gene promoter, originating genotype (TA)<sub>7</sub>/(TA)<sub>7</sub> instead of the wild genotype (TA)<sub>6</sub>/(TA)<sub>6</sub> [8]. Three other polymorphic variations associated with hyperbilirubinemia were also identified: (TA)<sub>5</sub>/(TA)<sub>6</sub>, which would lead to a slight increase in bilirubin; (TA)<sub>5</sub>/(TA)<sub>7</sub>, with prolonged neonatal jaundice; and (TA)<sub>7</sub>/(TA)<sub>8</sub>, which would show more severe values. Thus, the insertion or deletion of repetition TA in promoter TATA region is associated with hyperbilirubinemia [9]. These alleles were described as rare in Caucasian individuals and as having a frequency between 3.5 and 6.9% in the Afro-descendant population [5]; they were also described in the white Brazilian population [11].

The identification of subjects of Gilbert's syndrome, a genetically transmitted condition, should alert their relatives to the possibility of appearance of clinically significant jaundice in siblings and future descendants; moreover, it should allow counseling and the

programming of the follow-up of newborns in maternities that count with adequate resources [10].

The objective of the present study was to determine the frequency of alleles and genotypes of the promoter region of the UGT1A1 enzyme gene in newborns who present jaundice and to estimate their association with severe hyperbilirubinemia.

### **Subjects and Methods**

A prospective, observational study of cases and controls was carried out with all the newborns admitted between March and December 2007 for phototherapy at the Neonatology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil; newborns were over 35 weeks of gestational age and weighed above 2,000g. Patients admitted with cholestasis, cephalohematoma, or sepsis were excluded from the study. This study was approved by the ethics committee of the institution and was conducted in the neonatology service of a university hospital which is a reference center for the intensive care of severe newborns and cares for cases of smaller complexity as well as normal newborns. After the consent given by the caretakers of eligible patients, the patient's medical file was analyzed in order to obtain information on gestation, delivery room, blood group, breastfeeding, and weight loss. The surplus blood of collections underwent by the newborn were requested to the Hematology Sector or Blood Bank in order to extract the DNA for PCR and genetic analysis. For each patient enrolled, one control neonate was also studied.

All newborns had their DNA extracted by the procedure described by LAHIRI and NURNBERGER [19], with modifications. The quantification of the genomic DNA was performed by optical density in a BioPhotometer spectrophotometer (Eppendorf, catalog #6131000.012). The genomic DNA was amplified using PCR for the promoter region of the human UGT gene [6] with initiators 5'- GTCACGTGACACAGTCAAAC -3' and 5'-

TTTGCTCCTGCCAGAGGTT -3' marked with FAM. The reaction was performed in a thermocycler (*Veriti*<sup>™</sup> 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems). PCR products were analyzed by means of capillary electrophoresis in a genetic analyzer ABI 3130xl (Applied Biosystems Inc.) with the identification of alleles. Sizes of amplified sequences were calculated by comparison with the standard of molecular weight GS120-LIZ through GeneMapper® program (Applied Biosystems Inc.).

The statistical package SPSS was used; category data were tested by means of the chi-square test with or without Yates' correction; the odds ratio was calculated between the study factors and jaundice, and the analysis of continuous data was done by means of Student's t test, ANOVA, and Mann-Whitney test (variables without normal distribution). The level of statistical significance for any case was considered for an alpha value = 0.05 and 80% of power.

## **Results:**

During the nine months of data collection, a total of 490 neonates with gestational age over 35 weeks and weighing above 2,000g were included in the study (Table 1).

The 4 alleles previously described for the UGT1A1 gene promoter were identified, with a frequency of 1.6% for (TA)5, 63.4% for (TA)6, 34% for (TA)7, and 1% for (TA)8 in the sample analyzed.

Seven of the 10 possible genotypes were identified. The genotypes related to Gilbert's syndrome were present in 16% of the patients, as follows: 54 (11,6%) homozygote (TA)7, 5 (1%) heterozygote (TA)7/(TA)8, 9 (1,9%) heterozygote (TA)5/(TA)6, and 6 (1.3%) heterozygote (TA)5/(TA)7, according to data presented in Table 2.

