

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

**POLIMORFISMOS NOS GENES DAS PROTEÍNAS  
TRANSPORTADORAS DE ÂNIONS ORGÂNICOS NA  
HIPERBILIRRUBINEMIA NEONATAL: UM ESTUDO  
DE CASOS E CONTROLES.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LAURA ALENCASTRO DE AZEVEDO

PORTO ALEGRE, BRASIL  
2012

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

**POLIMORFISMOS NOS GENES DAS PROTEÍNAS  
TRANSPORTADORAS DE ÂNIONS ORGÂNICOS NA  
HIPERBILIRRUBINEMIA NEONATAL: UM ESTUDO  
DE CASOS E CONTROLES.**

LAURA ALENCASTRO DE AZEVEDO

**Orientadora: Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira**

**Coorientadora: Profa. Dra. Ursula da Silveira Matte**

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  
2012

### CIP - Catalogação na Publicação

Azevedo, Laura Alencastro de  
Polimorfismos nos genes das proteínas  
transportadoras de ânions orgânicos na  
hiperbilirrubinemia neonatal: um estudo de casos e  
controles. / Laura Alencastro de Azevedo. -- 2012.  
120 f.

Orientadora: Themis Reverbel da Silveira.  
Coorientadora: Ursula Matte.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,  
Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Hiperbilirrubinemia Neonatal. 2.  
Polimorfismos. 3. UGT1A1. 4. SLC01B1. 5. SLC01B3. I.  
Silveira, Themis Reverbel da, orient. II. Matte,  
Ursula, coorient. III. Título.

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:

16/02/2012

E FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Paulo Roberto Antonacci Carvalho

PPG em Saúde da Criança e do Adolescente, FAMED, UFRGS

Prof. Dr. Boaventura Antônio dos Santos

Departamento de Pediatria, FAMED, UFRGS

Prof. Dr. Diogo André Pilger

Departamento de Análises, FACFAR, UFRGS

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira, entusiasta e incentivadora, que me apoiou sempre e acolheu como mais um de seus filhos “Hepatológicos”.

À minha Coorientadora Profa. Dra. Ursula da Silveira Matte, sempre disponível e com sugestões muito inteligentes.

À Clarissa Gutiérrez Carvalho, a grande idealizadora deste trabalho, que me auxiliou e ajudou durante todo o processo.

À Profa. Dra. Simone Martins de Castro, que me ajudou a chegar até aqui, sempre acreditando em mim.

Aos meus queridos colegas do Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental (Dr. Jorge, Thais, Gabi, Renata, Felipe, Álvaro, Rafael, Laisa, Grazi, Thayssa, Ana, Najara, Cleandra, Gustavo, Darlan, Silvia), pela ajuda durante todo esse tempo, amizade e todas as risadas compartilhadas.

À Profa. Dra. Mara Hutz, por auxílio na análise final dos resultados e sugestão de análise de haplótipos.

Ao pessoal do Centro de Terapia Gênica, pela ajuda e apoio em diversos momentos, em especial à Fernanda Sperb, que me ajudou várias vezes com *TaqMan*.

Às secretarias do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente e a do Centro de Pesquisa Experimental pelo auxílio nos processos de compras, documentação e outros.

Aos meus pais, pois sem eles nada disso seria possível.

## RESUMO

A icterícia costuma ser um fenômeno fisiológico em recém-nascidos saudáveis, contudo, hiperbilirrubinemia não conjugada grave ocorre em 5 a 6% dessa população. Tem sido sugerido que a variabilidade genética de genes de proteínas transportadoras de bilirrubina poderia aumentar o risco de hiperbilirrubinemia quando associada a outros fatores icterogênicos. O presente estudo incluiu neonatos com idade gestacional de 35 semanas ou mais e peso superior a 2000g com indicação para fototerapia. Os polimorfismos nos genes *SLCO1B1* (rs4149056 e rs2306283) e *SLCO1B3* (rs17680137 e rs2117032) foram analisados por sondas de hidrólise. Um total de 167 hiperbilirrubinêmicos e 247 recém-nascidos controles foi arrolado. Sexo, incompatibilidade ABO, peso ao nascimento e idade gestacional diferiram entre os grupos, mas as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos dos genes *SLCO1B* não. Na análise por regressão logística, incompatibilidade ABO, idade gestacional e o alelo polimórfico T do rs2117032 permaneceram no modelo. A presença desse polimorfismo pareceu conferir proteção à hiperbilirrubinemia. Os indivíduos que eram homocigotos para o alelo G do rs2306283 e deficientes da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase eram mais frequentes entre os casos. No presente estudo foram observadas apenas fracas interações entre os diferentes polimorfismos e os fatores clínico-ambientais.

**Palavras-chave:** Hiperbilirrubinemia Neonatal; Polimorfismos; *UGT1A1*; *SLCO1B1*; *SLCO1B3*.

## ABSTRACT

Jaundice usually is a physiological phenomenon among newborns; however, severe hyperbilirubinemia occurs in 5% to 6% of this population. It has been suggested that genetic variation in the genes of bilirubin transporters could enhance the risk of hyperbilirubinemia when co-expressed with other icterogenic conditions. The present study included newborns with a gestational age of greater than 35 weeks and weights greater than 2000 g with indications for phototherapy. The polymorphisms from *SLCO1B1* (rs4149056 and rs2306283) and *SLCO1B3* (rs17680137 and rs2117032) genes were analyzed by hydrolysis probes. A total of 167 hyperbilirubinemic infants and 247 control subjects were enrolled. The gender, ABO incompatibility, birth weight, and gestational age differed between the groups but the allelic and genotypic frequency of the polymorphisms from *SLCO1B* genes did not. In logistic regression, the ABO incompatibility, gestational age, and polymorphic T allele of rs2117032 remained in the model. The presence of this polymorphism seemed to provide protection from hyperbilirubinemia. The individuals that were homozygous for the G allele of rs2306283 and glucose 6-phosphate-dehydrogenase deficient were more frequent among the cases. In the present study there were observed only weak associations between the different polymorphisms and the clinical/environmental factors.

**Keywords:** Neonatal Hyperbilirubinemia; Polymorphisms; *UGT1A1*; *SLCO1B1*; *SLCO1B3*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Formação da bilirrubina. ....	17
Figura 2. Captação, transporte, conjugação e excreção da bilirrubina. ....	20
Figura 3. Diretrizes para fototerapia em recém-nascidos hospitalizados com idade gestacional de 35 ou mais semanas. ....	25
Figura 4: Abordagem possível para avaliar a icterícia do recém-nascido. ....	27
Figura 5: <i>Locus</i> da família UGT1A. ....	32
Figura 6. Níveis séricos totais de bilirrubina para os 167 recém-nascidos hospitalizados para fototerapia, de acordo com as diretrizes da Associação Americana de Pediatria <i>versus</i> idade em horas. ....	55
Figura 7. Gráfico ilustrando o fenômeno de FRET (fluorescência por transferência de energia ressonante). ....	89
Figura 8. Ensaio por sondas de hidrólise TaqMan (ABI, EUA). ....	90



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores associados à hiperbilirrubinemia neonatal. ....	26
Tabela 2. Nomenclatura, tamanho, substratos endógenos, tecidos expressos, <i>locus</i> gênico e número de éxons das proteínas de transporte mais bem caracterizadas na literatura: OATP1A2, OATP2B1, OTAP1B1 e OATP1B3.....	36
Tabela 3: Dados clínicos e laboratoriais dos indivíduos arrolados no estudo. ....	43
Tabela 4. Éxons, tamanho dos fragmentos amplificados, sequências dos primer, e respectivas temperaturas de anelamento para as mutações G202A, A376G e C563T do gene G6PD. ....	46
Tabela 5. Enzimas de restrição e fragmentos obtidos para cada uma das mutações do gene G6PD. ....	47
Tabela 6. Dados clínicos e demográficos dos controles e dos pacientes (variáveis categóricas). .....	53
Tabela 7. Dados clínicos e demográficos dos controles e dos pacientes (variáveis contínuas). .....	54
Tabela 8. Valores médios de bilirrubina sérica total dos 167 casos. ....	55
Tabela 9. Características dos pacientes com seguimento neurológico.....	57
Tabela 10. Caracterização molecular dos 21 indivíduos com deficiência de G6PD.....	59
Tabela 11. Frequência alélica do polimorfismo rs8175347 da <i>UGT1A1</i> . ....	60
Tabela 12. Frequência genotípica do polimorfismo rs8175347 da <i>UGT1A1</i> .....	60

Tabela 13. Frequência alélica do polimorfismo rs8175347 da de acordo com a cor da pele..	61
Tabela 14. Frequência dos genótipos do polimorfismo rs8175347 da de acordo com a cor da pele. ....	61
Tabela 15. Frequências alélica e genotípica dos polimorfismos do gene <i>SLCO1B1</i> . ....	62
Tabela 16. Frequências alélica e genotípica dos polimorfismos do gene <i>SLCO1B3</i> . ....	63
Tabela 17. Frequência alélica dos polimorfismos rs2306283 e rs2117032 de acordo com a cor da pele.....	63
Tabela 18. Frequências haplotípicas dos polimorfismos rs4149056, rs2306283, rs2117032 e rs17680137 dos genes <i>SLCO1B1</i> e <i>SLCO1B3</i> . ....	64
Tabela 19. Variáveis que permaneceram no modelo de regressão logística para o desfecho hiperbilirrubinemia neonatal grave.....	65
Tabela 20. Frequência do genótipo TA <sub>7</sub> /TA <sub>7</sub> em amostras de neonatos hiperbilirrubinêmicos e controles em diversos países.....	71
Tabela 21. Dados clínicos e demográficos dos controles e dos pacientes (variáveis categóricas).....	91
Tabela 22. Dados clínicos e demográficos dos controles e dos pacientes (variáveis contínuas). ....	92
Tabela 23. Valores médios de bilirrubina sérica total dos 167 casos.....	93
Tabela 24. Caracterização molecular dos 21 indivíduos com deficiência de G6PD.....	95
Tabela 25. Frequência alélica do polimorfismo rs8175347 da <i>UGT1A1</i> . ....	95

Tabela 26. Frequência genotípica do polimorfismo rs8175347 da <i>UGT1A1</i> .....	96
Tabela 27. Frequência alélica do polimorfismo rs8175347 da de acordo com a cor da pele..	97
Tabela 28. Frequência dos genótipos do polimorfismo rs8175347 da de acordo com a cor da pele. ....	97
Tabela 29. Frequências alélica e genotípica dos polimorfismos do gene <i>SLCO1B1</i> . ....	98
Tabela 30. Frequências alélica e genotípica dos polimorfismos do gene <i>SLCO1B3</i> . ....	99
Tabela 31. Frequência alélica dos polimorfismos rs2306283 e rs2117032 de acordo com a cor da pele.....	99
Tabela 32. Frequências haplotípicas dos polimorfismos rs4149056, rs2306283, rs2117032 e rs17680137 dos genes <i>SLCO1B1</i> e <i>SLCO1B3</i> . ....	100
Tabela 33. Variáveis que permaneceram no modelo de regressão logística para o desfecho hiperbilirrubinemia neonatal grave.....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS

11q2	Região 2 do braço longo do cromossomo 11
12p2	Região 2 do braço curto do cromossomo 12
aa	Aminoácidos
AAP	<i>American Academy of Pediatrics</i> (Academia Americana de Pediatria)
ABC	<i>Anion Binding Cassette</i> (Família de transportadores de efluxo)
AIG	Adequado para Idade Gestacional
ATP	Adenosina Trifosfato
BST	Bilirrubina Sérica Total
CNI	Síndrome de Crigler-Najjar tipo I
CNII	Síndrome de Crigler-Najjar tipo II
CO	Monóxido de Carbono
CPE	Centro de Pesquisa Experimental
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Dideoxynucleotídeos
FRET	Fluorescência por Transferência de Energia Ressonante
G6PD	Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

GIG	Grande para a Idade Gestacional
GWAS	<i>Genome Wide Association Study</i> (Estudo de Associação Genômica)
Hb	Hemoglobina
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HO-1	Enzima Heme Oxigenase-1
IC	Intervalo de Confiança
MRP2	<i>Multidrug Resistance Protein 2</i> (Transportador dependente de ATP)
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
n	Tamanho da amostra
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato
OATP	<i>Organic Anion Transporting Polypeptides</i> (Proteína Transportadora de Ânions Orgânicos)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
P	Nível de significância
p75	Percentil 75
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PIG	Pequeno para a Idade Gestacional
RS	Rio Grande do Sul

SLC	<i>Solute Carrier</i> (Proteínas Carreadoras de Solutos)
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de base única)
TA	Timina-Adenina
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UGT1A1	<i>Uridine-Diphosphoglucuronate Glucuronosyltransferase 1A1</i> (Uridina Difosfato Glucuronosiltransferase)
UGT1A1*28	Variante polimórfica da região promotora da UGT1A1 com (TA) <sub>7</sub> /(TA) <sub>7</sub>
$\chi^2$	Qui-quadrado

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1. Metabolismo da bilirrubina.....	17
2.1.1. Aspectos do metabolismo da bilirrubina no feto e no recém-nascido.....	20
2.2. Toxicidade da bilirrubina.....	22
2.3. Manejo da hiperbilirrubinemia .....	23
2.4. Fatores associados à hiperbilirrubinemia.....	25
2.4.1. G6PD.....	29
2.4.2. Enzima de conjugação hepática da bilirrubina.....	31
2.4.3. Proteínas Transportadoras de Ânions Orgânicos .....	34
3. JUSTIFICATIVA.....	40
4. OBJETIVOS.....	41
4.1. Objetivo geral .....	41
4.2. Objetivos específicos .....	41
5. PACIENTES E MÉTODOS .....	42
5.1. Delineamento do estudo e amostra .....	42

5.2 Análises anteriores .....	44
5.2.1. Determinação da atividade enzimática da G6PD .....	44
5.2.2. Extração de DNA .....	45
5.2.3. Genotipagem G6PD .....	45
5.2.4. Amplificação da UGT1A1 .....	47
5.2.5. Análise de fragmento por eletroforese capilar .....	48
5.3 Análises deste estudo .....	48
5.3.1. Análise dos polimorfismos dos genes <i>SLCO1B1</i> e <i>SLCO1B3</i> .....	48
5.4 Análise Estatística .....	49
5.4.1 Cálculo de Tamanho Amostral .....	49
5.4.2 Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg .....	50
5.4.3 Reconstrução dos haplótipos .....	50
5.5. Considerações Éticas .....	50
6. RESULTADOS .....	52
6.1. Deficiência de G6PD .....	58
6.2. Polimorfismo UGT1A1 .....	59
6.3. Polimorfismos <i>SLCO1B1</i> e <i>SLCO1B3</i> .....	62
7. DISCUSSÃO .....	66
7.1. Considerações gerais .....	66



7.2. Deficiência da G6PD .....	69
7.3. UGT1A1 .....	70
7.4. OATPs .....	73
7.5. Considerações finais .....	76
8. CONCLUSÕES .....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	80
APÊNDICE A - Sondas de hidrólise comerciais. ....	88
APÊNDICE B - Resultados com todos pacientes encaminhados para fototerapia. ....	91
APÊNDICE C – Artigo original.....	102

## 1. INTRODUÇÃO

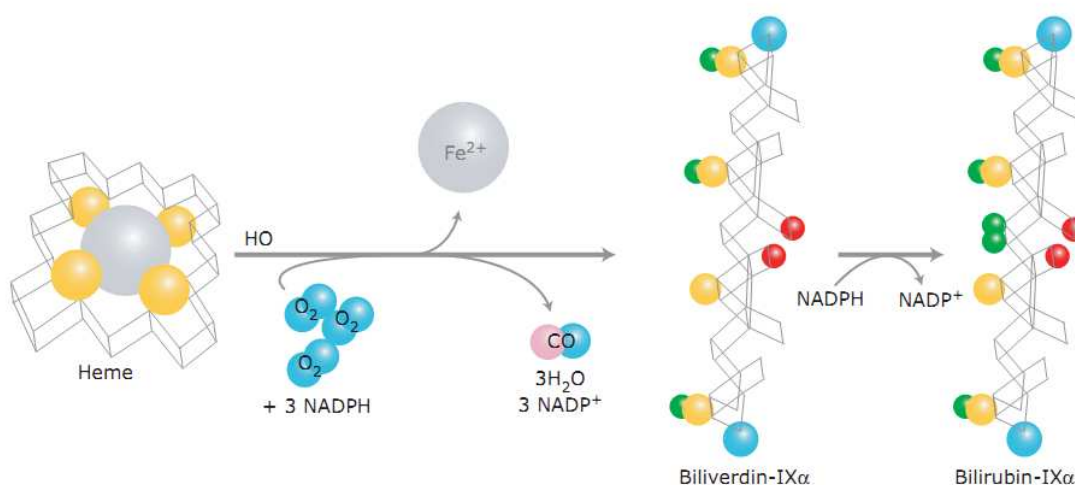
Bilirrubina sérica total (BST) superior a 1mg/dL acomete praticamente todos os recém-nascidos em algum momento da primeira semana de vida (MAISELS, 2005). Estima-se que dois terços ou mais destes neonatos irão desenvolver icterícia, sendo esta caracterizada pela coloração amarelada da pele e mucosas, normalmente percebida quando os níveis de BST atingem 3 a 4mg/dL (WOLKOFF e BERK, 2007). Contudo, hiperbilirrubinemia grave (BST acima do percentil 95 para idade em horas) irá ocorrer em apenas 5 a 6% da população de neonatos (BHUTANI *et al.*, 2000).

Alguns dos fatores associados à hiperbilirrubinemia incluem: desordens hemolíticas, baixa ingestão calórica, cefalohematoma, perda de peso, etnia asiática e deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (AAP, 2004). Os recém-nascidos devem ser monitorados para identificar aqueles que podem desenvolver hiperbilirrubinemia grave e, devido à toxicidade da bilirrubina, encefalopatia, que pode evoluir para *kernicterus*. Tem sido sugerido que a variação de genes envolvidos no metabolismo da bilirrubina poderia aumentar o risco de hiperbilirrubinemia quando associada com outras condições icterogênicas. Nesse contexto, as variantes da proteína de transporte da bilirrubina ganham destaque como possíveis fatores contributivos para potencialização da icterícia neonatal.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Metabolismo da bilirrubina

A bilirrubina é um tetrapirrol de cor amarela proveniente da degradação de protoporfirinas. Aproximadamente 75% da produção de bilirrubina é originada da degradação do grupamento heme dos eritrócitos circulantes. O restante é produzido por precursores eritróides destruídos na medula e pelo *turnover* de outras protoporfirinas, sendo que o catabolismo de 1g de hemoglobina gera 35mg de bilirrubina. O anel heme é primariamente aberto pela enzima microsossomal heme oxigenase, presente nas células reticuloendotélias do fígado e baço, produzindo quantidades equimolares de biliverdina e monóxido de carbono (CO) (Figura 1). A segunda reação é catalisada pela enzima citosólica biliverdina redutase, que reduz o metileno da molécula de biliverdina formando a bilirrubina (MCDONAGH, 2010).



**Figura 1.** Formação da bilirrubina.  
Fonte: Ryter et al, 2004.

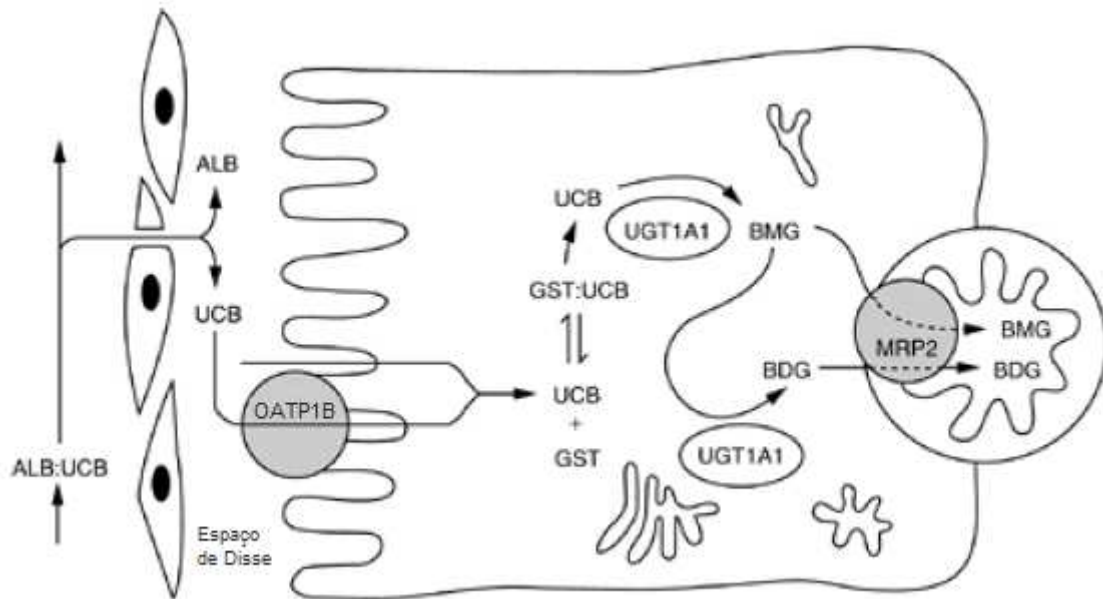
A razão pela qual a biliverdina, um composto hidrossolúvel e facilmente excretável é convertido à bilirrubina, composto lipossolúvel que requer metabolismo hepático, não é completamente entendida. Há sugestão que a bilirrubina exerça papel antioxidante e citoprotetor (GREENBERG, 2002). Após sua internalização nas células ela seria oxidada a biliverdina e imediatamente reduzida à bilirrubina de novo, propagando o ciclo antioxidante (SEDLAK e SNYDER, 2004).

No pH 7,4 do sangue a bilirrubina possui uma solubilidade muito baixa (0,24mg/dL), motivo pelo qual circula não covalentemente ligada à albumina. A bilirrubina é carregada até o fígado para ser metabolizada e excretada. O mecanismo pelo qual há passagem da bilirrubina, mas não da albumina, para o fígado ainda é desconhecido. Diversos estudos indicam que este processo é saturável e inibido pela competição com outros ânions orgânicos (MCDONAGH, 2010), sugerindo que seja mediado por proteínas transportadoras. Cui e cols., baseados em estudos *in vitro*, concluíram que o transporte da bilirrubina poderia ser mediado pela proteína transportadora de ânions orgânicos 1B1 (OATP1B1, do inglês *Organic Anion Transporter Polypeptides*) presente na membrana sinusoidal do hepatócito (CUI *et al.*, 2001; CUI e WALTER, 2003). Esse fato levou outros pesquisadores a procurarem associação de polimorfismos para o gene desta proteína com a hiperbilirrubinemia neonatal (HUANG *et al.*, 2004; WATCHKO *et al.*, 2009). Uma vez no interior do hepatócito, a bilirrubina se liga a diversas proteínas, sendo a mais estudada a glutatona S-transferase, previamente denominada ligandina. Ela aumenta a rede de sequestro da bilirrubina evitando seu efluxo para o espaço de Disse (WOLKOFF e BERK, 2007) (Figura 2).

A bilirrubina é conjugada ao ácido glicurônico pela enzima uridina difosfato glucuronosiltransferase 1A1 (UGT1A1) formando mono e diglicuronídeos. Mutações no gene desta enzima podem levar a uma das três condições patológicas caracterizadas por hiperbilirrubinemia não conjugada: Síndrome de Gilbert-Meulengracht e Síndromes de

Crigler-Najjar tipos I e II. A Síndrome de Gilbert-Meulengracht apresenta prevalência entre caucasoides em torno de 8%, sendo caracterizada por uma leve hiperbilirrubinemia não conjugada, sem alterações funcionais ou histológicas do fígado (STRASSBURG *et al.*, 2008). A Síndrome de Crigler-Najjar tipo I é uma doença rara, recessiva que resulta na perda total da atividade da UGT1A1, sendo que a maioria dos pacientes sucumbe ao *kernicterus*. Já na Síndrome de Crigler-Najjar tipo II a atividade enzimática se mantém em níveis mínimos e, para maioria dos pacientes, a indução enzimática da UGT1A1 por administração de fenobarbital é o suficiente para prevenir o *kernicterus* (WOLKOFF e BERK, 2007). Em adultos normais, a maior parte dos conjugados de bilirrubina é excretada na bile como diglicuronídeos (80%). Em recém-nascidos, a atividade da UGT1A1 é menor e a bile contém menos diglicuronídeos e mais monoglicuronídeos (GOURLEY, 2007).

