

bioanálise

Variação Inter-Individual nos Níveis de Bilirrubina:
O Papel dos Factores Genéticos e Adquiridos
Between-subject Variation in Bilirubin Levels:
The Role of Acquired and Genetic Factors

Factos Importantes Sobre a Determinação da HbA1c
Important Facts about HbA1c Determination



IX CONGRESSO
ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA

25 e 26
Nov. 2011
Hotel Costa da Caparica
Costa da Caparica
(Almada)

CURSOS

- Segurança Transfusional e Hemovigilância
- Citometria de Fluxo como complemento do Hemograma
- Comunicação Escrita na Área das Ciências da Saúde e Seus Indicadores de Qualidade
- Coagulação e Homeostase

Sociedade Portuguesa de BioAnálistas Clínicos
Ap. 2009 • 3501-909 Viseu • www.spbs.pt • spbs@portugalmail.pt • Tlm. 926150214

IX CONGRESSO
DE ANÁLISES CLÍNICAS
E SAÚDE PÚBLICA
DA SOCIEDADE
PORTUGUESA
DE BIOANALISTAS
CLÍNICOS

9th CONGRESS
OF CLINICAL ANALYSES
AND PUBLIC HEALTH
OF THE PORTUGUESE
SOCIETY OF CLINICAL
BIOANALYSTS



Sociedade Portuguesa de BioAnálistas Clínicos

Variação Inter-Individual nos Níveis de Bilirrubina: O Papel dos Factores Genéticos e Adquiridos

CARINA RODRIGUES^{1,2}, EMÍLIA VIEIRA³, ROSÁRIO SANTOS³, JOÃO DE CARVALHO⁴, ALICE SANTOS-SILVA^{1,5},
ELÍSIO COSTA^{5,6}, ELSA BRONZE-DA-ROCHA^{1,5}

¹ Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Bioquímica, Fac. de Farmácia da Univ. do Porto

² Departamento das Tecnologias de Diagnóstico e Terapêutica, Esc. Sup. de Saúde do Inst. Polit. de Bragança

³ Unidade de Genética Molecular, Centro de Genética Médica Dr. Jacinto Magalhães INSARJ, Porto

⁴ Serviço de Gastrenterologia, Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia

⁵ Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto

⁶ Departamento de Ciências da Saúde, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica do Porto

RESUMO

A bilirrubina é um pigmento biliar que deriva principalmente do catabolismo da hemoglobina. É um marcador bioquímico de doenças hepáticas e hematológicas e tem vindo a ser alvo de interesse devido à sua capacidade antioxidante. O objectivo deste trabalho foi avaliar a contribuição de vários factores para a variação da concentração da bilirrubina sérica na população portuguesa. Foi analisado o contributo dos polimorfismo genéticos no promotor do gene *UGT1A1* (c.-41_40dupTA e c.-3279T>G), factores ambientais (hábitos tabágicos, consumo de álcool, terapêutica com contraceptivos orais, ingestão calórica e actividade física), jejum nocturno, massa eritrocitária e parâmetros antropométricos. A amostra consistiu num grupo controlo de 146 jovens com média de idade: 20.7±2.6 anos. A aplicação de um inquérito permitiu avaliar os factores adquiridos e foram colhidas amostras de sangue para a realização de hemograma, determinação da bilirrubina total e extracção de ADN. A amostra em estudo foi dividida em três grupos de acordo com os tertis de bilirrubina total (T1: ≤6 µmol/L; T2: 6-9.2 µmol/L; T3: ≥9.2 µmol/L). Foi observada aumento significativo na concentração de hemoglobina no terceiro tercil de bilirrubina ($p<0.0001$). Maior frequência do alelo c.-41_40dupTA foi observada no tercil T2 e T3 ($p<0.0001$).

A análise de regressão multivariada evidenciou que o polimorfismo do gene *UGT1A1*, a concentração de hemoglobina, índice de massa corporal e o tempo de jejum eram variáveis independentes significativamente associadas a variações na concentração de bilirrubina na nossa população.

Palavras chave: Concentração de bilirrubina • Gene *UGT1A1* • Factores genéticos e não genéticos.

ABSTRACT

Bilirubin is a bile pigment that derives primarily from the hemoglobin catabolism. It's a biochemical marker of liver and hematologic disease and has been a target of interest due to its antioxidant capacity. The aim of this study was to evaluate the contribution of various factors to serum bilirubin concentration variation in the Portuguese population. We analyzed the contribution of the genetic polymorphisms in the *UGT1A1* gene promoter (c.-41_40dupTA e c.-3279T>G), acquired factors (smoking, alcohol consumption, contraceptive therapy, caloric intake and physical activity), fasting time, anthropometric features and red cell mass. The sample comprised a control group of 146 young female with a mean age: 20.7 ± 2.6 years. The application of a

survey allowed the assessment of environmental factors and blood samples were collected to perform blood counts, determination of bilirubin concentration and DNA extraction. The study sample was divided into three groups according to the tertils of total bilirubin (T1: $\leq 6 \mu\text{mol/L}$, T2: $6-9.2 \mu\text{mol/L}$, T3: $\geq 9.2 \mu\text{mol/L}$). Significant differences were observed regarding the concentration of hemoglobin in the tertile T3 in relation to tertils with lower bilirubin levels ($p < 0.0001$). Increased frequency of the allele-41_40dupTA tertile was observed in T2 and T3 ($p < 0.0001$). The multivariate regression analysis showed that the polymorphism of the UGT1A1 gene, hemoglobin concentration, body mass index and fasting time were independent variables significantly associated with variations in the concentration of bilirubin in our population.

