

Interés del estudio de las variantes genéticas del promotor del gen *UGT1A1* en la ictericia neonatal

M.^aL. Seco^a, E. del Río^a, M.^aJ. Barceló^a, A. Remacha^b, G. Ginovart^c, E. Moliner^c y M. Baiget^a

^aServicio de Genética. ^bDepartamento de Hematología.

^cServicio de Pediatría. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

(*An Esp Pediatr* 2002; 56: 139-143)

Antecedentes

Recientemente se ha mostrado la asociación entre un polimorfismo en el promotor del gen *UGT1A1* (asociado con el síndrome de Gilbert) y la presencia de ictericia. Este polimorfismo consiste en la existencia de siete repeticiones TA (TA)₇, en lugar de seis (TA)₆.

Objetivo

Analizar la distribución del genotipo (TA)₇ en una población de recién nacidos para determinar la posible relación entre el síndrome de Gilbert y la ictericia neonatal.

Métodos

Se estudiaron 136 recién nacidos: 21 presentaron ictericia del resto de recién nacidos, 69 eran sanos y el resto mostró diferentes procesos, incluyendo 7 prematuros. El ADN de cada paciente fue utilizado para amplificar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, la región del promotor del gen de la UGT-1 que flanquea la caja TATA donde se encuentra el polimorfismo.

Resultados

Grupo sin ictericia: 53% normales (genotipo 6/6); 40% genotipo 6/7, y 7%, 7/7. Grupo con ictericia: 33% normales, 53% heterocigotos (6/7) y 14% homocigotos (7/7). Al comparar entre los grupos, los recién nacidos con ictericia tenían una tendencia a tener una mayor prevalencia del polimorfismo para el gen de la UGT-1 (p = 0,09).

Conclusión

Este estudio sugiere una relación en la población española entre la ictericia neonatal y el síndrome de Gilbert. Estos datos y otros similares obtenidos por varios autores indican la idoneidad de incluir el escrutinio molecular para el síndrome de Gilbert en el protocolo diagnóstico de la ictericia neonatal. Evidentemente, estudios más amplios permitirán definir cuál es el grado exacto de relación

entre la presencia de una ictericia neonatal marcada y la presencia de este polimorfismo.

Palabras clave:

Síndrome de Gilbert. Ictericia neonatal. Gen UGT1A1. Repeticiones TA.

INTEREST IN THE STUDY OF GENETIC VARIANTS OF THE PROMOTER REGION OF THE *UGT1A1* GENE IN NEONATAL JAUNDICE

Background

A relationship between polymorphism in the promoter region of the *UGT1A1* gene (associated with Gilbert's syndrome) and the development of jaundice has recently been demonstrated. This polymorphism is due to (TA)₇ instead of wild-type (TA)₆.

Objective

To investigate the relationship between Gilbert's syndrome and neonatal jaundice by evaluating the distribution of (TA)₇ in a population of newborns.

Methods

A total of 136 newborns were studied: 21 had neonatal jaundice, 69 were healthy and the remaining newborns had various diseases. DNA from each patient was used to amplify, by polymerase chain reaction, the promoter region of the *UGT1A1* gene, which flanks the TATA box where the polymorphism is located.

Results

In the group without jaundice, 53% of the newborns were normal (6/6 genotype), 40% were 6/7 and 7% were 7/7. In the group with jaundice, 33% of the newborns were normal, 53% were heterozygous (6/7) and 14% were

Correspondencia: Dra. M. Baiget.

Servicio de Genética. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Sant Antoni M.^a Claret, 167. 08025 Barcelona.
Correo electrónico: mbaiget@hsp.santpau.es

Recibido en noviembre de 2000.

Aceptado para su publicación en octubre de 2001.

homozygous (7/7). Comparison of the groups revealed that the prevalence of UGT1A1 polymorphism tended to be greater among jaundiced newborns (p = 0.09).