A bilirrubina conjugada é secretada através da membrana apical do hepatócito para o canalículo biliar, processo a expensas de adenosina trifosfato (ATP) pela proteína MRP2 (do inglês *Multidrug Resistance Protein*) (JEDLITSCHKY *et al.*, 1997). No intestino, parte do conjugado sofre ação das bactérias colônicas, podendo ser reduzido a urobilinogênio ou desconjugado por ação de  $\beta$ -glicuronidases bacterianas. Tanto o urobilinogênio como a bilirrubina desconjugada podem voltar ao sangue pela recirculação entero-hepática (GOURLEY, 2007). A maior parte do urobilinogênio re-circulante é excretado pelo fígado e só pequenas quantidades são eliminadas pelos rins. A bilirrubina não conjugada re-circulante é de suma importância nos neonatos, pois contribui para o aumento da hiperbilirrubinemia, já que estes possuem alta atividade da enzima  $\beta$ -glicuronidase, presente também no leite materno.



**Figura 2.** Captação, transporte, conjugação e excreção da bilirrubina.

ALB: albumina; BMG: monoglicuronídeo de bilirrubina, BDG: diglucuronídeo de bilirrubina; GST: glutatona S-transferase; UCB: bilirrubina não conjugada. Fonte: Adaptado de Wolkoff and Berk, 2007.

### 2.1.1. Aspectos do metabolismo da bilirrubina no feto e no recém-nascido

Os recém-nascidos, em algum momento da primeira semana de vida, apresentam níveis de BST acima de 1mg/dL, bem como dois terços manifestam icterícia (SMITHERMAN *et al.*, 2006). Embora alguns casos requeiram fototerapia para minimizar os efeitos neurotóxicos da bilirrubina, a maioria dos recém-nascidos não precisará de intervenção terapêutica, levando ao uso difundido do termo “icterícia fisiológica”.

A bilirrubina pode ser detectada no líquido amniótico após 12 semanas de gestação, mas não é observada entre a trigésima sexta a trigésima sétima semana. A bilirrubina não conjugada atravessa a placenta onde é excretada pelo fígado materno, razão pela qual os recém-nascidos saudáveis apresentam icterícia ao nascer. Icterícia no nascimento em geral indica hemólise, obstrução intestinal ou obstrução dos ductos biliares (MAISELS, 2005).

Os recém-nascidos produzem em média 8,5mg/kg de bilirrubina por dia, aproximadamente o dobro do que é produzido por adultos (MAISELS *et al.*, 1971). Também possuem níveis mais altos de hemoglobina - os nascidos com 35 a 42 semanas de idade gestacional têm valores médios de hemoglobina de 18g/dL, que caem a 13g/dL no vigésimo oitavo dia de vida (JOPLING *et al.*, 2009). Além disso, o tempo médio de vida dos eritrócitos é de 80 a 100 dias em neonatos a termo e 60 a 80 em pré-termos, em comparação aos 120 dias dos adultos (WATSON, 2009).

Os níveis de albumina nos recém-nascidos são menores que nos indivíduos adultos, aumentando a porção de bilirrubina livre (não ligada à albumina), fração que efetivamente atravessa a barreira hemato-encefálica (NOTARIANNI, 1990). Além disso, os níveis de glutathione S-transferase são diminuídos o que poderia contribuir para o aumento da bilirrubinemia (WOLKOFF *et al.*, 1979).

O feto possui uma capacidade muito limitada de metabolizar a bilirrubina. No período entre 17 e 30 semanas de gestação a atividade enzimática da UGT1A1 é apenas 0,1% da atividade de um adulto normal, aumentando para 1% entre 30 e 40 semanas de gestação. Nos primeiros 10 dias após o nascimento, a atividade da UGT1A1 é ainda menor que 1% dos valores dos indivíduos adultos. Mas a atividade enzimática aumenta e numa taxa exponencial atinge níveis adultos em 6 a 14 semanas de vida (KAWADE e ONISHI, 1981).

De acordo com Gourley (2007), aspectos relacionados com a excreção, contribuem para o aumento da bilirrubinemia nos recém-nascidos através da motilidade intestinal diminuída, do aumento da recirculação entero-hepática, dos níveis de  $\beta$ -glicuronidase serem 10 vezes o valor dos adultos e possuírem flora intestinal imatura. Embora a flora intestinal do neonato aumente rapidamente após o nascimento, esta não é capaz de converter adequadamente a bilirrubina em urobilinogênio. Dessa forma, a baixa motilidade permite que

a bilirrubina conjugada tenha mais tempo para sofrer ação da  $\beta$ -glicuronidase, e uma vez desconjugada será reabsorvida do intestino pela recirculação entero-hepática.

## 2.2. Toxicidade da bilirrubina

Os grupos polares da bilirrubina, na sua conformação mais estável, estão envolvidos em pontes de hidrogênio intramoleculares que restringem a solvatação da molécula e deixam o composto praticamente insolúvel em água. Devido à sua lipofilia, a bilirrubina livre pode prontamente deixar o espaço intravascular e atravessar a barreira hemato-encefálica. O mecanismo pelo qual a bilirrubina exerce toxicidade ainda não foi completamente elucidado. Em uma revisão recente, Watchko sugere que a injúria causada seria iniciada por alterações de permeabilidade e de função das membranas, induzindo processos proteolíticos, apoptóticos e necróticos, via cascata de cálcio (WATCHKO, 2006).

Na encefalopatia aguda que ocorre decorrente da hiperbilirrubinemia grave na primeira semana de vida, os recém-nascidos passam por três fases distintas. Na primeira, tornam-se letárgicos e hipotônicos e mamam pouco. A fase intermediária é caracterizada por estupor, irritabilidade e hipertonia (muitos apresentam arqueadura do pescoço e tronco). A fase avançada é caracterizada pelo pronunciamento do opistótono, choro estridente, recusa alimentar, apnéia, febre, profundo estupor e muitas vezes, óbito (SHAPIRO, 2010).

Alguns autores preferem que o termo *kernicterus* seja reservado para as sequelas neurológicas crônicas e permanentes causadas pela bilirrubina e é caracterizado por intensa coloração amarela dos neurônios em algumas regiões do cérebro com evidência histopatológica de dano neural nessas regiões coradas. O tingimento atinge principalmente o globo pálido, núcleo subtalâmico, hipocampo, núcleo óculo-motor, núcleo ventro-coclear e



células de Purkinje do córtex cerebelar (WATCHKO, 2006). As sequelas clássicas da encefalopatia constituem a tétrade distúrbios extrapiramidais, anormalidades auditivas, olhar paralisado e displasia dentária (SHAPIRO, 2010).

Embora o nível de bilirrubina não seja o único preditor para o desenvolvimento de *kernicterus*, é consenso que existe uma maior possibilidade de que ele ocorra em neonatos com bilirrubina acima de 30mg/dL do que naqueles com bilirrubina menor de 20mg/dL.

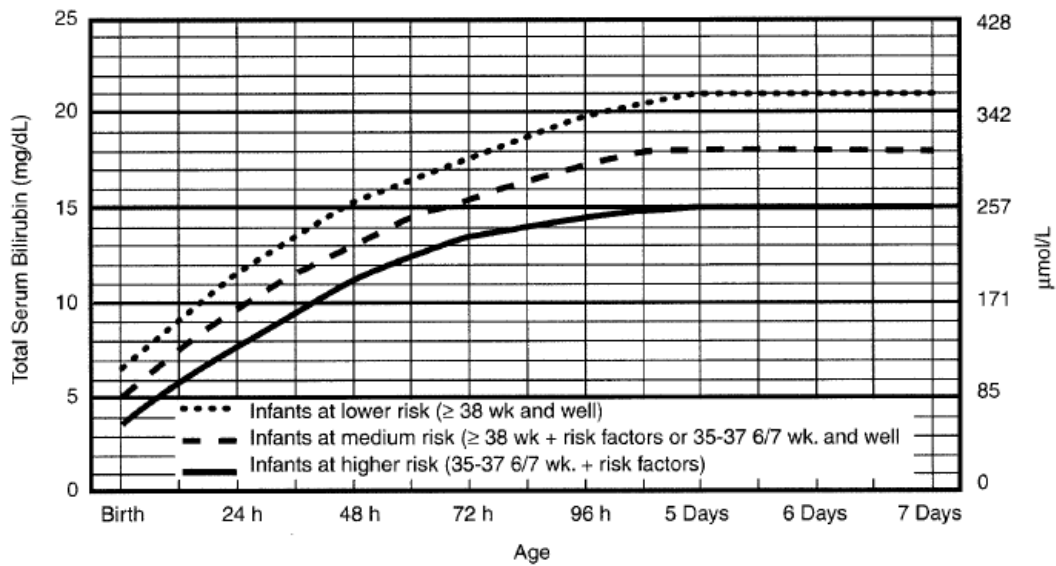
### **2.3. Manejo da hiperbilirrubinemia**

Todo recém-nascido deve ser inspecionado rotineiramente quanto ao aparecimento de icterícia. A progressão do amarelamento se dá no sentido cefalocaudal, e quando o corpo inteiro do recém-nascido está ictérico, estima-se que a bilirrubina tenha ultrapassado 15mg/dL (KRAMER, 1969). No entanto, a estimativa visual dos níveis de bilirrubina não é confiável, especialmente naqueles com pele escura, levando frequentemente a erros.

Dentre as alternativas disponíveis para avaliação das bilirrubinas, encontram-se os bilirrubinômetros que permitem a medida transcutânea. O aparelho, encostado na pele do recém-nascido, permite a leitura do nível de bilirrubina total. Os aparelhos modernos são bastante acurados e permitem a correção da influência de outros pigmentos cutâneos que não a bilirrubina (RUBALTELLI *et al.*, 2001). Povaluk e cols. demonstraram que a medida transcutânea da bilirrubina com o aparelho Minolta JM-103 (Minolta Camera Co, Japão) apresenta boa correlação com a BST no momento da indicação da fototerapia ( $r=0,89$ ). Nas 24h após a fototerapia, a dosagem transcutânea na região esternal coberta apresenta alta correlação com a BST ( $r=0,85$ ) (POVALUK *et al.*, 2011). Leite e cols. observaram que a

correlação da dosagem de BST e transcutânea é confiável até 14mg/dL utilizando o Bilicheck® (SpectRx Inc, EUA) (LEITE *et al.*, 2007).

A fototerapia continua sendo o tratamento mais comumente usado no manejo da hiperbilirrubinemia neonatal (VREMAN *et al.*, 2004). As diretrizes da AAP para manejo da hiperbilirrubinemia em neonatos maiores de 35 semanas recomendam promover o aleitamento materno, estabelecer protocolos de enfermagem para identificação precoce da icterícia, avaliar a bilirrubinemia dos ictericos nas primeiras 24h de vida e interpretar os níveis de bilirrubina de acordo com a idade em horas. Deve-se promover avaliação sistemática da bilirrubina total antes da alta hospitalar, fornecendo informação aos pais e cuidadores sobre icterícia neonatal e os potenciais fatores de risco (AAP, 2004) As diretrizes para uso da fototerapia em neonatos com 35 ou mais semanas de idade gestacional são descritas pela AAP (Figura 3). O princípio da fototerapia é que a luz irradiada sobre a pele atua sobre a estrutura molecular da bilirrubina, permitindo que ela seja excretada pela bile ou urina sem a necessidade de conjugação hepática. Por ação da luz, as pontes de hidrogênio se rearranjam, formando isômeros de bilirrubina, em especial a lumirrubina, que tornam o composto mais solúvel.



**Figura 3.** Diretrizes para fototerapia em recém-nascidos hospitalizados com idade gestacional de 35 ou mais semanas.

Fatores de risco: doença hemolítica isoimune, deficiência da G6PD, asfixia, letargia, temperatura instável, sepse, acidose ou albumina <3,0g/dL (se dosada). Fonte: AAP, 2004.

## 2.4. Fatores associados à hiperbilirrubinemia

Muitos fatores têm sido constantemente associados à hiperbilirrubinemia neonatal e estão listados na Tabela 1. Aqueles com maior número de evidências, observados em estudos epidemiológicos robustos, estão destacados na tabela.

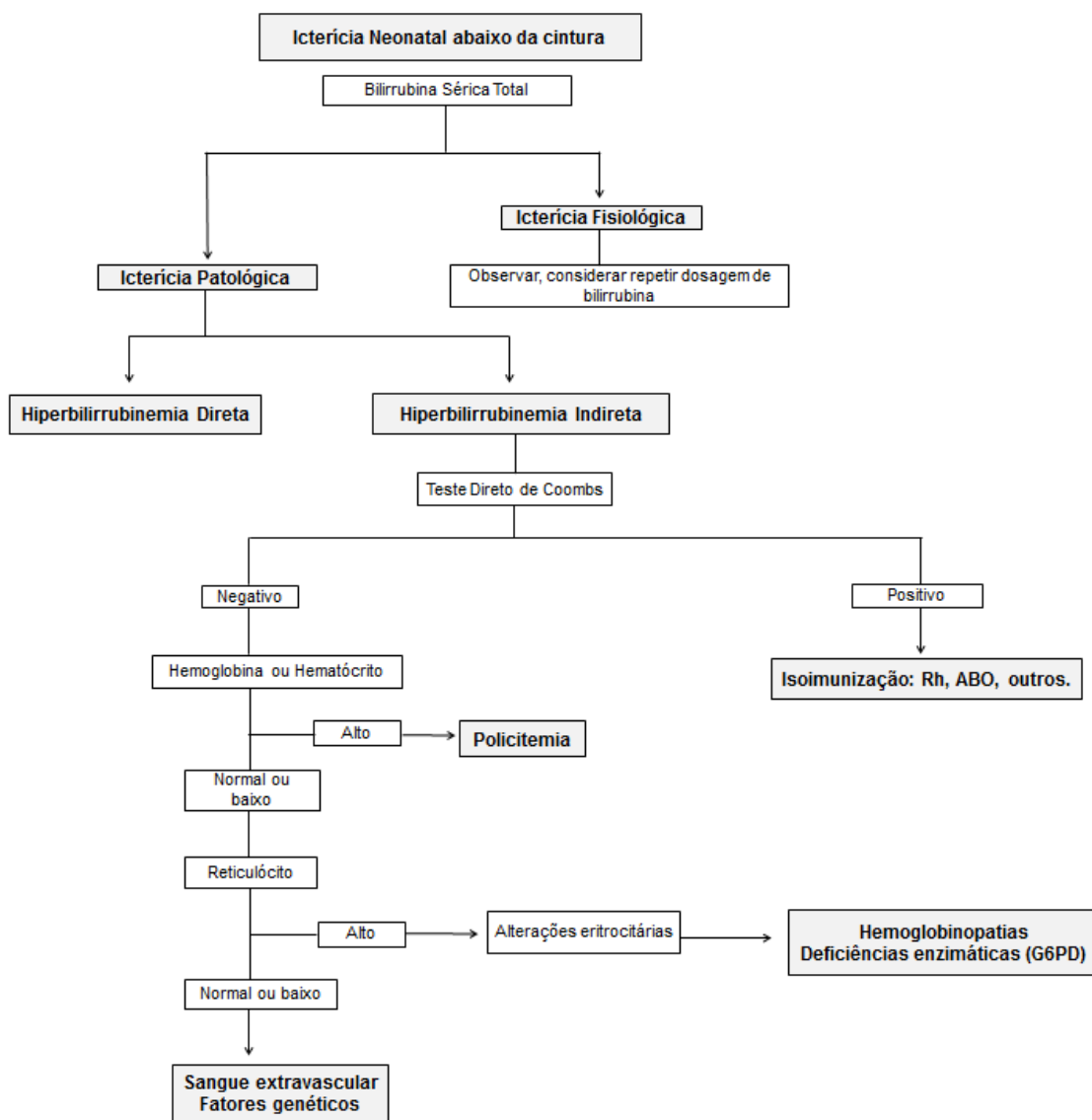
**Tabela 1.** Fatores associados à hiperbilirrubinemia neonatal.

Fator Associado	Efeito nos níveis séricos de bilirrubina em neonatos		
	Aumento	Diminuição	Sem efeito
Etnia	Asiática* Nativo americano Grego Hispânica (mexicana)*	Afro-americana*	
Genético ou familiar	Irmão que teve icterícia*		
Materno	Primípara Idade $\geq$ 25 anos Diabetes gestacional Hipertensão Contraceptivo oral no momento da concepção Sangramento primeiro trimestre Baixos níveis séricos de zinco	Tabagismo	
Drogas administradas para mãe	Oxitocina Diazepam Anestesia epidural Prometazina	Fenobarbital Meperidina Reserpina Aspirina Hidrato de cloral Heroína Fenitoína Antipirina Álcool	Beta-adrenérgicos
Parto	Ruptura prematura de membranas Uso de fórceps Uso de extrator à vácuo *		Sofrimento fetal
Recém-nascido	Prematuridade* Sexo masculino* Atraso no clampeamento do cordão Nível elevado de bilirrubina no cordão Icterícia antes da alta Alta com BST em zonas de risco Cefalohematoma* Atraso na passagem do mecônio Aleitamento materno * Privação calórica* Perda de peso* Baixos níveis de zinco e magnésio	Idade gestacional $\geq$ 41 semanas* Amamentação por fórmula*	Baixo escore Apgar
Drogas administradas para o recém-nascido	Hidrato de cloral Pancurônio		
Outros	Altitude Pouca permanência no hospital após nascimentos *		

Fonte: Traduzido de Maisels, 2005.

Embora nem sempre a causa específica da icterícia do recém-nascido possa ser determinada, muitos dos fatores acima listados possuem influência no surgimento da

hiperbilirrubinemia por aumentarem a produção de bilirrubina ou promoverem a diminuição da excreção da mesma. Na Figura 4 é sugerida uma abordagem para avaliação e identificação de possível causa da icterícia.



**Figura 4:** Abordagem possível para avaliar a icterícia do recém-nascido.  
Fonte: Adaptado de Gourley, 2007.

Considerando-se que a progressão do amarelamento se dá no sentido cefalocaudal, quando a icterícia ultrapassa o nível da cintura é importante monitorar os recém-nascidos para

identificar aqueles com risco de desenvolverem hiperbilirrubinemia grave. Após a dosagem da BST e suas frações é possível encaminhar o neonato para o devido acompanhamento.

Quando o aumento BST, a expensas da bilirrubina não conjugada atinge níveis de risco, uma dos primeiros parâmetros a ser pesquisado é a isoimunização por incompatibilidades sanguíneas.

A isoimunização Rh ocorre quando o sangue de um recém-nascido Rh positivo atravessa a placenta da mãe Rh negativo, ocorrendo sensibilização do sistema imune materno (GEAGHAN, 2011). Aproximadamente 10 $\mu$ L de sangue são necessários para que ocorra a sensibilização. Cerca de metade dos recém-nascidos afetados não requer tratamento, sendo levemente anêmicos ao nascimento e não desenvolvendo hiperbilirrubinemia grave. Trinta por cento irão necessitar de tratamento (fototerapia ou ex-sanguíneo transfusão) e vinte por cento apresentarão hidropsia *in utero* (MAISELS, 2005). Atualmente mais de 49 antígenos foram identificados por meio de anticorpos produzidos após transfusão sanguínea ou gravidez para o sistema Rh, sendo cinco os mais importantes: *D*, *C*, *E*, *c* e *e*. O principal antígeno do ponto de vista clínico do sistema Rh é o *D* (NARDOZZA *et al.*, 2010).

A isoimunização por incompatibilidade ABO é geralmente limitada aos neonatos do grupo A ou B nascidos de mães do grupo O, e a ocorrência tende a ser familiar. Mães de grupo O têm títulos elevados de anticorpos anti-A ou anti-B naturais. Como esses anticorpos são do tipo IgG, atravessam a placenta, ligando-se aos antígenos específicos nas hemácias A ou B dos neonatos e causa hemólise. De 15 a 25% das mães/recém-nascidos apresentam incompatibilidade ABO, mas a doença hemolítica é confinada a apenas 1% das mulheres grupo O com altos títulos de IgG (MURRAY e ROBERTS, 2007).

O teste Direto de *Coombs* detecta anticorpos ligados a superfície dos glóbulos vermelhos do recém-nascido. Um terço dos neonatos dos grupos A ou B de mães do grupo O

terá exame positivo, porém desses, nem todos desenvolverão hemólise ou hiperbilirrubinemia. O diagnóstico de doença hemolítica por incompatibilidade ABO é feito, em geral, por um teste direto de *Coombs* positivo e icterícia nas primeiras 24h de vida, mas Kaplan e cols. descreveram casos de hiperbilirrubinemia em bebês com teste direto de *Coombs* negativo e portadores da Síndrome de Gilbert (KAPLAN *et al.*, 2000).

Na presença de um teste direto de Coombs negativo, outros parâmetros devem ser analisados, como o hemograma. Níveis muito aumentados de hemoglobina e hematócrito podem indicar policitemia (hematócrito superior a 65%) (SARKAR e ROSENKRANTZ, 2008). A contagem de reticulócitos permite avaliar o impacto da hemólise no recém-nascido e pode indicar defeitos de membrana do eritrócito ou deficiências enzimática.

#### **2.4.1. G6PD**

A deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), doença genética e hereditária ligada ao cromossomo X (BEUTLER, 1994), é uma das enzimopatias mais frequentes e incidentes em nosso meio. A G6PD é a primeira enzima do ciclo das Pentoses, rota esta responsável pela produção de Nicotinamida-Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) e pela produção de riboses, indispensáveis a produção de ácidos nucleicos. O NADPH, nos eritrócitos, é a única molécula capaz de reduzir a glutatona oxidada, que protege as células do estresse oxidativo. O dano celular causado por agentes oxidantes se traduz como oxidação do DNA e proteínas, peroxidação de lipídios e consequente rompimento da membrana do eritrócito (BEUTLER, 1994; CAPPELLINI e FIORELLI, 2008; NELSON e COX, 2002).

A deficiência de G6PD foi dividida em 5 classes pela Organização Mundial de Saúde (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.

Os indivíduos ainda podem ser classificados 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).

A prevalência global estimada para a deficiência da G6PD é de 7,1%, sendo que a África e o Oriente Médio apresentam os maiores índices - 8,5 e 7,2%, respectivamente (NKHOMA *et al.*, 2009), variando entre as regiões. Em estudo em doadores do banco de sangue, em São Paulo no ano de 2000, Compri e cols. apresentaram uma prevalência de 1,7% de deficientes da G6PD (COMPRI *et al.*, 2000). Em 2006, Castro e cols. (CASTRO *et al.*, 2006) observaram no Sul do Brasil uma prevalência de 7,9% de deficientes da G6PD na rede de Triagem Neonatal, sendo que 1,4% eram deficientes totais e outros 6,5% deficientes parciais.



As duas variantes polimórficas consideradas mais comuns da doença são a Mediterrânea (C563T) e a Africana (G202A, A376G). A primeira afeta descendentes de italianos, gregos, espanhóis, árabes, judeus e curdos, podendo desencadear icterícia neonatal (às vezes grave), ou hemólise na presença de drogas oxidativas. A variante africana é mais branda, originária da África, e também pode desencadear icterícia neonatal e hemólise com oxidantes (BEUTLER, 1994).

A maioria dos indivíduos portadores de mutações na G6PD é assintomática. Quando ocorrem manifestações clínicas, as mais comuns são a icterícia neonatal e a anemia hemolítica aguda causada por fatores exógenos, como medicamentos, infecções e acidose diabética (CAPPELLINI e FIORELLI, 2008).

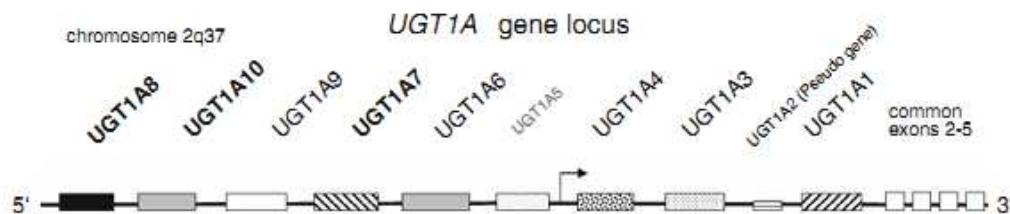
Na ausência de achados incomuns no hemograma, pode-se considerar também cefalohematoma, contusões, hemorragias ou qualquer outro sangramento que possam levar a níveis aumentados de BST por degradação dos eritrócitos localizados extra vascularmente (WATCHKO, 2009).

Mais recentemente, o impacto da variabilidade genética de cada indivíduo tem sido explorado. No que se refere à hiperbilirrubinemia, genes envolvidos no metabolismo da bilirrubina poderiam desempenhar papel essencial na progressão da mesma.

#### **2.4.2. Enzima de conjugação hepática da bilirrubina**

O gene UGT1A codifica a família das enzimas de conjugação ao ácido glicurônico uridina difosfato glucuronosiltransferase e se localiza no cromossomo 2q37. São possíveis 9 isoformas, que constam com um éxon inicial específico seguido dos éxons 2 a 5, que são comuns a todas (Figura 5) (STRASSBURG *et al.*, 2008). A isoforma UGT1A1 é a

responsável pela glicuronidação hepática da bilirrubina e mutações em seu gene podem levar à Síndrome de Gilbert e às Síndromes de Crigler-Najjar Tipos I e II.