In the whole sample, 74 (16%) patients with polymorphic genotypes and 390 (84%) normal homo or heterozygote were determined. The prevalence of polymorphic genotypes in icteric patients was 31 (13.5%) and in normal patients was 43 (18.2%), a difference which was not significant ( $p=0.08$ ). Also, no significant difference was found between sexes or in the outcomes of hyperbilirubinemia. As to ABO incompatibility, the incompatible group ( $n=120$ ) showed normal genotype in 99 (87%) and polymorphic variants in 15 (13%); this genotypic rate was also maintained in the cases without ABO incompatibility.

Among icteric patients, 103 (45%) presented genotype (TA)6/(TA)6; among control patients, 103 (44%) presented (TA)6/(TA)7. These rates showed no statistical difference when compared to the other genotypes in the 2 groups analyzed ( $p=0.21$ ).

Patients were divided into 2 groups, according to their UGT1A1 genotypes: Group A – homozygote (TA)6/(TA)6, heterozygote (TA)6/(TA)7 and (TA)6/(TA)8, and Group B – homozygote (TA)7/(TA)7, heterozygote (TA)7/(TA)8, (TA)5/(TA)6 and (TA)5/(TA)7, respectively considered as “low risk” and “polymorphic”.

As to ethnic groups, 310 (86.6%) of white neonates showed group A or low risk

genotypes, and 48 (13.4%), group B genotypes, while among blacks, 18 (34%) showed group B or polymorphic genotypes, and 35 (76%), group A genotypes ( $p=0.001$ ).

Grouping blacks and mulattos in a single category, these polymorphic genotypes were present in 24.5% of the babies ( $n=26$ ), which is higher than what was found among whites ( $p=0.014$ ).

Among black anicteric patients, 12 (48%) showed polymorphic genotypes (group B),  $p=0.000$ , and 22 of the icteric patients (78.6%) showed low risk genotypes.

Among the newborns undergoing treatment for jaundice ( $n=229$ ), mean total bilirubin in group A was higher than that in group B, although the values were not significantly different (16.5mg/dL vs. 15.5mg/dL) ( $p=0.02$ ).

Later, these patients were divided into 3 groups according to their UGT1A1 genotypes: Group I – homozygote (TA)6/(TA)6, Group II – heterozygote (TA)6/(TA)7 and (TA)6/(TA)8, and Group III – homozygote (TA)7/(TA)7, heterozygote (TA)7/(TA)8, (TA)5/(TA)6 and (TA)5/(TA)7, in order to evaluate the possibility of existence of an intermediary risk of hyperbilirubinemia in Group II. No difference was found between the means of total bilirubins in the 3 groups (16.5 vs. 16.4 vs. 15.5mg/dL) ( $p=0.25$ ).

In the sample analyzed, there were 156 (44.4%) white babies who showed genotype (TA)6/(TA)6, and 18 (34%) black babies with polymorphic genotypes (group III) ( $p=0.001$ ).

In the group of icteric patients, neonates with polymorphic genotypes of risk of UGT1A1 (group III) showed a slightly younger age at hospitalization when compared to the 2 groups of low or intermediary risk (68h, 74h, 76h, respectively), but this difference was not significant ( $p=0.65$ ). Their weight at hospitalization was not different, neither their percentual loss.

As to the treatment of icteric patients, 21 (68%) of the patients in Group III underwent simple phototherapy; no significant differences were found when compared to babies with no

polymorphisms. No patient in Group III, in phototherapy, was re-hospitalized, but 3 (9.6%) repeated phototherapy, but this was not significant when compared to the other genotypes.

Median time of phototherapy was 36h and the range was 12h to 7 days. The baby with genotype (TA)6/(TA)8 was in treatment for 7 days, followed by 60h for the 3 babies with (TA)7/(TA)8, and 50h for the 3 babies with (TA)5/(TA)6.

After correcting the value of total bilirubin at hospitalization to an estimate of 48h of life for all neonates being treated with phototherapy (the figure for indication of phototherapy of the 2004 AAP guidelines was used as tool for this), we found higher bilirubin values in the neonates with genotype (TA)5/(TA)6 and (TA)7/(TA)8 (16.9mg/dL and 16.8mg/dL, respectively), as Figure 1 shows.

