



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO

↳ Instituto de Ciências da Saúde

DUPLICAÇÃO [TA] NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *UGT1A1*: REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialidade em
Hematologia e Imunohemoterapia

por

Susana Cristina Fidalgo Monteiro

Fevereiro, 2012



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Instituto de Ciências da Saúde

**DUPLICAÇÃO [TA] NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE
UGT1A1: REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialidade em
Hematologia e Imunohemoterapia

Por Susana Cristina Fidalgo Monteiro

Sob orientação de:

Professor Doutor Elísio Costa

Professor Doutor Rui Pimenta

Fevereiro, 2012

Resumo:

O Síndrome de Gilbert (SG) é uma entidade clínica comum caracterizada por uma forma benigna de hiperbilirrubinemia não conjugada, na ausência de disfunção hepática e de hemólise. O seu diagnóstico, inicialmente de carácter presuntivo, passou a dispor de caracterização molecular quando, em 1995, foram descritas as primeiras mutações no gene UridinoDifosfato-glucuronosil transferase-1 (*UGT1A1*). Em particular, uma duplicação de 2 nucleotídeos [TA] na região promotora do gene, que tem vindo a revelar-se como a principal causa de SG em todas as populações caucasianas estudadas. A homozigotia para a duplicação TA na região promotora do gene *UGT1A1* tem vindo a ser associada com SG. Desde então, muitos estudos têm vindo a ser realizados no sentido de associar esta mutação com outras patologias, que também associam hiperbilirrubinémia, bem como com algumas terapêuticas utilizadas, como agentes quimioterápicos ou terapêutica com estrogénios.

O objectivo deste trabalho foi compilar e sintetizar a literatura existente, para calcular a frequência mundial, bem como a frequência por país e por continente, da duplicação TA na região promotora do gene *UGT1A1*, associada a SG.

Foram incluídos, neste trabalho, 100 estudos, realizados em vinte e nove países, de quatro continentes. Não se obtiveram estudos do continente africano. Obteve-se uma frequência mundial de 4,8% para o genótipo 7/7 e de 21,8% para o alelo 7. As frequências obtidas, por continente, foram 10,5% na Europa, 10,7% na América do Norte, 10,2% na América do Sul, 13,8% na América Central, 15% na Oceânia e 1% na Ásia. A análise estatística Q de Cochran e I^2 permitiu-nos avaliar a homogeneidade dos estudos incluídos na análise, concluindo-se pela sua heterogeneidade [$p < 0,001$, $I^2 = 92,3\%$ (genótipo 7/7)]; [$p < 0,001$, $I^2 = 96\%$ (alelo 7)], a nível global.

Em conclusão, este trabalho demonstrou que há heterogeneidade de valores, entre os diversos estudos incluídos. Com excepção da Ásia, todos os outros países apresentam uma prevalência elevada da duplicação TA no promotor do gene *UGT1A1*, o que justifica a sua pesquisa sistemática, tanto no diagnóstico, como na sua associação a outras patologias que também condicionam hiperbilirrubinémia, e em situações em que o défice da enzima UGT1A1 está associado com diminuição da metabolização hepática de alguns fármacos.

Abstract:

The Gilbert Syndrome (GS) is a common clinical entity characterized by a benign form of unconjugated hyperbilirubinemia in the absence of liver dysfunction and hemolysis. The diagnosis, initially presumptive in nature, began to use molecular characterization when, in 1995, were described the first mutations in UDP – glucuronosyltransferase-1 (*UGT1A1*). In particular, a duplication of two nucleotides [TA] in the promoter region of the gene, which has revealed itself as the leading cause of the GS in the Caucasian population studied. Affected individuals are homozygous for the variant of the promoter and they have seven despite of six repeats. Since then, many studies have been undertaken in order to relate this mutation with other pathologies, as well as some therapies used as chemotherapeutic agents or estrogen therapy.

The aim of this study was to compile and synthesize the literature to calculate the global frequency, and frequency by country and continent, of TA duplication in the promoter region of the gene, associated with GS. One hundred studies were included in this study, conducted in twenty-nine countries of four continents. No studies were obtained from Africa. It was obtained an overall frequency of 4,8% for genotype 7/7 and of 21,8% for allele 7. The frequencies obtained per continent were, 10,5% in Europe, 10,7% in North America, 10,2% in South America, 13,8% in Central America, 15% in Oceania and 1% in Asia. Statistical analysis of Cochran Q and I^2 allowed us to evaluate the homogeneity of the studies included, concluding heterogeneity ($p < 0,001$, $I^2 = 92,3\%$ (genótipo 7/7); ($p < 0,001$, $I^2 = 96\%$ (alelo 7)), at global.

In conclusion, thus study demonstrated that there is heterogeneity among the various studies included. With the exception of Asia, all countries have a high prevalence of this mutation, which justifies its systematic research, both in diagnosis, as in its association with other diseases that also causes hyperbilirubinemia, and in situations where the deficit of UGT1A1 enzyme is associated with decreased hepatic metabolism of some drugs.

Agradecimentos:

Gostaria de agradecer aos meus orientadores, Professor Doutor Elísio Costa, da Universidade Católica pela disponibilidade e cooperação, e ao Professor Doutor Rui Pimenta, da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, pela paciência, apoio e disponibilidade demonstradas.

Gostaria também de agradecer a Kai Sprecher, design da Universidade Católica. A sua disponibilidade e simpatia foram uma grande ajuda.

Um agradecimento muito especial à minha família, em especial ao meu marido e à minha filha. Pela paciência infundável e porque privaram muito da minha atenção e da minha companhia, para que este trabalho fosse possível.

Obrigada aos meus pais, pois foram um apoio imprescindível.

Lista de Abreviaturas:

SG – Síndrome de Gilbert

SCN – Síndrome de Crigler-Najjar

UDP-UGT1A1 – Uridinodifosfato-glucuronosiltransferase 1

DHC – Doença hemolítica crónica

EH – Esferocitose hereditária

G6PD – Glicose-6-fosfato-desidrogenase

Índice:

Parte I - Introdução	8
1- Metabolismo da bilirrubina	9
2- Gene <i>UGT1A1</i>	14
3- Patologias associadas com alterações no gene <i>UGT1A1</i>	15
4- Associação do Síndrome de Gilbert com outras patologias	17
5- Meta-análise	21
Parte II - Objetivos	23
Parte III - Material e Métodos	25
Parte IV- Resultados	28
Parte V- Discussão	39
Parte VI- Bibliografia	45

Índice de tabelas:

Tabela I – Artigos incluídos na meta-análise. Continente, país, número de indivíduos incluídos no estudo e frequência do genótipo 7/7 e do alelo 7.	29
Tabela II – Frequências médias estimadas, por país e por continente.	33
Tabela III – Análise Q de Cochran e valor de I^2 para o genótipo 7/7.	35
Tabela IV – Análise Q de Cochran e de I^2 para o alelo 7.	35

Índice de figuras:

Figura 1 - Estrutura química da bilirrubina.	9
Figura 2 - Esquema ilustrativo do metabolismo da bilirrubina.	12
Figura 3 - Fórmula estrutural da bilirrubina conjugada ou diglicuronidada.	13
Figura 4 - Esquema ilustrativo da excreção da bilirrubina e do urobilinogénio.	13
Figura 5 - Esquema ilustrativo do cromossoma 2q37.	14
Figura 6 - Ilustração da estrutura tridimensional do gene <i>UGT1A1</i> .	14
Figura 7 - Esquema ilustrativo do Locus do gene <i>UGT1A1</i> .	15
Figura 8 - Frequência mundial do genótipo 7/7.	37
Figura 9 - Frequência mundial do alelo 7.	38

PARTE I - Introdução

1 – Metabolismo da bilirrubina

A bilirrubina é o produto final da decomposição da hemoglobina e o seu doseamento tem vindo a ser utilizado como um marcador de diagnóstico de doenças hepáticas e hematológicas. É um composto endógeno que pode ser neurotóxico, especialmente em recém-nascidos¹. No entanto, é reconhecido que a bilirrubina não-conjugada exerce uma actividade anti-oxidante forte e que uma hiperbilirrubinemia ligeira pode ter efeitos positivos para a saúde^{2,3}.

A bilirrubina é um composto com peso molecular de 584 Kd, com quatro anéis pirrol, ligados por dois grupos de metileno (-CH=) e um grupo meteno (-CH₂=) (fig. 1). A sua estrutura está directamente relacionada com as suas características físicas¹.

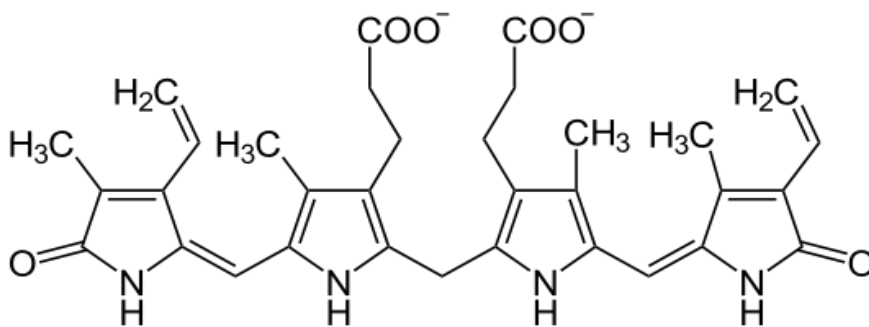
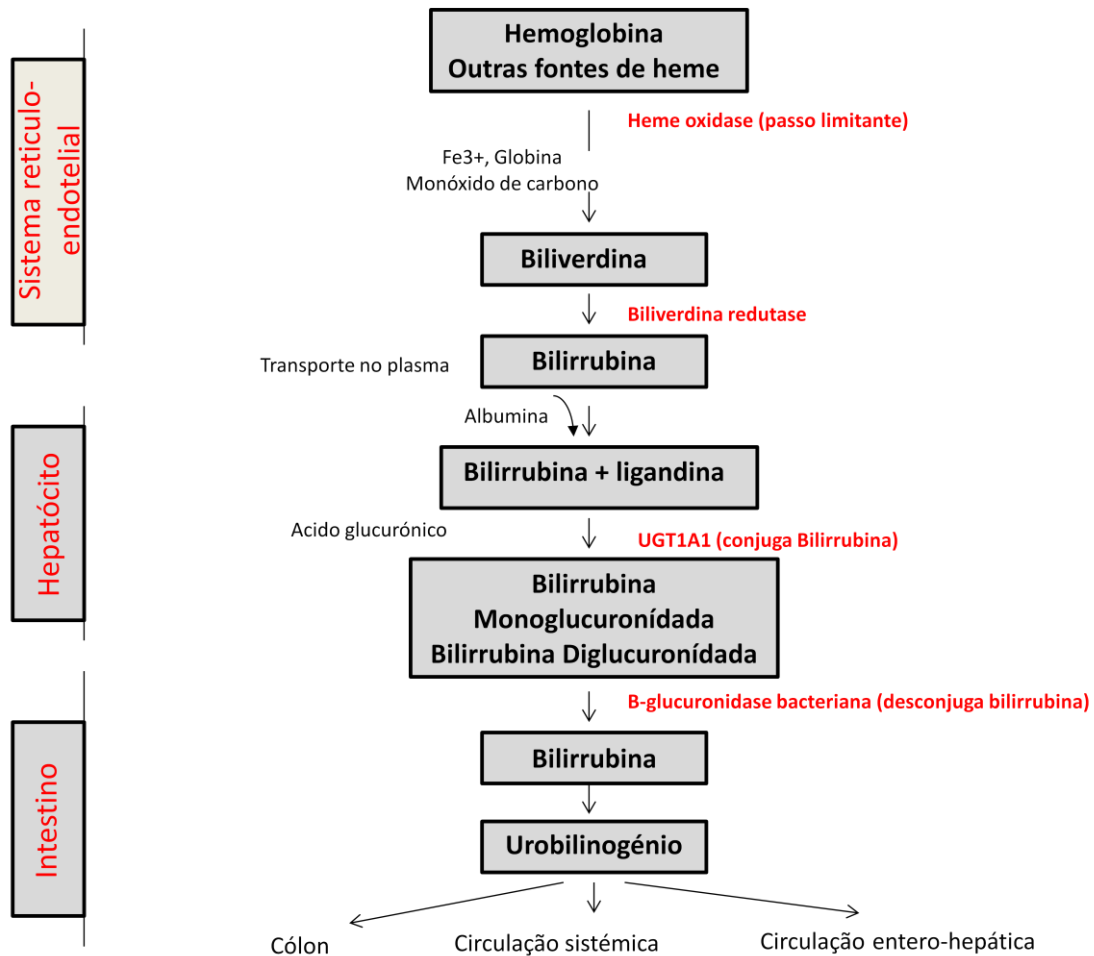


Figura 1 - Estrutura química da molécula de bilirrubina.

O metabolismo da bilirrubina envolve 4 passos: formação e transporte, metabolização hepática, fase intestinal e excreção renal (fig. 2).



UGT1A1 – Uridinodifosfato-glucuronosiltransferase

Figura 2 – Esquema ilustrativo do metabolismo da bilirrubina.

Aproximadamente 70 a 80% da bilirrubina resulta do metabolismo do grupo heme da hemoglobina, proveniente da senescência dos eritrócitos, sendo libertada durante a decomposição dos mesmos. A restante bilirrubina resulta do metabolismo de outras proteínas com o grupo heme, como o citocromo P450, isoenzimas, mioglobina e outras proteínas que apresentam o grupo heme⁴. A hemoglobina é metabolizada ao nível do baço e no sistema reticuloendotelial, sendo degradada em heme e globina. A abertura do anel do grupo heme na ponte de carbono α , origina ferro livre e biliverdina. Esta clivagem é catalisada pela enzima heme-oxigenase. A biliverdina é rapidamente reduzida a bilirrubina livre, pela enzima citosólica biliverdina-redutase. Esta forma de

bilirrubina é denominada como não conjugada e é lipossolúvel^{5,6,7,8,9}. Num adulto normal, são formadas cerca de 250-300 mg de bilirrubina, diariamente⁵.

As concentrações séricas da bilirrubina estão directamente relacionadas com a quantidade produzida e com a capacidade que o organismo tem para a eliminar¹⁰. A bilirrubina não conjugada pode entrar em circulação de duas formas: por síntese *de novo* ou por reabsorção do intestino após excreção biliar^{11,12}. A maioria da bilirrubina circulante no adulto advém da síntese *de novo*. No entanto, no recém-nascido, a reabsorção é uma fonte importante de bilirrubina sérica.