**Figura 5:** Locus da família UGT1A.  
Fonte: Strassburg et al, 2008.

#### 2.4.2.1. Síndrome de Gilbert

A Síndrome de Gilbert é caracterizada por hiperbilirrubinemia crônica e recorrente, sem evidências de doença hepática ou hemólise (BOSMA, 2003). É uma síndrome comum, que afeta de 6 a 9% da população caucasóide, e ambos os modelos de herança, autossômico recessivo e dominante já foram sugeridos (STRASSBURG *et al.*, 2008). Em geral a hiperbilirrubinemia indireta não é reconhecida até a puberdade, manifestando-se em situações como estresse e jejum, porém vários estudos mostraram que a Síndrome poderia desenvolver um papel importante na patogênese da hiperbilirrubinemia neonatal.

A hiperbilirrubinemia resulta de um decréscimo da atividade da enzima de conjugação hepática uridina difosfato glucuronosiltransferase 1A1. Mutações nas regiões promotora e codificante do gene *UGT1A1* podem produzir mudanças funcionais ou estruturais que levem à conjugação comprometida e consequente hiperbilirrubinemia.

O polimorfismo mais frequentemente associado à Síndrome de Gilbert é o rs8175347- que se caracteriza pela inserção dinucleotídica de uma timina e uma adenina (TA) na região

promotora do gene *UGT1A1* (BOSMA *et al.*, 1995). O alelo normal conta com seis repetições TA, enquanto o alelo variante possui sete repetições TA, o que provoca uma diminuição de 70% da transcrição da enzima. São encontradas ainda variantes com cinco e oito repetições, que aumentam e diminuem a transcrição, respectivamente (STRASSBURG *et al.*, 2008).

Recentemente em meta-análise, Long e cols. avaliaram a associação entre o polimorfismo rs8175347 e a hiperbilirrubinemia neonatal (LONG *et al.*, 2011), onde foram incluídos 27 estudos sobre o tema. Dos sete estudos em populações caucasoides, seis não apresentaram risco significativo aumentado para hiperbilirrubinemia neonatal quando comparados frente aos genótipos TA<sub>7</sub>/TA<sub>7</sub> e TA<sub>6</sub>/TA<sub>6</sub>+TA<sub>6</sub>/TA<sub>7</sub>. Apenas um estudo mostrou um risco elevado para icterícia (ERGIN *et al.*, 2010).

#### **2.4.2.3. Síndrome de Crigler-Najjar I e II**

As Síndromes de Crigler-Najjar tipos I (CNI) e II (CNII) são herdadas de forma autossômica recessiva. Na Síndrome de CNI existe uma completa ausência da atividade da enzima UGT1A1, enquanto na Síndrome de CNII a atividade da enzima é diminuída, porém não completamente ausente. As mutações encontradas em ambas as síndromes podem afetar todos os éxons, e aquelas encontradas no éxons 2-5 acabam afetam todo o complexo UGT, razão pela qual estes pacientes podem apresentar déficit não apenas na conjugação da bilirrubina, como de outros compostos (STRASSBURG, 2010).

A identificação das Síndromes geralmente ocorre nos primeiros dias de vida, quando os níveis de bilirrubina ultrapassam 20mg/dL e a ex-sanguíneo transfusão é necessária muitas vezes (CLARKE *et al.*, 1997). Uma importante diferenciação clínica entre CNI e CNII é a responsividade ao fenobarbital, que reduz os níveis séricos de bilirrubina em 30% dos

pacientes CNII por indução da UGT1A1, enquanto em pacientes CNI, pequeno ou nenhum efeito é observado (BOSMA, 2003). Pacientes com CNI irão requerer fototerapia até a realização do transplante de fígado. Fox e cols. descreveram em 1998 o primeiro transplante de hepatócitos em uma menina de 10 anos com síndrome de CNI que apresentou substancial redução dos níveis de bilirrubina (FOX *et al.*, 1998). Desde então outros relatos da terapia são descritos e o efeito benéfico parece variar de 3 a 11 meses (MEYBURG *et al.*, 2009).

Outro método de discriminação entre CNI e CNII é a determinação da atividade de conjugação residual da bilirrubina em biópsia de fígado. No entanto este procedimento é extremamente invasivo e o método de escolha é a análise de mutações no gene da UGT. O diagnóstico de CN pode ser feito, por exemplo, se ambos os alelos codificarem uma proteína truncada bem como se as mutações já tiverem sido identificadas em outros pacientes CNI ou CNII (SEPPEN *et al.*, 1994).

### **2.4.3. Proteínas Transportadoras de Ânions Orgânicos**

As proteínas transportadoras são sistemas acoplados à membrana que medeiam a translocação de compostos químicos para o interior e exterior das células, por mecanismos ativos ou passivos (KLAASSEN e ALEKSUNES, 2010). O transporte de drogas e substratos endógenos, como ácidos biliares e colesterol, é mais associado com duas superfamílias de transportadores: os carreadores de solutos (*solute carrier* – SLC) e os transportadores ABC (*Anion Binding Cassete*). Os transportadores SLC são considerados transportadores de absorção, embora existam exemplos de transporte bidirecional. Os transportadores ABC funcionam como bombas de efluxo que removem substâncias das células ou organelas usando transporte ativo primário (KLAASSEN e ALEKSUNES, 2010).

Fazendo parte da superfamília SLC, encontram-se as proteínas de transporte de ânions orgânicos (OATPs). São importantes proteínas transmembrana que facilitam o transporte sódio-independente de uma variada gama de compostos orgânicos anfipáticos, incluindo sais biliares, corantes orgânicos, esteroides, hormônios tireoidianos e numerosas drogas (KALLIOKOSKI e NIEMI, 2009). As OATPs são codificadas pelos genes da família *SLCO*. Embora algumas OATPs sejam seletivamente envolvidas no metabolismo hepático de compostos ligados a albumina via veia porta, muitas são expressas em múltiplos tecidos, incluindo a barreira hemato-encefálica, plexo coriáceo, pulmão, coração, intestino, rim, placenta e testículos (KLAASSEN e ALEKSUNES, 2010).

OATPs de uma mesma família compartilham >40% de homologia na sequência de aminoácidos e são designados por numeração arábica (ex.: OATP1). As subfamílias incluem OATPs com sequência de aminoácidos com >60% de homologia e são designadas por letras (ex.: OATP1B) (NIEMI *et al.*, 2011).

Os genes codificantes da família OATP1 estão localizados no braço curto do cromossomo 12, enquanto os das outras famílias estão localizados nos cromossomos 3, 5, 8, 11, 15 e 20 (KALLIOKOSKI e NIEMI, 2009). Já foram identificadas 11 OATPs em humanos: OATP1A2, 1B1, 1B3, 1C1, 2A1, 2B1, 3A1, 4A1, 4C1, 5A1 e 6A1 (KALLIOKOSKI e NIEMI, 2009). Destas, os papéis de OATP1B1, 1A2, 1B3 e 2B1 como transportadores são os melhores caracterizados (Tabela 2). OATP1A2 facilita a entrada de substratos principalmente através do duodeno para a circulação. OATP2B1 é expressa na membrana sinusoidal do hepatócito, mas também em outros tecidos, como intestino e coração. Dentre seus substratos endógenos encontram-se dehidroepiandrosterona, estrona-3-sulfato e prostaglandina E<sub>2</sub> (KALLIOKOSKI e NIEMI, 2009). OATP1B1 e OATP1B3 são localizados principalmente na membrana sinusoidal dos hepatócitos humanos e medeiam o influxo dos seus substratos do sangue para o interior dos hepatócitos, dentre eles, a bilirrubina.

**Tabela 2.** Nomenclatura, tamanho, substratos endógenos, tecidos expressos, *locus* gênico e número de éxons das proteínas de transporte mais bem caracterizadas na literatura: OATP1A2, OATP2B1, OATP1B1 e OATP1B3.

Proteínas				Gene			
Nome	Outros nomes	Tamanho	Substratos endógenos	Tecido expresso	Nome	<i>Locus</i>	Éxons
OATP1A2	OATP-A	670aa	ácidos biliares conjugados esteroides hormônios tireoidianos	cérebro fígado rins intestino	<i>SLCO1A2</i>	12p12	14
OATP2B1	OATP-B	687aa	dehidroepiandrosterona estrona-3-sulfato prostaglandina E2	fígado intestino coração	<i>SLCO2B1</i>	11q13	14
OATP1B1	OATP2, LST-1, OATP-C	691aa	bilirrubinas ácidos biliares conjugados esteroides eicosanoides hormônios tireoidianos	fígado intestino	<i>SLCO1B1</i>	12p2	15
OATP1B3	OATP8, LST-2	702aa	bilirrubinas ácidos biliares conjugados esteroides eicosanoides hormônios tireoidianos colecistoquinina	fígado	<i>SLCO1B3</i>	12p2	16

Fonte: Kalliokoski e Niemi, 2009.

### 2.4.3.1. OATP1B1

OATP1B1 (previamente conhecida como OATP2, OATP-C e LST-1) é uma glicoproteína de 691 aminoácidos codificada pelo gene *SLCO1B1*. Sua expressão parece estar

restrita a membrana basolateral dos hepatócitos (HAGENBUCH e MEIER, 2004). O mRNA já foi encontrado em outros tecidos inclusive no intestino delgado (GLAESER *et al.*, 2007). Um grande número de polimorfismos de base única (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) foi descrito no gene *SLCO1B1* e suas frequências alélicas variam notavelmente em diferentes populações (TIRONA *et al.*, 2001), sendo identificadas 41 variantes. Os polimorfismos mais estudados são rs2302682 (A388G), que possui uma frequência alélica que varia de 40% em Europeus a 80% em Africanos e Asiáticos, e rs4149056 (T521C), que possui frequência de 10% em Europeus e Asiáticos e de 2% Africanos (KALLIOKOSKI e NIEMI, 2009). Outros SNPs foram associados com atividade alterada da OATP1B1 *in vitro* (TIRONA *et al.*, 2001), porém a relevância clínica não está estabelecida, em parte por causa das baixas frequências alélicas (NIEMI, 2007; PASANEN *et al.*, 2008). Estatinas, rifampicina, enalapril, inibidores de protease, metrotexato são exemplos de drogas transportadas por OATP1B1 (NIEMI *et al.*, 2011).

Cui e Briz demonstraram que, *in vitro*, a OATP1B1 transporta bilirrubina conjugada e não conjugada (BRIZ *et al.*, 2006; CUI *et al.*, 2001; CUI e WALTER, 2003), porém Wang e colaboradores demonstraram que isto é improvável (WANG *et al.*, 2003). As concentrações plasmáticas de bilirrubina e seus conjugados já foram associadas com alguns genótipos *SLCO1B1*. Em um estudo de associação genômica (*Genome Wide Association Study* - GWAS), pesquisando os fatores genéticos associados com os níveis de bilirrubina, Johnson e cols. observaram que os indivíduos portadores do alelo C do rs4149056 apresentaram concentrações maiores de bilirrubina (JOHNSON *et al.*, 2009). Já Sanna e cols. demonstraram que rs4149056 e rs2302682 apresentavam um efeito moderado sobre níveis séricos de bilirrubina (SANNA *et al.*, 2009).

Após a demonstração de que OATP1B1 seria transportador de bilirrubina, surgiu o interesse em estudá-lo como um dos fatores genéticos para hiperbilirrubinemia neonatal. Em

2004, Huang estudou 4 polimorfismos do gene *SLCO1B1* (A388G, C463A, T521C e G1463C) que poderiam atuar como fatores de risco para hiperbilirrubinemia neonatal (HUANG *et al.*, 2004). Ele observou que o alelo A do rs2302682 conferia um *odds ratio* (OR) de 2,01 para hiperbilirrubinemia, mas não encontrou nenhuma associação para os demais polimorfismos. Prachukhutum e cols. (PRACHUKTHUM *et al.*, 2009), Watchko e cols. (WATCHKO *et al.*, 2009) e Wong e cols. (WONG *et al.*, 2009) também não encontraram associação entre polimorfismos do gene *SLCO1B1* e a hiperbilirrubinemia neonatal. Zhang e cols. (ZHANG *et al.*, 2010) descreveram que o alelo C do rs4149056 apresentava baixo risco para icterícia neonatal (OR = 0,530), enquanto as frequências do alelo A do rs2302682 não diferiram, contudo os níveis de bilirrubina eram estatisticamente maiores nos homocigoto AA.

#### **2.4.3.2. OATP1B3**

OATP1B3 (anteriormente denominado OATP8 e LST-2) como a OATP1B1 é expressa principalmente na membrana sinusoidal dos hepatócitos. Seus substratos são similares: bilirrubina, ácidos biliares, conjugados esteroides, eicosanoides e hormônios tireoidianos. O gene codificante (*SLCO1B3*) é polimórfico e algumas variantes foram associadas com uma menor atividade transportadora da OATP1B3. Dentre as drogas que sofrem transporte por essa proteína encontramos fexofenadina, estatinas, metotrexato e paclitaxel (KALLIOKOSKI e NIEMI, 2009).

Em 2009, em um GWAS, Sanna e cols. descreveram dois polimorfismos no gene *SLCO1B3* relacionados com o aumento de bilirrubina sérica (SANNA *et al.*, 2009). O alelo C do polimorfismo rs2117032, na região 3'-UTR é responsável pelo aumento de 0,048 mg/dL



de bilirrubina. O segundo polimorfismo, rs17680137, localizado no íntron 7 é responsável por um aumento maior, 0,067 mg/dL por cópia de alelo.

Apesar de a icterícia neonatal ser um processo, na maior parte das vezes, fisiológico, a compreensão dessa condição é de extrema importância. Os fatores que entremeiam esse processo são os mais variados e a influência da genética sobre essa condição cada vez é mais relevante na prática clínica.

### **3. JUSTIFICATIVA**

A hiperbilirrubinemia não conjugada neonatal é um fenômeno comum e embora geralmente apresente curso benigno, um número seletivo de neonatos irá desenvolver níveis de bilirrubina preocupantes que oferecerão ameaça ao sistema nervoso central. Por isso, há necessidade da melhor caracterização dos eventuais fatores genéticos que possam predispor à hiperbilirrubinemia não conjugada neonatal, em especial aqueles envolvidos no metabolismo da bilirrubina. Tais como a enzima de conjugação hepática e as proteínas transportadoras de ânions orgânicos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo geral**

Estimar a frequência dos polimorfismos rs2306283 e rs4149056 do gene *SLCO1B1* e rs17680137 e rs2117032 do gene *SLCO1B3* na hiperbilirrubinemia neonatal grave.

### **4.2. Objetivos específicos**

Estudar associações dos polimorfismos descritos com

- Prematuridade;
- Incompatibilidade ABO;
- Deficiência da G6PD;
- Polimorfismo rs8175347 na região promotora do gene *UGT1A1*.

## 5. PACIENTES E MÉTODOS

### 5.1. Delineamento do estudo e amostra

Re-análise de estudo prospectivo e observacional de casos e controles cujo material inicial originou a dissertação “Polimorfismos genéticos em neonatos hiperbilirrubinêmicos em mais de 35 semanas de idade gestacional” (CARVALHO, 2009). No estudo anterior, a presente autora participou ativamente tanto da execução quanto da interpretação das técnicas biomoleculares (CARVALHO *et al.*, 2010). O estudo prévio incluiu recém-nascidos admitidos para fototerapia no Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os neonatos arrolados entre março e dezembro de 2007 apresentavam mais de 35 semanas de idade gestacional e peso superior a 2000g e foram avaliados em relação à presença de deficiência de G6PD e polimorfismos da *UGT1A1*. Foram considerados como critérios de exclusão internação por colestase neonatal, cefalohematoma e sepse comprovada. Para cada paciente internado foi escolhido neonato controle no alojamento conjunto ou na enfermaria do setor de neonatologia, obedecidos os mesmos critérios de inclusão e exclusão, porém, sem níveis de bilirrubina suficientes para fototerapia, conforme estimativa visual pela equipe médica assistente. A escolha foi aleatória, mas houve o cuidado de incluir apenas recém-nascidos com coleta de sangue para alguma outra razão, sem coletas exclusivas para o estudo. Todos recém-nascidos eram classificados como brancos ou não brancos baseado na cor da pele dos pais. Após, era aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no estudo. Os dados dos sujeitos foram obtidos por prontuário. Foi solicitado ao setor de Hematologia ou Banco de Sangue o sangue excedente das coletas realizadas no recém-nascido ou da coleta de cordão umbilical, para a quantificação da atividade da G6PD e

extração de DNA para realização de técnicas biomoleculares. Os indivíduos arrolados no estudo foram acompanhados até a alta e posteriormente para avaliação dos tempos de internação e fototerapia, necessidade de re-internação, re-intervenções ou ex-sanguíneo transfusão, alterações neurológicas ou óbito por um período de 30 dias.

No presente estudo, as amostras foram transferidas e armazenadas no Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia, CPE, HCPA, onde foram analisados os polimorfismos rs2306283 e rs4149056 do gene *SLCO1B1* e rs17680137 e rs2117032 do gene *SLCO1B3*, utilizando aparelho termociclador localizado no Centro de Terapia Gênica, CPE, HCPA.

Os dados obtidos para os indivíduos estão descritas na Tabela 3.

**Tabela 3:** Dados clínicos e laboratoriais dos indivíduos arrolados no estudo.

Dados de prontuário		Análises genéticas
Todos os indivíduos	Apenas para casos	Todos
Idade Gestacional	Perda percentual de peso	Mutação Africana <i>G6PD</i>
Sexo	Níveis de bilirrubina	Mutação Mediterrânea <i>G6PD</i>
Peso ao nascimento	Níveis de hemoglobina	Polimorfismo <i>UGT1A1</i>
Deficiência da G6PD	Tipo de alimentação	Polimorfismos <i>SLCO1B1</i>
Parto	Tempo de fototerapia	Polimorfismos <i>SLCO1B3</i>
Incompatibilidades sanguíneas	Tipo de fototerapia	
Apgar 5'	Idade em horas na internação	
Idade materna		

## 5.2 Análises anteriores

### 5.2.1. Determinação da atividade enzimática da G6PD

A determinação da atividade da G6PD bem com a análise de suas mutações foi realizada na Faculdade de Farmácia, UFRGS. Para a dosagem da atividade enzimática da G6PD pelo método quantitativo utilizou-se o kit Neolisa G-6-PD (*Interscientific Corporation, USA*), 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 $\mu$ L de amostra de sangue total e controles em microplacas de microtitulação com fundo em “U”. A estes foram adicionados 75 $\mu$ L de reagente de eluição e agitados em um agitador orbital por 20 minutos. Foram transferidos 15 $\mu$ L do eluído para outra microplaca de fundo chato juntamente com 75 $\mu$ L de reagente de trabalho e agitados durante 10 minutos. Uma primeira leitura em 405nm foi realizada para medida da concentração de hemoglobina das amostras e dos controles. Posteriormente foi adicionado 100 $\mu$ L do reagente de cor e efetuada uma segunda leitura, em 550nm, 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).

### **5.2.2. Extração de DNA**

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total por procedimento adaptado, descrito por Lahiri e Nurnberger (1991). A um volume de 0,5-1mL de sangue total foram adicionados 10mL de tampão fosfato (TKM 1 - 10mM Tris-HCl pH 7,6; 10mM KCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 2mM EDTA') e 300uL do detergente Nonidet P-40 (Sigma) em tubo Falcon (15mL) para promover lise dos eritrócitos. Após centrifugar 8 minutos a 3200 rpm 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 durante 5 minutos a 12000 rpm. O DNA presente no sobrenadante foi, então, precipitado em 2 volumes de etanol absoluto. O DNA seco a temperatura ambiente foi solubilizado em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e mantido em freezer a -20°C.

### **5.2.3. Genotipagem G6PD**

No material com atividade deficiente foi realizada a investigação das três mutações mais frequentes na região do sul do Brasil: a A- (G202A, A376G) e a Mediterrânea (C563T) para todos pacientes com atividade enzimática deficiente. As regiões analisadas foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) conforme descrito na Tabela 4. 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 da Invitrogen. A reação ocorreu em termociclador (Eppendorf Personal Cycler) com desnaturação inicial por 5 min a 94°C, seguidos de 34 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento por 30s (vide tabela) e extensão 72°C por 45s. Finalmente, 10µL do produto da PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% e os fragmentos amplificados foram digeridos *overnight* a 37°C utilizando enzimas de restrição (BioLabs) conforme instruções do fabricante (Tabela 5).

**Tabela 4.** Éxons, tamanho dos fragmentos amplificados, sequências dos primer, e respectivas temperaturas de anelamento para as mutações G202A, A376G e C563T do gene G6PD.

Mutação	Exon	Fragmento amplificado (pb)	Primers	Temperatura de Anelamento (°C)
202	4	109	5' GTG GCT GTT CCG GGA TGG CCT TCT G 3' 5' CTT GAA GAA GGG CTC ACT CTG TTT G 3'	56
376	5	295	5' CTG TCTGTG TGT CTG TCT GTC C 3' 5' GGC CAG CCT GGC AGG CGG GAA GG 3'	63
563	6	547	5' ACT CCC CGA AGA GGG GTT CAA GG 3' 5' CCA GCC TCC CAG GAG AGA GGA AG 3'	60



**Tabela 5.** Enzimas de restrição e fragmentos obtidos para cada uma das mutações do gene G6PD.

<b>Mutações Investigadas</b>	<b>Enzimas</b>	<b>Fragmentos Resultantes (pb)</b>
202G→A	Nla III	63-46
376A→G	Fok I	154-141
563C→T	Mbo II	277-119-100

#### **5.2.4. Amplificação da UGT1A1**

As análises de fragmentos por eletroforese capilar foram realizadas no Laboratório de Identificação Genética do Centro de Pesquisa Experimental (CPE), HCPA. O DNA genômico foi amplificado utilizando-se da PCR para a região promotora do gene UGT1A1. A sequência dos *primers* (BEZERRA, 2007) foi 5'- GTCACGTGACACAGTCAAAC -3' e 5'- TTTGCTCCTGCCAGAGGTT -3' marcado com FAM. A reação foi realizada em termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (ABI, USA) adicionando-se os seguintes reagentes: 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 por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, com uma extensão final de 72°C durante 10 minutos.

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

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese capilar em analisador genético ABI 3130xl (Applied Biosystems Inc.). Foi adicionado 1µL do produto amplificado a 8,8µL de formamida e 0,2µL 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 50µm 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 sequencias amplificadas foram calculadas por comparação com o padrão de peso molecular GS120-LIZ através do programa GeneMapper® (Applied Biosystems Inc.). Os tamanhos dos fragmentos para cada um dos alelos TA<sub>5</sub>, TA<sub>6</sub>, TA<sub>7</sub> e TA<sub>8</sub> eram 96, 98, 100 e 102pb, respectivamente.

## **5.3 Análises deste estudo**

### **5.3.1. Análise dos polimorfismos dos genes *SLCO1B1* e *SCLO1B3***

Os polimorfismos rs4149056 (521T>C) e rs2302682 (388A>G) do gene *SLCO1B1*; e rs17680137 e rs2117032 do gene *SLCO1B3* foram identificados por PCR utilizando sondas de hidrólise comerciais (Ensaio TaqMan, IDs: C\_30633906\_10, C\_1901697\_20, C\_25766725\_10, e C\_2809241\_10, respectivamente).

Para realizar a PCR por ensaio *TaqMan*® em 12,5µL de volume final, foram utilizados 6,25µL de *Genotyping Master Mix* ( tampão, enzima AmpliTaq Gold, dNTPs e marcador fluorescente de referência passiva (ROX)); 0,625µL da mistura de oligonucleotídeos específicos para o polimorfismo (pares de *primers* e sondas); e 15ng de DNA genômico. As temperaturas de ciclagem foram 10min de desnaturação inicial a 95°C, 40 ciclos de 12s a 95°C e 60s a 60°C para os ensaios *Genotyping* e 10min de desnaturação a 95°C e 50 ciclos de 15s a 92°C e 90s a 60°C para os ensaios *Drug Metabolism*. As reações foram realizadas em aparelho PCR tempo real Stratagene (GE, USA) e os resultados analisados pelo software Mx3000P. Detalhes sobre a metodologia com sondas de hidrólise encontra-se disponível no Apêndice A.

## **5.4 Análise Estatística**

Para análises estatísticas foram realizados teste de  $\chi^2$  para variáveis categóricas ou Exato de Fisher, e cálculo do *odds ratio* e regressão logística entre os fatores em estudo e o desfecho hiperbilirrubinemia. A análise dos dados contínuos foi realizada com o teste t de Student, ANOVA e Mann-Whitney (variáveis sem distribuição normal). O nível de significância estatística foi considerado para um valor de alfa < 0,05. Foi utilizado o programa SPSS Statistics versão 17.0.