Conclusion

The results of this study suggest that there is a relationship between neonatal jaundice and Gilbert's syndrome among the Spanish population. These results, together with those of other authors, suggest that genetic screening for Gilbert's syndrome should be included in the investigation of neonatal jaundice in our population. Further studies with a greater number of subjects would determine the exact relationship between marked neonatal jaundice and UGT1A1 polymorphism.

Key words:

Gilbert's syndrome. Neonatal jaundice. UGT1A1 gene. TA repeats.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Gilbert se caracteriza por la existencia de una hiperbilirrubinemia no conjugada crónica, que aparece en ausencia de enfermedad hepática o hemolítica^{1,2}. Se asocia a episodios de ictericia moderada debida a la disminución de la actividad de la enzima uridina-difosfo-glucuronosiltransferasa (UGT-1), responsable de la eficiente excreción biliar de bilirrubina.

El análisis del gen que codifica para esta enzima, localizada en el brazo largo del cromosoma 2 (2q37), ha mostrado una asociación entre mutaciones en el gen que codifica la enzima UGT-1 (*UGT1A1*) y determinadas hiperbilirrubinemias no conjugadas, como el síndrome de Gilbert o el síndrome de Crigler-Najjar tipo II³⁻⁶.

En la mayoría de los pacientes con síndrome de Gilbert se ha descrito la existencia de variantes en el promotor del gen *UGT1A1*. La caja TATA del promotor del gen tiene la estructura (A[TA]₆TAA), mientras que en los individuos con síndrome de Gilbert, existe un par de bases adicional, presentando, por lo tanto, 7 repeticiones TA (A[TA]₇TAA) en lugar de las 6 correspondientes. La presencia de este par de bases adicional se ha asociado con los niveles incrementados de bilirrubina que muestran estos pacientes.

Un grupo de población que presenta, con frecuencia, una hiperbilirrubinemia no conjugada son los recién nacidos. Así, durante los primeros 5 días de vida, aproximadamente la mitad de los recién nacidos desarrollan una ictericia neonatal que se debe, principalmente, a variaciones en las velocidades de síntesis y eliminación de bilirrubina. La ictericia neonatal se considera un proceso multifactorial en el que intervienen, por ejemplo, la variación en la masa de los eritrocitos en el momento del nacimiento, la inducción de enzimas hepáticas fetales por factores ambientales, la sobrecarga de bilirrubina causada por la degradación de hemoglobina fetal o la prematuridad de la actividad de la UGT-1⁷.

En la población española, el 10% de sujetos son homocigotos mutados (TA₇/TA₇) y el 50% son portadores

heterocigotos de un alelo de 7 repeticiones⁸. Considerando la elevada frecuencia del alelo mutado en nuestra población, se ha analizado la distribución del genotipo (TA)₇ en una población de recién nacidos españoles, con el fin de determinar la posible relación entre la presencia de dicho alelo y la ictericia neonatal.

PACIENTES Y MÉTODOS

El objetivo de este estudio ha sido valorar la relación entre la presencia de ictericia neonatal y de mutaciones de la región del promotor del gen de la UGT-1, que condiciona la aparición del síndrome de Gilbert.

Para ello se valoró durante las primeras 72 h de vida sobre una muestra consecutiva de 136 recién nacidos provenientes del Unidad de Neonatología de nuestro hospital la presencia de ictericia neonatal. De los 136 casos valorados en 21 se evidenció ictericia neonatal (determinada visualmente por dos observadores). Además, se intentó valorar la posible relación entre mutaciones para el síndrome de Gilbert, prematuridad e ictericia neonatal en el mismo grupo de recién nacidos. De los 136 neonatos, siete resultaron prematuros.