Após conjugação com o ácido glucurónico, a bilirrubina pode ser eliminada, tanto por via hepática, como por via renal, em contrapartida a bilirrubina não conjugada ou indirecta liga-se reversivelmente à albumina, forma em que é transportada no plasma.

O fígado ocupa papel central no metabolismo da bilirrubina, sendo responsável pela sua captação, conjugação e excreção. Em condições normais, a bilirrubina não conjugada é rapidamente captada e metabolizada a nível hepático, que a prepara para ser eliminada. A existência de proteínas transportadoras, na membrana do hepatócito, que promovam a entrada da bilirrubina está ainda em investigação¹³. Após a sua entrada, a bilirrubina é acumulada nos hepatócitos. Existe alguma controvérsia quanto ao mecanismo responsável pela manutenção da bilirrubina dentro do hepatócito. Estudos sugerem que a bilirrubina se dissocia da albumina nos sinusóides sendo posteriormente transportada através da membrana plasmática dos hepatócitos, através de proteínas transportadoras. Uma vez transferida para dentro do hepatócito, a bilirrubina liga-se, pelo menos em parte, a uma proteína citoplasmática denominada ligandina. Essa ligação pode impedir o efluxo dessa substância do hepatócito para o plasma. No entanto, existe evidência que o fluxo de bilirrubina na membrana do hepatócito é bidireccional, estando estimado que cerca de 40% da bilirrubina que entra no hepatócito volta de novo ao plasma^{14,15}. No retículo endoplasmático do hepatócito, a maioria da bilirrubina é mono- e diglucuronidada. Apenas uma pequena quantidade de bilirrubina é convertida em substâncias solúveis na água, por conjugação de outras substâncias que não o ácido glucurónico¹⁶.

Acredita-se que existam proteínas transportadoras responsáveis pelo transporte da bilirrubina da membrana plasmática até o retículo endoplasmático. No retículo, a bilirrubina não conjugada, que é lipossolúvel, é convertida pela acção da enzima UGT1A1 (UridinoDifosfato-glucuronosil transferase-1) em compostos solúveis em

água (bilirrubina conjugada) que são o monoglicuronato (15% do total) e o diglicuronato (85% do total) de bilirrubina¹⁶ (fig. 3).

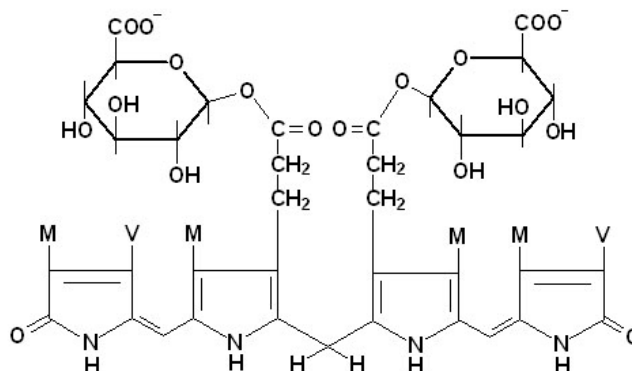


Figura 3 - Fórmula estrutural da bilirrubina conjugada ou diglicuronidada.

Em situações de déficit da enzima UGT1A1, tais com em doentes com SG, e em recém-nascidos, a bilirrubina é excretada predominantemente sob a forma de bilirrubina monoglicuronina^{16,17}. Existe evidência de uma relação directa entre a quantidade de bilirrubina mono ou diglicuronina e a actividade da enzima UGT1A1¹⁷. Esses compostos (monoglicuronato e diglicuronato) são passíveis de transporte rápido através da membrana canalicular para a bile¹⁸. O processo de excreção de bilirrubina para o canalículo biliar requer energia, sendo um dos passos mais susceptíveis de comprometimento quando a célula hepática é lesada. A informação quanto ao movimento da bilirrubina conjugada dentro do hepatócito é ainda escassa. No entanto, deverá existir algum tipo de mecanismo que a encaminhe para os canalículos, já que apenas uma reduzida quantidade reflui para o plasma¹⁹. A excreção da bilirrubina conjugada está dependente da quantidade de sais de bile e de lípidos biliares excretados. A bilirrubina conjugada adere às membranas celulares tal como a bilirrubina não conjugada, no entanto não consegue transpô-las. Assim os microtúbulos conseguem conduzir a bilirrubina conjugada, do local onde é conjugada até ao local de excreção^{19,20}.

A bilirrubina conjugada alcança o lúmen intestinal através da bile. A bilirrubina conjugada, na fase intestinal, pode ser excretada para as fezes ou metabolizada em urobilinogénio. A transformação em não conjugada tem lugar no intestino, através da

acção de enzimas intestinais. Esta conversão pode ocorrer de forma não enzimática ou então mediada pela enzima β -glucuronidase produzida por algumas bactérias intestinais²¹. Isto leva à formação de quantidades substanciais de bilirrubina não conjugada e este pigmento pode sofrer reabsorção intestinal (circulação entero-hepática)²² (fig. 4).

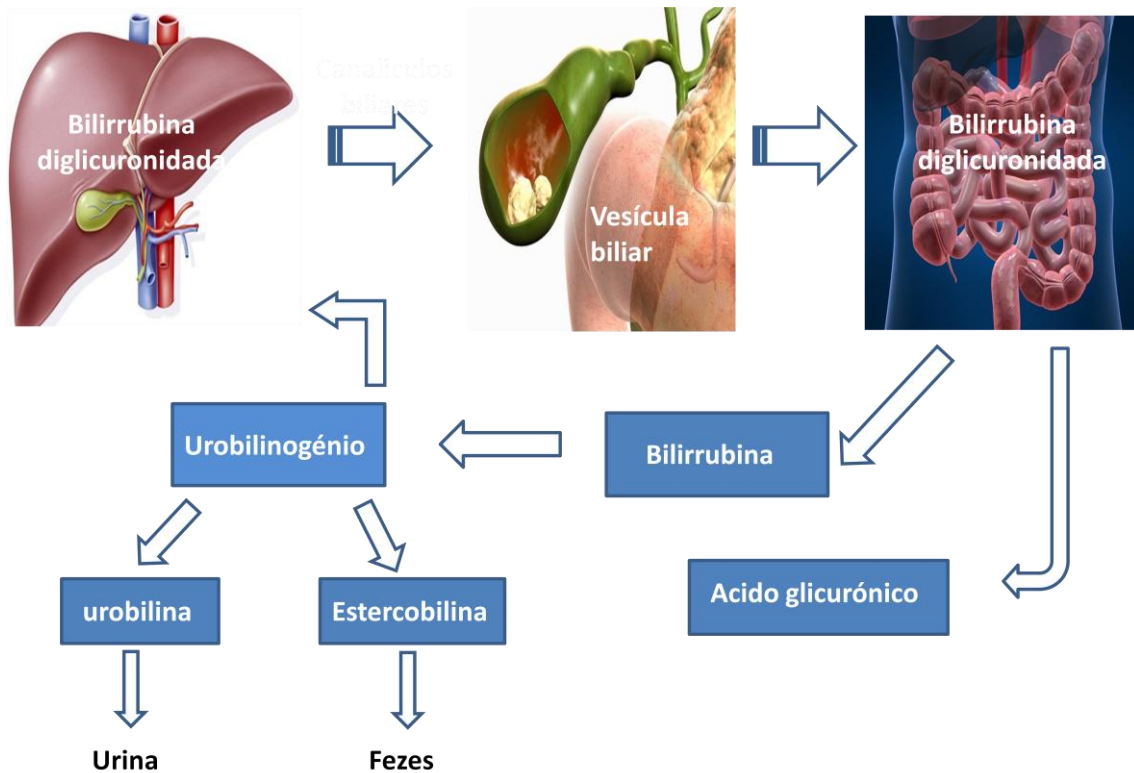


Figura 4 - Esquema ilustrativo da excreção da bilirrubina e do urobilinogénio.

Tal absorção pode levar a um aumento dos níveis séricos de bilirrubina não conjugada. Nos recém-nascidos, a flora bacteriana ainda não está desenvolvida e a formação de urubilinóides é insignificante. Prevalece, assim, a não conjugação, que contribui para o aumento dos níveis séricos de bilirrubina, que se observam na icterícia neonatal²³. O urobilinogénio é uma substância hidrossolúvel pelo que é reabsorvida pela mucosa intestinal através da circulação entero-hepática. Posteriormente excretado, pelos rins, através da urina²⁴.

Em condições normais, a bilirrubina não é detectável na urina por métodos convencionais. A bilirrubina indirecta, em virtude de estar fortemente ligada à albumina

e ser insolúvel em água, não é filtrada pelo glomérulo. A bilirrubina directa está menos ligada à albumina e pode aparecer na urina. Os sais biliares aumentam a filtração renal de bilirrubina directa, e conseqüentemente uma diminuição de excreção de sais de bile diminui o grau de excreção de bilirrubina^{19,20}.

2 – Gene *UGT1A1*

O gene *UGT1A1*, está localizado no braço longo do cromossoma 2 (2q37)^{25,26} (fig. 5).

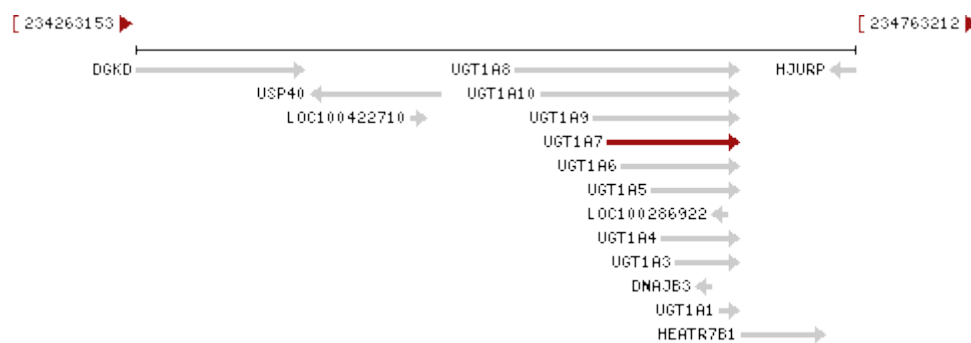


Figura 5 – Esquema ilustrativo do cromossoma 2q37²⁷.

Este gene, (fig. 6) que codifica para uma proteína, cuja principal função é a glucuronidação da bilirrubina, compreende 5 exões, sendo o primeiro específico desta isoforma e os restantes 4 comuns a todas as restantes 8 isoformas codificadas neste *locus*^{25,28} (fig. 7).

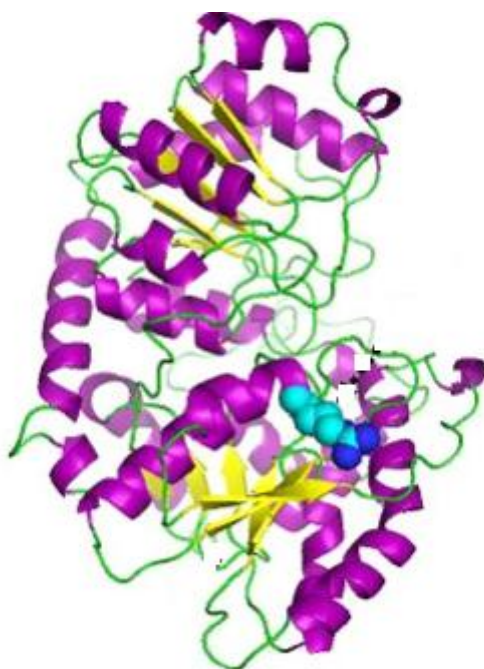


Figura 6 – Ilustração da estrutura tridimensional do gene *UGT1A1*.

Na região codificante deste gene foram identificadas várias mutações associadas a SG²⁹. A duplicação de um par de nucleótidos TA no elemento TA(6)TAA na região promotora deste gene, tem vindo a ser associada com SG³⁰. Nas populações caucasianas estudadas, esta duplicação tem vindo a revelar-se como a principal causa de SG^{31,32}. Em indivíduos caucasianos, o elemento TATAA, é o local de ligação do Factor de Transcrição IID, que regula o início da transcrição²⁹. A presença da duplicação TA no elemento A(TA)6TAA diminui a eficiência de ligação do Factor de Transcrição IID, condicionando um decréscimo na expressão do gene *UGT1A1*, e consequentemente uma redução na quantidade de enzima produzida. Esta redução é tanto mais acentuada quanto maior o número de repetições TA²⁹. Em consequência, diminui a actividade da enzima UGT1A1 e aumenta os níveis de bilirrubina, tanto em indivíduos normais como em portadores de outras patologias que condicionem também hiperbilirrubinémia³³⁻⁴⁴. A frequência estimada desta mutação é 38,7% na população europeia, 16% na população de origem asiática e 42,6% na população de origem africana³¹. Beutler et al.³¹ previram uma frequência de homozigotia na população caucasiana de 15%.

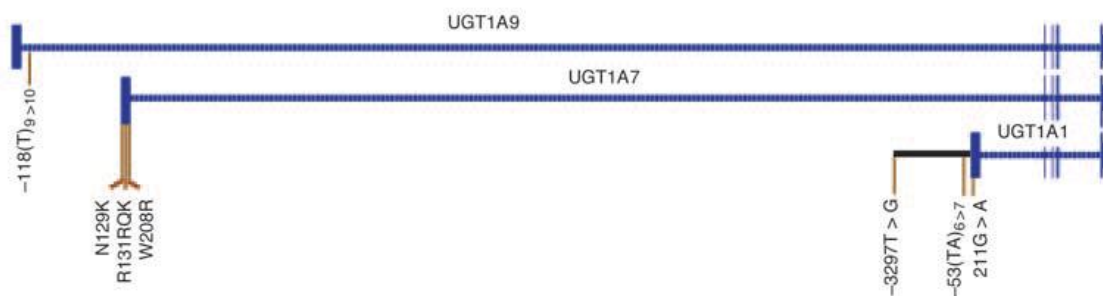


Figura 7 – Esquema ilustrativo do Locus do gene *UGT1A1*⁴⁵.

3 – Patologias associadas com alterações no gene *UGT1A1*

O SG, a causa mais comum de hiperbilirrubinémia ligeira, é caracterizado por episódios de icterícia, na ausência de anemia hemolítica e de alterações da função hepática. Resulta de aumento na concentração sérica de bilirrubina não conjugada, devida a uma deficiência parcial da glucuronidação hepática de bilirrubina, por diminuição de cerca de 30% da actividade da enzima *UGT1A1*^{46,47}.