### **5.4.1 Cálculo de Tamanho Amostral**

Baseado no trabalho de Huang e cols. (2004) foi calculado o tamanho amostral. Para uma diferença na frequência alélica de 0,37 para 0,22 nos grupos caso e controle (OR=2,10) para o alelo G do polimorfismo rs2306283, foi calculado um “n” de 154 para cada grupo.

#### **5.4.2 Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg**

As análises envolvendo os genótipos e sua concordância com o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram realizadas no Excell utilizando função qui-quadrado com 1 grau de liberdade. Se  $P > 0,05$ , a frequência é consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

#### **5.4.3 Reconstrução dos haplótipos**

Para reconstrução dos haplótipos dos polimorfismos dos genes *SLCO1B1* e *SLCO1B3* foi utilizado o programa PHASE v 2.1., que utiliza estatística Bayesiana a partir dos genótipos populacionais (STEPHENS e SCHEET, 2005; STEPHENS *et al.*, 2001).

### **5.5. Considerações Éticas**

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto original (CEP-HCPA: 06-575) previa em seu texto o armazenamento das amostras de DNA para análises posteriores.

Durante o processo de análise dos DNAs, os pacientes foram anonimizados, sendo codificados por números e não por nomes de pacientes, não sendo possível a identificação dos

mesmos. O Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA autorizou o uso dos DNAs e seus respectivos dados clínicos, visto que se trata de uma amostra anonimizada para genotipagem dos polimorfismos *SLCO1B1* e *SLCO1B3* (CEP-HCPA: 09-518).

## 6. RESULTADOS

Um total de 494 neonatos (246 internados para fototerapia e 248 controles selecionados) com idade gestacional superior a 35 semanas e peso superior a 2000g foram elegíveis para o estudo nos nove meses de coleta. Três recém-nascidos do grupo dos casos e um dos controles foram excluídos por extravio de amostra. Para 28 amostras (15 casos e 13 controles) não foi possível realizar estudo molecular por DNA inadequado, perfazendo 386 neonatos com estudo completo. Para 42 desses recém-nascidos não foi realizada quantificação da enzima G6PD, mas todos estes foram confirmados por teste molecular (27 casos e 15 controles). Dos 243 recém-nascidos internados para fototerapia pela equipe neonatal, 76 foram excluídos das análises aqui apresentadas por estarem com BST na faixa de 3mg/dL de bilirrubina, abaixo do percentil 95 para idade em horas. A Academia Americana de Pediatria (AAP) indica como opcional o tratamento por fototerapia nestas condições. Esta medida foi adotada para permitir maior homogeneidade da amostra, visto que polimorfismos genéticos apresentam, no geral, associações fracas com os desfechos clínicos e também para melhor comparar os dados com os demais apresentados na literatura. As análises incluindo todos os recém-nascidos encaminhados para fototerapia encontram-se disponíveis no Apêndice B. Dados categóricos e contínuos dos indivíduos encontram-se nas Tabelas 6 e 7.

Sexo masculino e incompatibilidade ABO foram mais frequentes entre hiperbilirrubinêmicos. A média de bilirrubina entre meninos e meninas internados para fototerapia foi de  $18,3 \pm 3,5$  mg/dL versus  $16,6 \pm 3,3$  mg/dL ( $P=0,004$ ). Com relação aos níveis de hemoglobina na internação, as médias entre meninos e meninas foram  $15,7 \pm 2,0$  g/dL versus  $16,2 \pm 1,7$  g/dL ( $P=0,079$ ). O peso médio ao nascer foi  $3217 \pm 460$  g no grupo controle versus

3099±504g no grupo caso ( $P=0,014$ ). A idade gestacional também diferiu entre os grupos, 39,5±1,3 semanas versus 38,1±1,7 semanas ( $P<0,001$ ).

**Tabela 6.** Dados clínicos e demográficos dos controles e dos pacientes (variáveis categóricas).

	Controles	Casos	P
<b>Sexo (n=414)</b>			
Masculino	122 (49,4%)	102 (61,1%)	0,019
Feminino	125 (50,6%)	65 (38,9%)	
<b>Cor da pele=414)</b>			
Branco	191 (77,3%)	122(73,1%)	NS *
Negro	56 (22,7%)	45 (26,9%)	
<b>Tamanho para Idade Gestacional (n=414)</b>			
Adequado	192 (77,7%)	136 (81,4%)	NS
Pequeno	40 (16,2%)	21 (12,6%)	
Grande	15 (6,1%)	10 (6,0%)	
<b>Parto (n=414)</b>			
Vaginal	160 (64,8%)	113 (67,7%)	NS
Cesárea	87 (35,2%)	54 (32,3%)	
<b>Incompatibilidade ABO (n=414)</b>			
Sim	47 (19%)	61 (36,5%)	<0,001
<b>Incompatibilidade Rh (n=414)</b>			
Sim	26 (10,5%)	20 (12,0%)	NS
<b>Deficiência da G6PD (n=405)</b>			
Sim	9 (3,7%)	12 (7,4%)	NS
<b>Necessidade de Reanimação (n=414)</b>			
Sim	28 (11,3%)	12 (7,2%)	NS

NS: estatisticamente não significativo.

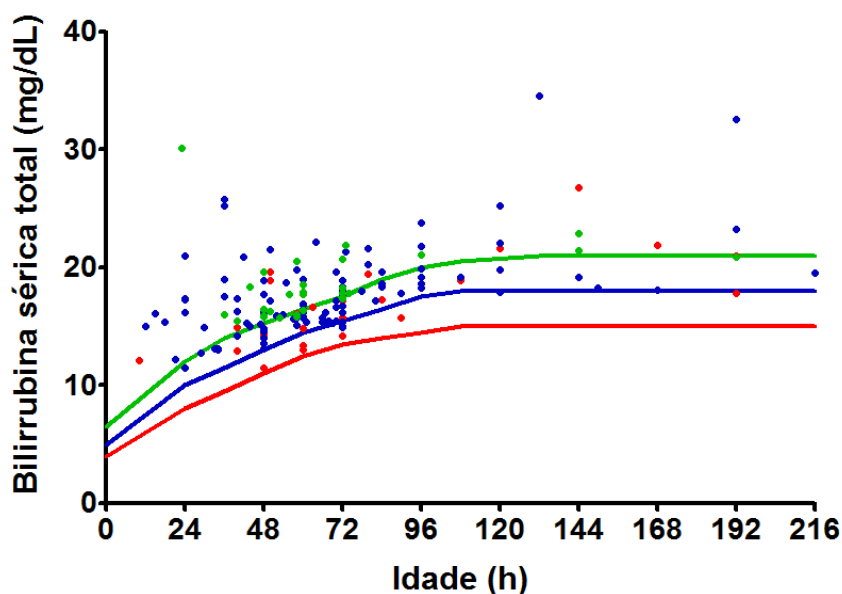
**Tabela 7.** Dados clínicos e demográficos dos controles e dos pacientes (variáveis contínuas).

	Controles	Casos	<i>P</i>
<b>Idade Gestacional (n=414)</b>			
(média ±dp, semanas)	39,5±1,4	38,1±1,8	<0,001
<b>Peso ao nascer (n=414)</b>			
(média ±dp, g)	3218±460	3099±460	0,014
<b>Idade Materna (n=411)</b>			
(média ±dp, anos)	26,12±6,8	25,2±6,5	NS
<b>Apgar 5' (n=413)</b>			
(média ±dp, score)	9±1	9±1	NS
<b>Atividade da G6PD (n=360)</b>			
(média ±dp, U/gHb)	17,2±5,7	17,2±6,2	NS

NS: estatisticamente não significativo.

Dosagens de bilirrubina foram obtidas para todos os neonatos internados para fototerapia. Os níveis de bilirrubina em relação à idade em hora obtidos encontram-se descritos na Figura 6.





**Figura 6.** Níveis séricos totais de bilirrubina para os 167 recém-nascidos hospitalizados para fototerapia, de acordo com as diretrizes da Associação Americana de Pediatria *versus* idade em horas. Linha vermelha: risco maior (35-37 semanas de idade gestacional (IG) + fatores de risco); Linha azul: risco médio (35-37 semanas de IG sem fatores de risco e >38 semanas de IG com fatores de risco); Linha verde: risco baixo (>38 semanas de IG sem fatores de risco).

A maioria dos recém-nascidos encaminhados para fototerapia foram internados do segundo ao terceiro dia de vida (42,5%), sendo que até o quarto dia de vida 85,6% apresentaram hiperbilirrubinemia grave (Tabela 8). Apenas 6,6% tiveram hiperbilirrubinemia grave após a primeira semana de vida.

**Tabela 8.** Valores médios de bilirrubina sérica total dos 167 casos.

Idade em horas	BST mg/dL (média $\pm$ dp)	Percentual	Percentual cumulativo
<24h	16,8 $\pm$ 5,2	6,6%	6,6%
>24 e <48h	16,0 $\pm$ 3,0	23,3%	29,9%
>48h e <72h	16,9 $\pm$ 1,8	42,5%	72,4%
>72h e >96	19,4 $\pm$ 1,9	13,2%	85,6%
>96h	21,9 $\pm$ 4,3	14,%	100%

Dos 167 recém-nascidos internados para fototerapia, 23 apresentaram níveis de mais de 20 mg/dL de BST (13,8%), 4 pacientes com mais de 25 mg/dL (2,4%) e 3 com mais de 30 mg/dL (1,8%).

O tempo mediano de fototerapia foi de 2 dias, com tempo de internação mediano, em dias, de 3. Fototerapia simples foi utilizada em 79 (47,3%) neonatos, fototerapia dupla em 64 (38,3%) e fototerapia tripla em 24 (14,4%).

Três pacientes foram acompanhados por alterações neurológicas atribuídas à hiperbilirrubinemia (Tabela 9). Destes, um era branco, dois eram meninos. O paciente A que necessitou de fototerapia com 24h de vida e com incompatibilidade ABO, apresentou níveis de bilirrubina de 11,3mg/dL enquanto os outros, que foram internados com mais de 132 e 192 horas de vida, apresentaram níveis acima de 30mg/dL. Todos tinham atividade normal da G6PD e apenas o paciente B apresentou um dos polimorfismos variantes (homozigose GG para rs2306283). Não houve qualquer manifestação clínico-laboratorial indicativa de *kernicterus* nessa amostra de pacientes durante o período de acompanhamento.

**Tabela 9.** Características dos pacientes com seguimento neurológico

	<b>Paciente A</b>	<b>Paciente B</b>	<b>Paciente C</b>
<b>Sexo</b>	Masculino	Feminino	Masculino
<b>Cor da pele</b>	Negro	Negro	Branco
<b>Peso (g)</b>	2755	2870	2830
<b>Idade Gestacional (sem)</b>	39	37	36
<b>Incompatibilidade ABO</b>	Sim	Não	Não
<b>Idade na fototerapia (h)</b>	24	132	192
<b>Tempo de foto (dias)</b>	7	2	2
<b>Bilirrubina na fototerapia (mg/dL)</b>	11,3	34	32
<b>Atividade da G6PD</b>	Normal	Normal	Normal
<b>Genótipo rs8175347 do <i>UGT1A1</i></b>	TA <sub>6</sub> /TA <sub>8</sub>	TA <sub>6</sub> /TA <sub>7</sub>	TA <sub>6</sub> /TA <sub>6</sub>
<b>Genótipo rs4149056 do <i>SLCO1B1</i></b>	TT	TT	TT
<b>Genótipo rs2306283 do <i>SLCO1B1</i></b>	AG	GG	AA
<b>Genótipo rs2117032 do <i>SLCO1B3</i></b>	CG	CC	CC
<b>Genótipo rs17680137 do <i>SLCO1B3</i></b>	CT	CC	CT

Houve 1 caso de ex-sanguíneo transfusão seguida de óbito em menos de 24h de evolução que ocorreu em paciente com incompatibilidade sanguínea por grupo c pequeno. Esse recém-nascido não tinha outras incompatibilidades do tipo ABO, Rh, deficiência da G6PD ou homozigose para nenhum dos polimorfismos estudados.

Entre os 61 pacientes ictericos com incompatibilidade ABO, 31 apresentavam teste de *Coombs* positivo e 30, teste negativo. Dos controles, foram 11 com o teste de *Coombs* positivo e 36 com o teste negativo. Dentre os indivíduos com *Coombs* negativo, não houve associação entre o polimorfismo do gene *UGT1A1*.

Em nossa amostra, a sensibilidade para o desfecho hiperbilirrubinemia a partir do teste de *Coombs* positivo, em indivíduos com incompatibilidade ABO, foi 51% e a especificidade foi 77%, já o valor preditivo positivo foi 76% e o negativo 55%. Dos 7 pacientes internados para fototerapia com incompatibilidade ABO nas primeiras 24h de vida, apenas um apresentou teste de *Coombs* negativo.

### **6.1. Deficiência de G6PD**

Na amostra global (414 recém-nascidos), 21 pacientes com deficiência de G6PD foram encontrados pela triagem enzimática, mostrando uma prevalência nesta população de 5,2%. Entre os 167 ictericos, 12 (7,4%) tinham a deficiência, e nos 247 controles a prevalência foi de 9 (3,7%) pacientes, não havendo diferença estatística. A atividade média de G6PD foi 17,2 U/gHb, em ambos os grupos.

A deficiência de G6PD foi determinada em 16 (7,1%) de todos os meninos e 5 (2,6%) meninas ( $P=0,058$ ). Do total de meninos ictericos da amostra ( $n=102$ ), 10 (9,8%) tinham deficiência de G6PD e do total de meninas ictericas ( $n=65$ ), 2 (3,1%) (*NS*).

Dos recém-nascidos com deficiência, um no grupo controle teve incompatibilidade ABO e outro no mesmo grupo, incompatibilidade Rh. Nos 21 neonatos com deficiência de

G6PD 14/21 eram brancos e 7/21 eram negros. Nos 167 bebês ictericos analisados encontrou-se 6 brancos com deficiência de G6PD e 6 negros.

Dos 21 casos de deficiência de G6PD, 4 foram diagnosticados pela PCR e não tiveram medida da atividade (Tabela 10). Não foi encontrado nenhum neonato com mutação Mediterrânea e em 7 pacientes não foi encontrada nenhuma das duas variantes em estudo.

**Tabela 10.** Caracterização molecular dos 21 indivíduos com deficiência de G6PD

		Casos (n)	Controles (n)
Atividade Média de G6PD (U/gHb)		5,45 (n=10)	5,54 (n=7)
Variante Africana	Homozigotos	7	6
	Heterozigotos	0	1
Sem mutação detectável		5	2

## 6.2. Polimorfismo UGT1A1

Os 4 alelos descritos na literatura foram identificados na amostra, tanto no grupo casos quanto nos controles e encontravam-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A frequência alélica do polimorfismo do gene *UGT1A1* diferiu entre os grupos (Tabela 11), sendo o alelo TA<sub>5</sub> mais frequente no grupo controle ( $P=0,0417$ ).

**Tabela 11.** Frequência alélica do polimorfismo rs8175347 da *UGT1A1*.

Polimorfismo		Controles	Casos	<i>P</i>
<b><i>UGT1A1</i> (n=386)</b>				
rs8175347	TA <sub>5</sub>	0.02	0.003	0,0417*
	TA <sub>6</sub>	0.60	0.67	
	TA <sub>7</sub>	0.36	0.31	
	TA <sub>8</sub>	0.01	0.01	

\* Diferença no Teste Exato de Fisher devido ao alelo TA<sub>5</sub>.

A frequência genotípica não diferiu em ambos os grupos, bem como a associação dos genótipos associados a níveis maiores de bilirrubina (TA<sub>6</sub>/TA<sub>8</sub>, TA<sub>7</sub>/TA<sub>7</sub> e TA<sub>7</sub>/TA<sub>8</sub>) (Tabela 12). Os genótipos TA<sub>5</sub>/TA<sub>6</sub> e TA<sub>5</sub>/TA<sub>7</sub> foram encontrados em 11 controles e apenas um caso.

**Tabela 12.** Frequência genotípica do polimorfismo rs8175347 da *UGT1A1*

	Controles n (%)	Casos n (%)	<i>P</i>
TA <sub>5</sub> /TA <sub>6</sub>	6 (2,6%)	1 (0,7%)	NS*
TA <sub>5</sub> /TA <sub>7</sub>	5 (2,1%)	0	
TA <sub>6</sub> /TA <sub>6</sub>	85 (36,3%)	67 (44,1%)	
TA <sub>6</sub> /TA <sub>7</sub>	103 (44,0%)	68 (44,7%)	
TA <sub>6</sub> /TA <sub>8</sub>	3 (1,3%)	1 (0,7%)	
TA <sub>7</sub> /TA <sub>7</sub>	30 (12,8%)	12 (7,9%)	
TA <sub>7</sub> /TA <sub>8</sub>	2 (0,9%)	3 (2,0%)	

\* NS: sem significância

Quando analisados quanto à cor da pele, encontramos que o alelo TA7 e seus genótipos são mais frequentes entre os negros (Tabela 13 e 14).

**Tabela 13.** Frequência alélica do polimorfismo rs8175347 da de acordo com a cor da pele.

	Branco	Negro	<i>P</i>
TA <sub>5</sub>	0,01	0,02	0,0003
TA <sub>6</sub>	0,67	0,51	
TA <sub>7</sub>	0,31	0,44	
TA <sub>8</sub>	0,01	0,03	

**Tabela 14.** Frequência dos genótipos do polimorfismo rs8175347 da de acordo com a cor da pele.

	Branco n (%)	Negro n (%)	<i>P</i>
TA <sub>5</sub> /TA <sub>6</sub>	6 (2,1%)	1 (1,1%)	0,004*
TA <sub>5</sub> /TA <sub>7</sub>	2 (0,7%)	3 (3,2%)	
TA <sub>6</sub> /TA <sub>6</sub>	128 (43,8%)	24 (25,5%)	
TA <sub>6</sub> /TA <sub>7</sub>	126 (43,2%)	45 (47,9%)	
TA <sub>6</sub> /TA <sub>8</sub>	2 (0,7%)	2 (2,1%)	
TA <sub>7</sub> /TA <sub>7</sub>	26 (8,9%)	16 (17,0%)	
TA <sub>7</sub> /TA <sub>8</sub>	2 (0,7%)	3 (3,2%)	

\*Diferença entre TA<sub>6</sub>/TA<sub>6</sub> e TA<sub>7</sub>/TA<sub>7</sub>

Quando as frequências dos genótipos são comparadas entre casos e controles estratificados pela cor da pele, não foi observada diferença estatística. A média de bilirrubinas entre os casos de cor da pele negra e branca também não diferiu ( $17,5 \pm 3,4 \text{mg/dL}$  versus  $17,6 \pm 3,4 \text{mg/dL}$ , NS).

### 6.3. Polimorfismos *SLCO1B1* e *SLCO1B3*

As frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos rs4149056, rs2306283, rs2117032 e rs17680137 não diferiram entre os grupos e encontravam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabelas 15 e 16).

**Tabela 15.** Frequências alélica e genotípica dos polimorfismos do gene *SLCO1B1*.

<i>SLCO1B1</i> (n=394)		Controles	Casos	<i>P</i>
rs4149056	Alelo C	0,13	0,11	NS*
	TT	179 (75,5%)	122 (77,7%)	NS
	TC	55 (23,2%)	34 (21,7%)	
	CC	3 (1,3%)	1 (0,6%)	
rs2306283	Alelo G	0,50	0,52	NS
	AA	56 (23,6%)	37 (23,6%)	NS
	AG	123 (52,0%)	78 (49,7%)	
	GG	58 (24,5%)	42 (26,8%)	

\* NS: sem significância



**Tabela 16.** Frequências alélica e genotípica dos polimorfismos do gene *SLCO1B3*.

<i>SLCO1B3</i> (n=394)		Controles	Casos	<i>P</i>
rs2117032	Alelo T	0,50	0,46	NS*
	CC	58 (24,5%)	50 (31,8%)	NS
	CT	121 (51,1%)	69 (43,9%)	
	TT	58 (24,5%)	38 (24,2%)	
rs17680137	Alelo G	0,11	0,12	NS
	CC	187 (78,9%)	121 (77,1%)	NS
	CG	49 (20,7%)	34 (21,7%)	
	GG	1 (0,4%)	2 (1,3%)	

\* NS: sem significância

O alelo G do rs2306283 foi mais frequente em negros do que em brancos (0,63 *versus* 0,47;  $P < 0,001$ ), enquanto o alelo T do rs2117032 (0,37 *versus* 0,52;  $P < 0,001$ ) foi menos frequente em negros (Tabela 17).

**Tabela 17.** Frequência alélica dos polimorfismos rs2306283 e rs2117032 de acordo com a cor da pele.

Polimorfismo	Alelo	Branco	Negros	<i>P</i>
rs2306283	Alelo G	0,47	0,63	$< 0,001$
rs2117032	Alelo T	0,37	0,52	$< 0,001$

Analisando a co-herança entre os diversos fatores estudados, foi observado que indivíduos homocigotos para o alelo G do rs2306283 e deficientes da G6PD eram mais frequentes no grupo caso do que no grupo controle (14,3 *versus* 1,7%;  $P = 0,039$ ). A

homozigose para pelo menos um dos cinco polimorfismos foi encontrada em 53% dos hiperbilirrubinêmicos e 55% dos controles. Apenas dois neonatos ictericos não apresentavam nenhum dos alelos variantes.

Referente à reconstrução dos haplótipos dos polimorfismos dos genes *SLCO1B1* e *SLCO1B3*, foram encontrados sete haplótipos com frequência superior a 1%. As frequências haplotípicas não diferiram entre os grupos (Tabela 18).

**Tabela 18.** Frequências haplotípicas dos polimorfismos rs4149056, rs2306283, rs2117032 e rs17680137 dos genes *SLCO1B1* e *SLCO1B3*.

	Controles	Casos	<i>P</i>
TGCC	148 (31,2%)	102 (32,5%)	NS*
TGCG	6 (1,3%)	7 (2,2%)	
TGTC	34 (7,2%)	23 (7,3%)	
TACC	44 (9,3%)	35 (11,1%)	
TATC	181 (38,2%)	110 (35,0%)	
CGCC	45 (9,5%)	28 (8,9%)	
CATC	12 (2,5%)	5 (1,6%)	
Outros †	4 (0,8%)	4 (1,2%)	

\* NS: sem significância

† Outros: haplótipos que tiveram frequência menor que 1%.

Para controlar o efeito das variáveis sexo, cor da pele, incompatibilidade ABO, idade gestacional e peso ao nascer sobre a influência dos polimorfismos, foi feita regressão logística (Tabela 19).

**Tabela 19.** Variáveis que permaneceram no modelo de regressão logística para o desfecho hiperbilirrubinemia neonatal grave.

<b>Fator em estudo</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>P</b>
Incompatibilidade ABO	3.27 (1.95 - 5.50)	<0,001
Idade Gestacional (por semana)	0.56 (0,48 – 0.66)	<0,001
Alelo T rs2117032	0.57 (0.34 – 0.94)	0,0027

Apenas a incompatibilidade ABO e o peso ao nascimento permaneceram no modelo. Além disso, a presença do alelo T do rs2117032 apresentou-se com um fator protetor a hiperbilirrubinemia, especialmente entre aqueles que não apresentavam incompatibilidade ABO.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Considerações gerais

Foram estudados 167 recém-nascidos com indicação para fototerapia em um período de nove meses, atendidos no Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O cálculo de tamanho amostral demonstrou a necessidade de 154 indivíduos em cada grupo para que uma diferença na frequência alélica do polimorfismo rs2306283 de 0,37 no grupo casos *versus* 0,22 no grupo controle fosse detectada (OR=2,1). Mesmo quando 76 recém-nascidos foram excluídos do grupo caso por não preencherem os requisitos obrigatórios para fototerapia, a amostra permaneceu com tamanho amostral suficiente. Fazendo um cálculo reverso, o n amostral detectaria um OR de 2,5 para todos os polimorfismos estudados, se houvesse diferença significativa entre os grupos. Todas as análises foram realizadas com e sem os 76 bebês e os resultados se mantiveram homogêneos, com exceção do resultado da regressão logística, que será discutida adiante.

O fato de 76 bebês que não preenchiam completamente os critérios da AAP terem sido encaminhados para fototerapia merece consideração. É importante ressaltar que a maioria desses indivíduos estava na faixa de 2 a 3mg/dL de bilirrubina abaixo do percentil 95, na qual a AAP considera o tratamento como opcional, demonstrando o zelo por parte da equipe assistencial, visando o melhor tratamento para os pacientes.