En cuanto a las características clínicas del grupo estudiado, 69 fueron recién nacidos normales y el resto mostraron diversos diagnósticos, como prematuridad (7 casos), riesgo séptico, ectasia piélica, duplicidad renal, distrés respiratorio, angioma, anemia, bajo peso, hipospadias, soplo cardíaco, fractura de clavícula e hijo de madre de riesgo (diabetes mellitus, virus de la inmunodeficiencia humana [VIH] y de la hepatitis B [VHB] y toxoplasmosis). En el grupo de los 69 recién nacidos sin ningún tipo de anomalía se valoró por separado la prevalencia de las mutaciones de la región del promotor del gen de la UGT-1.

Como grupo control de los recién nacidos con ictericia (21 casos) se utilizó el resto de los recién nacidos sin ictericia (115 casos). Lo mismo se hizo con los casos con prematuridad (7 casos).

El ADN se obtuvo, mediante procedimientos convencionales, a partir de los leucocitos de la sangre del cordón fetal. El ADN de cada paciente se utilizó para amplificar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la región del promotor del gen de la UGT-1 que flanquea la caja TATA donde se encuentra el polimorfismo. Para ello, se empleó un par de cebadores descritos previamente⁵ que amplifican una región de 98 pares de bases correspondientes al alelo (TA)₆ y de 100 pares de bases correspondiente al alelo (TA)₇. La amplificación se realizó en un volumen de 50 µl conteniendo MgCl₂ 50 mM, dNTPs 40 mM, cebadores 10 pmol/µl, tampón 10 × y 5 U de Taq polimerasa en un termociclador MINICYCLER™, con las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 40 s a 58 °C y 40 s a 72 °C, con una extensión final a 72 °C durante 2 min. Los productos de PCR se separaron mediante una

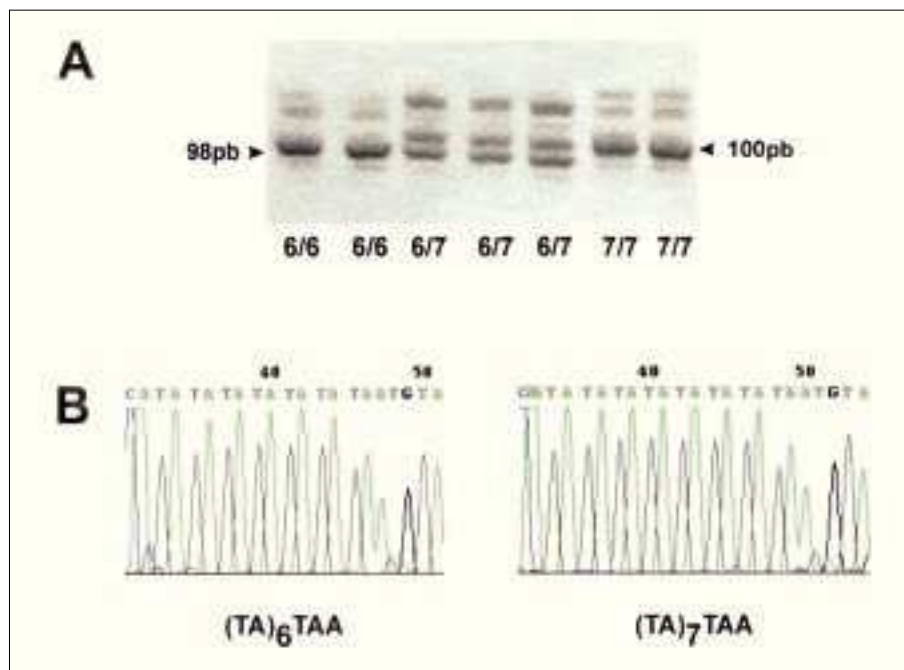


Figura 1. A) Separación en gel de poliacrilamida de los fragmentos de ADN de 98 pares de bases (alelo con 6 repeticiones TA) y de 100 pares de bases (alelo con 7 repeticiones TA). En la parte inferior se indican los genotipos correspondientes a las distintas muestras analizadas. **B)** Secuencias correspondientes a un homocigoto normal TA₆ y a un homocigoto mutado TA₇ de la región del promotor del gen de la UGT-1 que contienen el polimorfismo.

electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% (38:2 acrilamida:bisacrilamida) en *buffer* tris-borato-EDTA. La identificación definitiva de los distintos patrones electroforéticos obtenidos se efectuó mediante secuenciación automática. La figura 1 muestra el patrón de separación electroforética y la secuencia de los alelos TA₆ y TA₇.