O SG, geralmente, apresenta-se durante a adolescência ou em jovens adultos. Em vários estudos, baseados no doseamento de bilirrubina total, o SG foi identificado em 3% a 6% da população, sendo mais frequente no homem (razão homem/mulher de 4:1). Esta disparidade poderá estar relacionada com o facto de o homem ter uma massa eritrocitária maior, e como tal um maior aporte hepático de bilirrubina, e/ou com a inibição das enzimas da glucuronidação causada pelos androgénios⁴⁸.

No entanto, está descrita uma baixa correlação entre o doseamento hepático da enzima *in vitro* e o nível sérico de bilirrubina total. Em doentes com SG, este nível de bilirrubina total varia entre 1 e 6 mg/dl, 95 % da qual é não conjugada⁴⁹.

O diagnóstico do SG baseia-se no quadro clínico e na exclusão das causas mais comuns de hiperbilirrubinémia não conjugada, nomeadamente doenças hepáticas e hematológicas. O SG é uma patologia benigna, e por isso, durante muitos anos o diagnóstico da doença foi de exclusão. O diagnóstico baseava-se apenas numa hiperbilirrubinemia não conjugada não superior a 6 mg/dl e na ausência de qualquer outra patologia associada. Mais recentemente, o SG foi associado à duplicação TA na região promotora do gene *UGT1A1*. A associação entre a homozigotia para o alelo TA7

e SG de transmissão autossômica recessiva, veio permitir fazer um diagnóstico directo, por técnicas de biologia molecular³¹.

O Síndrome de Crigler-Najjar (SCN) é outra patologia relacionada com o gene *UGT1A1*. Neste caso, há um défice grave da actividade da enzima UGT1A1⁵⁰. Este síndrome, tipo 1 e 2, é extremamente raro, pelo que a sua incidência estimada é de 1 em cada 1.000.000 de nascimentos. O SCN manifesta-se logo nas primeiras horas de vida, através do aparecimento de icterícia severa devida ao aumento bilirrubina não conjugada levando, por vezes, à necessidade de transfusão permuta.

A distinção clínica entre o SCN tipo I e tipo II baseia-se na eficácia da terapia com fenobarbital e nos níveis de bilirrubina. No SCN tipo 1, o recém-nascido já apresenta icterícia persistente logo após o nascimento, podendo desenvolver uma intoxicação cerebral pelo excesso de bilirrubina, chamada de kernicterus, que pode levar à morte. A concentração sérica de bilirrubina pode chegar até 50 mg/dl, ultrapassando muito o limite da toxicidade. No SCN tipo 2, o quadro é mais ligeiro e a icterícia pode surgir após alguns anos de vida. A ocorrência de kernicterus é rara e a concentração de bilirrubina sérica não costuma ultrapassar 10 a 20 mg/dl. O fenobarbital induz um decréscimo rápido da bilirrubina no plasma de indivíduos com SCN tipo II, enquanto que, em crianças com SCN tipo I não tem qualquer actividade. A eficácia do fenobarbital mantém a concentração da bilirrubina abaixo do limiar da neurotoxicidade. Esta terapêutica é bem tolerada e efectiva a longo prazo. Para o SCN tipo I, o único tratamento possível é o transplante hepático^{48,51,52,53}. Neste caso, o risco de neurotoxicidade é elevado, apesar da fototerapia diária e crónica. O diagnóstico da doença é feito quando, nos primeiros anos de vida, se manifesta uma hiperbilirrubinemia não conjugada grave. No entanto, é obrigatório eliminar outras possíveis causas de hiperbilirrubinemia, nomeadamente síndromes hemolíticas. Podem fazer-se análises dos derivados glucuroconjugados da bilirrubina no soro, por HPLC, no entanto a sua interpretação é difícil em recém-nascidos. A análise destes derivados na bile pode ser útil, no entanto, este processo é mais complicado pela necessidade de entubação duodenal para obtenção da bile^{51,52,53}. Presumindo-se que se trata de SCN, deve testar-se a indução com fenobarbital para distinguir o tipo I ou II da doença. O diagnóstico definitivo do SCN tipo I baseia-se na total inactividade da enzima hepática UGT1A1. Esta confirmação faz-se, normalmente, quando a criança atinge 3 meses de vida, através de biopsia hepática.

4 – Associação do SG com outras patologias

4.1- Relação com o agente quimioterápico irinotecano

O irinotecano é um dos agentes quimioterápicos mais efectivo no tratamento do cancro colorectal metastizado^{54,55}. O irinotecano é um derivado semi-sintético da camptotecina e actua como inibidor da topoisomerase intracelular⁵⁶. *In vivo*, o pró-fármaco é metabolizado pela carboxilesterase, no seu metabolito activo, SN-38. O SN-38 é inactivado pela enzima UGT1A1 em SN-38G, que é excretado pela bile⁵⁷.

Os efeitos secundários mais comuns da terapêutica com irinotecano incluem neutropenia, neutropenia febril, náuseas, alopecia e diarreia. Esta última representa a principal e maior consequência da toxicidade e o principal factor limitante da dose. Este efeito secundário ocorre porque a betaglucuronidase do intestino reactiva o SN-38G para o metabolito activo SN-38^{58,59,60}.

A UGT1A1, enzima essencial para a inactivação do SN-38, está também envolvida no metabolismo da bilirrubina e de glucuronidação de SN-38⁶¹. Em comparação com o genótipo selvagem (6/6), indivíduos que exibem o genótipo (7/7) têm uma redução de 30% na actividade transcricional do gene e consequentemente são mais predispostos aos efeitos colaterais associados ao SN38⁶². Vários estudos têm evidenciado associação entre a duplicação TA na região promotora do gene *UGT1A1* e a toxicidade aumentada ao irinotecano⁶³⁻⁶⁶.

Marcuello et al⁶⁷, descreveram existir relação entre o genótipo do gene *UGT1A1* e o aparecimento de diarreia severa. Este sintoma apareceu em 17% dos casos 6/6, em 33% dos casos 6/7 e em 70% dos casos 7/7. Ando et al.⁶⁸ reportaram ainda uma frequência 3,5 vezes superior de doentes com genótipo 7/7 que sofriam de diarreia grave e leucocitopenia, quando em tratamento com quimioterapia baseada em Irinotecano. Perante estes resultados, os autores consideram que a genotipagem do gene *UGT1A1* serve como uma ferramenta fundamental na predição de toxicidade em terapia com o Irinotecano. Por outro lado, Seymour et al.⁶⁹ não confirmaram a associação entre a presença da duplicação TA no gene *UGT1A1* e o aumento de toxicidade ao Irinotecano. A literatura relativamente a este tema é muito heterogénea^{67,69} e isso deve-se, em grande

parte, ao facto da maior parte dos estudos serem retrospectivos e às diferentes dosagens de irinotecano utilizadas.

4.2 – Relação com Icterícia Neonatal

Odell⁷⁰, já em 1980, afirmou que o SG poderia influenciar o aparecimento e a gravidade da icterícia neonatal. No entanto, só foram realizados estudos em que se procurava relacionar estas duas patologias, após a identificação das alterações do gene *UGT1A1* associadas ao SG. Esta associação foi estudada pela primeira vez em 1997 por Kaplan et al.⁷¹ em recém-nascidos com défice de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) que desenvolveram icterícia neonatal. Em 1999, Monaghan et al.²³ sugeriram uma relação entre a icterícia neoanatal prolongada em recém-nascidos, sem outros factores de risco, com SG. No mesmo ano, Maruo et al.⁷² descreveram a mutação G71R como factor de risco de icterícia neonatal não fisiológica na população Japonesa. No entanto, diferentes trabalhos, entretanto publicados, apresentam resultados contraditórios. Em alguns deles é demonstrada a associação entre o SG e a icterícia neonatal e em outros não.

Os níveis séricos de bilirrubina nos recém-nascidos de origem japonesa são significativamente superiores aos níveis nos recém-nascidos caucasianos⁷³. Isto deve-se, provavelmente a uma diferença genética entre as populações caucasianas e as japonesas. A mutação mais frequente, nos indivíduos japoneses com SG, é uma mutação *missense*, em que há uma troca do aminoácido glicina para uma arginina, no nucleótido 211, codão 71 (G71R)⁷⁴. Foi demonstrado por Yamamoto et al.⁷⁵, que a mutação G71R diminui a actividade enzimática e que está relacionada com icterícia neonatal na população japonesa.

Akaba et al.⁷⁶ e Maruo et al.⁷², também demonstraram que a frequência da mutação G71R, nos recém-nascidos que necessitavam de fototerapia (com hiperbilirrubinemia severa), era substancialmente maior que nos recém-nascidos que não necessitavam. Estes resultados sugerem que a presença da mutação G71R é um factor de risco genético associado a hiperbilirrubinemia em neonatais japoneses. Mais ainda, como a mutação G71R é comum nos indivíduos japoneses com SG⁷⁴, a hiperbilirrubinemia neonatal associada a mutação G71R deve ser um fenótipo de SG. Apesar desta correlação, Yamamoto et al.⁷⁵, estudaram recém-nascidos com hiperbilirrubinemia e observaram que mais de 30% exibiam o genótipo G/G e não o G71R. Este resultado

sugere a existência de outros factores genéticos e/ou ambientais que também contribuem para o desenvolvimento de hiperbilirrubinemia neonatal⁷⁵.

A frequência da mutação G71R é muito rara na população caucasiana⁷⁶, no entanto, não estão disponíveis estudos desta mutação em recém-nascidos caucasianos.

4.3 – Relação com Doença Hemolítica Crónica (DHC)

A associação entre o SG e a doença hemolítica crónica (DHC) também foi já alvo de vários estudos, nomeadamente no que se refere aos níveis de bilirrubina, mas também relativamente às suas complicações, nomeadamente a litíase vesicular. Um dos primeiros trabalhos na literatura sobre este assunto foi publicado em 1999, por Guidice et al.⁴⁰. Neste trabalho é demonstrado de forma inequívoca que a presença do alelo TA7, em doentes com Esferocitose Hereditária (EH) lhes aumenta de forma significativa os níveis de bilirrubina e o risco de desenvolvimento de litíase vesicular. Entretanto, têm surgido na literatura vários estudos que relacionam o SG com outras patologias com algum tipo de componente hemolítico, nomeadamente, drepanocitose³⁵, β -talassemia^{31,34}, incompatibilidade AB0³⁵ e défice de glucose-6-fosfato desidrogenase³⁷. Costa et al.⁴² estudaram 44 crianças portuguesas, com diagnóstico de DHC (esferocitose hereditária - 30, défice de glicose-6-fosfato desidrogenase da classe I - 6, défice de piruvato kinase - 6, xerocitose hereditária - 1 e sem diagnóstico etiológico - 1). Neste trabalho, encontraram uma média de bilirrubina total nos doentes com o genótipo ([TA]7/[TA]7) significativamente superior à dos doentes com genótipo ([TA]6/[TA]6), assim como um aumento estatisticamente significativo, na proporção de doentes que desenvolveram litíase vesicular (0% dos doentes com o genótipo [TA]6/[TA]6, 16 % dos doentes com o genótipo [TA]6/[TA]7 e 60% dos doentes com o genótipo [TA]7/[TA]7).

4.4 – Relação com Cancro

O aparecimento de cancro na mulher, nomeadamente o cancro da mama e do endométrio, está intimamente ligado aos níveis endógenos de hormonas esteróides ligadas ao sexo.

Os estrogénios têm que sofrer glucuronidação para originar metabolitos hidrossolúveis e menos reactivos. Esta transformação é mediada pelas enzimas UGT, das quais a mais representativa é a UGT1A1^{77,78}. A associação da duplicação TA na região promotora do gene *UGT1A1* como factor de risco de desenvolvimento de cancro da mama tem vindo a ser estudada. Os trabalhos não são muito numerosos e apresentam resultados contraditórios. O trabalho mais completo sobre este assunto foi publicado em 2004, por Adegoke et al.⁷⁸ tendo concluído que a presença do alelo TA7 está associado com aumento do risco de desenvolvimento de cancro da mama em mulheres chinesas com idade inferior a 40 anos. Neste mesmo trabalho, os autores especulam que as conclusões contraditórias encontradas nos diferentes trabalhos se relacionam com variações raciais existentes em outros genes relacionados com o metabolismo dos estrogénios.

4.5 – Relação com doença coronária

Durante vários anos, pensou-se que a bilirrubina era apenas um tóxico produzido durante o catabolismo do heme. No entanto, existe evidência recente que a bilirrubina é um potente antioxidante fisiológico e, como tal, tem um efeito protector contra aterosclerose, doença coronária arterial, e inflamação^{79,80}. Muitos estudos têm vindo a ser efectuados, existindo evidência de uma associação inversa entre os níveis séricos de bilirrubina e doença cardiovascular. Hopking et al.⁸⁰, realizaram um estudo em 1996, em que se conclui que existe uma redução de 60 a 90% do risco de doença coronária arterial nos indivíduos que apresentam valores de bilirrubina mais elevados.

PARTE II - Objectivos

O SG tem vindo a ser estudado, por muitos autores, devido à sua associação com outras patologias, nomeadamente, icterícia neonatal, EH, cancro, doença cardiovascular e também com alguns fármacos, como o agente quimioterápico irinotecano ou com a terapêutica hormonal de substituição, raloxifeno[®]. Esta associação com diferentes patologias, assim como a sua crescente utilização no diagnóstico de SG, torna importante saber qual a frequência, a nível mundial, da duplicação TA no promotor do gene *UGT1A1*.

O objectivo deste trabalho foi compilar e sintetizar a literatura existente para calcular a frequência mundial, bem como a frequência por país e por continente, da duplicação TA na região promotora do gene *UGT1A1*, associada a SG. Por outro lado, tentou-se perceber quais as causas de variabilidade das frequências estimadas pelos vários autores, na mesma região.

PARTE III - Material e Métodos

Pesquisa bibliográfica

Foi efectuada pesquisa por palavras-chave, em bases de dados informáticas – Elsevier Science, MEDLINE/PubMed e Science Direct – utilizando os termos “Gilbert Síndrome”, “prevalence” e “UGT1A1”. Foi definido um intervalo temporal para a pesquisa, pelo que foram pesquisados artigos publicados desde Janeiro de 1992 até final de 2011 e escritos em inglês, espanhol, português ou francês.

Adicionalmente, foram ainda analisadas as referências bibliográficas dos artigos encontrados nesta pesquisa, no sentido de identificar artigos não identificados na pesquisa anterior.

Muitos dos artigos encontrados só apresentavam o resumo, pelo que sempre que isto aconteceu, foi enviado e-mail ao autor para solicitar o artigo completo. Para garantir a validade do método e para seleccionar apenas os estudos relevantes para a presente meta-análise, foram definidos critérios de inclusão e de exclusão.