Key words: Bilirubin concentration • UGT1A1 gene • Genetic and non-genetic factors.

INTRODUÇÃO

Um adulto com metabolismo normal produz cerca de 250-350 mg de bilirrubina por dia, na sua maior parte (70-80%) derivada do catabolismo da hemoglobina proveniente da destruição dos eritrócitos senescentes. O restante provém dos eritrócitos prematuramente destruídos na medula óssea e do catabolismo de outras hemoproteínas como a mioglobina e citocromo (1,2). A bilirrubina produzida é lipossolúvel e para ser armazenada e excretada pelas vias biliares tem de ser solubilizada através da conjugação com uma ou duas moléculas de ácido glucurónico. Esta reacção é catalisada pela enzima hepática uridinadifosfato glucuronosiltransferase 1A1, também designada por UGT1A1 (3). Além da bilirrubina, a enzima UGT1A1 apresenta outros substratos endógenos e exógenos implicados no metabolismo de hormonas e na fase II da detoxificação, levando à eliminação de potenciais carcinogéneos (4,5). Elevados níveis plasmáticos podem estar associados à presença de alterações genéticas ou adquiridas que condicionam a sua produção, captação pelo hepatócito, glucoronidação, armazenamento e excreção nas vias biliares. A alteração genética mais frequente associada

hiperbilirrubinemia moderada é o polimorfismo localizado no elemento A(TA)₆TAA do promotor do gene *UGT1A1* que codifica a enzima específica responsável pela glucoronidação da bilirrubina. Este local é responsável pela ligação do factor de transcrição IID que regula o início da transcrição (6). A duplicação de um ou mais pares de nucleótidos TA no elemento A(TA)₆TAA tem como consequência a diminuição da eficiência de ligação do factor de transcrição, que origina um decréscimo da expressão provocando uma redução na quantidade de enzima sintetizada (6). Na população Caucasiana o alelo mais frequente, associado a hiperbilirrubinemia, é a duplicação de um par de bases TA (c.-41_40dupTA), que em homozigotia, induz uma diminuição de cerca de 30% da actividade da enzima UGT1A1 (5-7). Esta é uma condição necessária, mas não suficiente, para o aparecimento da síndrome de Gilbert, uma hiperbilirrubinemia moderada, não conjugada, na ausência de hemólise ou de doença hepática (6,8). Mais recentemente, verificou-se que outro polimorfismo no promotor do *UGT1A1*, a transição T>G na região de resposta ao fenobarbital (c.-3279), poderia estar associado à esta síndrome e, tal como a duplicação TA, se associar com icterícia neonatal (9,10). Outros factores que contribuem para a variação inter-individual de bilirrubina são o sexo e a idade (11). Estudos anteriores demonstram que os níveis de bilirrubina são significativamente mais elevados no sexo masculino e durante a adolescência e tendem a diminuir com a idade (11-13). Verifica-se também uma diminuição dos níveis de bilirrubina em fumadores (12,13). A explicação parece estar no facto de algumas substâncias presentes no fumo do tabaco poderem induzir a actividade da UGT1A1 levando a uma maior excreção de bilirrubina. A actividade da enzima UGT1A1 aumenta com o consumo de álcool e certas drogas (14-19) e é inibida pela presença de infecção (20), inflamação (21) e jejum prolongado (22,23). Mais recentemente verificou-se que uma maior massa eritrocitária, ainda que dentro dos valores normais, poderia também contribuir para o aparecimento de hiperbilirrubinemia não conjugada (24). No diagnóstico clínico a determinação da concentração de bilirrubina é importante para testar a função hepática e monitorizar doenças hematológicas. Recentemente a

bilirrubina tem vindo a ganhar importância devido ao seu potencial efeito protector, como antioxidante (25). De acordo com alguns estudos, baixas concentrações de bilirrubina estão associadas a um aumento do risco de doença arteriosclerótica, diabetes mellitus tipo 2 e a outras doenças relacionadas com *stress* oxidativo (25-28). Para determinar o papel da bilirrubina nas diferentes patologias bem como delinear possíveis estratégias terapêuticas é necessário conhecer a contribuição dos factores genéticos e adquiridos nas variações inter-individuais observadas. Dado que a análise de muitos destes factores foi realizada separadamente, muitas vezes sem ter em conta o factor genético, dificulta a percepção do verdadeiro impacto de cada um deles nos níveis de bilirrubina.

O objectivo deste trabalho foi avaliar a contribuição dos polimorfismos do gene *UGT1A1*, factores ambientais (hábitos tabágicos, consumo de álcool, terapêutica com contraceptivos orais, ingestão calórica e actividade física), jejum nocturno, massa eritrocitária e parâmetros antropométricos para a concentração de bilirrubina sérica na população portuguesa.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra

Foi estudado um grupo de 146 jovens caucasianas escolhidas aleatoriamente, da região do Norte de Portugal com média de idades de 20.7±2.6 anos. Foram excluídas todos as participantes que apresentassem historial de doenças hepáticas, hematológicas ou que tivessem sido medicadas durante o último mês. Uma vez que se observam diferenças na concentração de bilirrubina de acordo com a idade e género optou-se por restringir a amostra ao sexo feminino e a uma faixa etária em que a presença de patologias, susceptível de interferir com os níveis de bilirrubina, é pouco frequente. Todas as participantes deram o seu consentimento para participarem neste estudo.