RESULTADOS

La distribución de los diferentes genotipos obtenidos en la población evaluada se muestra en la tabla 1. El 51% de los recién nacidos estudiados presentaron un polimorfismo en el promotor del gen *UGT1A1*, siendo homocigotos para el alelo (TA)₇ el 8% y heterocigotos el 43%. El 49% restante mostró los dos alelos (TA)₆ normales (genotipo 6/6).

En la evaluación de la posible relación entre el genotipo mutado y la presencia de ictericia neonatal se observó que el 67% de los 21 recién nacidos que mostraron ictericia neonatal, mostraron la mutación (TA)₇ en al menos uno de sus alelos: el 53% en forma heterocigota y el 14% en forma homocigota). Estos resultados contrastaron de forma considerable con los obtenidos en el grupo que no desarrolló ictericia, en el cual sólo el 47% presentó el polimorfismo (el 40% mostró el genotipo 6/7, mientras que el 7% restante fue 7/7). Esta diferencia demostró una tendencia a la significación ($\chi^2 = 2,76$; $p = 0,09$).

Al estudiar la posible relación entre prematuridad, síndrome de Gilbert e ictericia neonatal, se objetivó que el 71% (57% homocigotos y 14% heterocigotos) de los 7 recién nacidos prematuros (cinco con ictericia neonatal) presentó el par de bases TA adicional, frente al 50% (42% homocigotos, 8% heterocigotos) de los recién nacidos a

TABLA 1. Distribución genotípica del gen *UGT1A1* en la población estudiada

Genotipo	Ictericia (+) (n [%])	Ictericia (-) (n [%])
6/6	7 (33)	61 (53)
6/7	11 (53)	46 (40)
7/7	3 (14)	8 (7)
Total	21	115

término; sin embargo, no existía diferencia significativa (χ^2 con corrección de continuidad = 0,602; $p = 0,44$). Estos datos vienen necesariamente marcados por la corteza de la muestra de prematuros.

En cuanto al grupo de 69 recién nacidos sin ningún tipo de proceso, el 47% mostró un genotipo normal (6/6), mientras que el 46% fue heterocigoto (6/7) y el restante 7% homocigoto (7/7). Estos porcentajes son similares a los que aparecen en la población española control de 100 individuos adultos analizada en un estudio previo (6/6, 40%; 6/7, 51%; 7/7, 9%)⁸.

DISCUSIÓN

Los niveles séricos de bilirrubina dependen de numerosos factores que pueden modificar su producción y su excreción. Entre los que afectan la producción están la masa eritroide y la semivida de los hematíes; y en cuanto a la excreción, la conjugación de la bilirrubina en el hígado y su transporte. La función de la bilirrubina, como un potente antioxidante, conlleva mantener unos niveles adecuados de esta sustancia. La enzima UGT1A1, que se encarga de regular la conjugación de la bilirrubina, ejer-

ce un papel primordial en la regulación de estos niveles en condiciones fisiológicas^{1-7,9}.

Evidentemente uno de los períodos más críticos en este metabolismo es el neonatal. Fisiológicamente, la enzima debe madurar y la actividad normal de la enzima UGT no se alcanza hasta transcurridos 3 meses. Debido a los cambios en la eritropoyesis en ese mismo período, al trastorno enzimático transitorio y a otros factores aparece la denominada ictericia fisiológica del recién nacido^{1,2,7}. A pesar de los efectos beneficiosos antioxidantes de la bilirrubina, una hiperbilirrubinemia neonatal grave es un problema médico serio que puede desembocar en un cuadro fatal de Kernicterus^{2,7}.