Critérios de inclusão

A pesquisa foi limitada a artigos de revistas científicas, não sendo consideradas teses e outras dissertações, capítulos de livros e estudos não publicados.

Assim, a investigação incluiu apenas artigos completos *peer-reviewed* de forma a assegurar a sua validade. Só foram incluídos estudos em que foram efectuados estudos populacionais da duplicação TA no promotor do gene *UGT1A1*

Critérios de exclusão

Não foram analisados estudos anteriores a 1992. Foram também excluídos estudos de indivíduos com diagnóstico de SG. Não foram considerados estudos em que a população estudada era imigrante, pois os valores de prevalência não seriam específicos do país de origem. Não foram incluídos artigos de revisão, sendo que estes foram usados como fonte de referências, úteis para novas pesquisas.

Análise de dados

Após a aplicação dos critérios referidos, resultaram 100 artigos. Relativamente a estes, foi feita uma análise de cada um e retirados os dados mais importantes, como os autores, a data de publicação, especificidades da população em estudo, número total de indivíduos estudados e frequências de cada genótipo.

Estas características estão devidamente detalhadas na tabela I, no capítulo “Resultados”. Para cada País, foi calculada a média ponderada de frequências do genótipo 7/7 e do alelo 7. Para cada estudo foi calculado também o desvio padrão e o intervalo de confiança de 95%.

As revisões sistemáticas e meta-análises podem fornecer evidências relevantes para muitos aspectos da medicina⁸⁸. O seu valor é especialmente nítido quando os resultados dos estudos mostram valores similares. É mais difícil tirar conclusões quando os resultados entre os estudos variam significativamente⁸⁸.

Para estabelecer se os estudos são ou não consistentes, realiza-se um teste estatístico de heterogeneidade. O teste permite determinar se existem diferenças reais subjacentes aos resultados do estudo ou se as variações são compatíveis com o acaso, ou seja, não são significativas. A medida clássica de heterogeneidade é o Q de Cochran⁸⁷. Este teste foi usado para avaliar a heterogeneidade entre os resultados dos estudos individuais.

Foi avaliada a heterogeneidade dos valores de frequências do genótipo 7/7 e do alelo 7, relativamente a cada país e a cada continente. Se a heterogeneidade for significativa indica que as diferenças entre os resultados, entre estudos, não podem ser atribuídas somente às variações nas amostras.

Considerámos que o resultado do teste de heterogeneidade era significativo quando o respectivo valor de prova era inferior ao nível de significância previamente definido, no nosso caso $\alpha=0.05$.

O Q de Cochran usa a soma dos desvios-padrão dos valores estimados de cada estudo recorrendo ao peso de cada estudo no valor global. Por um lado, este teste é pouco potente no caso de as amostras terem dimensão reduzida e, por outro lado, para amostras de grande dimensão pode ter um poder excessivo, pelo que os resultados devem ser analisados com alguma precaução. O teste pode ser indicativo de heterogeneidade e isso nada afectar as conclusões do estudo. A heterogeneidade pode ser afectada por diversos factores, nomeadamente, a presença de outras patologias associadas. No sentido de contribuir para minimizar este problema calculou-se o I^2 , valor que indica a proporção de variabilidade entre resultados de estudos, e que nos fornece um indicador da magnitude da heterogeneidade. O valor de I^2 varia entre 0% e 100%, sendo que 0% indica homogeneidade e 100% indica heterogeneidade.

O tratamento estatístico dos dados foi feito com recurso ao programa estatístico STATA.

A meta-análise é uma técnica estatística de revisão, amplamente utilizada nos últimos anos, em variadas áreas de investigação, com particular ênfase nas ciências sociais e comportamentais^{81,82,83}.

Glass⁸⁴, responsável pela introdução do termo meta-análise, tal como se conhece hoje, definiu-a como a “análise das análises”.

O objectivo principal da meta-análise é responder à necessidade de sintetizar informação, proveniente da expansão da pesquisa nos diferentes domínios técnico-científicos, através da utilização de um desenho de estudo que permite compilar a informação de diversos estudos, de uma mesma temática, analisando-a de forma quantitativa^{84,85}. Este método permite obter conclusões fidedignas e livres de potenciais enviesamentos, oriundos da subjectividade de análises qualitativas, sem formulação estatística⁸⁶.

A meta-análise é uma técnica que permite aos investigadores extraírem conclusões relativamente precisas acerca de uma área de estudo ou hipótese, com base em estudos que reportam resultados inconsistentes⁸². A meta-análise, enquanto técnica, permite ligar micro evidências (evidência acumulada de estudos independentes) a macro pareceres que geralmente direccionam hipóteses sobre uma associação ou relação de causa-efeito^{82,85}, e fá-lo controlando numerosos factores estatísticos potencialmente responsáveis pela variabilidade dos micro resultados de cada estudo⁸². Para tal, os resultados de cada estudo têm que ser expressos numa métrica comum, capaz de representar a relação entre as variáveis definidas⁸¹.

O processo envolve a aplicação de critérios explícitos, procedimentos rigorosos e padronizados. É um tipo de revisão sistemática que usa métodos estatísticos para combinar, quantitativamente, e agregar resultados de pesquisas individuais⁸⁷.

Sendo que a acumulação de investigação é a base do conhecimento científico⁸⁶, este método consiste assim num conjunto de procedimentos estatísticos que permite:

- a) indicar uma tendência abrangente dos resultados da investigação numa determinada área;
- b) aumentar o número de observações e o poder estatístico dos testes de hipóteses;
- c) estudar a variabilidade de resultados entre estudos, dissolvendo dúvidas derivadas da diversidade de conclusões;
- d) avaliar a possibilidade de extrapolação de resultados (aumentando a validade dessa generalização);
- e) realizar sub-análises dentro da mesma meta-análise;

- f) identificar de forma mais precisa e direccionada a necessidade de realizar estudos complementares;
- g) reduzir significativamente a subjectividade implícita nas revisões, devida ao enviesamento provocado pela tendência inferencial do investigador;
- h) responder a questões que inicialmente não foram atribuídas aos estudos individuais – novas conclusões coesas e abrangentes.

Os passos para desenvolver um estudo de meta-análise são similares aos usados para elaborar um estudo empírico^{81,86}. A principal diferença assenta na unidade de análise, que enquanto no estudo primário é (geralmente) o sujeito, na meta-análise é o estudo em si⁸¹.

PARTE IV – Resultados

A pesquisa inicial, com os termos mencionados na sessão anterior, deu origem a 1168 artigos. Após a aplicação dos critérios de exclusão, já referidos, obtivemos 100 artigos, de 29 países, de 4 continentes. Não se conseguiu obter estudos que tivessem origem no continente Africano.

Relativamente ao número total de indivíduos estudados em cada artigo, este varia entre 9 e 1780 indivíduos. A amplitude de valores é grande e a variação de estudo para estudo também é muito grande. Todos estes dados estão sumarizados na tabela I.

Tabela I – Artigos incluídos na meta-análise. Continente, país, número de indivíduos incluídos no estudo e frequência do genótipo 7/7 e do alelo 7.

Continente	País	Referência bibliográfica	n	Genótipo7/7 (%)	Alelo 7 (%)	Observações
Europa	Alemanha	Von Ahsen (2000) ⁸⁹	100	9.0	32,5	
		Christoph Schulz (2009) ⁹⁰	105	9.5	35.2	Cancro cólon
		Borucki K. (2009) ⁹¹	218	17.9	36.2	
	Aústria	B.Rantner (2008) ⁹²	255	13.0	37.8	
	Escócia	G.Monaghan (1999) ²³	94	12.8	31.9	
		G.Monaghan (1996) ⁹³	77	11.7	35.7	
	Reino Unido	C-F. Xu (2010) ⁹⁴	236	16	39,6	
	Eslovénia	B.Ostaneck (2006) ⁹⁵	236	13.6	37.7	
		J.Trontelj (2008) ⁹⁶	57	19.0	42.1	Mulheres pós-menopausa a fazer raloxifeno
	Espanha	F.Salazar (2000) ⁹⁷	100	9.0	34.5	
		E.Marcuello (2004) ⁶⁷	95	10.5	34.2	Cancro cólon
		Albert Font (2003) ⁹⁸	47	15.0	33.0	Cancro pulmão a fazer irinotecano
		M.L. Seco (2002) ⁹⁹	115	7.0	31.3	Recém-nascidos
		E. Balibrea (2010) ¹⁰⁰	149	10.0	36.2	Indivíduos com cancro colorectal, tratados com irinotecano e fluoruracilo
	França	B.Levaufre (2001) ¹⁰¹	100	17.0	38.5	
		E.Rouits (2004) ⁶⁶	75	9.0	34.0	Cancro cólon
V.Ribrag (2008) ¹⁰²		187	12.0	36.4		
V.Ribrag (2008) ¹⁰²		313	10.0	30.8	Linfoma Hodgkin	
	B.Levaufre (2000) ¹⁰³	97	17.0	38,14		

		F.Cotê (2007) ⁶⁵	176	9.0	31.8	Indivíduos com cancro colorectal, tratados com irinotecano e fluoruracilo	
Grécia		T.Tsezou (2009) ¹⁰⁴	152	17.8	34.5		
		S.Tzeli (2003) ¹⁰⁵	40	15.0	28.8	Crianças saudáveis <15 anos	
Holanda		P.Bosma (1995) ³¹	55	15.0	35.5		
		D. Kweekel (2008) ¹⁰⁶	225	7.7	28.7	Cancro cólon	
		P.Bosma (2003) ¹⁰⁷	255	7.8	27.5	Doença coronária	
Israel		E. Van der Logt (2004) ¹⁰⁸	399	11.8	33.0		
		M.Kaplan (1997) ⁷¹	250	14.7	36.0	Recém-nascidos	
		M.Kaplan (1999) ³⁷	185	12.4	33,5		
Itália		E. Giudice (1999) ⁴⁰	103	22.0	40.8	Crianças com esferocitose hereditária	
		A.Iolascon (1999) ³⁹	102	13.7	34.8		
		R.Galanello (1997) ³³	49	10.2	25.5	β-talassemia	
		R.Galanello (1997) ³³	21	9.5	31.0		
Portugal		R.Martins (2008) ¹⁰⁹	153	18.9	38.6	Crianças com drepanocitose	
		S.Rocha (2009) ¹¹⁰	48	6.3	30.2		
		E.Costa (2006) ¹¹¹	75	6.7	26.0		
		E. Gonçalves (2001) ¹¹²	171	9.9	31.6		
		C-F. Xu (2010) ⁹⁴	236	15.7	39.6		
Suécia		K.Ekblom (2010) ¹¹³	1184	8.3	31.6	Indivíduos com antecedente de enfarte do miocárdio	
	Turquia		K.Ekblom (2010) ¹¹³	618	8.7	28.7	
			M.Babaoglu (2005) ¹¹⁴	32	9.3	26.6	
	A.Ulgenalp (2003) ¹¹⁵	110	9.0	32.3	Recém nascidos saudáveis		
Ásia	China		C.Shan Huang (2002) ¹¹⁶	218	0.5	8.9	
			C.Shan Huang (2002) ¹¹⁷	232	0.9	8.8	
	Coreia Sul		K.Yoon Hong (2002) ¹¹⁸	20	5.0	10.0	
			P.Gyun Choe (2010) ¹¹⁹	168	0.6	11.3	Indivíduos HIV positivo
			J.Youn Han (2008) ⁴⁵	81	0	7,41	Cancro pulmão
	Índia		K.Chang-Seok (2003) ¹²⁰	324	2,2	16,2	
			S.Farheen ¹²¹	95	10.0	36.8	
	Japão		M.Saeki (2003) ¹²²	48	0	13,5	
			Y.Takekuma (2006) ¹²³	46	0	13,7	
			Y.Akyama (2008) ¹²⁴	300	0.7	2.5	Indivíduos a fazer irinotecano

		K.Akaba (1998) ⁷⁶	159	1.3	6.6	Recém-nascidos saudáveis
		T.Kamisako (2004) ¹²⁵	71	4.0	11.3	
		Y.Ando (1998) ⁶²	9	11.1	16.7	Cancro pulmão
		N.Kaniwa (2004) ¹²⁶	150	2.0	9,7	
		Y.Maruo (1999) ⁷²	100	4.0	15.0	
		Y.Maruo (2000) ¹²⁷	17	0	2,9	
		Y. Ando (1998) ⁶²	58	3.0	13.8	
	Kuwait	E.Samilchuk (2001) ¹²⁸	55	16.4	40.0	Deficiência G6PD
	Malásia	S.Yusoff (2006) ¹²⁹	50	2.0	8	
	Taiwan	M.Jen Huang (2003) ¹³⁰	100	1.0	7,5	
		Y.Yang Huang (2009) ¹³¹	200	0	1.5	
		L.Chun-Yu (2008) ¹³²	128	4.7	4.7	Cancro cólon
	Tailândia	T.Kung-Sheng (2005) ¹³³	441	0.7	21,8	
América Central	Guadalupe	V.Chaar (2005) ¹³⁴	324	14.8	38.1	Crianças com drepanocitose
	Jamaica	Eden V. (2004) ¹³⁵	335	20.0	42,8	Crianças com drepanocitose
	México	E.Arámula (2002) ¹³⁶	375	10.1	33,4	
América Norte	Canadá	H.Girard (2008) ¹³⁷	325	17	39,4	Afroamericanos
		H.Girard (2008) ¹³⁷	541	10.0	31,6	
		Y.Duguay (2004) ¹³⁸	656	13.4	34,7	
	E.U.A	J.Bancroft (1998) ⁴³	151	13	37,1	Recém-nascidos saudáveis
		L.Parodi (2008) ¹³⁹	113	9.7	32.7	Cancro cólon
		JY.Liu (2007) ¹⁴⁰	82	5.0	15.2	
		JY.Liu (2007) ¹⁴⁰	56	13.0	32.9	
		D.Buckley (2009) ¹⁴¹	98	6.0	28.6	
		L.Jing-Ping (2009) ¹⁴²	1091	9.0	31.0	
		S.Navarro (2009) ¹⁴³	70	7.0	32.9	
		M.Saracino (2008) ¹⁴⁴	283	10.6	30.0	
		Zhili Lin (2008) ¹⁴⁵	450	12.4	33.9	
		J.L.Chang (2007) ¹⁴⁶	63	22.2	40.5	
		J.Ping Lin (2006) ¹⁴⁷	1780	10.8	32.4	
		E.Shatalova (2005) ¹⁴⁸	173	9.8	34.7	Mulheres com cancro da mama
		E.Shatalova (2005) ¹⁴⁸	25	4.0	26.0	Mulheres afroamericanas com cancro da mama
		S.Peterson (2005) ¹⁴⁹	191	11.5	11,52	
		L.Carlini (2005) ¹⁵⁰	66	7.6	30.3	Cancro cólon
		J.Long Fang (2004) ¹⁵¹	95	11.6	36.8	Cancro fígado

		C.Guillemette (2000) ¹⁵²	200	16.5	38.2	
		Y. Ando (2000) ⁶²	118	5.9	13.6	Indivíduos a fazer irinotecano
		Innocenti et al (2004) ⁶⁴	66	9.1	27.3	Indivíduos a fazer irinotecano
		Lyer et al (2002) ⁶³	20	20.0	37.5	Indivíduos a fazer irinotecano
		Rouits (2004) ⁶⁶	75	9.3	32.7	Indivíduos a fazer irinotecano
		Marcuello (2004) ⁶⁷	95	10.5	34.2	Indivíduos a fazer irinotecano
		N.Kaniwa (2005) ¹²⁶	150	22.7	46	Afro-americanos
		N.Kaniwa (2005) ¹²⁶	150	12.0	37,7	
América Sul	Brasil	C.Abnet (2007) ¹⁵³	199	10.0	22.6	
		C.Carvalho (2010) ¹⁵⁴			43	Recém-nascidos afrodescendentes
		C.Carvalho (2010) ¹⁵⁴			31,4	Recém-nascidos
		K.Fertrin (2002) ¹⁵⁵	32	3.1	32.8	Índios
		K.Fertrin (2002) ¹⁵⁵	54	16.7	40.7	Afrodescendentes
		K.Fertrin (2002) ¹⁵⁵	71	12.7	32.4	
Oceânia	Nova Zelândia	J.Harraway (2005) ¹⁵⁶	60	15.0	34.2	

n – número total de indivíduos estudados;

G6PD – Glicose-6-fosfato-desidrogenase

A tabela II resume as frequências do genótipo 7/7 e do alelo 7, por país e por continente.