Determinações hematológicas e bioquímicas

As amostras de sangue periférico foram colhidas para um tubo contendo anticoagulante - EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético anidro), para proceder à realização do hemograma e, posteriormente, separar o

plasma e os leucócitos para a determinação bioquímica da bilirrubina plasmática e extracção de ADN. O hemograma completo, contagem de eritrócitos, contagem diferencial de leucócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito e índices hematimétricos [Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e índice de anisocitose (Red Cell Distribution Width - RDW)], foi efectuado no aparelho (ABX MICRO 60-OT, Horiba-ABX, França). A bilirrubina plasmática foi determinada utilizando o método colorimétrico com a reacção do ácido sulfanílico diazotado (Roche Diagnostics Co., Indianapolis). O ADN genómico foi extraído a partir de uma amostra de 200 µl de buffy coat pelo método automático - BioRobot EZ1@ Workstation/ EZ1@Buffy Coat Card, QUIAGEN, de acordo com as instruções do fabricante.

Avaliação dos factores ambientais

A todos os participantes foi aplicado um instrumento de recolha de dados, incluindo questões sobre tempo de jejum, hábito tabágicos, consumo de álcool e frequência alimentar. Foi também aplicado o Questionário Internacional de Actividade Física (29). O peso e altura foram determinados por técnicas padrão. O índice de massa corporal (IMC) foi determinado de acordo com as recomendações da OMS. A gordura corporal foi determinada com uma balança de bioimpedância (Modelo BC532; TANITA, Tóquio).

Genotipagem

A determinação do número de repetições TA na região TATA-box do promotor do gene *UGT1A1* foi efectuada em todos indivíduos. Esta região foi amplificada por PCR usando os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Bancroft e colaboradores (30). A reacção de PCR foi efectuada usando PCR Master Mix (Promega, Madison, EUA). A 25 µl desta mistura (que inclui dNTPs, DNA Taq polimerase e MgCl₂) adicionou-se 1 µl de cada oligonucleotídeo a 10 pmol/µl, 1 µl de DNA genómico a 100 ng/µl e água para um volume final de 50 µl, e submeteu-se ao seguinte ciclo de temperaturas: uma desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 45 segundos a 58°C e 1 minuto a

72°C, e uma extensão final de 10 minutos a 72°C, no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). A separação dos produtos de PCR foi realizada em electroforese capilar num sequenciador automático (ABI 3130xl Genetic Analyzer; Applied Biosystems) utilizando o polímero POP7TM e o tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado usando o programa GeneScan v4.

A análise do polimorfismo c.-3279T>G foi realizada em apenas 116 indivíduos por amplificação por PCR da região correspondente, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Costa et al. (7) seguido de sequenciação do fragmento obtido. As reacções de sequenciação foram efectuadas usando reagentes comerciais (Kit Big Dye Terminator v.1.1, Applied Biosystems). O programa das reacções de sequenciação incluiu uma desnaturação inicial de 1 minuto a 96°C, seguida de 27 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 15 minutos a 60°C, e de extensão final de 5 minutos a 60°C, no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). A separação dos fragmentos foi realizada por electroforese capilar no sequenciador automático (3130XL, Applied Biosystems) utilizando como matriz de separação o polímero POP7TM.

Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi efectuada no programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences; version 17.0 for Windows, Inc. Chicago, IL, USA). O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade das distribuições. As variáveis contínuas que não apresentaram distribuição normal foram logaritmizadas. Os participantes foram divididos por tertis de bilirrubina e o estudo das variáveis contínuas foi realizado recorrendo à análise multivariada da variância (ANOVA) entre os grupos, suplementada com os testes Turkey's HSD *post hoc*. Para as variáveis categóricas foi utilizado o teste de χ^2 ou teste exacto de Fisher para comparação de grupos. Foi também utilizada a coeficiente de variação de *Pearson* para avaliar a relação de algumas variáveis com os níveis de bilirrubina total. A análise de regressão múltipla (método *stepwise*) foi utilizada para identificar variáveis independentes associadas a variações dos níveis de bilirrubina. Para o genótipo TA foi criada uma variável *dummy*,

considerando o homozigótico para o alelo normal como referência. Para todos os testes a significância foi aceite para $p < 0.05$. O coeficiente de correlação (r^2) e o índice Lewontin, (D') para determinar o desequilíbrio de ligação entre os dois polimorfismos (c.-3279T>G e c.-41_40dupTA) foi calculado utilizando a ferramenta disponível na Web: <http://www.oege.org/software/hwemr-calc.shtml>.

RESULTADOS

A análise da contribuição de cada uma das variáveis em estudo foi realizada dividindo a amostra total em três grupos, correspondentes aos tertis de bilirrubina. O primeiro grupo T1 compreende os valores ≤ 6 $\mu\text{mol/L}$, o grupo T2 representa o intervalo de valores de 6 a 9.2 $\mu\text{mol/L}$, e o grupo T3 os valores ≥ 9.2 $\mu\text{mol/L}$ de bilirrubina total.