Dentre os fatores de risco já conhecidos, incompatibilidade ABO, sexo, idade gestacional e peso ao nascer tiveram diferenças estatística entre o grupo controle e caso. A diferença entre os grupos com relação ao sexo apenas corrobora o que a literatura descreve,

bem como a diferença nos níveis de bilirrubina entre os meninos e meninas internados para fototerapia. Tioseco e cols. demonstraram que a bilirrubina em recém-nascidos do sexo masculino com baixo peso ao nascer na faixa de 1500- 2499-g é mais elevada que em meninas(TIOSECO *et al.*, 2005). Outros autores já haviam relatado que o sexo masculino é um fator associado à hiperbilirrubinemia (MAISELS e KRING, 1998; NEWMAN *et al.*, 2000). Além disso, meninos apresentaram níveis de hemoglobina mais baixos. Galacteros e cols. descreveram que meninos entre 37 a 41 semanas de idade gestacional e peso entre 2000-4500g possuem hemoglobina mais reduzida que meninas de mesma idade e peso (GALACTEROS *et al.*, 1991). Talvez os meninos apresentem um *turnover* eritrocitário mais acentuado, o que justificaria o porquê da hiperbilirrubinemia ser mais frequente entre o sexo masculino.

A hemólise causada pela aloimunização ABO configura um conhecido risco para hiperbilirrubinemia. O teste de *Coombs* positivo é considerado o elemento chave no diagnóstico da doença hemolítica do recém-nascido (MURRAY e ROBERTS, 2007). Porém a sensibilidade do teste de *Coombs* para o desfecho hiperbilirrubinemia não foi alto em nossa amostra (51%). Diferentemente de Kaplan (KAPLAN *et al.*, 2000), não encontramos associação entre hiperbilirrubinemia, o polimorfismos da *UGT1A1* e os bebês com teste de *Coombs* negativo.

A menor idade gestacional tem sido sucessivamente associada a níveis maiores de bilirrubina (MAISELS, 2005; NEWMAN *et al.*, 2000). Em nossa amostra, os bebês ictericos apresentaram idade gestacional média de 38 semanas enquanto o grupo controle apresentou 39 semanas. Considerando que um recém-nascido com 38 semanas seja aceito como termo e, portanto, com menor risco de desenvolver hiperbilirrubinemia, modernamente é questionada a definição de parto a termo como sendo de 37 semanas ou mais. Crianças nascidas com 37 e

38 semanas apresentam morbi-mortalidade aumentada, em relação a crianças nascidas com 39–41 semanas. Há um movimento internacional entre os neonatologistas para redefinir partos a termo como aqueles de 39 semanas ou mais, e não mais acima de 38 semanas (DONOVAN *et al.*, 2010). É sabido que a prematuridade é importante fator de risco para hiperbilirrubinemia e para a neurotoxicidade da bilirrubina por limitações no metabolismo do pigmento e imaturidade das membranas. Nos pré-termos a hiperbilirrubinemia tem risco 2-5 vezes maior, o que justifica a preocupação com maior risco de *kernicterus* (BHUTANI e JOHNSON, 2006) (MAISELS *et al.*, 2009).

Embora controles e hiperbilirrubinêmicos tenham apresentado diferença no peso ao nascimento, a média de ambos os grupos se encontrou acima de 3000g (peso adequado). Provavelmente a diferença tenha ocorrido por influência da diferença da idade gestacional, já que na regressão logística a variável peso ao nascimento perdeu significância.

A maioria dos recém-nascidos com início precoce da hiperbilirrubinemia internados para fototerapia foi encaminhada antes das 72h de vida (SMITHERMAN *et al.*, 2006). Este dado reforça as diretrizes da AAP de que os bebês com alta antes das 72h devam ser acompanhados (AAP, 2004). Em nossa amostra 13,8% dos neonatos tiveram mais de 20 mg/dL de BST e 2,4% mais de 25 mg/dL. Punaro e cols. descreveram, em uma coorte de recém-nascidos de 35 a 37 semanas de idade gestacional, uma frequência 8,7% de bilirrubinemia total  $\geq 20$  mg/dL e de 0,8% para bilirrubinemia total entre 25-30 mg/dL (PUNARO *et al.*, 2011). Praticamente metade da amostra dos neonatos teve indicação de fototerapia simples (47,3%). De Carvalho e cols. relataram que a fototerapia dupla era mais eficaz que a simples em uma população de recém-nascidos de maior risco (prematuros e de baixo peso)(DE CARVALHO *et al.*, 1996), enquanto para Silva e cols. em neonatos a termo

com níveis de bilirrubina moderados, a fototerapia simples foi tão eficiente quanto a dupla (SILVA *et al.*, 2009).

## 7.2. Deficiência da G6PD

A deficiência da G6PD é a doença genética mais comum, afetando 330 milhões de indivíduos no mundo (NKHOMA *et al.*, 2009). A prevalência da deficiência de G6PD na amostra foi de 5,2%, corroborando a frequência descrita em nosso estado de 7,8% (CASTRO *et al.*, 2006). Em um estudo paulista com uma coorte de recém-nascidos foi descrita uma prevalência de 6,1% para deficiência da G6PD (MEZZACAPPA *et al.*, 2010). Nosso estudo não demonstrou diferenças entre os grupos para deficiência de G6PD, assim como no grupo paulista. Na Tailândia, Prachukthum (PRACHUKTHUM *et al.*, 2009) descreveram que a frequência da deficiência era 21,2% entre recém-nascidos hiperbilirrubinêmicos do sexo masculino e 4,8% em um grupo controle. Para meninas a associação não foi encontrada. Resultados similares foram descritos por Wong (WONG *et al.*, 2009) em neonatos chineses, com frequências de 35,4% e 10%, respectivamente. O critério para definir a deficiência para todos os estudos foi a atividade enzimática, porém foram utilizados pontos de corte diferentes, devido a diferentes padronizações e valores de referência, o que pode levar ter levado a tais diferenças de frequências. Nosso estudo utilizou como ponto de corte para atividade enzimática 8 U/gHb, Mezzacappa 10 U/gHb, Prachukthum 4,6 U/gHb e Wong 8,5 U/gHb.

No nosso material, a única mutação identificada foi a Africana, não sendo encontrada a variante Mediterrânea. Esse achado corrobora o de Mezzacappa e cols., no qual a única mutação identificada também foi apenas a Africana (MEZZACAPPA *et al.*, 2010).

### 7.3. UGT1A1

O polimorfismo da *UGT1A1* apresentou diferença entre os grupos controle e icterico na frequência alélica apenas para o alelo TA<sub>5</sub>, que está associado a uma maior transcrição da enzima (BEUTLER *et al.*, 1998). Isso explica porque os genótipos TA<sub>5</sub>/TA<sub>6</sub> e TA<sub>5</sub>/TA<sub>7</sub> foram encontrados em 11 controles e apenas um caso, porém ainda assim não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quando comparados os grupos frente aos genótipos. O trabalho de Ergin e cols. é um dos poucos em população caucasóide- Turquia, que encontrou frequências genotípicas e alélicas diferentes entre grupo hiperbilirrubinêmico e controles (ERGIN *et al.*, 2010). Diferentemente de nosso estudo, Ergin selecionou recém-nascidos com idade gestacional superior a 38 semanas e peso superior a 2500g. Além disso, não entraram no estudo aqueles com incompatibilidade ABO, deficiência de G6PD ou qualquer outro fator de risco descrito pela AAP. A tentativa de restringir os fatores de risco e deixar apenas os casos sem fatores de risco aparente, talvez tenha um poder maior para detectar diferenças entre frequências genotípicas. Em nossa amostra, mesmo quando aqueles que possuem os fatores de risco clássicos são excluídos das análises, ainda assim não são encontradas diferenças nas frequências do polimorfismo.

A recente meta-análise de Long e cols. aponta o trabalho de Ergin como o único que encontrou relação entre o polimorfismo da região promotora com a hiperbilirrubinemia neonatal dos sete estudos por eles analisados em populações caucasóides (LONG *et al.*, 2011). A frequência do genótipo TA<sub>7</sub>/TA<sub>7</sub> em nosso estudo foi de 12,8% entre casos e 7,9% entre controles. Estas frequências são muito semelhantes às frequências dos estudos em recém-nascidos de outras populações caucasóides (Tabela. Em São Paulo, Mezzacappa e cols. encontraram uma frequência de 12,7% entre neonatos hiperbilirrubinêmicos e 9,2% entre os



não hiperbilirrubinêmicos (MEZZACAPPA *et al.*, 2010). Watchko e cols. encontraram prevalências de 13,7% e 9,4%, respectivamente nos EUA (WATCHKO *et al.*, 2009). Já Seco e cols. descreveram 14,3% e 7% em recém nascidos espanhóis (SECO *et al.*, 2002). Entre a população asiática as frequências são bem menores. No Japão, Yusoff e cols. encontraram prevalências bem baixas entre neonatos ictericos e controles, 1,5% *versus* 1,4% (YUSOFF *et al.*, 2010). Em Taiwan, Huang e cols. encontraram frequências de 0,8% entre neonatos ictericos e 0,4% em 2002 (HUANG *et al.*, 2002) e não identificaram o genótipo polimórfico em 2004 (HUANG *et al.*, 2004). Da mesma forma, Maruo e cols. e Kanai e cols. não encontraram o genótipo TA<sub>7</sub>/TA<sub>7</sub> em neonatos japoneses (MARUO *et al.*, 1999) Na Índia, Agrawal e cols. descreveram frequências de 17,4% e 8% entre ictericos e controles (AGRAWAL *et al.*, 2009).

**Tabela 20.** Frequência do genótipo TA<sub>7</sub>/TA<sub>7</sub> em amostras de neonatos hiperbilirrubinêmicos e controles em diversos países.

País	Casos (%)	Controles (%)	Referência
Brasil	12,8	7,9	(CARVALHO, 2009)
Brasil	12,7	9,2	(MEZZACAPPA <i>et al.</i> , 2010)
EUA	13,7	7,0	(WATCHKO e LIN, 2010)
Espanha	14,3	7,0	(SECO <i>et al.</i> , 2002)
Japão	1,5	1,4	(YUSOFF <i>et al.</i> , 2010)
Taiwan	0,8	0,4	(HUANG <i>et al.</i> , 2002)
Índia	17,4	8,0	(AGRAWAL <i>et al.</i> , 2009)
Turquia	12,0	0	(ERGIN <i>et al.</i> , 2010)

Embora comumente associado à Síndrome de Gilbert, o polimorfismo isolado não caracteriza a doença. A homozigose para o alelo TA<sub>7</sub> foi primeiramente considerada como a única causa para Síndrome em caucasoides (BIONDI *et al.*, 1999; BOSMA *et al.*, 1995), contudo a relação genótipo/fenótipo não é linear. O polimorfismo c.-3279T>G, também na região promotora é considerado como um fator extra para o desenvolvimento da Síndrome (COSTA *et al.*, 2005). Alguns autores observaram que este polimorfismo em homozigose para o alelo G associado não só ao genótipo TA<sub>7</sub>/TA<sub>7</sub>, mas também ao genótipo TA<sub>6</sub>/TA<sub>7</sub> seriam mais comuns entre indivíduos com a Síndrome de Gilbert quando comparados a controles normais (COSTA *et al.*, 2005; FERRARIS *et al.*, 2006).

As diferenças entre negros e brancos para o polimorfismo da UGT1A1 são consistentes com os achados da literatura. Premawardhen e cols. genotiparam o polimorfismo em diversos grupos étnicos, encontrando frequências de 50,8% e 19,1% para o genótipo TA<sub>6</sub>/TA<sub>6</sub> no Reino Unido e Quênia e frequências de 5% e 17,9% para o genótipo TA<sub>7</sub>/TA<sub>7</sub>. Estes valores são consistentes com os valores encontrados de 43,8% e 25,5% para TA<sub>6</sub>/TA<sub>6</sub> e 8,9% e 17% para TA<sub>7</sub>/TA<sub>7</sub>. Diferentemente de negros e caucasoides, asiáticos possuem uma frequência muito baixa do polimorfismo TA<sub>7</sub>/TA<sub>7</sub>. Em Hong Kong a frequência é de 2%, enquanto para o genótipo TA<sub>6</sub>/TA<sub>6</sub> é 76% (PREMAWARDHENA *et al.*, 2003).

Recentemente Fujiwara e cols. desenvolveram um modelo de camundongos transgênicos, que expressavam a *UGT1A1* humana (FUJIWARA *et al.*, 2010). Dez por cento dos camundongos recém-nascidos desenvolveram dano no Sistema Nervoso Central, caracterizado por convulsões e óbito. Não se encontrou relação entre o desenvolvimento de hiperbilirrubinemia neonatal e a presença dos alelos TA<sub>6</sub> ou TA<sub>7</sub>. Fazendo análise proteica por Western Blotting, os autores encontraram que a expressão da UGT hepática é praticamente nula no período neonatal em camundongos, e que em torno da segunda semana,

quando os níveis de bilirrubina começam a diminuir, este fenômeno é acompanhado pelo aumento da expressão da UGT intestinal. Diferentemente, os camundongos adultos possuem relação da expressão da UGT hepática com o genótipo carregado. Além disso, estes mesmo autores demonstraram que leite materno humano diminui a expressão da UGT intestinal nos camundongos transgênicos da enzima UGT1A1 (FUJIWARA *et al.*, 2011). Isto poderia explicar por que o genótipo da UGT1A1 tem se mostrado um baixo preditor da hiperbilirrubinemia neonatal, mostrando que a avaliação não só da UGT hepática, mas também da intestinal é importante.

#### **7.4. OATPs**

Algumas evidências sugerem que a bilirrubina não conjugada seria substrato para o transportador de ânions orgânicos OATP1B1, um transportador que facilita a captação hepática de vários substratos endógenos e exógenos. Presumivelmente polimorfismos no gene desta proteína poderiam impactar a cinética de captação da bilirrubina e alterar seu metabolismo em neonatos. Neste estudo foram analisados dois polimorfismos no gene desta proteína. O polimorfismo A388G (rs2306283) provoca a troca de um aspartato por uma asparagina no códon 130 (MEYER ZU SCHWABEDISSEN e KIM, 2009) e não apresentou diferença entre os grupos caso e controle em nosso estudo, tanto em frequência alélica quanto genotípica. Em 2004, Huang e cols. descreveram que a presença do alelo A ofereceria um OR=2,10 para hiperbilirrubinemia (HUANG *et al.*, 2004). Vários outros grupos (PRACHUKTHUM *et al.*, 2009; WATCHKO *et al.*, 2009; WONG *et al.*, 2009) porém não encontraram tal polimorfismo como fator de risco para hiperbilirrubinemia. Zhang e cols. descreveram que nem a frequência alélica ou genotípica do 388G diferiu entre neonatos

hiperbilirrubinêmicos e controles, porém indivíduos homozigotos GG tinham BST menor quando comparados com aqueles que não possuíam a variante (351,7  $\mu\text{mol/L}$  *versus* 602,5  $\mu\text{mol/L}$ ) (ZHANG *et al.*, 2010).

Quando analisada a co-herança entre os diversos fatores estudados, foi observado que indivíduos homozigotos para o alelo G do rs2306283 e deficientes da G6PD eram mais frequentes no grupo caso do que no grupo controle (14,3 *versus* 1,7%,  $P=0,039$ ). Watchko e cols. descreveram que os recém-nascidos com deficiência da G6PD e homozigotos para o alelo G do rs2306283 eram mais comuns em um grupo icterício quando comparados com um grupo controle (87,5% *versus* 20%,  $P=0,015$ ) (WATCHKO *et al.*, 2009).

Embora a maioria da nossa população possua pele clara, quando analisamos os marcadores moleculares de etnia, grande parte de nossa ancestralidade é africana (PIMENTA *et al.*, 2006). Embora estimar a etnia apenas visualmente não seja o mais adequado, recentemente Sortica e colaboradores descreveram no Brasil, por auto declaração, uma frequência de 0,64 entre negros e 0,49 entre brancos do polimorfismo rs2306283 (SORTICA *et al.*, 2011), muito semelhantes às aqui descritas. A frequência alélica encontrada em nosso estudo para o alelo G foi de 0,50-0,52, um valor intermediário entre aquele encontrado em descendentes de europeus - 0,30 e de afro-americanos - 0,74 (MEYER ZU SCHWABEDISSEN e KIM, 2009).

Da mesma forma que o A388G, o polimorfismo T521C (rs4149056), que acarreta a troca de uma Valina por uma Alanina no códon 174 (MEYER ZU SCHWABEDISSEN e KIM, 2009), também não apresentou diferenças entre os grupos, assim como nos estudos de Hunag e cols., Wathcko e cols. e Wong e cols. (HUANG *et al.*, 2004; WATCHKO *et al.*, 2009; WONG *et al.*, 2009). Zhang e cols. descreveram que a frequência alélica do polimorfismo 521C era apenas 8,2% entre neonatos hiperbilirrubinêmicos e 14% em

controles, que é muito semelhante a de indivíduos europeus e japoneses (MEYER ZU SCHWABEDISSEN e KIM, 2009) e as de nosso estudo (11,0-13,0%). Para Zhang e cols. a proporção de indivíduos homozigotos entre os casos foi de 84,1%, apresentando um OR = 0,541, IC95% = 0.344 - 0.851 (ZHANG *et al.*, 2010).

Assim como OATP1B1, a OATP1B3 também foi apontada como transportadora de bilirrubina e seu papel na hiperbilirrubinemia neonatal ainda não foi estudado. Sanna e cols. descreveram que os dois polimorfismos estudados aqui, rs2117032 e rs17680137 estavam fortemente associados a hiperbilirrubinemia de causa desconhecida em indivíduos saudáveis na Sardenha (SANNA *et al.*, 2009). Em nossa amostra não foram encontradas diferenças alélicas e genotípicas na análise univariada. As frequências alélicas aqui apresentadas para rs21170132 T- 0,46-0,50 e para rs17680137 G- 0,11-0,12 são muito semelhantes às descritas por Sanna e cols., de 0,54 e 0,22, respectivamente. O alelo T do rs2117032 apresentou uma frequência de 0,37 em negros e de 0,52 em brancos ( $P < 0,001$ ). Na Coreia, Kang e cols. não encontraram nenhuma associação destes dois polimorfismos com níveis de bilirrubina (KANG *et al.*, 2010).

A regressão logística de potenciais fatores confundidores nos permitiu identificar que a presença do alelo T do rs2117032 seria um fator protetor para hiperbilirrubinemia, especialmente entre aqueles que não apresentam incompatibilidade ABO. Embora isso vá ao encontro pelo descrito por Sanna e cols., que encontraram um aumento de bilirrubina relacionado ao alelo C, não pudemos confirmar isso em nossa amostra por não haver dosagem de bilirrubinas entre os controles. Já nas análises por regressão logística envolvendo todos os pacientes, a influência do alelo T desaparece (ver Apêndice B). Isso pode ter ocorrido pelo efeito do alelo ser muito fraco e se perder quando uma amostra mais heterogênea é analisada

ou por se tratar apenas de um achado espúrio. Mais estudos investigando essa possível associação são necessários.

A homozigose para pelo menos um dos 5 polimorfismos estudados foi encontrada em 53% dos casos e 55% dos controles. Apenas dois neonatos no grupo caso não possuíam nenhum dos alelos variantes. Isso apenas reforça que nenhum polimorfismo isoladamente parece influenciar o aumento do risco de hiperbilirrubinemia. Com frequências tão altas destes polimorfismos, é improvável que apenas um deles seja o responsável por tal condição. Além disso, em 2003, Wang e cols. publicaram que a captação de bilirrubina pela OATP1B1 seria improvável (WANG *et al.*, 2003) e Zucker e cols. identificaram que esta poderia passar por difusão passiva através da membrana do hepatócito (ZUCKER *et al.*, 1999).

## **7.5. Considerações finais**

A icterícia neonatal é um exemplo de uma manifestação intrincada, onde os fatores clínicos em geral estudados não podem responder isoladamente como causa. Aproximadamente 14 milhões de bebês no mundo requerem fototerapia a cada ano (BHUTANI, 2012). A variabilidade genética é responsável por boa parte desta condição, embora a forma como diferentes polimorfismos se relacionam uns com os outros e com fatores ambientais ainda não possuem explicação. Talvez possa ser considerada uma limitação de o estudo ter sido adotada a fototerapia como critério de discriminação entre casos e controles. Watchko e cols. sugerem que a escolha de percentis mais afastados pudesse tornar o estudo mais robusto (WATCHKO *et al.*, 2009).

Além da *UGT1A1* e da família *SLCO*, outros genes envolvidos na rota metabólica devem ser estudados. A enzima heme oxigenase-1 (HO-1) é a enzima limitante na conversão do heme para bilirrubina. Na região promotora se encontra repetições nucleotídicas GT que variam de 12 a 40 inserções. Alelos com menos de 27 repetições foram reportados como associados com níveis maiores de BST em adultos (EXNER *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2009). Um estudo explorou a relação das repetições GT<sub>n</sub> em neonatos de uma coorte japonesa e nenhum efeito foi observado sobre a hiperbilirrubinemia (KANAI *et al.*, 2003). Já Boskaya e cols. encontraram que os neonatos com menos de 24 repetições em ambos os alelos tinham mais hiperbilirrubinemia prolongada que os controles (BOZKAYA *et al.*, 2010). A biliverdina redutase, em teoria poderia afetar o risco de hiperbilirrubinemia em recém-nascidos, porém nenhum estudo foi encontrado relacionando os dois. Mandelbrot e cols. observaram que recém-nascidos a termo de mães soropositivas, em tratamento com atazanavir, eram frequentemente acometidos por hiperbilirrubinemia. Quatro de 23 neonatos requereram fototerapia (MANDELBROT *et al.*, 2011). Atazanavir é um inibidor de protease que possui efeito inibitório sobre a atividade da enzima UGT1A1 (STRASSBURG *et al.*, 2008) e poderia influenciar também os níveis de bilirrubina em recém-nascidos.

A icterícia é um dos problemas mais frequentes no período neonatal e corresponde à expressão clínica da hiperbilirrubinemia. Este é, no recém-nascido, um processo fisiológico explicado pelas condições próprias do metabolismo da bilirrubina: sobrecarga ao hepatócito e menor capacidade de captação, conjugação e excreção hepática. O impacto genético exercido sobre esta condição, assim como o ambiental, é cada vez mais reconhecido. Em adultos, os estudos sugerem que até 50% da variação dos níveis de BST podem ser explicados pela variação genética (LIN *et al.*, 2003). Embora a imaturidade de proteínas como OATP e UGT possa ser mascarada no período neonatal, a influência genética não deve ser descartada. A literatura tem mostrado consistentemente que o estudo da patogênese da hiperbilirrubinemia

neonatal não conjugada deve ser realizado de forma ampla, analisando os diversos aspectos envolvidos no processo, ao invés de focar apenas em encontrar uma causa específica.

Três fatores genéticos mostraram associação com a hiperbilirrubinemia neonatal nessa amostra:

- Alelo TA<sub>5</sub> do gene da UGT1A1;
- Homozigose GG do polimorfismo rs2306283 + deficiência da G6PD;
- Alelo T do rs2117032.

Futuros estudos prospectivos sobre essas variáveis genéticas são necessários na elucidação das causas das hiperbilirrubinemia neonatal. Talvez um, ou mais, desses polimorfismos possam configurar como fatores a serem pesquisados em casos de hiperbilirrubinemia grave.



## 8. CONCLUSÕES

Foram descritas as frequências para os polimorfismos rs2306283 e rs4149056 do gene *SLCO1B1* e rs17680137 e rs2117032 do gene *SLCO1B3* em pacientes com hiperbilirrubinemia neonatal grave, as quais se encontram de acordo com o que é relatado na literatura.

A única associação encontrada foi para o gene *SLCO1B1* entre o polimorfismo rs2306283 e a deficiência de G6PD. Indivíduos homocigotos para o alelo G do rs2306283 e deficientes da G6PD eram mais frequentes no grupo caso do que no grupo controle.