Tabela II – Frequências médias estimadas, por país e por continente.

		Genótipo 7/7		Alelo 7	
		%	%	%	%
Europa	Alemanha	13	10,50	35	32,30
	Áustria	13		38	
	Escócia	12		34	
	Eslovénia	14		39	
	Espanha	9		34	
	França	11		34	
	Grécia	17		33	
	Holanda	10		30	
	Israel	14		35	
	Itália	15		35	
	Portugal	10		33	

	Reino Unido	16		40		
	Suécia	8		28		
	Turquia	9		31		
Ásia	China	0,6	1,00	9	6,70	
	Coreia Sul	1		13		
	Índia	10		37		
	Japão	1		5		
	Kuwait	16		40		
	Malásia	2		8		
	Taiwan	2		3		
	Tailândia	0,7		22		
	América Central	Guadalupe	15	13,8	38	37,80
		Jamaica	20		43	
México		10		33		
América Norte	Canadá	13	10,7	35	32,50	
	E.U.A	10		32		
América Sul	Brasil	10	10,2	30	29,60	
Oceânia	Nova Zelândia	15	15	34	34,20	

A frequência global do genótipo 7/7 e do alelo 7, obtida neste estudo, foi de 4,8% e de 21,8%, respectivamente.

Os valores das frequências obtidas, para o genótipo 7/7, variam entre 0,6%, correspondente à China, e 20%, correspondente à Jamaica. Verificou-se que os valores de frequências mais baixos correspondem aos países asiáticos. Ao nível dos continentes analisados, não se obteve variações muito significativas, excepto no caso da Ásia. Neste caso, a frequência obtida foi de 1%, sendo que a frequência obtida no continente europeu e na América do Norte foi de 10,5% e 10,7%, respectivamente, e para a América do Sul de 10%. Frequências mais elevadas foram obtidas para a América Central, 13,8%, e para a Oceânia, 15%. As figuras 8 e 9 mostram o mapa mundial com as diferenças entre as frequências estimadas, por país, do genótipo 7/7 do alelo 7, respectivamente.

Verificou-se ainda que, dentro do mesmo país, encontramos variações significativas nas frequências estimadas. No caso da Alemanha, por exemplo, encontrou-se no estudo de J. Dierkes⁹¹, um valor de 17,9%, enquanto que nos outros 2 estudos (Von Ahsen⁸⁹ e Christoph Schulz⁹⁰), encontrou-se uma frequência de 9% e 9,5%. Verificou-se também uma diferença considerável dos valores obtidos nos dois estudos realizados na

Eslovénia, 13,6% e 19%. Em França, B. Levaufre¹⁰¹, obteve valores de frequência do genótipo 7/7 de 17%, em dois estudos realizados. Estes valores são também distanciados dos restantes estudos efectuados no mesmo país.

Em Itália, E. Giudice⁴⁰, obteve uma frequência de 22%, valor este obtido na Sardenha, em crianças com EH. Este valor é também bastante discrepante dos restantes estudos efectuados no mesmo país.

R. Martins¹⁰⁹, estudou o genótipo 7/7 em crianças portuguesas com drepanocitose e obteve uma prevalência de 18,9%, valor muito superior ao obtido por outros autores em indivíduos saudáveis, oriundos do mesmo país.

No continente asiático, a Índia apresenta uma frequência de 10% e o Kuwait de 16,4%. Nestes países, próximos do continente europeu, encontram-se frequências muito semelhantes. No Japão, Y. Ando⁶² obteve um valor de frequência muito distanciado dos valores obtidos nos restantes estudos no mesmo país, 11,1%. No entanto, este estudo foi realizado numa amostragem muito reduzida, de apenas nove indivíduos.

Na América Central, Eden V¹³⁵, obteve uma frequência muito elevada na Jamaica, 20%, em crianças com drepanocitose. No Canadá, H. Girard¹³⁵ estudou indivíduos afro-americanos e obteve para o genótipo 7/7, uma frequência bastante superior (17%) às restantes frequências obtidas no mesmo país.

Nos EUA, Lyer et al⁶³ e N. Kaniwa¹²⁶ obtiveram valores de 20% e de 22,7% respectivamente. Estes valores são mais altos do que os restantes. De salientar que N. Kaniwa¹²⁴, estudou indivíduos afro-americanos.

Para aferir sobre a homogeneidade dos estudos incluídos na análise, recorreu-se ao Q de Cochran e ao valor de I^2 . Os valores obtidos constam da tabela III e IV, relativos ao genótipo 7/7 e ao alelo 7, respectivamente.

Tabela III – Análise Q de Cochran e valor de I^2 para o genótipo 7/7.

	Genótipo 7/7					
	Frequência média estimada	Q	p	I^2 (%)	Intervalo Confiança 95%	Peso (%)
Europa	10,5	76,48	<0,001	49	0,098-0,112	17,28
Ásia	1	34,49	0,007	50,7	0,006-0,014	61,24
América Norte	13,8	61,78	<0,001	57,9	0,100-0,114	17,23
América Central	10,7	13,96	0,001	85,7	0,117-0,159	2
América do Sul	10,2	6,71	0,082	55,3	0,081-0,123	1,98
Oceânia	15	0	-	-	0,06-0,24	0,11
Total	4,8	1204,85	<0,001	92,3	0,045-0,051	100

Tabela IV – Análise Q de Cochran e de I^2 para o alelo 7.

	Alelo 7					
	Frequência média estimada	Q	p	I^2 (%)	Intervalo Confiança 95%	Peso (%)
Europa	32,3	53,06	0,066	26,5	0,313-0,334	25,62
Ásia	6,7	224,98	<0,001	90,2	0,058-0,075	41,65
América Norte	37,8	82,30	<0,001	69,6	0,314-0,336	25,45
América Central	32,5	6,74	0,034	70,3	0,348-0,407	3,49
América do Sul	29,6	9,47	0,05	57,7	0,265-0,327	3,24
Oceânia	34,2	0	-	-	0,222-0,462	0,21
Total	21,8	2473,48	<0,001	96	0,213-0,224	100

Relativamente ao genótipo 7/7, verifica-se que há heterogeneidade significativa de valores entre os estudos incluídos ($p < 0,001$), excepto no caso da Ásia ($p = 0,007$), e da América do Sul ($p = 0,082$). Neste caso, a amostra é muito pequena pelo que a análise Q de Cochran tem um potencial baixo. Assim sendo, é importante analisar o I^2 que assume um valor de 55,3%, o que significa que os valores entre estudos não são muito heterogêneos. O continente que apresenta uma heterogeneidade mais significativa é a

América Central ($p=0,001$; $I^2=85,7\%$). O continente europeu apresenta um nível de heterogeneidade moderado ($I^2=49\%$). Para o alelo 7, a heterogeneidade mais elevada verifica-se para o continente asiático ($p<0,001$; $I^2=90,2\%$). O valor de I^2 , neste caso, é muito próximo de 100%. Na Europa, não se verifica heterogeneidade significativa, ($p=0,066$; $I^2=26,5\%$). Para a Oceânia, não é possível calcular a heterogeneidade pois apenas um estudo foi incluído na análise, para este continente.

Na globalidade, observa-se um grau de heterogeneidade significativo ($p<0,001$; $I^2=92,3\%$) e ($p<0,001$; $I^2=96\%$), para o genótipo 7/7 e para o alelo 7, respectivamente.

As figuras 8 e 9 ilustram a distribuição geográfica da frequência do genótipo 7/7 e do alelo 7, respectivamente.

Figura 8 – Frequência mundial do genótipo 7/7.

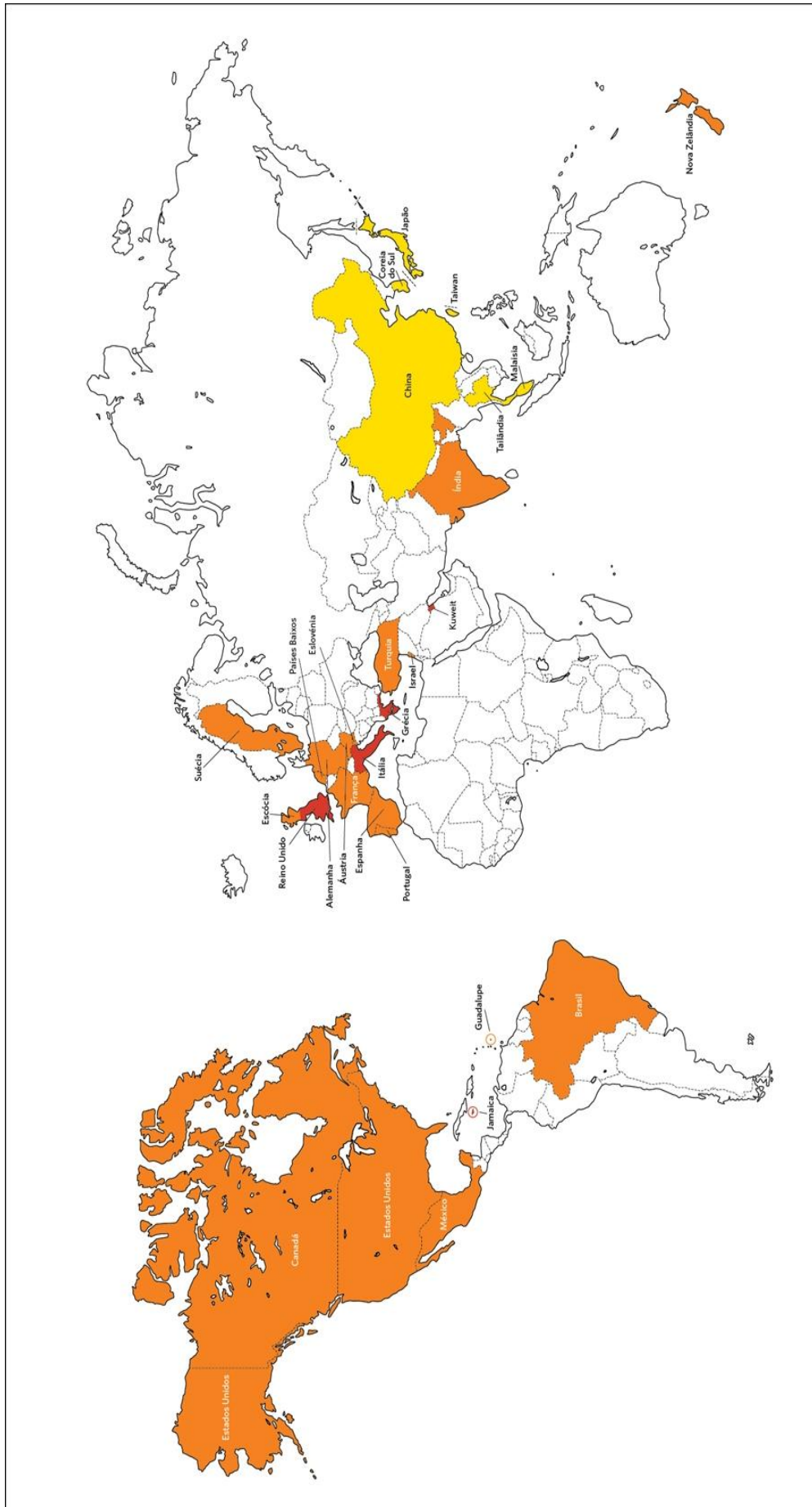
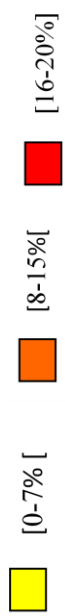
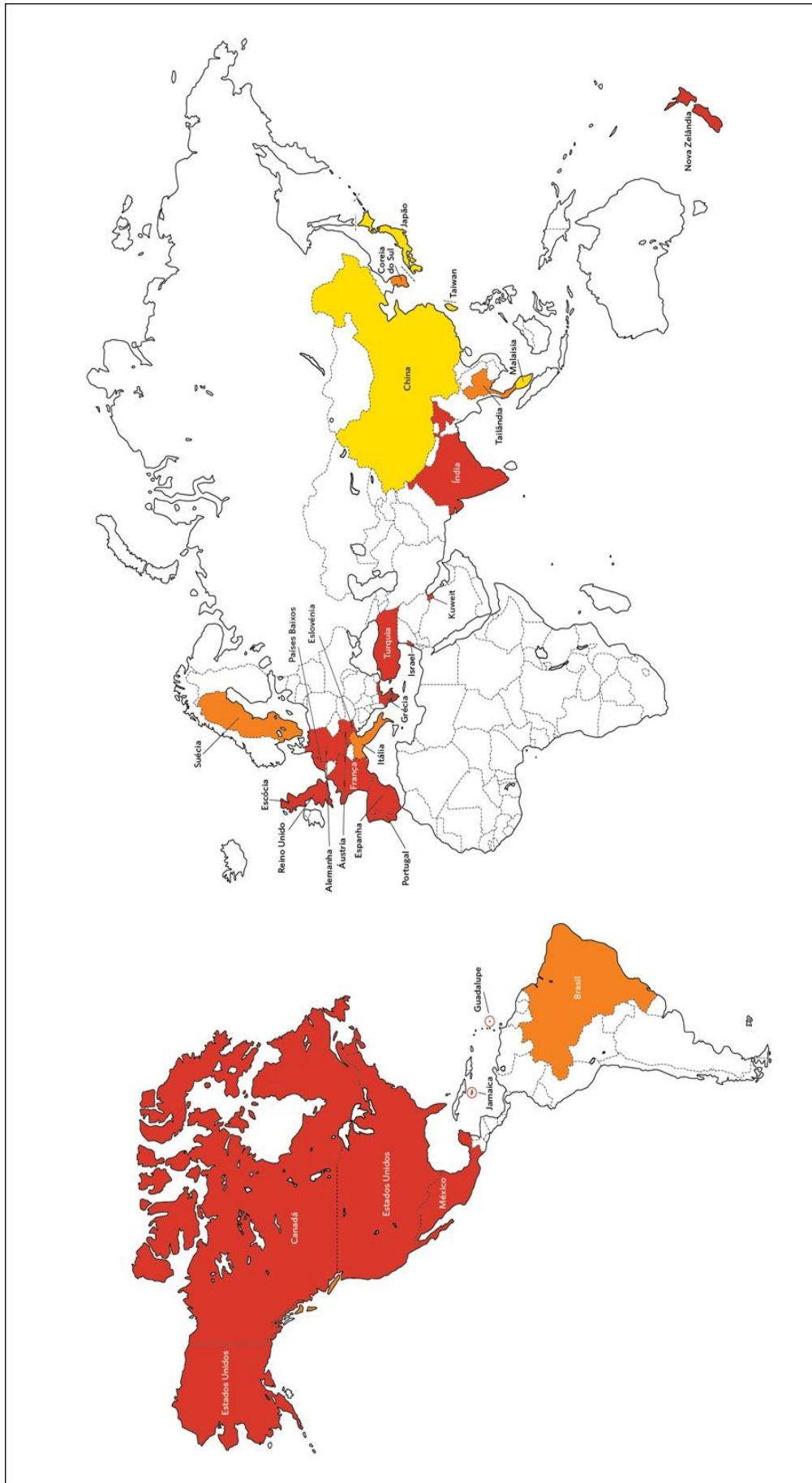
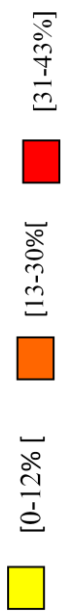