Não foram observadas diferenças significativas entre os 3 grupos em relação à idade (Tabela 1). A análise dos parâmetros hematológicos evidenciou que os indivíduos do tercil T2 e T3 apresentavam valores significativamente mais elevados de concentração de hemoglobina ($p < 0.0001$), de hematócrito ($p = 0.005$), dos índices hematimétricos, HCM e CHCM ($p < 0.0001$), e diminuição na contagem de plaquetas ($p = 0.019$). O grupo T3 apresentou também maior massa eritrócitária comparado com o T1 ($p = 0.009$) (Tabela 1).

A frequência do alelo c.-41_40dupTA em homozigotia aumentou desde o primeiro até ao terceiro grupo, tendo-se observado diferenças significativas entre T3 e os restantes grupos. A frequência genética foi 0.69 para o alelo normal e 0.31 para o alelo c.-41_40dupTA. Não foram encontradas diferenças entre os três tertis de bilirrubina no que respeita às variáveis: actividade física, hábitos tabágicos, contraceptivos orais, gordura corporal, ingestão de álcool e tempo de jejum (Tabela 2). Contudo, foi verificada uma tendência para uma menor IMC quando comparados o primeiro e terceiro tercil ($p = 0.099$). A análise de regressão múltipla revelou que o polimorfismo c.-41_40dupTA, a concentração de hemoglobina, o IMC e tempo de jejum nocturno eram responsáveis por cerca de 44% da variação observada nos indivíduos em estudo ($R^2 = 0.439$; $p < 0.0001$). O modelo identificou o alelo c.-41_40dupTA como a variável com mais peso nas

variações inter-individuais ($\beta=0.481$; $p<0.0001$) quando em homozigotia, seguido da concentração de hemoglobina ($\beta=0.297$; $p<0.0001$), tempo de jejum ($\beta=0.292$; $p<0.0001$) e IMC ($\beta=-0.235$; $p<0.004$).

Para o estudo do polimorfismo c.-3279T>G foram sequenciadas apenas 123 amostras na região de resposta

ao fenobarbital. A frequência genética obtida para o alelo -3279T foi 0.55 e 0.45 para o alelo c.-3279G. A frequência de homozigóticos foi 33.6% para alelo normal (TT), 43.4% para os heterozigóticos (TG) e 23.0% para os homozigóticos para o alelo mutado (GG).

Para a análise do potencial de desequilíbrio de ligação

Tabela 1 – Dados hematológicos, distribuição do genótipos do polimorfismo TA do gene *UGT1A1* por tertis de bilirrubina total.

	Tertis de bilirrubina total ($\mu\text{mol/L}$)				<i>p</i> ^a
	Participantes (n=146)	T1 (<6.0) (n=49)	T2 (6.0-9.2) (n=49)	T3 (>9.2) (n=48)	
Idade (anos)	20.5 (2.3)	20.9 (2.8)	20.3 (2.1)	20.4 (2.0)	0.332
Hemograma					
Eritrócitos ($\times 10^{12}/\text{L}$)	4.6 (0.3)	4.5 (0.2)	4.6 (0.3)	4.7 (0.3) ^a	0.149
Hemoglobina (g/dL)	13.6 (1.1)	13.0 (1.1)	13.8 (1.0) ^b	13.9 (1.0) ^a	<0.0001
Hematócrito (%)	40.7 (2.4)	39.8 (2.5)	41.1 (2.2) ^b	41.3 (2.4) ^a	0.005
VCM (fL)	88.4 (3.9)	87.6 (4.1)	88.8 (4.1)	88.8 (3.5)	0.231
HCM (pg)	29.4 (1.7)	28.7 (1.8)	29.8 (1.7) ^b	29.9 (1.4) ^a	0.001
CHCM (g/L)	33.3 (1.1)	32.8 (1.0)	33.5 (1.1) ^b	33.7 (1.1) ^a	<0.0001
RDW-CV (%)	12.9 (0.9)	13.1 (0.9)	12.8 (0.8)	12.7 (0.9)	0.341
Leucócitos ($\times 10^9/\text{L}$)	6.4 (1.3)	6.5 (1.3)	6.6 (1.3)	6.3 (1.6)	0.390
Neutrófilos ($\times 10^9/\text{L}$)	3.4 (1.4)	3.5 (1.4)	3.4 (1.5)	3.2 (1.4)	0.493
Eosinófilos ($\times 10^9/\text{L}$)	0.13 (0.5)	0.12 (0.5)	0.15 (0.5)	0.12 (0.5)	0.377
Basófilos ($\times 10^9/\text{L}$)	0.03 (0.06)	0.02 (0.06)	0.03 (0.05)	0.02 (0.06)	0.075
Mnócitos ($\times 10^9/\text{L}$)	0.4 (0.2)	0.4 (0.1)	0.5 (0.3)	0.4 (0.1)	0.085
Limfócitos ($\times 10^9/\text{L}$)	2.4 (0.7)	2.3 (0.6)	2.5 (0.7)	2.3 (0.8)	0.606
Plaquetas ($\times 10^9/\text{L}$)	248 (56.9)	267.9 (62.7)	242.9 (54.4) ^a	234.4 (48.4) ^a	0.019
Polimorfismo TA					
[=] + [=] [%, (n)]	48.8 (71)	67.3 (33)	53.1 (26)	25.0 (12)	
[=] + [c.-41_-40dupTA] [%, (n)]	40.8 (59)	33.3 (16)	43.1 (21)	45.8 (22)	<0.0001
c.-41_-40dupTA [%, (n)]	10.9 (16)	0.0 (0)	3.9 (2)	29.2 (14)	

Os dados estão representados como média (desvio padrão DP) para as variáveis contínuas, e percentagens (número) para as variáveis categóricas. ^avalor de *p* para a análise multivariada (ANOVA) e teste do χ^2 quadrado.