## **Discussion:**

BANCROFT et al [4] were the first to confirm an association between Gilbert's syndrome, identified by the presence of the variant of the UGT1A1 gene promoter, and neonatal jaundice. Four previously described alleles were identified for the promoter of this gene and 7 of 10 possible genotypes. The genotypes related to Gilbert's syndrome were present in 15.7% of the patients, 11.6% being homozygote (TA)7. A 10-13% prevalence of (TA)7/(TA)7 was identified in an adult Scottish population, and 16% in a Dutch population [22, 7]. In Spain, a 10% frequency was found in an adult population [26], and 14% in icteric neonates [27]; this finding was very similar to that observed in Portugal, where the value of 9.9% was found [13] and smaller than that found in the South of Italy, where a frequency of 15% was described [14]. In the US, a prevalence of 12.4% was found [20], and another Brazilian study indicated the value of 12.5% [11]. In Asians, this value was only 3% to 5% [5], and the most common finding was the missense mutation in the codon with an amino acid change in its protein formation [21].

In our study, the genotypes associated with a higher level of hyperbilirubinemia were (TA)5/(TA)6 and (TA)7/(TA)8; other studies have also identified (TA)5/(TA)7 as being responsible for prolonged neonatal jaundice [9], but this did not happen in our sample. These results may have occurred due to the small number of babies with these polymorphic variants among the individuals analyzed. Alleles (TA)5 and (TA)8 have also been described by BANCROFT et al [4] and BEUTLER et al [5]; the latter found in the black population a frequency of respectively 3.5% and 6.9%, higher than what was found in our sample. It is possible that these differences in frequencies found in the different studies may also be associated with the different methodologies employed in the genotypic characterization used in the studies.

Some polymorphic alleles, such as (TA)5 and (TA)8, associated to a higher risk of



hyperbilirubinemia were not found in white individuals in Portugal [13], but they were well characterized in other studies in the Brazilian population, both in white and in black and mulatto individuals [11]. In our sample, polymorphic alleles were also more frequent in Afro-descendant newborns.

In Group B, the mean total bilirubin was lower than the mean in Group A (low risk), although the values showed no significant clinical difference. The same happened in the creation of an intermediary risk group, that is, heterozygote (TA)6/(TA)7 and (TA)6/(TA)8. These results are the inverse of what was described by MONAGHAN et al [22] but are in line with the results found in studies conducted in Turkey, which found no relation between the polymorphic variant and hyperbilirubinemia [3]. The analysis of an intermediary risk group was the result of the findings of the classic study carried out by KAPLAN et al [15]; that study suggested an additive risk effect as allele (TA)7 appeared in the genotype, but this did not happen in the present sample of newborns. There was a higher rate of genotype (TA)6/(TA)6 in icteric patients and of (TA)6/(TA)7 in anicteric patients, with no statistical significance, but justifiable by the higher prevalence of these genotypes when compared to the other genotypes described.

The analysis of the 3 genotypic groups of risk of UGT1A1 showed there were more blacks in Group III – polymorphic variants ( $p=0.001$ ). The frequency of alleles (Table 3) was quite similar to that of another Brazilian study which found a higher prevalence of genotype (TA)7/(TA)7 in blacks and mulattos when compared to whites [11]. The study carried out by KAPLAN et al [18] in a population of Nigerian neonates indicated the following allelic frequencies: (TA)5 7%, (TA)6 46%, (TA)7 44%, and (TA)8 2%; in this case, the frequency of (TA)7 was similar to that observed in our black and mulatto babies, but the remaining were different, probably due to the miscegenation found in our population of the South of Brazil, whose colonization was composed of Indian, African, Portuguese, Spanish, German, and

Italian, followed by Polish, Jewish, Syrian, Lebanese, and Japanese [25].

In the group of icteric patients, hospitalization was slightly earlier (68h) in neonates with polymorphic genotypes of UGT1A1 when compared to the 2 groups of low or intermediary risk, but this finding was not significant. The study by BANCROFT et al [4] suggested that Gilbert's syndrome accelerates the development of neonatal jaundice in the 2 first days of life.

The patients with polymorphic genotypes (such as Group B or III) did not show worse outcomes when compared to the patients with lower risk genotypes, and they showed neither statistically significant time of hospitalization nor a longer period of phototherapy. This finding differed from the results of a study carried out with neonates with prolonged jaundice compared to acute jaundice which found a higher prevalence of genotype (TA)7/(TA)7 [23]. However, the baby with genotype (TA)6/(TA)8 received phototherapy for 7 days, followed by 60h and 50h, respectively, for the 3 (TA)7/(TA)8 babies and the 3 (TA)5/(TA)6 babies. Genotype (TA)6/(TA)8 was described as being associated with severe or prolonged hyperbilirubinemia in the study by BURCHELL and HUME [9], was not described in the classic study by KAPLAN et al [15], and by analyzing the study by BEUTLER et al [5] one could infer that this genotype would lead to a low activity of UGT1A1, due to the addition of allele (TA)8 to the wild allele. In the present study, this genotype was most prevalent in anicteric patients; however, the number of individuals with this genotype was small for a definitive conclusion, which suggests the need for further investigations.