La prevalencia de las alteraciones del gen *UGT1* (adición de un TA en la caja TATA de la región promotora 5') es extraordinariamente frecuente en la población general: la mitad de la población es heterocigota y el 5-10% son homocigotos^{6,8,9}. La relación entre la cifra de bilirrubina y las anomalías genéticas que causan el síndrome de Gilbert ha venido despertando creciente interés, sobre todo en el campo de la neonatología. Este aspecto se ha valorado desde el punto de vista de su posible asociación a anemias hemolíticas hereditarias y su papel en el nivel de ictericia fisiológica que presenta cada recién nacido.

En los adultos se ha demostrado una relación entre los niveles de bilirrubina y la presencia de mutaciones en el gen *UGT1* en pacientes con anemias hemolíticas hereditarias (déficit de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, beta-talasemia homocigota y heterocigota, esferocitosis hereditaria, etc.) e incluso se ha relacionado con la presencia de una mayor prevalencia de cálculos biliares en estos pacientes¹⁰⁻¹². También se ha implicado el polimorfismo del gen *UGT1* en los niveles de hiperbilirrubinemia de las anemias diseritropoyéticas congénitas¹³.

En el período neonatal se ha establecido una relación en los casos de esferocitosis hereditaria que presentan ictericia neonatal importante y la homocigocidad para la mutación del gen *UGT1*¹⁴. En el caso del déficit de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD), esta relación no está tan clara, puesto que en un estudio realizado en Cerdeña no se ha demostrado esta relación¹⁵ y, en cambio, sí se ha demostrado el compromiso del polimorfismo del promotor del gen *UGT1* en la ictericia neonatal en una población de origen sefardita con déficit de G6PD¹⁶.

Aparte de los casos con anemia hemolítica, la ictericia fisiológica neonatal requiere un manejo clínico adecuado; por ejemplo, es uno de los factores implicados en la controversia sobre la fecha adecuada para dar de alta a los recién nacidos¹⁷. En este sentido se ha objetivado que los neonatos con la homocigocidad para el polimorfismo (TA)₇ presentan un incremento mayor de la bilirrubina los días 1 y 2 del período neonatal¹⁸. Un aspecto muy interesante, no valorado en nuestro estudio, es la relación observada entre la presencia del polimorfismo y el desarrollo de ictericia neonatal prolongada relacionada con la

lactancia materna¹⁹. En este mismo sentido, en la población japonesa los casos con hiperbilirrubinemia no fisiológica presentan una mayor frecuencia de un polimorfismo frecuente en esa población (en el exón 1 del gen *UGT1* hay un cambio de G → A en el nucleótido 211, lo que genera el cambio de una glicina por arginina en el aminoácido 71, G71R)²⁰. Todo esto sugiere la implicación de anomalías del gen *UGT1* en la hiperbilirrubinemia neonatal excesiva observada en diferentes etnias. Nuestro estudio también apoyaría estos datos.

En el presente estudio se ha observado que en el 67% de los neonatos con ictericia neonatal presentaban el polimorfismo del gen *UGT1A1* (heterocigoto u homocigoto), lo cual sugiere una relación entre la presencia del polimorfismo y la ictericia de los recién nacidos en la población española. Sin embargo, el grado de esta asociación no se ha podido definir exactamente por las dificultades intrínsecas de un estudio como éste, ya que otros factores de tipo físico, bioquímico o genético también pueden contribuir al desarrollo de ictericia en recién nacidos^{3,6,9,10}.