Figura 9 – Frequência mundial do alelo 7.



PARTE V - Discussão

O diagnóstico de SG foi durante muitos anos de exclusão, dada a dificuldade no estudo bioquímico da enzima UGT1A1. A localização do seu gene e posteriormente a identificação de mutações relacionadas com o SG, veio alterar de forma significativa este panorama, pois permitiu encontrar marcadores genéticos para a doença, nomeadamente a duplicação TA no promotor do gene *UGT1A1*³⁰. Embora o SG seja uma patologia benigna, o seu diagnóstico pode ser de extrema importância dado estes doentes, no decurso da investigação etiológica da hiperbilirrubinémia, poderem vir a ser sujeitos a um número significativo de exames, mais ou menos invasivos. Adicionalmente, a sua associação a outras patologias que também condicionam hiperbilirrubinémia, e com situações em que o défice da enzima UGT1A1 está associado com diminuição da metabolização hepática de alguns fármacos, tem vindo também a ser estudada na literatura.

Pelos resultados obtidos, constata-se que existe uma variabilidade considerável nas frequências do genótipo 7/7 e do alelo 7 nos diferentes estudos, mesmo dentro de estudos do mesmo país. Uma das variáveis a ter em conta para justificar que os valores entre estudos do mesmo país sejam diferentes é o número total de indivíduos estudados. Efectivamente, a dimensão das amostras estudadas varia muito, entre os 9 e os 1780. Outra explicação está relacionada com outras patologias associadas ao alelo [TA]₇. Alguns artigos estudam indivíduos com determinadas patologias, particularmente as que também condicionam hiperbilirrubinemia, que poderão influenciar a prevalência desta alteração no gene *UGT1A1*.

No que respeita à análise de frequências, de acordo com o continente, obteve-se uma frequência estimada de 10,5% do genótipo 7/7 para o continente europeu, de 1% para o continente asiático, de 13,8% para a América Central, 10,7% para a América do Norte, 10,2% para a América do Sul e 15% para a Oceânia. Relativamente ao alelo 7, foram estimadas frequências de 32,3% na Europa, 6,70% na Ásia, 32,5% na América do Norte, 37,8% na América Central, 29,6% na América do Sul e 34,20% na Oceânia. Era previsível que a frequência estimada na Ásia fosse muito reduzida dado que, neste continente, a mutação G71R, no gene *UGT1A1*, é encontrada com frequência elevada. No que diz respeito à Oceânia, apenas um estudo foi encontrado, resultando uma frequência de 15%. O continente Europeu apresenta uma frequência estimada igual à frequência estimada para a América do Norte (10,5%), e praticamente igual à encontrada para a América do Sul (10,2%); no entanto, nestes dois continentes verifica-se uma grande variabilidade nos valores das frequências estimadas nos vários estudos.

Já na América Central, o valor obtido é um pouco mais elevado (13,8%). A semelhança entre a frequência média estimada para o continente Americano e Europeu mostra que a duplicação TA está distribuída de forma uniforme pelos dois continentes e deverá estar relacionada com o facto de, nestes dois continentes, a população ser predominantemente caucasiana. No caso da América Central, a Jamaica eleva o valor da frequência média estimada, possivelmente pela origem africana de muitos dos indivíduos jamaicanos e também pelo facto dos indivíduos estudados terem drepanocitose. A drepanocitose ou anemia das células falciformes deve-se a um defeito hereditário, que determina a produção de uma hemoglobina defeituosa, denominada hemoglobina S. Neste tipo de hemoglobina, as cadeias de globina beta têm uma alteração estrutural e, perante diminuição da concentração de oxigénio, tendem a unir-se entre si provocando deformação nos eritrócitos e, conseqüentemente, diminuição da sobrevivência eritrocitária, condicionando anemia hemolítica. Os indivíduos que associam uma anemia hemolítica a SG manifestam uma hiperbilirrubinemia muito acentuada. Eden V. et al.¹³⁵ estudaram, na Jamaica, indivíduos com drepanocitose e verificaram que indivíduos homocigóticos para o alelo 7 e heterocigóticos (6/7) têm concentrações séricas de bilirrubina não conjugada semelhantes, e estão associados a aumento da frequência de litíase vesicular. A genotipagem do *UGT1A1* é uma potencial ferramenta para identificar indivíduos com drepanocitose, com elevado risco de litíase vesicular, e que necessitam de monitorização clínica mais apertada. Indivíduos com esta patologia, foram estudados também por R. Martins¹⁰⁹, em Portugal e por V. Chaar¹³⁴, em Guadalupe. Em Portugal foi obtida uma frequência mais elevada que nos restantes estudos efectuados no mesmo país (18,9%) e em Guadalupe e na Jamaica, apenas foi considerado um estudo, pelo que não há termo de comparação. No entanto, as frequências obtidas nestes estudos foram elevadas. Como a drepanocitose é uma patologia muito frequente em indivíduos de raça africana, presume-se que quando se realiza estudos em indivíduos com drepanocitose, estes poderão ter descendência africana, ou seja, existe um background genético diferente. Esta deverá ser a explicação para que as frequências, nestes estudos, sejam mais elevadas que as encontradas nos restantes estudos.

Em alguns artigos foi estudada a associação dos polimorfismos do gene *UGT1A1* com doenças hemolíticas, como a EH. Giudice⁴⁰, estudou a relação da presença do alelo 7 com o aparecimento de cálculos biliares e conseqüente esplenectomia em crianças com EH. A formação precoce de cálculos biliares é a complicação mais comum da EH, sendo que o mesmo acontece em cerca de metade dos doentes portadores desta

patologia. A prevenção deste problema representa o maior ímpeto para a esplenectomia em muitos doentes com hemólise compensada¹⁶⁰. A EH é caracterizada por uma anemia hemolítica com grande heterogeneidade clínica. A patogénese dos cálculos biliares está relacionada com uma elevada concentração biliar de bilirrubina monoconjugada¹⁶¹. Como o SG está relacionado com um aumento da produção de bilirrubina monoconjugada, Giudice⁴⁰ procurou estudar a relação entre as duas patologias. No seu estudo, confirmou que o desenvolvimento de cálculos biliares foi substancialmente superior nos indivíduos homozigóticos para o alelo 7 (48%), comparativamente aos indivíduos 6/6 (12%) e mesmo em indivíduos heterozigóticos (26%). A esplenectomia cursa com risco cirúrgico bem como risco de sépsis no pós-operatório. Foi também reportado recentemente, que após os 40 anos de idade o nível de enfarte agudo do miocárdio ou de trombose, em paciente com EH esplenectomizados, é 5,6 vezes superior aos pacientes que têm baço⁴¹. Giudice et al.⁴⁰ mostraram uma associação significativa entre a homozigotia 7/7 e o aumento do nível de formação de cálculos biliares em crianças com EH. Mais ainda, este risco é proporcional ao número de alelos mutados. Estes resultados podem ser explicados pelo efeito combinado da hemólise presente na EH e da produção aumentada de bilirrubina monoconjugada, característico do SG. A associação entre os aumentos de bilirrubina devidos à hemólise crónica e também à diminuição da sua conjugação hepática, aumenta o risco de formação de cálculos biliares. Perante estes factos, conclui-se que a determinação do genótipo UGT1A1 deverá ser uma grande ajuda na gestão de pacientes com EH, nomeadamente no que respeita à decisão de esplenectomia. O facto da EH em conjunto com o SG provocar uma hiperbilirrubinemia grave faz com que seja mais fácil diagnosticar estes indivíduos. Neste sentido, quando se realiza a genotipagem de indivíduos com EH, os valores obtidos poderão ser superiores ao normal, pois a presença da duplicação TA, com conseqüente aumento dos níveis de bilirrubina, poderá estar relacionada com o aumento dos casos de EH ligeira diagnosticados. Esta poderá ser uma explicação para a obtenção de uma frequência mais elevada no estudo de E. Giudice⁴⁰ em Itália.

Galanello et al³³ estudaram indivíduos com β -talassemia heterozigótica, e a sua relação com polimorfismos na enzima UGT1A1. Os indivíduos heterozigóticos com β -talassemia mostram uma variação considerável nos níveis de bilirrubina. Neste estudo, bem como noutros³¹, a homozigotia 7/7 foi encontrada em indivíduos normais com níveis de bilirrubina normais, apesar de estarem no limiar superior da normalidade. Isto indica que esta mutação é necessária mas não é suficiente para originar SG. Existem

outros factores que afectam o metabolismo da bilirrubina e que devem interagir com a variação promotora no gene *UGT1A1*, resultando em hiperbilirrubinemia associada a SG. Neste estudo concluiu-se que um destes factores pode ser a β -talassemia heterozigótica. Galanello et al³³ estudaram indivíduos com SG e destes, 44% apresentavam concomitantemente β -talassemia. Este facto vem demonstrar que existem mais factores para além dos polimorfismos associados ao gene *UGT1A1*, que contribuem para o fenótipo de SG e existe uma forte associação entre o SG e outras patologias hemolíticas.

J. Trontelj⁹⁶ estudou a influência desta mutação em mulheres pós-menopausicas a tomar Raloxifeno[®]. O Raloxifeno[®] é um estrogénio modulador usado para a prevenção e tratamento da osteoporose em mulheres pós-menopausicas. Este fármaco é eliminado em grande parte, após conjugação a metabolitos glucuronido. A enzima UGT1A1 é uma das principais isoformas responsáveis por essa metabolização¹⁵⁵. Alterações no gene *UGT1A1* são a principal causa para a variabilidade observada na farmacocinética e na farmacodinâmica deste fármaco. No estudo efectuado, o autor verificou que o grupo de mulheres homozigóticas para o alelo 7, e consequentemente com diminuição da actividade da enzima UGT1A1, estava associado a níveis baixos de formação e de excreção de conjugados do fármaco e, consequentemente, uma maior exposição ao mesmo. Mais, verificou que havia um aumento significativo na densidade mineral óssea da anca após um ano de tratamento, em comparação com as mulheres heterozigóticas ou homozigóticas para o alelo 6. Trontelj⁹⁶ concluiu que as mulheres homozigóticas para o alelo 7 apresentavam uma exposição ao Raloxifeno[®] 2,2 vezes superior às mulheres com genótipo 6/6. Uma das consequências desta alteração metabólica do fármaco é a redução comprovada do risco de fractura óssea¹⁵⁸. Recentemente, o Raloxifeno[®] foi aprovado para redução do risco de cancro da mama invasivo em mulheres pós-menopáusicas com osteoporose e em mulheres pós-menopausicas com alto risco de cancro da mama invasivo¹⁵⁹.

Perante estes dados e as indicações terapêuticas do fármaco, é de extrema importância estudar alterações na enzima UGT1A1 em mulheres pós-menopausicas com osteoporose e com alto risco de cancro da mama. Este estudo ajuda na predição da farmacocinética e farmacodinâmica do fármaco.

Shatalova et al¹⁴⁸ estudaram a influência das variações genéticas na enzima UGT1A1 nas características do cancro da mama e a importância da determinação dessas mesmas variações para o prognóstico do cancro. Existem compostos estrogénicos, como o E₂, o

etinilestradiol, 2-OHE₂, que são inactivados pela enzima UGT1A1^{162,163}. A exposição aos estrogénios é reconhecida como sendo um factor crítico na etiologia dos tumores da mama. A diminuição da actividade da enzima UGT1A1 leva à não glucuronidação dos estrogénios, o que contribui para a formação e exposição acentuada a estrogénios activos nas células alvo. Neste estudo, os autores verificaram que indivíduos com alto grau de actividade enzimática, estavam mais predispostos para tumores de baixo grau. Pelo contrário, a diminuição da capacidade de glucuronidação dos estrogénios está associada a características tumorais mais agressivas, incluindo tumores maiores, de graus mais avançados, mas, curiosamente, com idades de diagnóstico superiores. Havendo uma mutação homozigótica para o alelo 7, a predisposição para cancro de mama de pior prognóstico é maior. A genotipagem do *UGT1A1* é importante, no sentido de facilitar o prognóstico destas doentes.