In icteric patients, the prevalence of polymorphic genotypes of risk of UGT1A1 was 13.5% and in normal patients was 18.2%, but this difference was not significant. The same occurred in the Italian study [12], which suggested that variant (TA)7/(TA)7 did not contribute to neonatal jaundice in this population and that other factors should be studied. This association was confirmed neither by a Spanish study [27] nor by a Turkish study [24].

KAPLAN et al [15] showed that neither the variant nor the G6PD deficiency alone would develop jaundice but their combination and under the effect of time. As to ABO incompatibility, the incompatible group presented normal UGT1A1 genotypes in 87% of the individuals and polymorphic genotypes in 13% of the individuals; this genotypic rate was maintained in the individuals without incompatibility and differed from that proposed by KAPLAN et al [16], who attributed hyperbilirubinemia in ABO incompatibility to the association with the polymorphic variant of UGT1A1.

A study conducted in the US [20] showed the coexpression of UGT1A1 variants with other genes, such as homozygote for the allele (TA)<sub>7</sub>, which were also homozygote or heterozygote for the OATP1B1 polymorphism A388G in 70%. This variant of the carrier enzyme, which was not researched in our sample, along with other factors could perhaps be further researched to add relevant information on hyperbilirubinemia in newborns.

Thus, in the present sample of newborns from the South of Brazil the presence of polymorphic variants of UGT1A1 could not be associated to severe hyperbilirubinemia. Rarer genotypes were found, with some relation with higher bilirubins and a longer use of phototherapy, but the number of individuals was small to allow definitive conclusions. Variants showed allelic prevalence and frequencies similar to those observed in other populations, with a highlight to the genotypes of higher risk in blacks and mulattos. Possibly due to the high miscegenation found in our state, other factors and genic interactions should be sought in order to explain severe neonatal hyperbilirubinemia, possibly including the study of other polymorphisms.

## **Acknowledgements**

The group would like to thank FIPE, CnPq, Capes-Reuni, the Postgraduate Program of UFRGS by their financial support; and to the Neonatology Service, Hemotherapy Service, Gene Therapy Center and to all the staff of these institutions who contributed to this work.

## **References:**

1. American Academy of Pediatrics Provisional Committee for quality improvement and Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Practice parameter: management of hyperbilirubinemia in the healthy term newborn. *Pediatrics* 1994; 94 (4): 558-565
2. American Academy of Pediatrics Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. *Pediatrics* 2004; 114 (1): 297–316
3. Babbaoglu MO, Yigit S, Aynacioglu AS, Kerb R, Yurdakok M, Bozkurt A. Neonatal jaundice and bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene polymorphism in Turkish patients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 98 (4): 377-80
4. Bancroft JD, Kreamer B, Gourley GR. Gilbert syndrome accelerates development of neonatal jaundice. *J Pediatr* 1998; 132 (4): 656-60
5. Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 (14): 8170-8174
6. Bezerra MAC. Aspectos clínicos, bioquímicos e moleculares das síndromes talassêmicas em população do estado de Pernambuco. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica. Campinas – SP, 2007.
7. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantia S, de Boer A, Oostra BA et al. The genetic

- basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333 (18): 1171-5
8. Bosma PJ. Inherited disorders of bilirubin metabolism. *J Hepatol* 2003; 38 (1): 107 - 117
  9. Burchell B, Hume R. Molecular genetic basis of Gilbert's syndrome. *J Gastroenterol and hepatol* 1999; 14 (10): 960-66.
  10. Facchini FP, de Assis AM. Hiperbilirrubinemia neonatal prolongada devido à associação entre síndrome de Gilbert e doença hemolítica por incompatibilidade RhD. *J Pediatr (Rio J)* 2005; 81 (5): 421-4.
  11. Fertrin KY, Gonçalves MS, Saad STO, Costa FF. Frequencies of UDP-glucuronosyltransferase 1 gene promoter polymorphisms among distinct ethnic groups from Brazil. *Am J Med Gen* 2002; 108 (2): 117-119.
  12. Galanello R, Cipollina L, Carboni G, Perseu L, Barella S, Corrias A, Cao A. Hyperbilirubinemia, glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency and Gilbert's syndrome. *Eur J Pediatr* 1999; 158 (11): 914-916
  13. Gonçalves E, Bento MC, Relvas L, Ribeiro ML, Tamagnini GP. Síndrome de Gilbert – frequência do genótipo UGT1A1 (TA)<sub>7</sub>/(TA)<sub>7</sub> numa amostra da população portuguesa. *J Port Gastroenterol* 2001, 8: 250-53
  14. Ioloscan A, Perrotta S, Coppola B, Carbone R, Miraglia del Giudice E. Frequency of Gilbert's syndrome associated with UGT1A1(TA)<sub>7</sub> polymorphism in Southern Italy. *Haematologica* 2000; 85 (3): 335-6
  15. Kaplan M, Reunbaum P, Levy-Lahad E, Hammerman C, Lahad A, Beutler E. Gilbert syndrome and glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency: a dose-dependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94 (22): 12128 - 12132
  16. Kaplan M, Hammerman C, Renbaum P, Klein G, Levy-Lahad E. Gilbert's syndrome and