^a $p < 0.05$ vs T1;

^b $p < 0.05$ vs T2.

VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW : índice de anisocitose (Red Cell Distribution Width).

Tabela 2 – Dados relativos às variáveis: actividade física, hábitos tabágicos, contraceptivos orais, índice de massa corporal, percentagem de gordura corporal, tempo em jejum e ingestão de álcool e de calorias diárias.

	Tertis de bilirrubina total ($\mu\text{mol/L}$)				<i>p</i>
	Participantes (n=135)	T1 (<6.0) (n=45)	T2 (6.0-9.2) (n=45)	T3 (>9.2) (n=45)	
Actividade Física					
Baixa [%, (n)]	14.8 (20)	20.0 (9)	10.9 (5)	14.3 (6)	
Moderada [%, (n)]	55.6 (75)	48.9 (23)	56.5 (26)	61.9 (26)	0.581
Alta [%, (n)]	29.6 (40)	33.3 (15)	32.6 (15)	23.8 (10)	
Fumadores [%, (n)]	11.9 (16)	14.9 (7)	13.0 (6)	7.1 (3)	0.504
TC [%, (n)]	42.2 (56)	48.9 (23)	35.6 (16)	35.4 (17)	0.420
IMC (Kg/m²)	22.0 (4.3)	22.6 (4.4)	22.8 (5.4)	20.8 (2.2) ^b	0.099
Gordura corporal (%)	25.7 (6.9)	27.4 (7.7)	26.1 (7.2)	24.3 (5.7)	0.211
Alcool (mg/dia)	4.0 (6.6)	5.3 (9.2)	3.7 (5.0)	2.9 (4.2)	0.248
Jejum (horas)	11.1 (2.0)	11.0 (2.1)	11.0 (2.0)	11.4 (1.6)	0.492
Ingestão (Kcal/dia)	2468.2 (1045.2)	2418.0 (934.8)	2564.9 (1116.8)	2419.2 (1097.3)	0.748

Os dados estão representados como média (e desvio padrão) para as variáveis contínuas, e percentagens (número) para as variáveis categóricas.

^avalor de *p* para a análise multivariada (ANOVA) e testes χ^2 .

^b $p < 0.05$ vs T2.

TC: Terapia Contraceptiva; IMC: Índice de Massa Corporal

entre os dois polimorfismos (c.-41_40dupTA e c.-3279T>G) foi utilizada uma ferramenta disponível na internet que permite calcular o índice de correlação r^2 e o valor D (Lewontin). De acordo com a distribuição dos genótipos nesta amostra os resultados foram $r^2=0.57$ e $D= 1.0$. Estes dados revelam um desequilíbrio de ligação entre os dois polimorfismos, que não é total, dado o valor de r^2 .

Para as nove combinações possíveis de genótipos dos dois polimorfismos, apenas sete diplótipos foram identificados (Tabela 3). As combinações mais frequentes foram os homocigóticos para os dois alelos normais $[TA]_6/[TA]_6$ -TT, representam 33.3% do total de combinações, 30.9% para os duplos heterocigóticos $[TA]_6/[TA]_7$ -TG e 12.3% para os duplos homocigóticos para o alelo mutado, $[TA]_7/[TA]_7$ -GG. Verificaram-se diferenças significativas nos níveis de bilirrubina entre o diplótipo $[TA]_7/[TA]_7$ -GG e os restantes ($p<0.0001$) mas não se observaram diferenças significativas entre outros diplótipos. Verifica-se, no entanto, que o impacto da adição do alelo $[TA]_7$ num diplótipo é superior ao da adição do alelo G (Tabela 3). Foi também analisada a variação dos níveis de bilirrubina por genótipo do polimorfismo c.-3279T>G, sem ter em conta a combinação com o polimorfismo TA, tendo-se verificado que a diferença entre os homocigóticos para o alelo normal e os heterocigóticos não é significativa ($p=0.320$) ao contrário do que se verificou no polimorfismo c.-41_40dupTA ($p=0.011$; Figura 1).

DISCUSSÃO

Diversos estudos têm sido realizados para determinar a influência de factores genéticos e não genéticos nos níveis de bilirrubina (5-18). A maior parte destes estudos está focada no *background* genético, sendo que a duplicação c.-41_40dupTA no gene *UGT1A1* surge como factor determinante para as variações inter-individuais de bilirrubina e desenvolvimento hiperbilirrubinemia não conjugada (3-8). Os nossos resultados mostraram que a presença do alelo c.-41_40dupTA permitiu estratificar a amostra em grupos com concentrações de bilirrubina significativamente diferentes entre si (Figura 1). No entanto, verificou-se que nem todos os indivíduos homocigóticos para o alelo com a duplicação TA eram hiperbilirrubinémicos, de 15 homocigóticos 6 apresentavam valores normais de bilirrubina total ($<17.1 \mu\text{mol/L}$). O polimorfismo nem sempre é suficiente para explicar a presença de hiperbilirrubinemia (3,8).