A presença do alelo T do rs2117032 se mostrou, na análise multivariada, um fator protetor para hiperbilirrubinemia, especialmente entre aqueles que não apresentavam incompatibilidade ABO.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AAP. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. *Pediatrics* 2004; 1 (114):297-316.
2. Agrawal SK, Kumar P, Rathi R, Sharma N, Das R, Prasad R, *et al.* UGT1A1 gene polymorphisms in North Indian neonates presenting with unconjugated hyperbilirubinemia. *Pediatr Res* 2009; 6 (65):675-80.
3. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood* 1994; 11 (84):3613-36.
4. Beutler E, Gelbart T e Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 14 (95):8170-4.
5. Bezerra MA. Aspectos clínicos, bioquímicos e moleculares das síndromes talassêmicas em população do estado de Pernambuco. Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
6. Bhutani VK, Gourley GR, Adler S, Kreamer B, Dalin C e Johnson LH. Noninvasive measurement of total serum bilirubin in a multiracial preterm newborn population to assess the risk of severe hyperbilirubinemia. *Pediatrics* 2000; 2 (106):E17.
7. Bhutani VK e Johnson L. Kernicterus in late preterm infants cared for as term healthy infants. *Semin Perinatol* 2006; 2 (30):89-97.
8. Bhutani VK. Editorial: Building Evidence to Manage Newborn Jaundice Worldwide. *Indian J Pediatr* 2012; 79 (2):253-5.
9. Biondi ML, Turri O, Dilillo D, Stival G e Guagnellini E. Contribution of the TATA-box genotype (Gilbert syndrome) to serum bilirubin concentrations in the Italian population. *Clin Chem* 1999; 6 Pt 1 (45):897-8.
10. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla 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; 18 (333):1171-5.
11. Bosma PJ. Inherited disorders of bilirubin metabolism. *J Hepatol* 2003; 1 (38):107-17.
12. Bozkaya OG, Kumral A, Yesilirmak DC, Ulgenalp A, Duman N, Ercal D, *et al.* Prolonged unconjugated hyperbilirubinaemia associated with the haem oxygenase-1 gene promoter polymorphism. *Acta Paediatr* 2010; 5 (99):679-83.
13. Briz O, Romero MR, Martinez-Becerra P, Macias RI, Perez MJ, Jimenez F, *et al.* OATP8/1B3-mediated cotransport of bile acids and glutathione: an export pathway for organic anions from hepatocytes? *J Biol Chem* 2006; 41 (281):30326-35.

14. Cappellini MD e Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 2008; 9606 (371):64-74.
15. Carvalho CG. Polimorfismos genéticos em neonatos hiperbilirrubinêmicos com mais de 35 semanas de idade gestacional. (Dissertação de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, UFRGS, Porto Alegre, 2009.
16. Carvalho CG, Castro SM, Santin AP, de Azevedo LA, Pereira ML e Giugliani R. Polymorphic variants of UGT1A1 in neonatal jaundice in southern Brazil. *J Trop Pediatr* 2010; 5 (56):366-7.
17. Castro S, Weber R, Dadalt V, Tavares V e Giugliani R. Prevalence of G6PD deficiency in newborns in the south of Brazil. *J Med Screen* 2006; 2 (13):85-6.
18. Castro SM, Weber R, Matte U, Reclos GJ, Pass KA, Tanyalcin T, *et al.* The use of LR values to check the best fit of cut-off values in G6PD deficient cases. *Clin Biochem* 2007; 7 (40):496-8.
19. Clarke DJ, Moghrabi N, Monaghan G, Cassidy A, Boxer M, Hume R, *et al.* Genetic defects of the UDP-glucuronosyltransferase-1 (UGT1) gene that cause familial non-haemolytic unconjugated hyperbilirubinaemias. *Clin Chim Acta* 1997; 1 (266):63-74.
20. Compri MB, Saad ST e Ramalho AS. [Genetico-epidemiological and molecular investigation of G-6-PD deficiency in a Brazilian community]. *Cad Saude Publica* 2000; 2 (16):335-42.
21. Costa E, Vieira E e Dos Santos R. The polymorphism c.-3279T>G in the phenobarbital-responsive enhancer module of the bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene is associated with Gilbert syndrome. *Clin Chem* 2005; 11 (51):2204-6.
22. Cui Y, Konig J, Leier I, Buchholz U e Keppler D. Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *J Biol Chem* 2001; 13 (276):9626-30.
23. Cui Y e Walter B. Influence of albumin binding on the substrate transport mediated by human hepatocyte transporters OATP2 and OATP8. *J Gastroenterol* 2003; 1 (38):60-8.
24. de Carvalho M, Cacho A, Neves EA e Lopes JM. [Single x double phototherapy for the treatment of hyperbilirubinemia in high risk newborn infants]. *J Pediatr (Rio J)* 1996; 3 (72):151-4.
25. Donovan EF, Lannon C, Bailit J, Rose B, Iams JD e Byczkowski T. A statewide initiative to reduce inappropriate scheduled births at 36(0/7)-38(6/7) weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 3 (202):243 e1-8.
26. Ergin H, Bican M e Atalay OE. A causal relationship between UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter polymorphism and idiopathic hyperbilirubinemia in Turkish newborns. *Turk J Pediatr* 2010; 1 (52):28-34.

27. Exner M, Minar E, Wagner O e Schillinger M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic Biol Med* 2004; 8 (37):1097-104.
28. Ferraris A, D'Amato G, Nobili V, Torres B, Marcellini M e Dallapiccola B. Combined test for UGT1A1 -3279T-->G and A(TA)<sub>n</sub>TAA polymorphisms best predicts Gilbert's syndrome in Italian pediatric patients. *Genet Test* 2006; 2 (10):121-5.
29. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, *et al.* Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998; 20 (338):1422-6.
30. Fujiwara R, Nguyen N, Chen S e Tukey RH. Developmental hyperbilirubinemia and CNS toxicity in mice humanized with the UDP glucuronosyltransferase 1 (UGT1) locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 11 (107):5024-9.
31. Fujiwara R, Chen S, Karin M e Tukey RH. Reduced Expression of UGT1A1 in Intestines of Humanized UGT1 Mice via Inactivation of NF-kappaB Leads to Hyperbilirubinemia. *Gastroenterology* 2011; 1 (142):109-118 e2.
32. Galacteros F, Guilloud-Bataille M e Feingold J. Sex, gestational age, and weight dependancy of adult hemoglobin concentration in normal newborns. *Blood* 1991; 4 (78):1121-4.
33. Geaghan SM. Diagnostic laboratory technologies for the fetus and neonate with isoimmunization. *Semin Perinatol* 2011; 3 (35):148-54.
34. Glaeser H, Bailey DG, Dresser GK, Gregor JC, Schwarz UI, McGrath JS, *et al.* Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 3 (81):362-70.
35. Gourley GR. Neonatal Jaundice and Disorders of Bilirubin Metabolism. In: F. J. Suchy, R. J. Sokol e W. F. Balistreri (Ed.). *Liver Disease in Children*. New York: Cambridge University Press, 2007. 270-309
36. Greenberg DA. The jaundice of the cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 25 (99):15837-9.
37. Hagenbuch B e Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 2004; 5 (447):653-65.
38. Huang CS, Chang PF, Huang MJ, Chen ES, Hung KL e Tsou KI. Relationship between bilirubin UDP-glucuronosyl transferase 1A1 gene and neonatal hyperbilirubinemia. *Pediatr Res* 2002; 4 (52):601-5.
39. Huang MJ, Kua KE, Teng HC, Tang KS, Weng HW e Huang CS. Risk factors for severe hyperbilirubinemia in neonates. *Pediatr Res* 2004; 5 (56):682-9.

40. Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Burchell B e Keppler D. ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem J* 1997; (327 ( Pt 1)):305-10.
41. Johnson AD, Kavousi M, Smith AV, Chen MH, Dehghan A, Aspelund T, *et al.* Genome-wide association meta-analysis for total serum bilirubin levels. *Hum Mol Genet* 2009; 14 (18):2700-10.
42. Jopling J, Henry E, Wiedmeier SE e Christensen RD. Reference ranges for hematocrit and blood hemoglobin concentration during the neonatal period: data from a multihospital health care system. *Pediatrics* 2009; 2 (123):e333-7.
43. Kalliokoski A e Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol* 2009; 3 (158):693-705.
44. Kanai M, Akaba K, Sasaki A, Sato M, Harano T, Shibahara S, *et al.* Neonatal hyperbilirubinemia in Japanese neonates: analysis of the heme oxygenase-1 gene and fetal hemoglobin composition in cord blood. *Pediatr Res* 2003; 2 (54):165-71.
45. Kang TW, Kim HJ, Ju H, Kim JH, Jeon YJ, Lee HC, *et al.* Genome-wide association of serum bilirubin levels in Korean population. *Hum Mol Genet* 2010; 18 (19):3672-8.
46. Kaplan M, Hammerman C, Renbaum P, Klein G e Levy-Lahad E. Gilbert's syndrome and hyperbilirubinaemia in ABO-incompatible neonates. *Lancet* 2000; 9230 (356):652-3.
47. Kawade N e Onishi S. The prenatal and postnatal development of UDP-glucuronyltransferase activity towards bilirubin and the effect of premature birth on this activity in the human liver. *Biochem J* 1981; 1 (196):257-60.
48. Klaassen CD e Aleksunes LM. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol Rev* 2010; 1 (62):1-96.
49. Kramer LI. Advancement of dermal icterus in the jaundiced newborn. *Am J Dis Child* 1969; 3 (118):454-8.
50. Leite MG, Granato Vde A, Facchini FP e Marba ST. Comparison of transcutaneous and plasma bilirubin measurement. *J Pediatr (Rio J)* 2007; 3 (83):283-6.
51. Lin JP, Cupples LA, Wilson PW, Heard-Costa N e O'Donnell CJ. Evidence for a gene influencing serum bilirubin on chromosome 2q telomere: a genomewide scan in the Framingham study. *Am J Hum Genet* 2003; 4 (72):1029-34.
52. Lin R, Wang X, Wang Y, Zhang F, Wang Y, Fu W, *et al.* Association of polymorphisms in four bilirubin metabolism genes with serum bilirubin in three Asian populations. *Hum Mutat* 2009; 4 (30):609-15.
53. Long J, Zhang S, Fang X, Luo Y e Liu J. Association of neonatal hyperbilirubinemia with uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 gene polymorphisms: Meta-analysis. *Pediatr Int* 2011; 4 (53):530-40.

54. Maisels MJ, Pathak A, Nelson NM, Nathan DG e Smith CA. Endogenous production of carbon monoxide in normal and erythroblastotic newborn infants. *J Clin Invest* 1971; 1 (50):1-8.
55. Maisels MJ e Kring E. Length of stay, jaundice, and hospital readmission. *Pediatrics* 1998; 6 (101):995-8.
56. Maisels MJ. Jaundice. In: G. B. Avery, M. G. Macdonald, M. M. K. Seshia e M. D. Mullet (Ed.). *Avery's neonatology: pathophysiology & management of the newborn*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 768-846
57. Maisels MJ, Bhutani VK, Bogen D, Newman TB, Stark AR e Watchko JF. Hyperbilirubinemia in the newborn infant > or =35 weeks' gestation: an update with clarifications. *Pediatrics* 2009; 4 (124):1193-8.
58. Mandelbrot L, Mazy F, Floch-Tudal C, Meier F, Azria E, Crenn-Hebert C, *et al.* Atazanavir in pregnancy: impact on neonatal hyperbilirubinemia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 157 (1):18-21.
59. Maruo Y, Nishizawa K, Sato H, Doida Y e Shimada M. Association of neonatal hyperbilirubinemia with bilirubin UDP-glucuronosyltransferase polymorphism. *Pediatrics* 1999; 6 Pt 1 (103):1224-7.
60. McDonagh AF. Controversies in bilirubin biochemistry and their clinical relevance. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010; 3 (15):141-7.
61. Meyburg J, Schmidt J e Hoffmann GF. Liver cell transplantation in children. *Clin Transplant* 2009; (23 Suppl 21):75-82.
62. Meyer Zu Schwabedissen HE e Kim RB. Hepatic OATP1B Transporters and Nuclear Receptors PXR and CAR: Interplay, Regulation of Drug Disposition Genes, and Single Nucleotide Polymorphisms. *Mol Pharm* 2009; 6 (6):1644-61.
63. Mezzacappa MA, Facchini FP, Pinto AC, Cassone AE, Souza DS, Bezerra MA, *et al.* Clinical and genetic risk factors for moderate hyperbilirubinemia in Brazilian newborn infants. *J Perinatol* 2010; 12 (30):819-26.
64. Murray NA e Roberts IA. Haemolytic disease of the newborn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2007; 2 (92):F83-8.
65. Nardoza LM, Szulman A, Barreto JA, Araujo Junior E e Moron AF. [The molecular basis of RH system and its applications in obstetrics and transfusion medicine]. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 6 (56):724-8.
66. Nelson DL e Cox MM. Lehninger- Princípios de Bioquímica. São Paulo: RR Donelley. 2002
67. Newman TB, Xiong B, Gonzales VM e Escobar GJ. Prediction and prevention of extreme neonatal hyperbilirubinemia in a mature health maintenance organization. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000; 11 (154):1140-7.

68. Niemi M. Role of OATP transporters in the disposition of drugs. *Pharmacogenomics* 2007; 7 (8):787-802.
69. Niemi M, Pasanen MK e Neuvonen PJ. Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. *Pharmacol Rev* 2011; 1 (63):157-81.
70. Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, Hall SA e Beutler E. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood Cells Mol Dis* 2009; 3 (42):267-78.
71. Notarianni LJ. Plasma protein binding of drugs in pregnancy and in neonates. *Clin Pharmacokinet* 1990; 1 (18):20-36.
72. Pasanen MK, Neuvonen PJ e Niemi M. Global analysis of genetic variation in SLCO1B1. *Pharmacogenomics* 2008; 1 (9):19-33.
73. Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, *et al.* Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum Hered* 2006; 4 (62):190-5.
74. Povaluk P, Shwetz EA e Kliemann R. Estudo comparativo entre a medida plasmática e transcutânea de bilirrubina em recém-nascidos. *Rev Paul Pediatr* 2011; 1 (29):6-12.
75. Prachukthum S, Nunnarumit P, Pienvichit P, Chuansumrit A, Songdej D, Kajanachumpol S, *et al.* Genetic polymorphisms in Thai neonates with hyperbilirubinemia. *Acta Paediatr* 2009; 7 (98):1106-10.
76. Premawardhena A, Fisher CA, Liu YT, Verma IC, de Silva S, Arambepola M, *et al.* The global distribution of length polymorphisms of the promoters of the glucuronosyltransferase 1 gene (UGT1A1): hematologic and evolutionary implications. *Blood Cells Mol Dis* 2003; 1 (31):98-101.
77. Punaro E, Mezzacappa MA e Facchini FP. Systematic follow-up of hyperbilirubinemia in neonates with a gestational age of 35 to 37 weeks. *J Pediatr (Rio J)* 2011; 4 (87):301-6.
78. 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; 6 (107):1264-71.
79. Sanna S, Busonero F, Maschio A, McArdle PF, Usala G, Dei M, *et al.* Common variants in the SLCO1B3 locus are associated with bilirubin levels and unconjugated hyperbilirubinemia. *Hum Mol Genet* 2009; 14 (18):2711-8.
80. Sarkar S e Rosenkrantz TS. Neonatal polycythemia and hyperviscosity. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008; 4 (13):248-55.

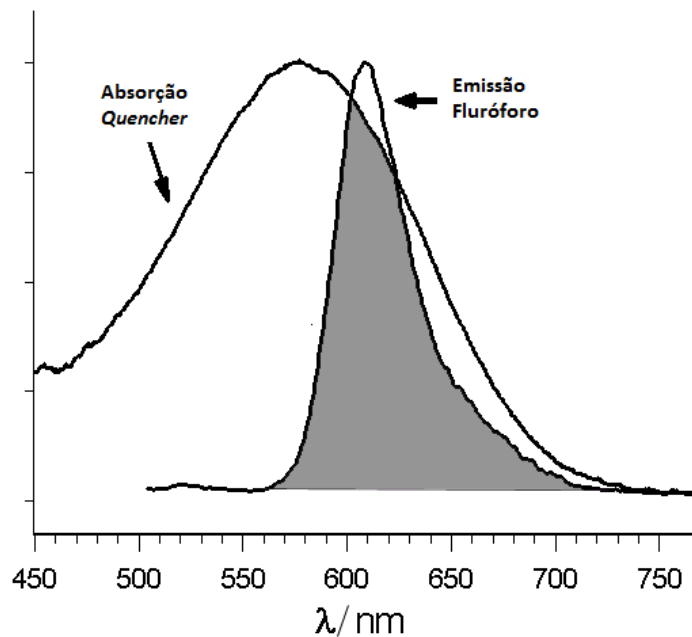
81. Seco ML, del Rio E, Barcelo MJ, Remacha A, Ginovart G, Moliner E, *et al.* [Interest in the study of genetic variants of the promoter region of the UGT1A1 gene in neonatal jaundice]. *An Esp Pediatr* 2002; 2 (56):139-43.
82. Sedlak TW e Snyder SH. Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. *Pediatrics* 2004; 6 (113):1776-82.
83. Seppen J, Bosma PJ, Goldhoorn BG, Bakker CT, Chowdhury JR, Chowdhury NR, *et al.* Discrimination between Crigler-Najjar type I and II by expression of mutant bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase. *J Clin Invest* 1994; 6 (94):2385-91.
84. Shapiro SM. Chronic bilirubin encephalopathy: diagnosis and outcome. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010; 3 (15):157-63.
85. Silva I, Luco M, Tapia JL, Perez ME, Salinas JA, Flores J, *et al.* Single vs. double phototherapy in the treatment of full-term newborns with nonhemolytic hyperbilirubinemia. *J Pediatr (Rio J)* 2009; 5 (85):455-8.
86. Smitherman H, Stark AR e Bhutani VK. Early recognition of neonatal hyperbilirubinemia and its emergent management. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006; 3 (11):214-24.
87. Sortica VD, Ojopi EB, Genro JP, Callegari-Jacques S, Ribeiro-Dos-Santos A, de Moraes MO, *et al.* Influence of Genomic Ancestry on the Distribution of SLCO1B1, SLCO1B3 and ABCB1 Gene Polymorphisms among Brazilians. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011.
88. Stephens M, Smith NJ e Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001; 4 (68):978-89.
89. Stephens M e Scheet P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am J Hum Genet* 2005; 3 (76):449-62.
90. Strassburg CP, Lankisch TO, Manns MP e Ehmer U. Family 1 uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferases (UGT1A): from Gilbert's syndrome to genetic organization and variability. *Arch Toxicol* 2008; 7 (82):415-33.
91. Strassburg CP. Gilbert-Meulengracht's syndrome and pharmacogenetics: is jaundice just the tip of the iceberg? *Drug Metab Rev* 2010; 1 (42):162-75.
92. Tioseco JA, Aly H, Milner J, Patel K e El-Mohandes AA. Does gender affect neonatal hyperbilirubinemia in low-birth-weight infants? *Pediatr Crit Care Med* 2005; 2 (6):171-4.
93. Tirona RG, Leake BF, Merino G e Kim RB. Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans. *J Biol Chem* 2001; 38 (276):35669-75.
94. Vreman HJ, Wong RJ e Stevenson DK. Phototherapy: current methods and future directions. *Semin Perinatol* 2004; 5 (28):326-33.



95. Wang P, Kim RB, Chowdhury JR e Wolkoff AW. The human organic anion transport protein SLC21A6 is not sufficient for bilirubin transport. *J Biol Chem* 2003; 23 (278):20695-9.
96. Watchko JF. Kernicterus and the molecular mechanisms of bilirubin-induced CNS injury in newborns. *Neuromolecular Med* 2006; 4 (8):513-29.
97. Watchko JF. Identification of neonates at risk for hazardous hyperbilirubinemia: emerging clinical insights. *Pediatr Clin North Am* 2009; 3 (56):671-87.
98. Watchko JF, Lin Z, Clark RH, Kelleher AS, Walker MW e Spitzer AR. Complex multifactorial nature of significant hyperbilirubinemia in neonates. *Pediatrics* 2009; 5 (124):868-77.
99. Watchko JF e Lin Z. Exploring the genetic architecture of neonatal hyperbilirubinemia. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010; 3 (15):169-75.
100. Watson RL. Hyperbilirubinemia. *Crit Care Nurs Clin North Am* 2009; 1 (21):97-120, vii.
101. WHO. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency. p.601-611. 1989
102. Wolkoff AW, Goresky CA, Sellin J, Gatmaitan Z e Arias IM. Role of ligandin in transfer of bilirubin from plasma into liver. *Am J Physiol* 1979; 6 (236):E638-48.
103. Wolkoff AW e Berk PD. Bilirubin metabolism and Jaundice. In: E. Schiff, M. F. Sorrel e W. C. Maddrey (Ed.). *Diseases of the liver*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 213-237
104. Wong FL, Boo NY, Ainoon O e Wang MK. Variants of organic anion transporter polypeptide 2 gene are not risk factors associated with severe neonatal hyperbilirubinemia. *Malays J Pathol* 2009; 2 (31):99-104.
105. Yusoff S, Takeuchi A, Ashi C, Tsukada M, Ma'amor NH, Alwi Zilfalil B, *et al.* A polymorphic mutation, c.-3279T>G, in the UGT1A1 promoter is a risk factor for neonatal jaundice in the Malay population. *Pediatr Res* 2010; 67 (4):401-6.
106. Zhang HX, Zhao X, Yang Z, Peng CY, Long R, Li GN, *et al.* [OATP 1B1 T521C/A388G is an important polymorphism gene related to neonatal hyperbilirubinemia]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2010; 9 (48):650-5.
107. Zucker SD, Goessling W e Hoppin AG. Unconjugated bilirubin exhibits spontaneous diffusion through model lipid bilayers and native hepatocyte membranes. *J Biol Chem* 1999; 16 (274):10852-62.

## APÊNDICE A - Sondas de hidrólise comerciais.

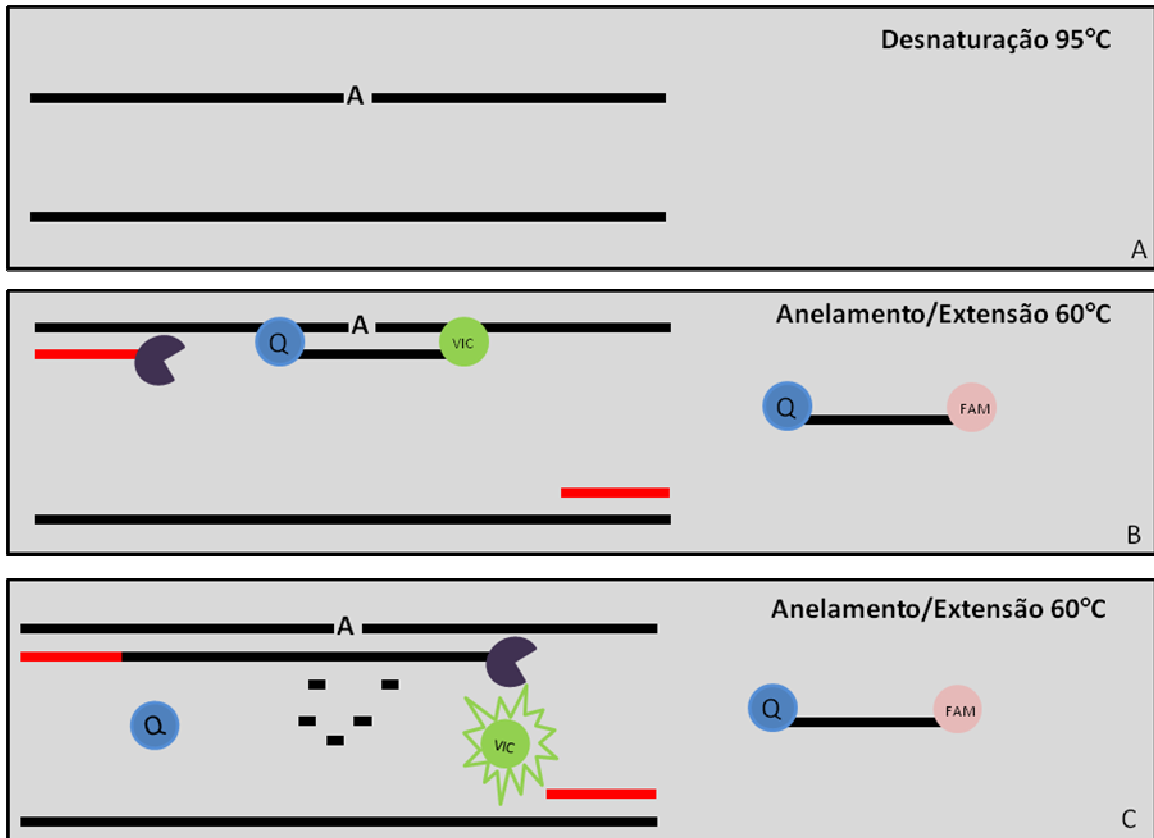
A genotipagem por sondas de hidrólise se baseia em uma reação de PCR, que além dos componentes básicos: DNA genômico, enzima TaqDNA polimerase, dNTPs, tampão, MgCl<sub>2</sub> e *primers*; utiliza um par de sondas (sequência de oligonucleotídeos de aproximadamente 18pb) complementares a cada um dos alelos a serem pesquisados diferindo apenas na base polimórfica. O princípio da detecção das diferentes sondas se baseia na fluorescência por transferência de energia ressonante (FRET). Em uma extremidade da sonda há um fluoróforo (diferente para cada sonda, VIC ou FAM) ligado a sequência de nucleotídeos, e na outra extremidade, uma molécula chamada *quencher*, que quando presente a pequenas distâncias de um fluoróforo (10-100Å) tem a propriedade de absorver a fluorescência emitida por este e liberá-la em outro comprimento de onda ( $\lambda$ ), desde que o espectro de absorção do *quencher* sobreponha o espectro de emissão do fluoróforo (Figura 7).