Vários artigos estudam a influência das variações no gene *UGT1A1* em doentes a fazer quimioterapia com irinotecano. Esta relação foi devidamente explicada no capítulo 4.1. Efectivamente, esta associação é alvo de muitos estudos, pois sabendo-se a genotipagem dos indivíduos, pode preconizar-se outro tipo de medicação quimioterápica, no sentido de evitar a neutropenia grave e a diarreia severa que o irinotecano provoca em doentes que exibem actividade UGT1A1 diminuída.

A associação entre a duplicação TA na região promotora do gene *UGT1A1* e outras patologias, bem como a sua influência na metabolização de alguns fármacos, revelam a importância de uma revisão sistemática da literatura efectuada. Por outro lado, a elevada frequência estimada desta mutação fundamenta a importância deste trabalho. Em conclusão, é importante ter noção da prevalência desta mutação e da sua distribuição, a nível mundial, para se poder direccionar medidas perante as situações referidas. Por outro lado, a importância da revisão sistemática de vários estudos, de diferentes autores, permite tirar conclusões relevantes e obter explicações para as diferenças e para a variabilidade observada entre estudos realizados em pessoas da mesma etnia.

PARTE VI - Bibliografia

- 1- Bonnet R, Davies JE, Hursthouse MB. Structure of bilirubin. *Nature* 1976; 262:326-328.
- 2- Vitek L, Jirsa M, Brodanova M, Kaláb M, Marecek Z, Danzig V et al. Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis* 2002; 160(2):449-456.
- 3- Wu TW, Fung KP, Wu J, Yang C, Weisel R. Antioxidation of human low density lipoprotein by unconjugated and conjugated bilirubins, *Biochem Pharmacol* 1996; 51(6):859-862.
- 4- Robinson SH. The origins of bilirubin. *N Engl J Med* 1968; 279:143-149.
- 5- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemim. *J Lab Clin Med* 1970; 75(3):410-421.
- 6- Yoshinaga T, Sassa S, Kappas A. A comparative study of heme degradation by NADPH-cytochrome c reductase alone and by the complete heme oxygenase system. Distinctive aspects of heme degradation by NADPH-cytochrome c reductase. *J Biol Chem* 1982; 257(13):7794-7802.
- 7- Yoshinaga T, Sassa S, Kappas A. The occurrence of molecular interactions among NADPH-cytochrome c reductase, heme oxygenase, and biliverdin reductase in heme degradation. *J Biol Chem* 1982; 257(13):7786-7793.
- 8- Maines MD. Multiple forms of biliverdin reductase: age-related change in pattern of expression in rat liver and brain. *Mol Pharmacol* 1990; 38(4):481-485.
- 9- Maines MD, Trakshel GM. Purification and characterization of human biliverdin reductase. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300(1):320-326.
- 10- Berk PD, Howe RB, Bloomer JR, Berlin NI. Studies of bilirubin kinetics in normal adults. *J Clin Invest* 1969; 48(11):2176-2190.
- 11- Berk PD, Martin JF, Blaschke TF, Scharschmidt BF, Plotz PH. Unconjugated hyperbilirubinemia. Physiologic evaluation and experimental approaches to therapy. *Ann Intern Med* 1975; 82(4):552-570.
- 12- Poland RL, Odell GB. Physiologic jaundice: the enterohepatic circulation of bilirubin. *N Engl J Med* 1971; 284:1-6
- 13- Berk PD, Bradbury M, Zhou SL, Stump D, Han NI. Characterization of membrane transport processes: lessons from the study of BSP, bilirubin, and fatty acid uptake. *Semin Liver Dis* 1996; 16(2):107-120.

- 14- Zucker SD, Storch J, Zeidel ML, Gollan JL. Mechanism of the spontaneous transfer of unconjugated bilirubin between small unilamellar phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry* 1992; 31(12):3184-3192.
- 15- Zucker SD, Goessling W, Zeidel ML, Gollan JL. Membrane lipid composition and vesicle size modulate bilirubin intermembrane transfer. Evidence for membrane –directed trafficking of bilirubin in the hepatocyte. *J Biol Chem* 1994; 269(30):19262-19270.
- 16- Fevery J, Van Damme B, Michiels R, Groote J, Heirwegh KPM. Bilirubin conjugates in bile of man and rat in the normal state and in liver disease. *J Clin Invest* 1972; 51(9):2482-2492.
- 17- Fevery J, Blanckaert N, Heirwegh KPM, Préaux AM, Berthelot P. Unconjugated bilirubin and an increased proportion of bilirubin monoconjugates in the bile of patients with Gilbert’s syndrome and Crigler-Najjar disease. *J Clin Invest* 1977; 60(5):970-979.
- 18- Wolkoff AW, Ketley JN, Waggoner JG, Berk PD, Jakoby WB. Hepatic accumulation and intracellular binding of conjugated bilirubin. *J Clin Invest* 1978; 61(1):142-149.
- 19- Crawford JM, Berken CA, Gollan JL. Role of the hepatocyte microtubular system in the excretion of the bile salts and biliary lipid: implications for intracellular vesicular transport. *J Lipid Res* 1988; 29(2):144-156.
- 20- Verkade HJ, Havinga R, Gerding A, Vonk RJ, Kuipers F. Mechanism of the bile acid-induced biliary lipid secretion in the rat: effect of conjugated bilirubin. *Am J Physiol* 1993; 264(3Pt1):G462-G469.
- 21- Gartner LM, Lee KS, Vaisman S, Lane D, Zarafu I. Development of bilirubin transport and metabolism in the newborn rhesus monkey. *J Pediatr* 1977; 90(4):513-531.
- 22- Lester R, Schmid R. Intestinal absorption of bile pigments. Bilirubin absorption in man. *N Engl J Med* 1963; 269:178-182.
- 23- Monaghan G, Mclellan A, Mcgeehan A, Li Volti S, Mollica F, Salemi I, et al. Gilbert’s syndrome is a contributory factor in prolonged unconjugated hyperbilirubinemia of the newborn. *J Pediatr* 1999; 134(4):441-446.
- 24- Watson CJ, Weimer M. Composition of the urobilin in urine, bile and feces and the significance of variations in health and disease. *J Lab Clin Med* 1959; 54(1):1-25.

- 25- Ritter JK, Chen F, Sheen YY, Tran HM, Kimura S, Yeatman MT et al. A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes with identical carboxyl termini. *J Biol Chem* 1992; 267(5):3257-3261.
- 26- Van Es H, Bout A, Liu J, et al. Assignment of the human UDP-glucuronosyltransferase gene (UGT1A1) to the chromosome region 2q37. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 63(2):114-116.
- 27- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=57007>
- 28- Ritter JK, Crawford JM, Owens IS. Cloning of two human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNAs with expression in COS-1 cell. *J Biol Chem* 1991; 266:1043-1047.
- 29- Bosma PJ, Chowdhury NR, Goldhoorn BG, Hofker MH, Oude Elferink RP, Jansen PL, et al. Sequence of exons and the flanking regions of human bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase gene complex and identification of a genetic mutation in a patient with Crigler-Najjar syndrome type I. *Hepatology* 1992; 15(5):941-947.
- 30- Owens D, Evans J. Population studies on Gilbert's syndrome. *J Med Genet* 1975; 12:152-156.
- 31- Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, Boer A, Oostra BA, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333(18):1171-1175.
- 32- Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(14):8170-8174.
- 33- Galanello R, Perseu L, Melis MA, Cipollina L, Barella S, Giagu N, Turco MP, Maccioni O, Cao A. Hyperbilirubinaemia in heterozygous beta-thalassaemia is related to co-inherited Gilbert's syndrome. *Br J Haematol* 1997; 99(2):433-436.
- 34- Borgna-Pignatti C, Rigon F, Merlo L, Chakrok R, Micciolo R, Perseu L, et al. Thalassaemia minor, the Gilbert mutation, and risk of gallstones. *Haematologica* 2003; 88(10):1106-1109.
- 35- Passon RG, Howard TA, Zimmerman SA, Schultz WH, Ware RE. Influence of bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A promoter

- polymorphisms on serum bilirubin levels and cholelithiasis in children with sickle cell anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001; 23(7):448-451.
- 36- Kaplan M, Hammarman C, Renbaum P, Klein G, Levy-Lahad E. Gilbert's syndrome and hyperbilirubinaemia in ABO-incompatible. *The Lancet* 2000; 356(9230):652-653.
- 37- Kaplan M, Beutler E, Vreman HJ, Hammerman C, Levy-Lahad E, Renbaum P, Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient heterozygotes. *Pediatrics* 1999; 104(1):68-74
- 38- Costa E, Vieira E, Cleto E, Cabeda JM, Pinho L, Coimbra E, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, neonatal hyperbilirubinemia and Gilbert syndrome. *Acta Med Port* 2002; 15(6):409-412.
- 39- Iolascon A, Faienza MF, Giordani L, Perrotta S, Ruggiu G, Meloni GF, del Giudice EM. Bilirubin levels in the acute hemolytic crisis of G6PD deficiency are related to Gilbert's syndrome. *Eur J Haematol* 1999; 62(5):307-310.
- 40- Giudice EM, Perrotta S, Nobili B, Specchia C, d'Urzo G, Iolascon A. Coinheritance of Gilbert syndrome increases the risk for developing gallstones in patients with hereditary spherocytosis. *Blood* 1999; 94(7):2259-2262.
- 41- Schilling RF. Spherocytosis, splenectomy, stroke, and heart attacks. *The Lancet* 1997; 350(9092):1677-1678.
- 42- Costa E, Pinto R, Vieira E, Polo S, Sarmiento AM, Oliveira I, et al. Influence of Gilbert's syndrome on serum bilirubin levels and gallstone formation in children with chronic hemolytic disease. *An Esp Pediatr* 2002; 57(6):529-533.
- 43- Bancroft JD, Kreamer B, Gourley GR. Gilbert syndrome accelerates development of neonatal jaundice. *J Pediatr* 1998; 132(4):656-660.
- 44- Alexandrino AM, Carvalho C, Costa E, Vieira E, Oliveira P, Duarte C, Barbot J, dos Santos R, Areias A. TATA box polymorphism in the UDP-glucuronosyltransferase-1 gene promoter and neonatal hyperbilirubinemia. *Prenatal and Neonatal Medicine* 2001; 6(2):133-136.
- 45- Han J, Lim H, Shin E, Yoo Y, Park Y, Lee J, et al. Comprehensive Analysis of UGT1A Polymorphisms Predictive for Pharmacokinetics and Treatment Outcome in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Treated With Irinotecan and Cisplatin. *J Clinical oncology* 2008; 24:2237-2244.
- 46- Black M, Billing BH. Hepatic bilirubin UDP-glucuronyltransferase activity in liver disease and Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1969; 280(23):1266-1271.

- 47- Arias IM, London IM. Bilirubin glucuronide formation in vitro, demonstration of a defect in Gilbert's disease. *Science* 1957; 126(3273):563-564.
- 48- Nathan DG, Orking SH. *Nathan and Oski's haematology of infancy and childhood* 5th ed. WB Sanders Company. Philadelphia 1998.
- 49- Sieg A, Stiehl A, Raedsch R, Ullrich D, Messmer B, Kommerell B. Gilbert's syndrome: diagnosis by typical serum bilirubin pattern. *Clin Chim Acta* 1986; 154(1):41-47.
- 50- Schmid R, Hammaker L. Metabolism and disposition of C14-bilirubin in congenital nonhemolytic jaundice. *J Clin Invest* 1963; 42(11):1720-1734.
- 51- Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. *Wintrobe's clinical haematology* 9th ed. Lea and Febiger. Philadelphia 1993.
- 52- Van der Veere CN, Sinaasappel M, McDonagh AF, Rosenthal P, Labrune P, odièvre M, et al. Current therapy for Crigler-Najjar syndrome type 1: report of a world registry. *Hepatology* 1996; 24(2):311-315.
- 53- Arrowsmith WA, Payne RB, Littlewood JM. Comparison of treatments for congenital nonobstructive nonhaemolytic hyperbilirubinemia. *Arch Dis Child* 1975; 50(3):197-201.
- 54- Garcia-Carbonero R, Supko JG. Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins. *Clin Cancer Res* 2002; 8(3):641-661.
- 55- Ulukan H, Swaan PW. Camptothecins: a review of their chemotherapeutic potential. *Drugs* 2002; 62(14):2039-2057.
- 56- Folprecht G, Köhne CH. The role of new agents in the treatment of colorectal cancer. *Oncology* 2004; 66(1):1-17.
- 57- Kawato Y, Aonuma M, Hirota Y, Kuga H, Sato K. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res* 1991; 51(16):4187-4191.
- 58- Vanhoefer U, Harstrick A, Achterrath W, Cao S, Seeber S, Rustum YM. Irinotecan in the treatment of colorectal cancer: clinical overview. *J Clin Oncol* 2001; 19(5):1501-1518.
- 59- Araki E, Ishikawa M, Iigo M, Koide T, Itabashi M, Hoshi A. Relationship between development of diarrhea and the concentration of SN-38, an active metabolite of CPT-11, in the intestine and the blood plasma of athymic mice

- following intraperitoneal administration of CPT-11. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84(6):697-702.
- 60- Gupta E, Lestingi TM, Mick R, Ramirez J, Vokes EE, Ratain MJ. Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea. *Cancer Res* 1994; 54:3723-3725.
- 61- Iyer L, Hall D, Das S, Mortell MA, Ramírez J, Kim S, Di Rienzo A, Ratain MJ. Phenotype-genotype correlation of in vitro SN-38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver tissue with UGT1A1 promoter polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65(5):576-582.
- 62- Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka H, et al. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: A pharmacogenetic analysis. *Cancer Res* 2000; 60:6921-6926.
- 63- Iyer L, Das S, Janisch L, Wen M, Ramirez J, Karrison T, et al: UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J* 2002; 2(1):43-47.
- 64- Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, Chen PX, Das S, Kocherginsky M, et al. Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol* 2004; 22(8):1382-1388.
- 65- Cotê JF, Kirzin S, Kramar A, Mosnier JF, Diebold MD, Soubeyran I, et al. UGT1A1 Polymorphism Can Predict Hematologic Toxicity in patients treated with irinotecan. *Clin Cancer Research* 2007; 13(11):3269-3275.~
- 66- Rouits E, Boisdrón-Celle M, Dumont A, Guérin O, Morel A, Gamelin E. Relevance of different UGT1A1 polymorphisms in irinotecan-induced toxicity: A molecular and clinical study of 75 patients. *Clin Cancer Research* 2004; 10(15):5151-5159.
- 67- Marcuello E, Altés A, Menoyo A, Del Rio E, Gómez-Pardo M, Baiget M. UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colon cancer. *Br J Cancer* 2004; 91(4):678-682.
- 68- Ando Y, Saka H, Asai G, Sugiura S, Shimokata K, Kamataki T. UGT1A1 genotypes and glucuronidation of SN-38, the active metabolite of irinotecan. *Annals of oncology* 1998; 9(8):845-847.
- 69- Seymour MT, Braun MS, Richman SD, Daly C, Thompson LC, Meade A, Parmar M, Allan JM, Selby P, Quirke P, FOCUS Trial Investigators. Association of molecular markers with toxicity outcomes in a randomized trial of chemotherapy