Na literatura está descrita a influência de factores adquiridos nas variações da concentração de bilirrubina, porém, nem sempre o polimorfismo genético, e outros factores que se sabe hoje influenciarem os níveis de bilirrubina, são ponderados (11-14). A selecção da amostra neste trabalho teve como objectivo eliminar as variações associadas à diferença de concentração entre género e faixa etária para poder avaliar o impacto de outros factores.

Uma vez que a maior parte da bilirrubina sérica

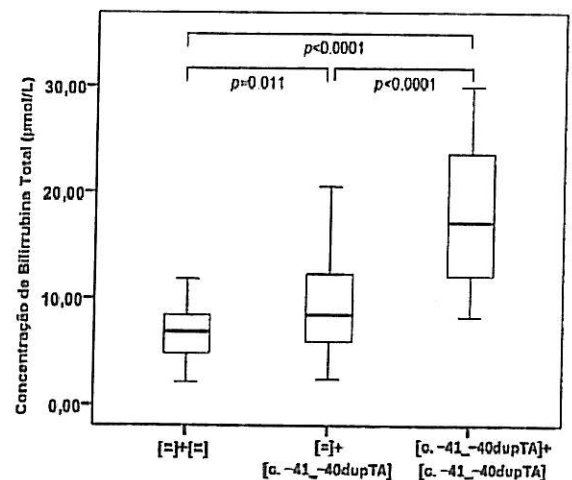
Tabela 3 – Contagem de diplótipos formados pelos polimorfismos do promotor c.-41_40dupTA e c.-3279T>G em 123 indivíduos da amostra e os respectivos níveis médios de bilirrubina total.

Nº	Diplótipo (c.-41_40dupTA-c.-3279T>G)	% (n)	BT $\mu\text{mol/L} \pm \text{DP}$	*p
1	$[TA]_6/[TA]_6$ -TT	33.3 (41)	7.6 \pm 3.2	<0.0001
2	$[TA]_6/[TA]_6$ -TG	12.2 (15)	7.1 \pm 3.7	
3	$[TA]_6/[TA]_7$ -TT	0.8(1)	13.4 \pm 0	
4	$[TA]_6/[TA]_7$ -TG	30.9 (38)	9.4 \pm 5.1	
5	$[TA]_6/[TA]_6$ -GG	2.4 (3)	8.4 \pm 3.8	
6	$[TA]_6/[TA]_7$ -GG	8.1 (10)	8.8 \pm 3.8	
7	$[TA]_7/[TA]_7$ -GG	12.3 (15)	19.4 \pm 10.2	

BT: níveis de bilirrubina total; bilirrubina por diplótipo representada como média e desvio padrão (DP);

* Análise por comparação múltipla revelou diferenças significativas nos níveis de BT entre o diplótipo $[TA]_7/[TA]_7$ -G/G e os restantes.

Figura 1 - Níveis de Bilirrubina Total de acordo com os genótipos do polimorfismo c.-41_40dupTA



resulta do catabolismo da hemoglobina no sistema reticuloendotelial, é esperado que quanto maior for a concentração de hemoglobina maior será a concentração do seu produto. Os nossos resultados evidenciaram que valores mais elevados de hemoglobina, hematócrito e de alguns índices hematimétricos estavam associados aos tertis com maior concentração de bilirrubina (T2 e T3). Isto revela que mesmo diferenças subtis nestes parâmetros hematológicos, em concentrações normais para a população geral, contribuem para a variação dos níveis séricos de bilirrubina. Esta associação é detectada mesmo sem ajustar os valores para as diferenças genéticas entre os indivíduos (Tabela 1). Buyukasik e colaboradores (24) também analisaram a influência destes parâmetros e os resultados mostraram que uma maior massa eritrocitária estava muitas vezes associada à manifestação da síndrome de Gilbert. Uma vez que baixa concentração de hemoglobina tem vindo a ser associadas a um aumento de risco para doenças cardiovasculares e mortalidade em indivíduos com insuficiência renal crónica (28), com doença coronária (31) e na população em geral (32) esta situação pode constituir um factor de agravamento, na medida em que irão baixar os níveis de bilirrubina tendo ela um importante papel como antioxidante (25-27).

Também identificamos o tempo de jejum nocturno como uma variável independente associada à concentração de bilirrubina. Esta associação foi anteriormente analisada num estudo onde os indivíduos foram estratificados de acordo com o genótipo do polimorfismo TA (22). O aumento da concentração da bilirrubina com o jejum parece estar associada à diminuição da sua motilidade intestinal o que leva ao seu refluxo do intestino para o plasma (33). Indivíduos com capacidade de glucoronidação normal podem atingir valores de bilirrubina superiores aos que apresentam deficiência enzimática devido a um maior tempo de jejum condicionar a motilidade do pigmento.