**Figura 7.** Gráfico ilustrando o fenômeno de FRET (fluorescência por transferência de energia ressonante).

Primeiramente ocorre a desnaturação do DNA com elevação da temperatura a 95°C (Figura 8A). Quando a temperatura baixa para 60°C, as sondas anelam juntamente com os *primers* no DNA alvo (Figura 8B), o processo é precedido, quase que simultaneamente, por uma etapa de extensão, onde a enzima TaqDNA polimerase produz uma fita complementar a fita molde. Como a enzima utilizada no ensaio possui atividade 5'→3' exonucleásica, ela degrada a sonda que está anelada no DNA alvo (Figura 8C). Quando a sonda sofre hidrólise, o fluoróforo e o *quencher* se afastam, fazendo com que a fluorescência emitida pelo fluoróforo passe a ser detectada por um detector de fluorescência. Desse modo, de acordo com o genótipo da amostra analisada, três perfis são possíveis: detecção apenas da fluorescência VIC (homozigoto para um dos alelos), apenas fluorescência FAM (homozigoto para o outro alelo) e detecção de ambas as fluorescências (heterozigoto). O marcador fluorescente de referência

passiva tem a função de normalizar a fluorescência emitida pelos fluoróforos das sondas, que pode flutuar ao longo da reação por variações de volume e concentração de cada amostra.



**Figura 8.** Ensaio por sondas de hidrólise TaqMan (ABI, EUA).

## APÊNDICE B - Resultados com todos pacientes encaminhados para fototerapia.

**Tabela 21.** Dados clínicos e demográficos dos controles e dos pacientes (variáveis categóricas).

	Controles	Casos (243)	P
<b>Sexo (n=490)</b>			
Masculino	122 (49,4%)	141 (58%)	0,055
Feminino	125 (50,6%)	102 (42%)	
<b>Cor da pele (n=490)</b>			
Branco	191 (77,3%)	185 (76,1%)	NS
Negro	56 (22,7%)	56 (23,9%)	
<b>Tamanho para Idade Gestacional (n=490)</b>			
Adequado	192 (77,7%)	187 (77%)	NS
Pequeno	40 (16,2%)	44 (18,1%)	
Grande	15 (6,1%)	12 (4,9%)	
<b>Parto (n=490)</b>			
Vaginal	160 (64,8%)	164 (67,5%)	NS
Cesárea	87 (35,2%)	79 (32,5%)	
<b>Incompatibilidade ABO (n=490)</b>			
Sim	47 (19%)	73 (30%)	0,005
<b>Incompatibilidade Rh (n=490)</b>			
Sim	26 (10,5%)	23 (9,5%)	NS
<b>Deficiência da G6PD (n=480)</b>			
Sim	9 (3,7%)	14 (5,9%)	NS
<b>Necessidade de Reanimação (n=490)</b>			
Sim	28 (11,3%)	18 (7,4%)	NS

NS: estatisticamente não significativo.

**Tabela 22.** Dados clínicos e demográficos dos controles e dos pacientes (variáveis contínuas).

	Controles	Casos	<i>P</i>
<b>Idade Gestacional (n=490)</b>			
(média ±dp, semanas)	39,5±1,4	38,4± 1,7	<0,001
<b>Peso ao nascer (n=490)</b>			
(média ±dp, g)	3218±460	3073± 530	0,001
<b>Idade Materna (n=487)</b>			
(média ±dp, anos)	26,12±6,8	25,4± 6,6	NS
<b>Apgar 5' (n=489)</b>			
(média ±dp, score)	9±1	9 ± 1	NS
<b>Atividade da G6PD (n=429)</b>			
(média ±dp, U/gHb)	17,2±5,7	17,2 ± 5,9	NS

Sexo masculino e incompatibilidade ABO foram mais frequentes entre hiperbilirrubinêmicos. A média de bilirrubina entre meninos e meninas internados para fototerapia foi de 17,0±3,5mg/dL versus 15,8±3,0mg/dL ( $P=0,005$ ). Com relação aos níveis de hemoglobina na internação, as médias entre meninos e meninas foram 15,6±2,1g/dL versus 16,1±1,7g/dL ( $P=0,042$ ).

A maioria dos recém-nascidos encaminhados para fototerapia foram internados do segundo ao terceiro dia de vida (40,7%), sendo que até o quarto dia de vida 86,3% fizeram hiperbilirrubinemia grave (Tabela 23). Apenas 4,1% fizeram hiperbilirrubinemia grave após a primeira semana de vida.

**Tabela 23.** Valores médios de bilirrubina sérica total dos 167 casos.

	BST mg/dL (média $\pm$ dp)	Percentual	Percentual cumulativo
<24h	14,6 $\pm$ 6,0	4,9%	4,9%
>24 e <48h	14,9 $\pm$ 2,1	19,3%	24,2%
>48h e <72h	15,9 $\pm$ 2,0	40,7%	64,9%
>72h e >96	17,1 $\pm$ 2,6	21,4%	86,3%
>96h	20,3 $\pm$ 4,6	13,5%	100%

Dos 243 recém-nascidos internados para fototerapia, 26 tinham mais de 20 mg/dL de BST (10,7%), 5 pacientes com mais de 25 mg/dL (2,1%) e 3 com mais de 30 mg/dL (1,2%).

O tempo de fototerapia mediano, em dias, foi de 2, com tempo de internação mediano, em dias, de 3. Fototerapia simples foi utilizada em 135 (55,6%) neonatos, fototerapia dupla em 81 (33,3%) e fototerapia tripla em 27 (11,1%).

Entre os 67 pacientes ictericos com incompatibilidade ABO, 37 apresentavam teste de *Coombs* positivo e 30, teste negativo. Dos controles, 11 com o teste de *Coombs* positivo e 36 com o teste negativo. Dentre os indivíduos com *Coombs* negativo, não houve associação entre o polimorfismo do gene *UGT1A1*.

Em nossa amostra, a sensibilidade para o desfecho hiperbilirrubinemia a partir do teste de *Coombs* positivo, em indivíduos com incompatibilidade ABO, foi 51% e a especificidade foi 77%, já o valor preditivo positivo foi 77% e o negativo 50%. Dos 7 pacientes internados para fototerapia com incompatibilidade ABO nas primeiras 24h de vida, apenas um apresentou teste de *Coombs* negativo.

## 6.1. Deficiência de G6PD

Um total de 23 pacientes com deficiência de G6PD foi encontrado, mostrando uma prevalência nesta população de 4,8%. Entre os ictericos, 14 (5,9%) tinham a deficiência, e nos controles a prevalência foi de 9 (3,7%) pacientes, não havendo diferença estatística. A atividade média de G6PD foi 17,2 U/gHb, em ambos os grupos.

A deficiência de G6PD foi determinada em 17 (6,6%) de todos os meninos e 6 (2,7%) meninas ( $P=0,054$ ). Do total de meninos ictericos da amostra ( $n=138$ ), 11 (8,0%) tinham deficiência de G6PD e do total de meninas ictericas ( $n=99$ ), 3 (3,0%).

Dos recém-nascidos com deficiência, um no grupo controle teve incompatibilidade ABO e outro no mesmo grupo, incompatibilidade Rh. Nos 23 neonatos com deficiência de G6PD 16/21 eram brancos e 7/21 eram negros. Nos 167 bebês ictericos analisados encontrou-se 8 brancos com deficiência de G6PD e 6 negros.

Dos 23 casos de deficiência de G6PD da amostra, 4 foram diagnosticados pela PCR e não tiveram medida da atividade (Tabela 24). Não foi encontrado nenhum neonato com mutação Mediterrânea e em 7 pacientes não foi encontrada nenhuma das duas mutações em estudo.



**Tabela 24.** Caracterização molecular dos 21 indivíduos com deficiência de G6PD.

		Casos (n)	Controles (n)
Atividade Média de G6PD (U/gHb)		5,45 (n=12)	5,54 (n=7)
Mutação 202/376	Homozigotos	7	6
	Heterozigotos	2	1
Sem mutação detectável		5	2

## 6.2. Polimorfismo UGT1A1

Os 4 alelos descritos na literatura foram identificados na amostra, tanto no grupo caso quanto controle e encontravam-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A frequência alélica do polimorfismo do gene *UGT1A1* diferiu entre os grupos (Tabela 25), sendo o alelo TA<sub>5</sub> mais frequente no grupo controle ( $P=0,06$ ).

**Tabela 25.** Frequência alélica do polimorfismo rs8175347 da *UGT1A1*.

Polimorfismo		Controles	Casos	<i>P</i>
<b><i>UGT1A1</i> (n=461)</b>				
rs8175347	TA <sub>5</sub>	0.02	0.01	0,06
	TA <sub>6</sub>	0.60	0.67	
	TA <sub>7</sub>	0.36	0.32	
	TA <sub>8</sub>	0.01	0.002	

\* Diferença no Teste Exato de Fisher devido ao alelo TA<sub>5</sub>.

A frequência genotípica não diferiu em ambos os grupos, bem como a associação dos genótipos associados a níveis maiores de bilirrubina (TA<sub>6</sub>/TA<sub>8</sub>, TA<sub>7</sub>/TA<sub>7</sub> e TA<sub>7</sub>/TA<sub>8</sub>) (Tabela 26). Os genótipos TA<sub>5</sub>/TA<sub>6</sub> e TA<sub>5</sub>/TA<sub>7</sub> foram encontrados em 11 controles e 3 casos.

**Tabela 26.** Frequência genotípica do polimorfismo rs8175347 da *UGT1A1*

	Controles n (%)	Casos n (%)	<i>P</i>
TA <sub>5</sub> /TA <sub>6</sub>	6 (2,6%)	2 (0,9%)	NS*
TA <sub>5</sub> /TA <sub>7</sub>	5 (2,1%)	1 (0,4%)	
TA <sub>6</sub> /TA <sub>6</sub>	85 (36,3%)	103 (45,4%)	
TA <sub>6</sub> /TA <sub>7</sub>	103 (44,0%)	93 (41,0%)	
TA <sub>6</sub> /TA <sub>8</sub>	3 (1,3%)	1 (0,4%)	
TA <sub>7</sub> /TA <sub>7</sub>	30 (12,8%)	22 (10,6%)	
TA <sub>7</sub> /TA <sub>8</sub>	2 (0,9%)	3 (1,3%)	

\* NS: sem significância

Quando analisados frente a cor da pele, encontramos que o alelo TA7 e seus genótipos são mais frequentes entre os negros (Tabela 27 e 28).

**Tabela 27.** Frequência alélica do polimorfismo rs8175347 da de acordo com a cor da pele.

	Brancos	Negros	<i>P</i>
TA <sub>5</sub>	0,01	0,02	0,0003
TA <sub>6</sub>	0,67	0,52	
TA <sub>7</sub>	0,31	0,43	
TA <sub>8</sub>	0,01	0,02	

**Tabela 28.** Frequência dos genótipos do polimorfismo rs8175347 da de acordo com a cor da pele.

	Brancos n (%)	Negros n (%)	<i>P</i>
TA <sub>5</sub> /TA <sub>6</sub>	7 (2,0%)	1 (0,9%)	0,0013*
TA <sub>5</sub> /TA <sub>7</sub>	2 (0,6%)	4 (3,8%)	
TA <sub>6</sub> /TA <sub>6</sub>	158 (44,5%)	30 (28,3%)	
TA <sub>6</sub> /TA <sub>7</sub>	148 (41,7%)	48 (45,3%)	
TA <sub>6</sub> /TA <sub>8</sub>	2 (0,6%)	2 (1,9%)	
TA <sub>7</sub> /TA <sub>7</sub>	36 (10,1%)	18 (17,0%)	
TA <sub>7</sub> /TA <sub>8</sub>	2 (0,6%)	3 (2,8%)	

\*Diferença entre TA<sub>6</sub>/TA<sub>6</sub> e TA<sub>7</sub>/TA<sub>7</sub>

Quando as frequências dos genótipos são comparadas entre casos e controles estratificados pela cor da pele, também não se encontra diferença estatística. A média de bilirrubinas entre os casos de cor da pele negra e branca também não diferem (16,6±3,5mg/dL *versus* 16,5±3,4mg/dL, NS).

### 6.3. Polimorfismos SLCO1B1 e SLCO1B3

As frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos rs4149056, rs2306283, rs2117032 e rs17680137 não diferiram entre os grupos e encontravam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabelas 29 e 30).

**Tabela 29.** Frequências alélica e genotípica dos polimorfismos do gene *SLCO1B1*.

<i>SLCO1B1</i> (n=469)		Controles	Casos	<i>P</i>
rs4149056	Alelo C	0,13	0,12	<i>NS</i> *
	TT	179 (75,5%)	176 (75,9%)	<i>NS</i>
	TC	55 (23,2%)	55 (23,7%)	
	CC	3 (1,3%)	1 (0,43%)	
rs2306283	Alelo G	0,50	0,48	<i>NS</i>
	AA	56 (23,6%)	59 (25,4%)	<i>NS</i>
	AG	123 (52,0%)	121 (52,1%)	
	GG	58 (24,5%)	52 (22,4%)	

\* *NS*: sem significância

**Tabela 30.** Frequências alélica e genotípica dos polimorfismos do gene *SLCO1B3*.

<i>SLCO1B3</i> (n=469)		Controles	Casos	<i>P</i>
rs2117032	Alelo T	0,50	0,49	<i>NS*</i>
	CC	58 (24,5%)	63 (27,2%)	<i>NS</i>
	CT	121 (51,1%)	110 (47,4%)	
	TT	58 (24,5%)	59 (25,4%)	
rs17680137	Alelo G	0,11	0,12	<i>NS</i>
	CC	187 (78,9%)	179 (77,2%)	<i>NS</i>
	CG	49 (20,7%)	49 (21,1%)	
	GG	1 (0,4%)	4 (1,7%)	

\* *NS*: sem significância

O alelo G do rs2306283 era mais frequente entre negros do que brancos (0,62 *versus* 0,46;  $P < 0,001$ ), enquanto o alelo T do rs2117032 (0,33 *versus* 0,53;  $P < 0,001$ ) foi menos frequente em negros (Tabela 31).

**Tabela 31.** Frequência alélica dos polimorfismos rs2306283 e rs2117032 de acordo com a cor da pele.

		Brancos	Negros	<i>P</i>
rs2306283	Alelo G	0,46	0,62	$< 0,001$
rs2117032	Alelo T	0,33	0,53	$< 0,001$

Analisando a co-herança entre os diversos fatores estudados, foi observado que indivíduos homozigotos para o alelo G do rs2306283 e deficientes da G6PD eram mais frequentes no grupo caso do que no grupo controle (11,5 *versus* 1,7%;  $P = 0,051$ ). A homozigose para pelo menos um dos cinco polimorfismos foi encontrada em 53% dos

hiperbilirrubinêmicos e 55% dos controles. Apenas quatro neonatos ictericos não apresentavam nenhum dos alelos variantes.

Referente a reconstrução dos haplótipos dos polimorfismos dos genes *SLCO1B1* e *SLCO1B3*, foram encontrados sete haplótipos com frequência superior a 1%. As frequências haplotípicas não diferiram entre os grupos (Tabela 32).

**Tabela 32.** Frequências haplotípicas dos polimorfismos rs4149056, rs2306283, rs2117032 e rs17680137 dos genes *SLCO1B1* e *SLCO1B3*.

	Controles	Casos	<i>P</i>
TGCC	148 (31,2%)	138 (29,7%)	NS*
TGCG	6 (1,3%)	12 (2,6%)	
TGTC	34 (7,2%)	32 (6,9%)	
TACC	44 (9,3%)	51 (11,0%)	
TATC	181 (38,2%)	172 (36,9%)	
CGCC	45 (9,5%)	42 (9,1%)	
CATC	12 (2,5%)	11 (2,4%)	
Outros †	4 (0,8%)	6 (1,3%)	

\* NS: sem significância

†Outros: haplótipos que tiveram frequência menor que 1%.

Para controlar o efeito das variáveis sexo, cor da pele, incompatibilidade ABO, idade gestacional e peso ao nascer sobre a influência dos polimorfismos, foi feita regressão logística (Tabela 33). Apenas a incompatibilidade ABO e o peso ao nascimento permaneceram no modelo.

**Tabela 33.** Variáveis que permaneceram no modelo de regressão logística para o desfecho hiperbilirrubinemia neonatal grave.

<b>Fator em estudo</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>P</b>
Incompatibilidade ABO	2,19 (1,37 -3,50)	0,001
Idade Gestacional (por semana)	0.59 (0,51 – 0.70)	<0,001

## APÊNDICE C – Artigo original

### Ped Res - Manuscript Submission Confirmation

Entrada



☆ de [info@pedres.org](mailto:info@pedres.org) ocultar detalhes 19/09/11 Responder

para [umatte@hcpa.ufrgs.br](mailto:umatte@hcpa.ufrgs.br)

cc [azvd.laura@gmail.com](mailto:azvd.laura@gmail.com),  
[unknown146@nature.com](mailto:unknown146@nature.com)

data 19 de setembro de 2011 16:39

assunto Ped Res - Manuscript Submission Confirmation

Importante principalmente por causa das pessoas na conversa.

Dear Dr. Matte,

Your submission entitled UGT1A1, SLCO1B1, and SLCO1B3 polymorphisms versus neonatal hyperbilirubinemia: is there an association? has been received by the Pediatric Research Editorial Office.

Your manuscript will be assigned to an Editor once we have received your Author Agreement/Copyright Transfer Form.

Please have all authors sign and complete this form. Original signatures, not photocopies, are required. Please send the completed form to:

Susan Tsujimoto, Managing Editor  
Pediatric Research, Editorial Office  
3400 Research Forest Drive, Suite B7  
The Woodlands, TX 77381 U.S.A.

Upon receipt of your completed Author Agreement/Copyright Transfer Form, your manuscript will be given a reference number and assigned to an Editor.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to:  
<http://mts-pr.nature.com/cgi-bin/main.plex>

Thank you for submitting your work to Pediatric Research.

Kind regards,  
Susan Tsujimoto  
Managing Editor  
Pediatric Research



*UGT1A1, SLCO1B1, and SLCO1B3 polymorphisms versus neonatal hyperbilirubinemia: is there an association?*

Laura A. Azevedo 1, 2, 5; Themis R.Silveira 2, 3, 5; Clarissa G. Carvalho 2; Simone M. Castro 1, Roberto Giugliani 2, 4, 6; Ursula Matte\* 2, 4, 6.

1 Pharmacy School and Postgraduate Programs in 2 Child and Adolescent Health, 3 Gastroenterology Sciences, 4 Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 5 Experimental Hepatology Laboratory and 6 Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

\*Ursula Matte, Ph.D.

Gene Therapy Center, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, Brazil, 90035-903.

Phone: +55 51 3359 8841, FAX: +55 51 3359 8761

E-mail: [umatte@hcpa.ufrgs.br](mailto:umatte@hcpa.ufrgs.br)

The authors would like to thank CAPES, CNPq and FIPE-HCPA for their financial support.

Clinical study.

## **Abstract**

Jaundice is a physiological phenomenon; however, severe hyperbilirubinemia occurs in only 5% to 6% of the healthy newborn population. It has been suggested that genetic variation could enhance the risk of hyperbilirubinemia when co-expressed with other icterogenic conditions. The present study included newborns with a gestational age of greater than 35 weeks and weights greater than 2000 g with indications for phototherapy. The polymorphisms from UGT1A1 (rs8175347), SLCO1B1 (rs4149056 and rs2306283), and SLCO1B3 (rs17680137 and rs2117032) were analyzed by capillary electrophoresis and hydrolysis probes. A total of 167 hyperbilirubinemic infants and 247 control subjects were enrolled. The gender, ABO incompatibility, birth weight, and gestational age differed between the groups but the allelic and genotypic frequency of the polymorphisms from SLCO1B genes did not. In logistic regression, the ABO incompatibility, gestational age, and polymorphic T allele of rs2117032 remained in the model. The presence of this polymorphism seemed to provide protection from hyperbilirubinemia. The individuals that were homozygous for the G allele of rs2306283 and glucose 6-phosphate-dehydrogenase deficient were more frequent among the cases. Although genetic variation accounts for a good part of this condition, the association between different polymorphisms and environmental factors has yet to be explained.

## **Keywords**

Neonatal Hyperbilirubinemia; Polymorphisms; *UGT1A1*; *SLCO1B1*; *SLCO1B3*.

## Introduction

Jaundice is a physiological phenomenon that occurs in 60% of normal newborns and nearly all pre-term infants. However, severe hyperbilirubinemia (total serum bilirubin (TSB) levels above the 95th percentile for age in hours) occurs in only 5% to 6% of the healthy newborn population <sup>1</sup>. Some of the risk factors for hyperbilirubinemia include the following: hemolytic conditions, poor caloric intake, cephalohematoma or significant bruising, exclusive breastfeeding, weight loss, East Asian race, and male gender <sup>2</sup>. Newborns must be monitored to identify those who might develop severe hyperbilirubinemia due to toxicity of bilirubin, and, in some cases, acute bilirubin encephalopathy, which might evolve to *kernicterus*.

It has been suggested that genetic variation could enhance the risk of hyperbilirubinemia when co-expressed with other icterogenic conditions <sup>3</sup>. The rs8175347 polymorphism from the promoter region of uridine-diphosphoglucuronosyl transferase 1A1 (*UGT1A1*) gene is described as a major cause of Gilbert's Syndrome <sup>4</sup>, which is characterized by an increase of TSB as a result of poor enzymatic conjugation by glucuronosyltransferase (EC 2.4.1.17). TA sequences in the promoter region vary in length from 5 to 8 repeats, and the TA<sub>7</sub> and TA<sub>8</sub> alleles are primarily responsible for the TSB increase and could contribute to neonatal hyperbilirubinemia <sup>5</sup>. The variant TA<sub>5</sub> is associated with an increase in *UGT1A1* transcription; while TA<sub>8</sub> is associated with reduced transcription <sup>6</sup>. Both of these alleles are rare and usually found in people of African descent <sup>6</sup>. The hepatic solute carrier organic anion transporter 1B1 (*SLCO1B1*), a putative bilirubin transporter, could also be associated with an increased predisposition to neonatal hyperbilirubinemia by limiting bilirubin uptake <sup>7</sup>. The rs2306283 (A388G) and rs4149056 (T521C) polymorphisms are associated with a diminished transporter activity <sup>8</sup> but their role in neonatal jaundice is controversial <sup>8, 9</sup>. Recently, in a genome-wide association study, two polymorphisms of another solute carrier organic anion transporter *SLCO1B3* gene (rs17680137 C>G and rs2117032 C>T) were observed to have a

strong association with bilirubin levels and to contribute to idiopathic mild unconjugated hyperbilirubinemia in healthy adults <sup>10</sup>.

The aim of this work was to evaluate the influence of the polymorphisms of *UGT1A1*, *SLCO1B1*, and *SLCO1B3* genes as a contributive cause for severe neonatal hyperbilirubinemia.

## **Methods**

### *Subject enrollment*

This case-controlled study involved newborns of greater than 35 weeks gestational age and 2000 g in weight admitted between March and December 2007 to the Neonatal Unit of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. The jaundiced babies were assessed using a transcutaneous bilirubinometer (Minolta®). The serum dosage was measured when bilirubin levels were increased, as determined by the diazotization method. The case subjects were infants with TSB levels that had indications for phototherapy in accordance with the guidelines of the American Association of Pediatrics (AAP) <sup>2</sup>, while the control subjects did not show signs for phototherapy, according to visual or laboratory evaluation. The exclusion criteria were based on the following observations: sepsis or infection, cephalohematoma, high levels of conjugated bilirubin, polycythemia, and large ecchymosis. In addition, infants that were administered drugs that could cause the inhibition of glucuronidation were also excluded. The newborns were subjectively classified as black or white based on their parent's skin color and facial features. All subjects were evaluated until discharge and subsequently evaluated by a trough chart to check the emergence of new outcomes. The Research Ethics Committee at the hospital approved this project, and parental consent was obtained for all infants that participated in this study.

### ***Glucose 6-phosphate-dehydrogenase (G6PD) enzyme quantification***

The G6PD Deficiency Neonatal Screening Test Kit (Interscientific Corporation, USA) was used for the quantitative measurement of G6PD activity in peripheral blood. The samples were normalized to their hemoglobin (Hb) content and then compared with the reference samples (supplied by Interscientific). A cut-off value of 8 U/g Hb was used to determine the enzyme deficiency <sup>11</sup>.

### *Molecular analysis*

The genomic DNA was extracted from 2 ml of cord blood as described <sup>12</sup>. The specific mutations on *G6PD*, *UGT1A1*, *SLCO1B1*, and *SLCO1B3* were analyzed as described below.