- hyperbilirubinemia in ABO-incompatible neonates. *Lancet* 2000, 356 (9230): 652-3
17. Kaplan M, Hammerman C. G6PD deficiency: a potential source of severe neonatal hyperbilirubinaemia and kernicterus. *Semin Neonatol* 2002; 7 (2): 121-128
  18. Kaplan M, Slusher T, Renbaum P, Essiet DF, Pam S, Levy-Lahad E et al. (TA)<sub>n</sub> UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter polymorphism in Nigerian Neonates. *Pediatr Res* 2008; 63: 109-111
  19. Lahiri DK, Nurnberger Jr JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMV DNA from blood for RFLP studies. *Nuc Acids Res* 1991, 19 (19): 5444
  20. Lin Z, Fontaine J, Watchko JF. Co-expression of gene polymorphisms involved in bilirubin production and metabolism. *Pediatrics* 2008; 122 (1): e156-e162
  21. Maruo Y, Nishizawa K, Sato H, Doida Y, Shimada M. Association of neonatal hyperbilirubinemia with bilirubin UDP-glucuronyltransferase polymorphism. *Pediatrics* 1999; 103 (6): 1224-1227
  22. 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): 578-581
  23. Monaghan G, McLellan A, Mc Geehan A, Volti SL, Mollica F, Salemi I et al. Gilbert's syndrome is a contributory factor in prolonged unconjugated hyperbilirubinemia of the newborn. *J Pediatr* 1999; 134 (4): 441-446
  24. Muslu N, Turhan AB, Eskandari G, Atici A, Ozturk OG, Kul S, Atik U. The frequency of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter region (TA)<sub>7</sub> Polymorphism in newborns and its relation with jaundice. *J Trop Pediatr* 2006; 53 (1): 64-68
  25. Pesavento SJ. Gaúcho: a integração do múltiplo. In: Coutinho C. Eds. Rio Grande do Sul: Continente Múltiplo. Porto Alegre: editora gráfica Metrópole. 1993: 160p
  26. Salazar JMF, Sevilha AR, Conde ER, Bastus MB. Distribución del genotipo A(TA)<sub>7</sub>TAA

asociado al síndrome de Gilbert en la población española. *Med Clin (Barc)* 2000; 115: 540-1

27. Seco ML, Del Rio E, Barcelo MJ, Remavha A, Ginovart G, Moliner E, Baiget M. Interés del estudio de las variantes genéticas del promotor del gen UGT1A1 en la ictericia neonatal. *An Esp Pediatr* 2002; 56 (2): 139-143

## **TABLES**

Table 1: Demographic data on the 490 neonates analyzed between March and December 2007 at HCPA.