Si se consideran nuestros resultados, otros datos existentes en la bibliografía y la relativa facilidad para el estudio del polimorfismo en el promotor del gen *UGT1A1* se plantea la idoneidad de incluir el escrutinio molecular del síndrome de Gilbert como una prueba adicional más en el protocolo diagnóstico de la ictericia neonatal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chowdhury JR, Chowdhury NR, Wolkoff AW, Arias JM. Heme and bile pigment metabolism. En: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Schafritz DA, eds. *The liver: Biology and pathobiology*. Nueva York: Raven Press, 1994; 471-504.
2. Chowdhury JR, Jansen PLM. Bilirubin metabolism and its disorders. En: Zakim D, Boyer TD, eds. *Hepatology*, 3^a ed. Filadelfia: WB Saunders, 1996; 343-368.
3. 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; 333: 1171-1175.
4. Aono S, Adachi Y, Uyama E, Yamada Y, Keino H, Nanno T et al. Analysis of genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome. *Lancet* 1995; 345: 958-959.
5. Monaghan G, Ryan M, Seddon R, Hume R, Burchell B. Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *Lancet* 1996; 347: 578-581.
6. Sampietro M, Iolascon A. Molecular pathology of Crigler-Najjar type I and II and Gilbert's syndromes. *Haematologica* 1999; 84: 150-157.
7. Maisels MJ. Neonatal jaundice. En: Avery GB, ed. *Neonatology: Pathophysiology and management of the newborn*. Filadelfia: Lippincott, 1987; 534-629.
8. Fernández Salazar JM, Remacha A, Del Río E, Baiget M. Distribución del genotipo A(TA)₇TAA asociado al síndrome de Gilbert en la población española. *Med Clin (Barc)* 2000; 115: 540-541.
9. Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: A balan-

- ced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? Proc Natl Acad Sci (USA) 1998; 95: 8170-8174.
10. Iolascon A, Faienza MF, Goirdani L, Perrotta S, Riggio G, Meloni GF et al. Bilirubin levels in the acute hemolytic crisis of G6PD deficiency are related to Gilbert's syndrome. Eur J Haematol 1999; 62: 307-310.
 11. Galanello R, Cipollina MD, Dessi C, Giagu N, Lai E, Cao A. Co-inherited Gilbert's syndrome: A factor determining hyperbilirubinemia in homozygous beta-thalassemia. Haematologica 1999; 84: 103-105.
 12. Miraglia del Giudice E, Perrotta S, Nobili B, Specchia C, d'Urzo G, Iolascon A. Coinheritance of Gilbert's syndrome increases the risk for developing gallstones in patients with hereditary spherocytosis. Blood 1999; 94: 2259-2262.
 13. Wickramasinghe SN, Thein SL, Srichairatanakool S, Porter JB. Determinants of iron status and bilirubin levels in congenital dyserythropoietic anaemia type I. Br J Haematol 1999; 107: 522-525.
 14. Iolascon A, Faienza MF, Moretti A. UGT1 promoter polymorphism accounts for increased neonatal appearance of hereditary spherocytosis. Blood 1998; 91: 1093.
 15. Iolascon A, Faienza MF, Perrotta S, Meloni GF, Riggio G, Miraglia del Giudice E. Gilbert's syndrome and jaundice in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient neonates. Haematologica 1999; 84: 99-102.
 16. Kaplan M, Renbaum P, Levy-Lahad E, Hammerman C, Lahad A, Beutler E. Gilbert syndrome and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A dose-dependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia. Proc Natl Acad Sci (USA) 1997; 94: 12128-12132.
 17. Kiely M, Drum A, Kessel W. Early discharge. In the end, it is judgement. Clin Perinatol 1998; 25: 539-553.
 18. Bancroft JD, Kreamer B, Gourley GR. Gilbert syndrome accelerates development of neonatal jaundice. J Pediatr 1998; 132: 656-660.
 19. Manoghan G, McLellan A, McGeehan A, Livolti S, Mollica S, Salemi I et al. Gilbert's syndrome is a contributory factor in prolonged unconjugated hyperbilirubinemia of the newborn. J Pediatr 1999; 134: 441-446.
 20. Maruo Y, Nishizawa K, Sato H, Doida Y, Suimada M. Association of neonatal hyperbilirubinemia with bilirubin UDP-glucosyltransferase polymorphism. Pediatrics 1999; 103: 1224-1227.