The coding region of the *G6PD* gene, encompassing the African (G202A and A376G) and Mediterranean mutations (C563T), was analyzed by polymerase chain reaction (PCR) of exons 6, 4, and 5 and posterior restriction fragment length polymorphism (RFLP) for each mutation<sup>13,14</sup>.

The rs8175347 polymorphism was identified by PCR using a FAM-labeled sense primer and analyzed by capillary electrophoresis through GeneMapper program (ABI, USA)<sup>15</sup>.

The polymorphisms rs4149056 and rs2306283 from the *SLCO1B1* gene and rs17680137 and rs2117032 from *SLCO1B3* were identified using hydrolysis probes (TaqMan Assays, ABI, USA), IDs: C\_30633906\_10, C\_1901697\_20, C\_25766725\_10, and C\_2809241\_10, respectively. A total of 15 ng of DNA was used in a final reaction volume of 12.5  $\mu$ l for real-time PCR on a Stratagene Thermocycler (GE, USA) and analyzed through Mx3000P software.

#### *Statistical analysis*

For the categorical data, the Chi-square and Fisher's Exact tests were performed where appropriate, and the residuals were adjusted when necessary. The odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were estimated for severe hyperbilirubinemia risk factors using multivariate logistic regression models. The numeric variables were analyzed using the Student's T test. The haplotypes for the four polymorphisms of the *SLCO1B1* and *SLCO1B3* genes were statistically reconstructed using the PHASE program, version 2.1, which implements a Bayesian statistical method for reconstructing haplotypes from genotype data<sup>16,17</sup>. The data were considered as significant when *P* was less than 0.05.

## Results

A total of 414 neonates were enrolled in the study, comprising 167 hyperbilirubinemic infants and 247 control subjects. Of the 414 samples, 386 completed the study. The DNA extraction was not performed on twenty of the samples because of inadequate material (ten samples in both groups) and eight samples failed to amplify for the *UGT1A1* polymorphism. The bilirubin measurements for the case individuals and their distribution according to the AAP Guidelines for the Management of Hyperbilirubinemia in newborn infants greater than 35 weeks gestational age<sup>2</sup> are showed in Figure 1.

The demographic and clinical data for the infants enrolled in the study are shown in Table 1. The male gender and ABO incompatibility were more common among the hyperbilirubinemic patients. The mean birth weight was  $3217 \pm 460$  g in the control group and  $3099 \pm 504$  g in the case group ( $P=0.014$ ). The gestational age also differed between the groups with  $39.5 \pm 1.3$  weeks versus  $38.1 \pm 1.7$  weeks ( $P<0.001$ ) for the control and case groups, respectively. An analysis of the frequency of premature newborns in each group revealed that 74 (44.3%) of jaundiced babies were <38 weeks as compared with the 29 (11.7%) control group babies ( $P<0.001$ ). For the babies in the case group, the median phototherapy time was 2 days, with a median ICU stay of 3 days.

A G6PD deficiency was detected in 21 individuals. Among these, none had the Mediterranean mutation, 13 were hemi or homozygous for the African mutation (7 on case group), one was heterozygous for the African mutation and 7 individuals had no mutation (2 in the control group). The mean enzyme activity of the deficient was  $5.5 \pm 2.0$  U/gHb as compared with that of  $17.8 \pm 5.4$  U/gHb ( $P<0.001$ ) for the non-deficient subjects.

The allelic frequency of the *UGT1A1* polymorphism differed between both groups (Table 2). The TA<sub>5</sub> allele was more frequent in the control group ( $P=0.04$ ), but the genotypic frequency for *UGT1A1* did not differ between the groups. The genotypes TA<sub>5</sub>/TA<sub>6</sub> and TA<sub>5</sub>/TA<sub>7</sub> were observed in 11 of the control subjects and only one case study individual. The genotypes

associated with minor conjugation activity were more frequent in black individuals than in white ones (22.3% versus 10.3%,  $P=0.003$ ).

The allelic and genotypic frequencies of the studied polymorphisms from the *SLCO* genes did not differ among the groups. The homozygosity for at least one of the studied polymorphisms occurred in 53% of the case subjects and 55% of the control subjects. Only 2 case subjects were homozygous for all wild-type polymorphisms. The G allele of rs2306283 was more frequent in black individuals than in white ones (0.63 versus 0.47,  $P<0.001$ ); however, the T allele of rs2117032 (0.37 versus 0.52,  $P<0.001$ ) was less frequent in blacks. An analysis of the co-inheritance between several of the factors studied revealed that individuals homozygous for the G allele of rs2306283, which were also G6PD deficient, were more frequent in the case subjects than in the control group (14.3 versus 1.7%,  $P=0.039$ ). The haplotype frequencies did not differ between the groups.

A logistic regression was performed to assess the controlling differences in gender, ABO incompatibility, gestational age, and birth weight. Only differences in the ABO incompatibility and gestational age remained in the model. Moreover, the T allele of rs2117032 seemed to confer protection against hyperbilirubinemia among those who did not presented ABO incompatibility (Table 3).



## Discussion

We studied 414 newborns with and without indication of phototherapy born in South Brazil. Among the well-known risk factors, the only statistically differences between the control and case groups were the ABO incompatibility, male gender, gestational age, and birth weight. In the multivariate analysis, only the ABO incompatibility and gestational age remained in the model, showing the large impact of these two variables in hyperbilirubinemia. Although the mean gestational age of the control and case groups of term neonates was 38.1 and 39.5 weeks, respectively, the control group showed a remarkably higher frequency of premature newborns; this result is consistent with the data published by Mezzacappa et al.<sup>18</sup>. In addition, the neonates born before 39 weeks require neonatal intensive care and have increased rates of neonatal and infant morbidity and mortality<sup>19</sup>.

Our study did not show differences in the G6PD deficiency between the groups, although Prachukthum et al.<sup>20</sup> and Wong et al.<sup>21</sup> reported that the G6PD deficiency was higher among the patient infants than in the control group. The mutations studied for *G6PD* are the most frequent in our state<sup>22</sup>, and the overall prevalence of the deficiency in our sample (5.2%) is consistent with the 7.8% previously described in our population<sup>23-26</sup>.

Recently, great attention has been given to genetic factors as a contributing cause of neonatal hyperbilirubinemia, and several studies attempted to determine the mechanisms involved in such manifestations<sup>3, 27, 28</sup>. Several studies have failed to demonstrate the relationship between jaundice and the rs8175347 polymorphism of *UGT1A1*<sup>3, 18, 27</sup>. Our study presented a higher frequency of the TA<sub>5</sub> allele among the control subjects, and this allele is associated with an increase in *UGT1A1* expression<sup>29</sup>. The statistical difference diminishes when the genotypic frequencies are compared; however, genotypes carrying the TA<sub>5</sub> allele were more frequent among the control subjects. The frequencies for *UGT1A1* polymorphism observed in our study<sup>15</sup> are consistent with those described in Brazil by Mezzacappa et al.<sup>18</sup>. We did not find any differences in the distribution of the polymorphisms from *SLCO1B1*. In a Brazilian study of lopinavir and ritonavir in HIV-infected men, similar frequencies of

rs2306283 and rs4149056 polymorphisms were observed<sup>30</sup>. In 2004, Huang et al. reported that the variant allele of rs2306283 was more frequent among hyperbilirubinemic infants (OR=2.01)<sup>27</sup>, although these results were not confirmed<sup>3, 20, 21</sup>. Zhang et al., however, showed that infants with the A allele of rs2306283 had higher bilirubin levels when compared with homozygous GG<sup>28</sup> infants. Zhang et al. also showed that the homozygosity for the wild-type allele of rs4149056 was more frequent among hyperbilirubinemic newborns than the controls; however, this polymorphism is frequently reported as a diminishing transport activity of OATP1B1<sup>8, 31</sup>. Similar to the polymorphisms on *SLCO1B1*, those on *SLCO1B3* did not present statistical differences in the univariate analysis, while we found by using multivariate analysis that the T allele of rs2117032 could be a protective factor for hyperbilirubinemia. Its frequency is different only when comparing those who do not have ABO incompatibility, showing that ABO incompatibility could outweigh the modest effect of this polymorphism. Recently, Sanna et al. described that the C allele of rs17680137 and the T allele of rs2117032 in a genome-wide association analysis were responsible, along with *UGT1A1* and *G6PD*, for the strong association with bilirubin levels in healthy individuals from Sardinia<sup>10</sup>. Kang et al. did not observe any association of these same polymorphisms with bilirubin levels<sup>32</sup> in a Korean sample. For instance, although Cui et al. inferred that *SLCO1B1* could be the hepatic transporter for bilirubin<sup>7</sup>, Wang et al. concluded the unlikelihood of this function<sup>33</sup>, and Zucker et al. suggested that bilirubin uptake could occur through passive diffusion<sup>34</sup>.

Watchko et al. reported that G6PD deficient infants who were homozygous for the G allele of rs2306283 were more common in the icteric group when compared with the controls (87.5% versus 20%,  $P=0.015$ ), respectively<sup>3</sup>. The frequencies reported in our work were 11.1% in the control group and 50.0% in the case group. This difference was not statistically significant, perhaps due to the small numbers in each group (9 and 12, respectively). However, when the opposite was examined (homozygous for G allele of rs2306283 who were also G6PD deficient (14.3% versus 1.7%)), a difference was observed ( $P=0.039$ ).

Interestingly, our study presented similar frequencies for the G6PD deficiency in both groups, and the frequencies of the individuals carrying the variant allele of rs2306283 were higher than the ones described by Wathcko et al. Because the G allele is more frequent among blacks and our sample had higher prevalence of black newborns, the difference between the case and control groups could be missed. However, although the frequencies observed for the polymorphisms were similar to those described in the literature for blacks and whites, visual estimation is not an accurate method of defining ethnicity, and an ancestral molecular analysis would work better because we received a great African genome ancestry<sup>35</sup>. Recently, Sortica et al. described similar frequencies of the G allele of rs2306283 in white (48.9%) and black (64.8%) individuals from South Brazil, which were ethnically classified by self-indentification<sup>36</sup>.

Our study is limited by the use of the need for phototherapy as criteria, which is not a strong discriminator to identify differences of genetic variability. This was the first report of the C allele of rs21170132 polymorphism in neonatal hyperbilirubinemia and the possibility of its protection against severe jaundice should be further studied. Frequently, the studied polymorphisms present controversial effects in studies and our results demonstrate that they do not have the power to modulate neonatal jaundice. Neonatal jaundice is an excellent example of an intricate manifestation, where usual studied clinical factors alone cannot provide the real cause. Genetic variation is primarily responsible for this condition; however, the mechanisms involved in the association of different polymorphisms and environmental factors have yet to be explained. In addition to the *UGT1A1* and *SLCO* family, other genes involved in the bilirubin pathway (heme oxygenase and biliverdin reductase) should be explored, as well as other environmental factors, such as newborns of HIV positive mothers using protease inhibitors<sup>37</sup>. Both *UGT1A1* and *SLCO* polymorphisms are well studied in pharmacokinetics of drugs<sup>29, 31</sup>, but their role in neonatal jaundice is still controversial and this matter deserves further consideration.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank Professor Mara Hutz from the Genetics Department of UFRGS for critical suggestions in the data analysis.

## References

1. Bhutani VK, Gourley GR, Adler S, Kreamer B, Dalin C, Johnson LH. Noninvasive measurement of total serum bilirubin in a multiracial predischarge newborn population to assess the risk of severe hyperbilirubinemia. *Pediatrics* 2000;106(2):E17.
2. AAP. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. *Pediatrics* 2004;114(1):297-316.
3. Watchko JF, Lin Z, Clark RH, Kelleher AS, Walker MW, Spitzer AR. Complex multifactorial nature of significant hyperbilirubinemia in neonates. *Pediatrics* 2009;124(5):e868-77.
4. Bosma P, Chowdhury JR, Jansen PH. Genetic inheritance of Gilbert's syndrome. *Lancet* 1995;346(8970):314-5.
5. Maisels MJ. Jaundice. In: Avery GB, MacDonald MG, Seshia MMK, Mullet MD, eds. *Avery's Neonatology: Pathophysiology & Management of the Newborn*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005:768-846.
6. 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 U S A* 1998;95(14):8170-4.
7. Cui Y, Konig J, Leier I, Buchholz U, Keppler D. Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *J Biol Chem* 2001;276(13):9626-30.
8. Kallioikoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol* 2009;158(3):693-705.
9. Watchko JF, Lin Z. Exploring the genetic architecture of neonatal hyperbilirubinemia. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010;15(3):169-75.
10. Sanna S, Busonero F, Maschio A, et al. Common variants in the SLCO1B3 locus are associated with bilirubin levels and unconjugated hyperbilirubinemia. *Hum Mol Genet* 2009;18(14):2711-8.
11. Castro SM, Weber R, Matte U, et al. The use of LR values to check the best fit of cut-off values in G6PD deficient cases. *Clin Biochem* 2007;40(7):496-8.
12. Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;19(19):5444.
13. Cittadella R, Civitelli D, Manna I, et al. Genetic heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in south-east Sicily. *Ann Hum Genet* 1997;61(3):229-34.
14. Bouanga JC, Mouele R, Prehu C, Wajcman H, Feingold J, Galacteros F. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and homozygous sickle cell disease in Congo. *Hum Hered* 1998;48(4):192-7.
15. Carvalho CG, Castro SM, Santin AP, de Azevedo LA, Pereira ML, Giugliani R. Polymorphic variants of UGT1A1 in neonatal jaundice in southern Brazil. *J Trop Pediatr* 2010;56(5):366-7.
16. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001;68(4):978-89.
17. Stephens M, Scheet P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am J Hum Genet* 2005;76(3):449-62.
18. Mezzacappa MA, Facchini FP, Pinto AC, et al. Clinical and genetic risk factors for moderate hyperbilirubinemia in Brazilian newborn infants. *J Perinatol* 2010;30(12):819-26.
19. Donovan EF, Lannon C, Bailit J, Rose B, Iams JD, Byczkowski T. A statewide initiative to reduce inappropriate scheduled births at 36(0/7)-38(6/7) weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202(3):243 e1-8.

20. Prachukthum S, Nunnarumit P, Pienvichit P, et al. Genetic polymorphisms in Thai neonates with hyperbilirubinemia. *Acta Paediatr* 2009;98(7):1106-10.
21. Wong FL, Boo NY, Ainoon O, Wang MK. Variants of organic anion transporter polypeptide 2 gene are not risk factors associated with severe neonatal hyperbilirubinemia. *Malays J Pathol* 2009;31(2):99-104.
22. Castro SM, Weber R, Matte U, Giugliani R. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in patients from the southern Brazilian city of Porto Alegre, RS. *Genetics and Molecular Biology* 2007;30(1):10-3.
23. Castro S, Weber R, Dadalt V, Tavares V, Giugliani R. Prevalence of G6PD deficiency in newborns in the south of Brazil. *J Med Screen* 2006;13(2):85-6.
24. Saad ST, Salles TS, Carvalho MH, Costa FF. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Brazil. *Hum Hered* 1997;47(1):17-21.
25. Compri MB, Saad ST, Ramalho AS. [Genetico-epidemiological and molecular investigation of G-6-PD deficiency in a Brazilian community]. *Cad Saude Publica* 2000;16(2):335-42.
26. Weimer TA, Salzano FM, Westwood B, Beutler E. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants from Brazil. *Hum Biol* 1993;65(1):41-7.
27. Huang MJ, Kua KE, Teng HC, Tang KS, Weng HW, Huang CS. Risk factors for severe hyperbilirubinemia in neonates. *Pediatr Res* 2004;56(5):682-9.
28. Zhang HX, Zhao X, Yang Z, et al. [OATP 1B1 T521C/A388G is an important polymorphism gene related to neonatal hyperbilirubinemia]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2010;48(9):650-5.
29. Strassburg CP, Lankisch TO, Manns MP, Ehmer U. Family 1 uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferases (UGT1A): from Gilbert's syndrome to genetic organization and variability. *Arch Toxicol* 2008;82(7):415-33.
30. Kohlrausch FB, de Cassia Estrela R, Barroso PF, Suarez-Kurtz G. The impact of SLCO1B1 polymorphisms on the plasma concentration of lopinavir and ritonavir in HIV-infected men. *Br J Clin Pharmacol* 2010;69(1):95-8.
31. Niemi M. Role of OATP transporters in the disposition of drugs. *Pharmacogenomics* 2007;8(7):787-802.
32. Kang TW, Kim HJ, Ju H, et al. Genome-wide association of serum bilirubin levels in Korean population. *Hum Mol Genet* 2010;19(18):3672-8.
33. Wang P, Kim RB, Chowdhury JR, Wolkoff AW. The human organic anion transport protein SLC21A6 is not sufficient for bilirubin transport. *J Biol Chem* 2003;278(23):20695-9.
34. Zucker SD, Goessling W, Hoppin AG. Unconjugated bilirubin exhibits spontaneous diffusion through model lipid bilayers and native hepatocyte membranes. *J Biol Chem* 1999;274(16):10852-62.
35. Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum Hered* 2006;62(4):190-5.
36. Sortica VD, Ojopi EB, Genro JP, et al. Influence of Genomic Ancestry on the Distribution of SLCO1B1, SLCO1B3 and ABCB1 Gene Polymorphisms among Brazilians. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011.
37. Mandelbrot L, Mazy F, Floch-Tudal C, et al. Atazanavir in pregnancy: impact on neonatal hyperbilirubinemia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;157(1):18-21.

Figure

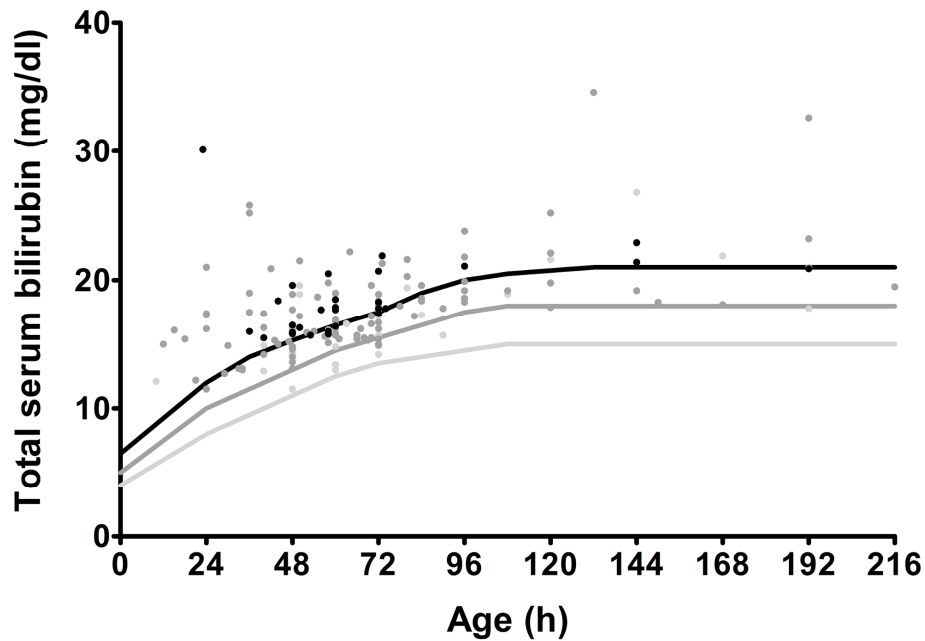


Figure 1. Total serum bilirubin levels for case subjects, who were hospitalized for phototherapy according to the AAP Guidelines *versus* age in hours. The lines represent the 95th percentile, above which infants most likely developed neurological damage due to bilirubin toxicity.

Black line: infants at minor risk (38 weeks or more of gestational age (GA) without risk factors). Dark grey line: infants at medium risk (35 to 37 weeks of GA without risk factors or 38 weeks or more with risk factors). Light grey line: infants at major risk (35 to 37 weeks of GA with risk factors). Risk factors: hemolytic disease, G6PD deficiency, low albumin, lethargy, temperature instability, and acidosis.

Table 1. Demographic and clinical data of control versus case infants enrolled in this study.

Factor in study	Control group	Case group	<i>P</i>
<b>Gender (n=414)</b>			
Male	122 (49.4%)	102 (61.1%)	0.019
Female	125 (50.6%)	65 (38.9%)	
<b>Ethnicity (n=414)</b>			
White	191 (77.3%)	122(73.1%)	NS
Black	56 (22.7%)	45 (26.9%)	
<b>Size for Gestational Age (n=414)</b>			
Appropriate	192 (77.7%)	136 (81.4%)	NS
Small	40 (16.2%)	21 (12.6%)	
Large	15 (6.1%)	10 (6.0%)	
<b>Birth Delivery (n=414)</b>			
Vaginal	160 (64.8%)	113 (67.7%)	NS
Cesarean	87 (35.2%)	54 (32.3%)	
<b>ABO Incompatibility (n=414)</b>			
Yes	47 (19%)	61 (36.5%)	<0.001
<b>Rh Incompatibility (n=414)</b>			
Yes	26 (10.5%)	20 (12.0%)	NS
<b>G6PD Deficiency (n=405)</b>			
Yes	9 (3.7%)	12 (7.4%)	NS
<b>Need for Reanimation (n=414)</b>			
Yes	28 (11.3%)	12 (7.2%)	NS
<b>Gestational age (n=414)</b>			
(mean ±SD, weeks)	39.5±1.4	38.1±1.8	<0.001
<b>Birth weight (n=414)</b>			
(mean ±SD, g)	3218±460	3099±460	0.014
<b>Mother's Age (n=411)</b>			
(mean ±SD, years)	26.12±6.8	25.2±6.5	NS
<b>Apgar 5' (n=413)</b>			
(mean ±SD)	9±1	9±1	NS
<b>G6PD Activity (n=360)</b>			
(mean ±SD, U/gHb)	17.2±5.7	17.2±6.2	NS



Table 2. Allelic, genotypic, and haplotype frequencies of the polymorphisms in *UGT1A1*, *SLCO1B1*, and *SLCO1B3* genes in control and case groups.

Factor in study		Control group	Case group	<i>P</i>
<b><i>UGT1A1</i> (n=386)</b>				
rs8175347				
	TA <sub>5</sub>	0.02	0.003	0.0417 <sup>a</sup>
	TA <sub>6</sub>	0.60	0.67	
	TA <sub>7</sub>	0.36	0.31	
	TA <sub>8</sub>	0.01	0.01	
	TA <sub>6</sub> /TA <sub>8</sub> , TA <sub>7</sub> /TA <sub>7</sub> , and TA <sub>7</sub> /TA <sub>8</sub> genotypes	35 (14.9%)	16 (10.5%)	NS
<b><i>SLCO1B1</i> (n=394)</b>				
rs4149056	C allele	0.13	0.11	NS
	TT genotype	179 (75.5%)	122 (77.7%)	NS
	TC genotype	55 (23.2%)	34 (21.7%)	
	CC genotype	3 (1.3%)	1 (0.6%)	
rs2306283	G allele	0.50	0.52	NS
	AA genotype	56 (23.6%)	37 (23.6%)	NS
	AG genotype	123 (52.0%)	78 (49.7%)	
	GG genotype	58 (24.5%)	42 (26.8%)	
<b><i>SLCO1B3</i> (n=394)</b>				
rs2117032	T allele	0.50	0.46	NS
	CC genotype	58 (24.5%)	50 (31.8%)	NS
	CT genotype	121 (51.1%)	69 (43.9%)	
	TT genotype	58 (24.5%)	38 (24.2%)	
rs17680137	G allele	0.11	0.12	NS
	CC genotype	187 (78.9%)	121 (77.1%)	NS
	CG genotype	49 (20.7%)	34 (21.7%)	
	GG genotype	1 (0.4%)	2 (1.3%)	
<b>Haplotypes</b>				
(rs4149056, rs2306283, rs2117032, and rs17680137)				
	TGCC	148 (31.2%)	102 (32.5%)	NS
	TGCG	6 (1.3%)	7 (2.2%)	
	TGTC	34 (7.2%)	23 (7.3%)	
	TACC	44 (9.3%)	35 (11.1%)	
	TATC	181 (38.2%)	110 (35.0%)	
	CGCC	45 (9.5%)	28 (8.9%)	
	CATC	12 (2.5%)	5 (1.6%)	
	Other <sup>b</sup>	4 (0.8%)	4 (1.2%)	

<sup>a</sup> Difference in Fisher's Exact Test is accounted for TA<sub>5</sub> allele.

<sup>b</sup> Other haplotypes had frequencies less than 1%.

Table 3. Variables which remained in logistic regression model.

<b>Factor in study</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>P</b>
<i>ABO incompatibility</i>	3.27 (1.95 - 5.50)	<0.001
<i>Gestational age (for a week increase)</i>	0.56 (0.48 - 0.66)	<0.001
<i>T allele at rs2117032</i>	0.57 (0.34 - 0.94)	0.0027