<b>Characteristics</b>	<b>Icteric patients (n=243)</b>	<b>Anicteric patients (n=247)</b>	<b>P</b>
Sex Male	141 (58%)	122 (49.4%)	0.055
Female	102 (42%)	125 (50.6%)	
Ethnic Group White	185 (76.1%)	191 (77.3%)	<i>NS</i>
Black	29 (11.9%)	27 (10.9%)	
Mulatto	29 (11.9%)	29 (11.7%)	
Adequate weight for gestational age	187 (77%)	192 (77.7%)	<i>NS</i>
Small	44 (18.1%)	40 (16.2%)	
Large	12 (4.9%)	15 (6.1%)	
ABO Incompatibility	73 (30%)	47 (19%)	0.005
Rh Incompatibility	23 (9.5%)	26 (10.5%)	<i>NS</i>
Vaginal Delivery	164 (67.5%)	160 (64.8%)	<i>NS</i>
Cesarean Section	79 (32.5%)	87 (35.2%)	
Need for reanimation	18 (7.4%)	28 (11.3%)	<i>NS</i>
G6PD Deficiency	13 (5.5%)	9 (3.7%)	<i>NS</i>
Birth Weight (g)	3,073 ± 530	3,217 ± 460	0.001
Gestational Age (weeks)	38.4 ± 1.7	39.5 ± 1.3	0.00
Mother's Age (years)	25.4 ± 6.6	26 ± 6.8	<i>NS</i>
Number of pre-natal visits	7 ± 3.1	6.5 ± 3.3	<i>NS</i>
Apgar score at 5'	9 ± 1	9 ± 1	<i>NS</i>
G6PD Activity (Ug/Hb)	17.2 ± 5.9	17.2 ± 5.6	<i>NS</i>

---

Values are mean ± standard deviation or the number of individuals and percentage, as adequate.  
NS indicates not significant



Table 2: Genotypes of the promoter region of UGT1A1 gene in the 464 newborns analyzed

<b>Genotype</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>UGT1A1</b>		
(TA)5/(TA)6	9	1,9
(TA)5/(TA)7	6	1,3
(TA)6/(TA)6	189	40,7
(TA)6/(TA)7	197	42,4
(TA)6/(TA)8	4	0,8
(TA)7/(TA)7	54	11,6
(TA)7/(TA)8	5	1

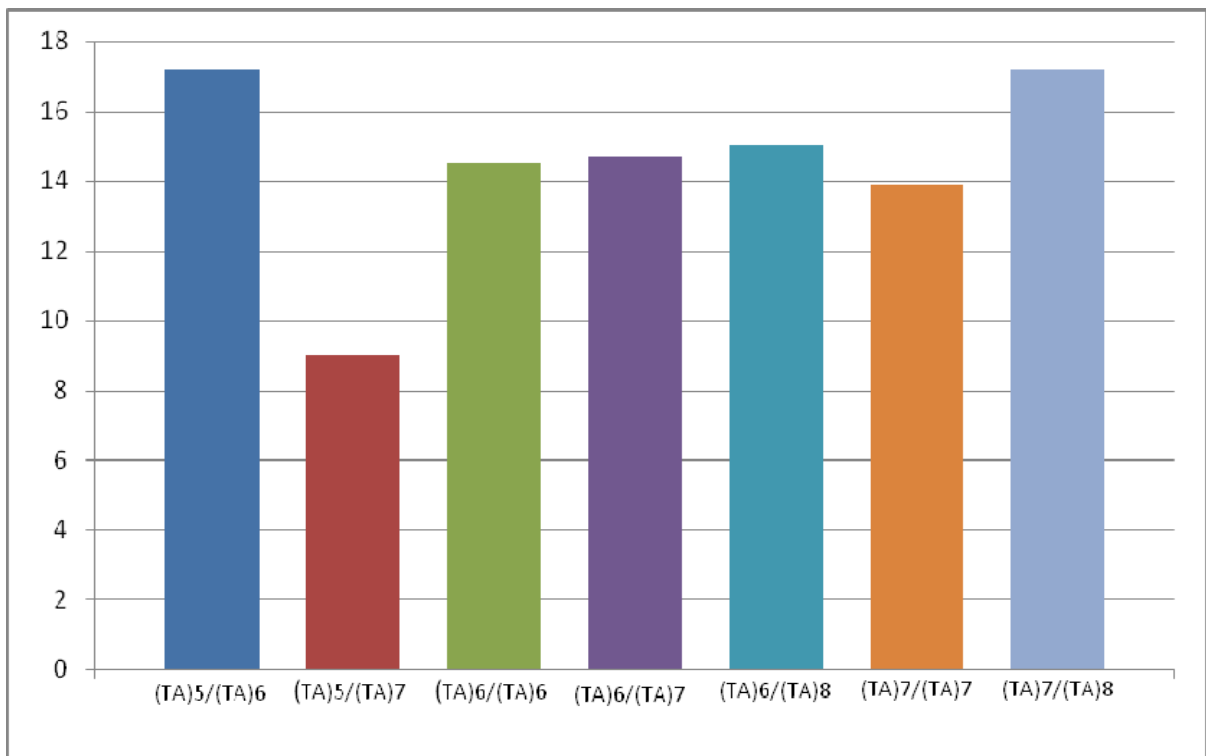
Table 3: Allelic frequency of polymorphisms in the UGT1A1 gene promoter in whites and Afro-descendants