A análise de regressão multivariada evidenciou o IMC como uma variável independente associada com a concentração da bilirrubina. Apesar de não se verificarem diferenças significativas entre os tertis quanto à percentagem de gordura corporal verificamos que o T3 apresentava percentagens mais baixas. Esta associação foi também observada por outros autores

(27,34), no entanto, o mecanismo subjacente ainda não foi devidamente esclarecido. Em relação às variáveis actividade física, hábitos tabágicos, ingestão calórica, álcool e contraceptivos orais não foram identificadas associações com a concentração de bilirrubina. Estes resultados podem estar relacionados com o facto dos indivíduos da nossa amostra serem jovens e os hábitos, como o tabaco e ingestão de álcool não estarem suficientemente "estabelecidos" para provocar alterações na concentração de bilirrubina. A análise da associação da presença dos polimorfismos com os níveis de bilirrubina foi efectuada, numa primeira fase, separadamente para cada polimorfismo e seguidamente foi avaliado o impacto das diferentes combinações (Tabela 3). Verificou-se que as diferenças entre genótipos do polimorfismo TA apresentam maior significância do que as diferenças entre os genótipos do polimorfismo c.-3279T>G. O principal objectivo era determinar em que mediada a presença do alelo c.-3279G contribuía para o aumento dos níveis de bilirrubina para além da presença do polimorfismo TA. Era esperado que a análise das várias combinações de genótipos pudesse esclarecer este aspecto. Nas 123 amostras estudadas verificamos que os dois polimorfismos se encontravam em desequilíbrio de ligação, à semelhança do que tinha sido descrito anteriormente (35-38). Dos nove diplótipos possíveis (Tabela 3), apenas identificamos sete e alguns com pouca representatividade o que, aliado ao facto dos dois polimorfismos estarem em desequilíbrio de ligação, dificultou a análise da sua influência nos níveis de bilirrubina. Na análise do impacto de cada diplótipo nos níveis de bilirrubina, apenas o duplo homocigótico para os dois alelos mutados, [TA]₇/[TA]₇-GG, apresentou diferenças estatisticamente significativas com os restantes diplótipos, estando associado aos valores de bilirrubina mais elevados encontrados na amostra em estudo. Em doentes com a síndrome de Gilbert este polimorfismo parece constituir um factor adicional para o desenvolvimento de hiperbilirrubinemia (9,10). No entanto, para estabelecer o seu impacto seria importante comparar níveis de bilirrubina associados a outros diplótipos que não estavam representados nesta amostra, com grupos mais representativos.

Em conclusão, este estudo revelou que, para

além do polimorfismo genético c.-41_40dupTA a concentração de hemoglobina, o tempo de jejum nocturno e o IMC são variáveis independentes significativamente associadas com a concentração de bilirrubina total. A análise conjunta dos dois polimorfismos revelou que os níveis de bilirrubina

são influenciados principalmente pela presença da duplicação c.-41_40dupTA e que o polimorfismo c.-3279T>G poderá constituir um factor adicional. Estudos posteriores, em faixas etárias diferentes e em ambos os sexos, deverão ser realizados para determinar como são influenciados os níveis de bilirrubina.

REFERÊNCIAS

1. Robinson SH. The origins of bilirubin. *N Eng J Med* 1968;279:143.
2. Berk, P. D., Howe, R. B., Bloomer, J. R. & Berlin, N. I. Studies of bilirubin kinetics in normal adults. *J Clin Invest* 1969;48:2176.
3. Bosma PJ, Seppen J, Goldhoor B, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, et al. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1A1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem* 1994;269:17960-4.
4. Strassburg CP, Kalthoff S, Ehmer U. Variability and function of family I uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferases (UGT1A), *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008;45:485-530.
5. Hong AL, Huo D, Kim HJ, Niu Q, Fackenthal DL, Cummings SA, et al. UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 Gene Polymorphisms and Total Bilirubin Levels in an Ethnically Diverse Cohort of Women. *Drug Metab Dispos* 2007;35:1254-61.
6. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, Boer A, Ostra BA, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1995;333:1171-5.
7. Costa E, Hematologically important mutations: Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene mutations in Gilbert and Crigler-Najjar syndromes. *Blood Cell Mol Dis* 2006;36:77-80.
8. Clementi M; Di Gianantonio E; Fabris L; Forabosco P; Strazzabosco M; Tenconi R, et al. Inheritance of hyperbilirubinemia: evidence for a major autosomal recessive gene. *Dig Liver Dis* 2007;39:351-5.
9. Sugatani J, Yamakawa K, Yoshinari K, Machida T, Takagi H, Mori M, et al. Identification of a defect in the UGT1A1 gene promoter and its association with hyperbilirubinemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;292:492-7.
10. Maruo Y, D'Addario C, Mori A, Iwai M, Takahashi H, Sato H, et al. Two linked polymorphic mutations (A(TA)7TAA and T-3279G) of UGT1A1 as the principal cause of Gilbert Syndrome. *Hum Genet* 2004;115:525-6.
11. Rosenthal P, Pincus M. & Fink D. Sex- and Age-Related Differences in Bilirubin Concentrations in Serum. *Clin Chem* 1984;30(8):1382-6.
12. Chan-Yeung M, Ferreira P, Frohlich J, Schulzer M, Tan F. The effects of age, smoking, and alcohol on routine laboratory tests. *Am J Clin Pathol* 1981;75:320-6.
13. Pascale GA Van Hoydonck, Elisabeth HM Temme, and Evert G Schouten Serum bilirubin concentration in a Belgian population: the association with smoking status and type of cigarettes. *Int J. Epidemiol* 200; 30(6):1465-72.
14. Shaper AG, Pocock SJ, Ashby D, Walker M, Whitehead TP. Biochemical and haematological response to alcohol intake. *Ann Clin Biochem* 1985;22:50-61.
15. Ideo G, De Franchis R, Del Ninno E. Ethanol increases liver uridine-diphosphate-glucuronyltransferase. *Experientia* 1971;27:24-5.
16. Ritter JK, Kessler FK, Thompson MT, Grove AD, Auyeung DJ, Fisher RA, et al. Expression and inducibility of the human bilirubin UDPglucuronosyltransferase UGT1A1 in liver and cultured primary hepatocytes: evidence for both genetic and environmental influences. *Hepatology* 1999;30:476-84.
17. Kanou M, Usui T, Ueyama H, Sato H. Ohkubo I, Mizutani T, et al. Stimulation of transcriptional expression of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 by dexamethasone. *Mol Biol Rep* 2004;31151-8.
18. Ramirez J, Komoroski BJ, Mirkov S, Graber AY, Fackenthal DL, Schuetz EG, et al. Study of the genetic determinants of UGT1A1 inducibility by phenobarbital in cultured human hepatocytes. *Pharmacogenet Genomic* 2006;16:79-86.
19. Hsieh TY, Shiu TY, Huang SM, Lin HH, Lee TC, Chen PJ, et al. Molecular pathogenesis of Gilbert's syndrome: decreased TATA-binding protein binding affinity of UGT1A1 gene promoter. *Pharmacogenet Genomics* 2007;17:229-36.
20. Assenat E, Gerbal-Chaloin S, Larrey D, Saric J, Fabre JM, Maurel P, et al. Interleukin 1 β inhibits CAR-induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance. *Hepatology* 2004;40:951-60
21. Richardson TA, Sherman M, Kalman D, Morgan ET. Expression of UDP-glucuroniltransferase isoform ImRNAS during inflammation and infection in mouse liver and kidney. *Drug Metab Dispos* 2006;34:351-3.
22. Teich N, Lehmann I, Rosendahl J, Tröltzsch M, Mössner J, Schiefke. The inverse starving test is not a suit-