<b>Allele</b>	<b>Whites* n (%)</b>	<b>Afro-descendants *** n (%)</b>	<b>p</b>
(TA)5	10 (1.4%)	5 (2.3%)	<i>NS</i>
(TA)6	477 (66.6%)	111 (52.3%)	<0.001
(TA)7	225 (31.4%)	91 (43%)	<0.001
(TA)8	4 (0.6%)	5 (2.4%)	<0.001

\* Total of alleles 716 / \*\*\* Total of alleles 212  
 Number in between parentheses = number of alleles

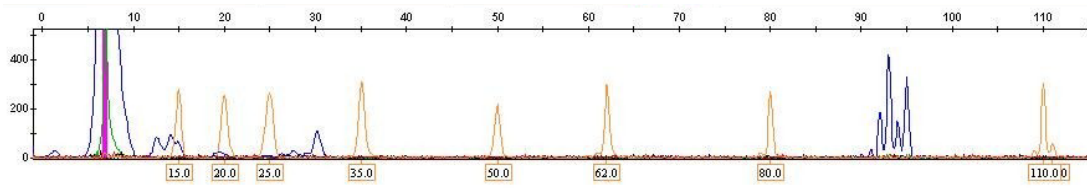
## **FIGURE LEGEND**

Figure 1: Mean of total bilirubin levels (mg/dL) in hospitalization corrected to 48h of life in each UGT1A1 genotype

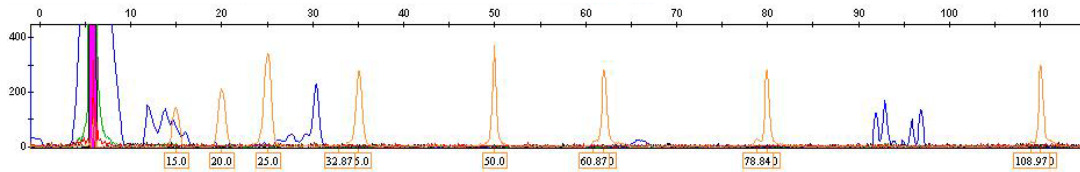


## ANEXO II - GENÓTIPOS

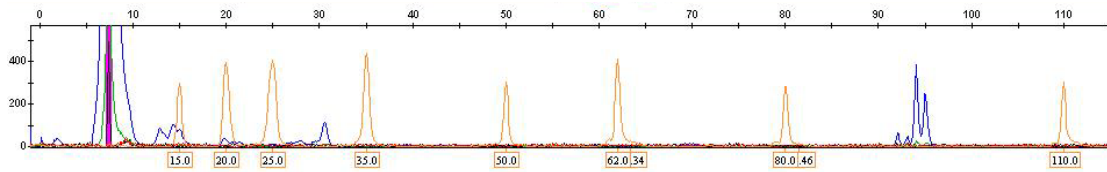
(TA)5/(TA)6



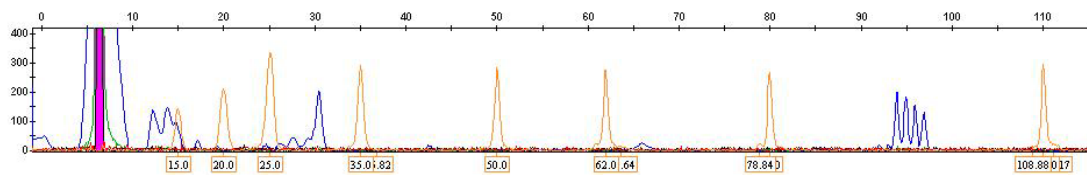
(TA)5/(TA)7



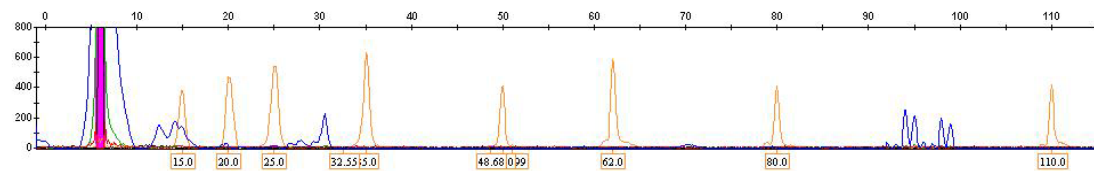
(TA)6/(TA)6



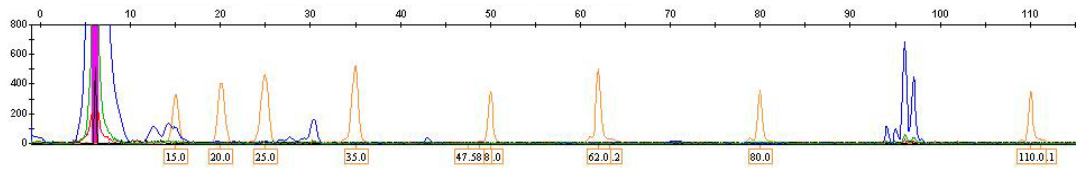
(TA)6/(TA)7



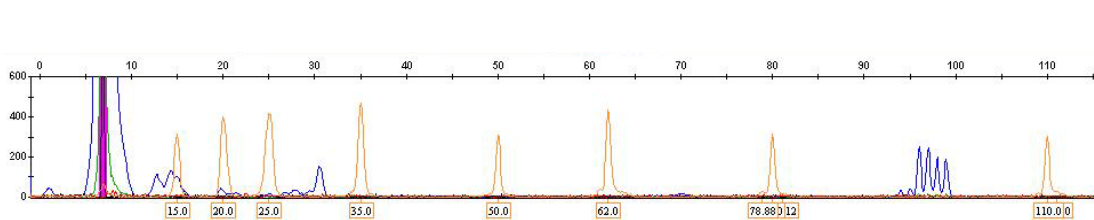
(TA)6/(TA)8



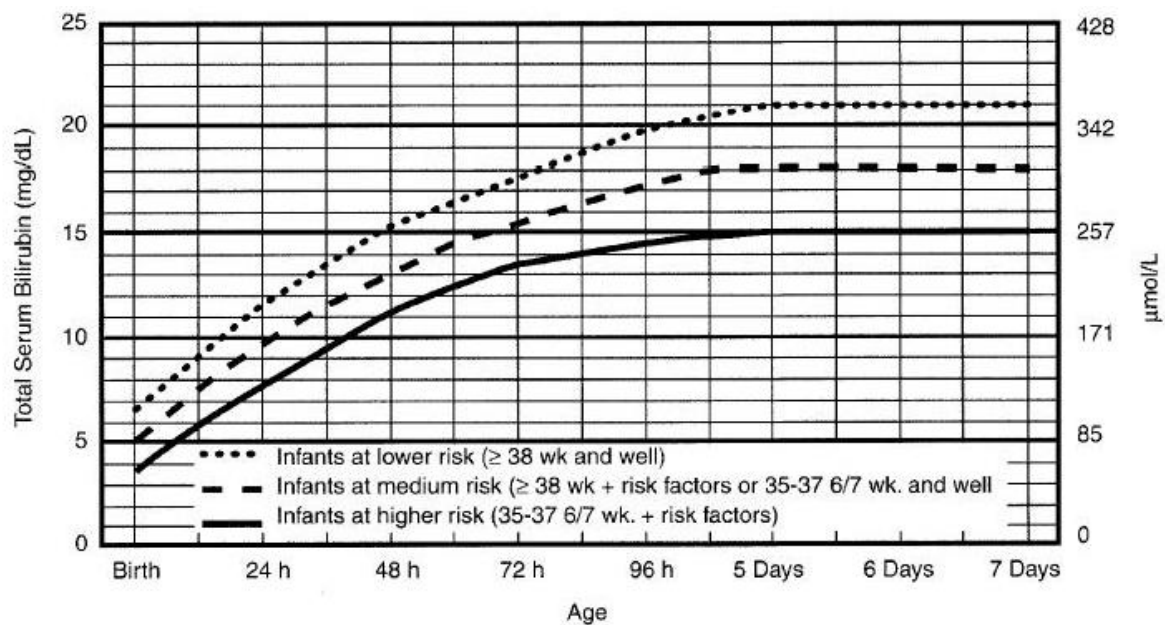
(TA)7/(TA)7



(TA)7/(TA)8



**ANEXO III – FIGURA DA INDICAÇÃO DE FOTOTERAPIA EM NEONATOS COM IDADE GESTACIONAL  $\geq 35$  SEMANAS**



Fonte: American Academy of Pediatrics Subcommittee on Hyperbilirubinemia (2004)