- able provocation test for Gilbert's syndrome. *B.M.C. Res Notes* 2008;1:35.
23. White GL, Nelson JA, Pedersen DM, Ash KO. Fasting and gender (and altitude?) influence reference intervals for serum bilirubin in healthy adults. *Clin Chem* 1981;27:1140-2.
 24. Buyukasik Y, Akman U, Buyukasik NS, Goker H, Kiliarslan A, Shorbagi AI, et al. Evidence for higher red blood cell mass in persons with unconjugated hyperbilirubinemia and Gilbert's syndrome. *Am J Med Sci* 2008;335:115-9.
 25. Schwertner HA, Libor V. Gilbert syndrome, UGT1A1*28 allele, and cardiovascular disease risk: Possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin. *Atherosclerosis* 2008;198:1-11.
 26. Troughton J, Woodside J, Young IS. PRIME Study Group. Bilirubin and coronary heart disease risk in the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME). *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007;142:79-84.
 27. Ohnaka K, Konob S, Inoguchic T, Yinb G, Moritab M, Adachiet M, et al. Inverse associations of serum bilirubin with high sensitivity C-reactive protein, glycated hemoglobin, and prevalence of type 2 diabetes in middle-aged and elderly Japanese men and women. *Diab Res Clin Pract* 2010;88:103-10
 28. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barre PE. The impact of anemia on cardiomyopathy, morbidity and mortality in end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* 1996;28:53-61.
 29. Guidelines for data processing and analysis of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ). Disponível: <http://www.ipaq.ki.se/scoring.pdf>. Outubro, 2011.
 30. Bancroft D, Kreamer B, Gourley R. Gilbert syndrome accelerates development of neonatal jaundice. *J. Pediatr* 1998; 132: 656-60.
 31. Horwich TB, Fonarow GC, Hamilton MA, MacLellan WR, Borenstein J. Anemia is associated with worse symptoms, greater impairment in functional capacity and a significant increase in mortality in patients with advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:1780-6.
 32. Culleton BF, Manns BJ, Zhang J, Tonelli M, Klarenbach S, Hemmelgarn BR. Impact of anemia on hospitalization and mortality in older adults. *Blood* 2006;107:3841-6.
 33. Goresky CA, Gordon ER, Shaffer EA, Paré P, Carassava D, Aronoff A.. Definition of a conjugation of dysfunction in Gilbert's syndrome: studies of the handling of bilirubin loads and of the pattern of bilirubin conjugates secreted in bile. *Clin Sci Mol Med* 1978;53(1):5563-71.
 34. Hopkins PN, Wu LL, Hunt SC. Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol* 1996;16:250-5.
 35. Borucki K, Weikert C, Fisher E, Jakubiczkac S, Luleya C, Westphalet S, et al. Haplotypes in the UGT1A1 gene and their role as genetic determinants of bilirubin concentration in healthy German volunteers. *Clin Biochem* 2009;42:1635-41.
 36. Innocenti F, Grimsley C, Das S, Ramirez J, et al. Haplotype structure of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter in different ethnic groups. *Pharmacogenetics* 2002;12:725-33.
 37. Jirsa M, Petrsek J, Vitek L. Linkage between A(TA)7TAA and -3279T>G mutations in UGT1A1 is not essential for pathogenesis of Gilbert syndrome. *Liver Int* 2006;26:1302-3.
 38. Ferraris A, D'Amato G, Nobili V, Torres B, Marcelini M, Dallapiccola B. Combined test for UGT1A1-3279T>G and A(TA)nTAA polymorphisms best predicts Gilbert's syndrome in Italian pediatric patients. *Genet Test* 2006;10:121-5.