- for advanced colorectal cancer (FOCUS). ASCO Annual Meeting Proceedings Part I (Abstract No. 2022). *J Clin Oncology* 2006; 24: 18S.
- 70- Odell GB. Neonatal hiperbilirubinemia. Grund and Stratton. New York 1980.
- 71- 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(22):12128-12132.
- 72- Maruo Y, Nishizawa K, Sato H, Doida Y, Shimada M. Association of neonatal hyperbilirubinemia with bilirubin UDP-glucuronosyltransferase polymorphism. *Pediatrics* 1999; 103(6 Pt 1):1224-1227.
- 73- Fisher AF, Nakamura H, Uetani Y, Vreman HJ, Stevenson DK. Comparison of bilirubin production in Japanese and caucasian infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition* 1988; 7(1):27-29.
- 74- Sato H, Adachi Y, Koiwai O. The genetic basis of Gilbert´s syndrome. *The Lancet* 1996; 347(9001):557-558.
- 75- Yamamoto A, Nishio H, Waku S, Yokoyama N, Yonetani M, Uetani Y, et al. Gly71Arg Mutation of the bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 Gene is associated with neonatal Hyperbilirubinemia in the Japanese Population. *J. Med. Sci.* 2002; 48(3-4):73-77.
- 76- Akaba K, Kimura T, Sasaki A, Tanabe S, Ikegami T, Hashimoto M, et al. Neonatal hyperbilirubinemia and mutation of the bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase gene: a common missense mutation among Japanese, Koreans and Chinese. *Biochem Mol Biol Int* 1998; 46(1):21-26.
- 77- Guillemette C, De Vito I, Hankinson SE, Haiman CA, Spiegelman D, Housman DE, et al. Association of genetic polymorphisms in UGT1A1 with breast cancer and plasma hormone levels. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2001; 10(6):711-714.
- 78- Adegoke OJ, Shu XO, Gao YT, Cai Q, Breyer J, Smith J, et al. Genetic polymorphisms in uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) and risk of brest cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2004; 85(3):239-245.
- 79- Mayer M. Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease. *Clinical Chemistry* 2000; 46(11):1723-1727.

- 80- Hopking PN, Wu LL, Hunt SC, James BC, Vicent GM, Williams RR. Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1996; 16:250-255.
- 81- Marín-Martínez, F., & Sánchez-Meca, J. Averaging dependent effect sizes in meta-analysis: a cautionary note about procedures. *The Spanish Journal of Psychology*, 1999; 2(1):32-38.
- 82- Chatzisarantis, N. L., & Stoica, A. *A primer on the understanding of meta-analysis*. *Psychology of Sport and Exercise* 2009; 10(5):498-501.
- 83- Glasziou P, Irwig L, Bain C, et al. Systematic reviews in health care: a practical guide.
- 84- Glass GV. Primary, secondary and meta-analysis of research. *Educational Researcher* 1976; 5(10):3-8.
- 85- Pai M, McCulloch M, Gorman JD, Pai N, Enanoria W, Kennedy G, et al. Systematic reviews and meta-analysis: an illustrated, step-by-step guide. *The National Medical Journal of India* 2004; 17(2):86-95.
- 86- Quintana SM & Minami T. Guidelines for meta-analyses of counseling psychology research. *The Counseling Psychologist* 2006; 34(6):839-877.
- 87- Higgins JPT, Green S. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of interventions*. The Cochrane Collaboration 2008.
- 88- Egger M, Smith GD. Meta-analysis: potentials and promise. *BMJ* 1997; 315(7119):1371-1374.
- 89- Von Ahsen N, Oellerich M, Schutz E. DNA Base Bulge vs Unmatched End Formation in Probe-based Diagnostic Insertion/Deletion Genotyping: Genotyping the UGT1A1 (TA)_n Polymorphism by Real-Time Fluorescence PCR. *C. Chemistry* 2000; 46(12):1939-1945.
- 90- Schulz C, Heinemann V, Schalhorn A, Moosmann N, Zwingers T, Boeck S, et al. UGT1A1 gene polymorphism: Impact on toxicity and efficacy of irinotecan-based regimens in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2009; 15(40):5058-5066.
- 91- Borucki K, Weikert C, Fisher E, Jakubizka S, Luley C, Westphal S, et al. Haplotypes in the UGT1A1 gene and their role as genetic determinants of bilirubin concentration in healthy German volunteers. *Clinical Biochemistry* 2009; 42(16-17):1635-1641.

- 92- Rantner B, Kollerits B, Stadler M, Anderwald-Stadler M, Klein-Weigel P, Gruber I, Gehringer A, et al. Association between the UGT1A1TA-Repeat Polymorphism and Bilirubin Concentration in Patients with Intermittent Claudication:Results from the CAVASIC Study. *Clinical Chemistry* 2008; 54(5):5 851-857.
- 93- Monaghan G, MRCPATH R, MRCPATH B, MRCPATH S, FRCPE H. Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *The Lancet* 1996; 347(9001):578-581.
- 94- Xu C, Reck B, Xue Z, Huang L, Baker K, Chen M, et al. Pazopanib-induced hyperbilirubinemia is associated with Gilbert's syndrome UGT1A1 polymorphism. *British Journal of Cancer* 2010; 102(9):1371-1377.
- 95- Ostanek B, Furlan D, Mavec T, Lukac-Bajalo J. UGT1A1(TA)_n promoter polymorphism - A new case of a (TA)₈ allele in Caucasians. *Blood Cells Molecules and Diseases* 2007; 38(2):78-82.
- 96- Trontelj J, Marc J, Zavratnik A, Bogataj M, Mrhar A. Effects of UGT1A1*28 polymorphism on raloxifene pharmacokinetics and pharmacodynamics. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2009; 67(4):437-444.
- 97- Salazar JMF, Sevilla AR, Conde ER, Bastús MB. Distribución del genotipo A(TA)₇TAA asociado al síndrome de Gilbert en la población española. *Med Clinica* 2000; 115(14):540-541.
- 98- Font A, Sánchez JM, Tarón M, Martínez-Balibrea E, Sánchez JJ, Manzano JL, et al. Weekly regimen of irinotecan/docetaxel in previously treated non-small cell lung cancer patients and correlation with uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) polymorphism. *Investigational New Drugs* 2003; 21(4):435-443.
- 99- Seco ML, del Rio E, Barceló 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; 56(2):139-143.
- 100- Martínez - Balibrea E, Abad A, Martínez-Cardús A, Ginés A, Valladares M, Navarro M, et al. UGT1A and TYMS genetic variants predict toxicity and response of colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan and fluorouracil combination therapy. *British Journal of Cancer* 2010; 103(4):581-589.

- 101- Levaufre B, Francoual J, Chalas J, Trioche P, Capel L, Lindenbaum A, et al. Prévalence génotypique de la maladie de Gilbert, en France. *Gastroenterol Clin Biol* 2001; 25(5):557-558.
- 102- Ribrag V, Koscielny S, Casasnovas O, Cazeneuve C, Brice P, Morshhauser F, et al. Pharmacogenetic study in Hodgkin lymphomas reveals the impact of UGT1A1 polymorphisms on patient prognosis. *Blood journal* 2009; 113(14):3307-3313.
- 103- Levaufre B, Francoual J, Labrune P, Chalas J, Capel L, Lindenbaum A. Mise au point et intérêt du diagnostic de la maladie de Gilbert par biologie moléculaire. *Annales de Biologie Clinique* 2001; 59(1):61-66.
- 104- Tzesou A, Tzetis M, Giannatou E, Spanos I, Roma E, Fretzayas A, et al. Gilbert syndrome as a predisposing factor for cholelithiasis risk in the Greek adult population. *Genetic test Mol biomarkers* 2009; 13(1):143-146.
- 105- Kitsiou-Tzeli S, Kanavakis E, Tzetis M, Kavazarakis E, Galla A, Tsezou A. Gilbert's syndrome as a predisposing factor for idiopathic cholelithiasis in children. *Haematologica* 2003; 88(10):1193-1194.
- 106- Kweekel DM, Gelderblom H, Van der Straaten T, Antonini NF, Punt CJ, Guchelaar HJ, et al. UGT1A1*28 genotype and irinotecan dosage in patients with metastatic colorectal cancer: a Dutch Colorectal Cancer Group study. *British Journal of Cancer* 2008; 99(2):275-282.
- 107- Bosma PJ, Van der Meer I, Bakker CT, Hofman A, Paul-Abrahamse M, Witteman JC. UGT1A1*28 Allele and Coronary Heart Disease: The Rotterdam Study. *Clinical Chemistry* 2003; 49(7):1180-1181.
- 108- Van der Logt E, Bergevoet S, Roelofs H, Hooijdonk Z, Morsche R, Kok J, et al. Genetic polymorphisms in UDP-glucuronosyltransferases and glutathione S-transferases and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis* 2004; 25(12):2407-2415.
- 109- Martins R, Morais A, Dias A, Soares I, Rolão C, Ducla-Soares JL, et al. Early modification of sickle cell disease clinical course by UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene promoter polymorphism. *J of Human Genetics* 2008; 53(6):524-528.
- 110- Rocha S, Costa E, Ferreira F, Cleto E, Barbot J, Rocha-Pereira P, et al. Hereditary spherocytosis and the (TA)_nTAA polymorphism of UGT1A1 gene promoter region--a comparison of the bilirubin plasmatic levels in the different clinical forms. *Blood cells, molecules and diseases* 2010; 44(2):117-119.
- 111- Costa E, Vieira E, Martins M, Saraiva J, Cancela E, Costa M, et al. Analysis of the UDP-glucuronosyltransferase gene in Portuguese patients with a clinical

- diagnosis of Gilbert and Crigler–Najjar syndromes. *Blood cells, molecules and diseases* 2006; 36(1):91-97.
- 112- Gonçalves E, Bento MC, Relvas L, Ribeiro ML, Tamagnisi GP. Síndrome de Gilbert - Frequência do genótipo UGT1A1 (TA)⁷/(TA)⁷ numa amostra da população portuguesa. *GE - J Port Gastreterol* 2001; 8:250-253.
- 113- Ekblom K, Marklund S, Jansson J, et al. Plasma Bilirubin and UGT1A1*28 Are Not Protective Factors Against First-Time Myocardial Infarction in a Prospective, Nested Case -Referent Setting. *Circ Cardiovasc Genetics* 2010; 3:340-347.
- 114- Babaoglu M, Yigit S, Aynacioglu S, Kerb R, Yurdakok M, Bozkurt A. Neonatal Jaundice and Bilirubin UDP-Glucuronosyl Transferase 1A1 Gene Polymorphism in Turkish Patients. *Clinical pharmacology and toxicology* 2006; 98(4):377-380.
- 115- Ulgenalp A, Duman N, Schaefer FV, Wetsell L, Bora E, Gulcant H, et al. Analyses of polymorphism for UGT1*1 exon 1 promoter in neonates with pathologic and prolonged jaundice. *Biol Neonate* 2003; 83(4):258-262.
- 116- Huang CS, Chang PF, Huang MJ, Chen ES, Hung KL, Tsou KI. Relationship between bilirubin UDP-glucuronosyl transferase 1A1 gene and neonatal hyperbilirubinemia. *Pediatric research* 2002; 52(4):601-605.
- 117- Huang CS, Chang PF, Huang MJ, Chen ES, Chen WC. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, the UDP-glucuronosyl transferase 1A1 gene, and neonatal hyperbilirubinemia. *Gastroenterology* 2002; 123(1):127-133.
- 118- Kim YH, Yeon JE, Jung GM, Kim HJ, Kim JS, Byun KS, et al. A study of polymorphism in UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter gene in Korean patients with gilbert's syndrome. *J Korean Medical Sciences* 2002; 8(2):132-138.
- 119- Choe PG, Park WB, Song JS, Kim NH, Song KH, Park SW, et al. Incidence of Atazanavir-associated Hyperbilirubinemia in Korean HIV Patients: 30 Months Follow-up Results in a Population with Low UDP-glucuronosyltransferase1A1*28 Allele Frequency. *J Korean Medical Sciences* 2010; 25(10):1427-1430.
- 120- Ki CS, Lee KA, Lee SY, Kim HJ, Cho SS, Park JH, et al. Haplotype Structure of the UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) Gene and Its Relationship to Serum Total Bilirubin Concentration in a Male Korean population. *Clinical Chemistry* 2003; 49(12):2078-2081.

- 121- Farheen S, Sengupta S, Santra A, Pal S, Dhali GK, Chakravorty, et al. Gilbert's syndrome: High frequency of the (TA)₇ TAA allele in India and its interaction with a novel CAT insertion in promoter of the gene for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 gene. *W J Gastroenterology* 2006; 12(14):2269-2275.
- 122- Saeki M, Saito Y, Jinno H, Tohkin M, Kurose K, Kaniwa N, et al. Comprehensive UGT1A1 Genotyping in a Japanese Population by Pyrosequencing. *Clinical Chemistry* 2003; 49(7):1182-1185.
- 123- Takekuma Y, Takenaka T, Kiyokawa M, Yamazaki K, Okamoto H, Kitabatake A, et al. Contribution of Polymorphisms in UDP-Glucuronosyltransferase and CYP2D6 to the Individual Variation in Disposition of Carvedilol. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2006; 9(1):101-112.
- 124- Akiyama Y, Fujita K, Nagashima F, Yamanoto W, Endo H, Sunakawa Y, et al. Genetic testing for UGT1A1*28 and *6 in Japanese patients who receive irinotecan chemotherapy. *Annals of oncology* 2008; 19(12):2089-2090.
- 125- Kamisako T. What is Gilbert's syndrome? Lesson from genetic polymorphisms of UGT1A1 in Gilbert's syndrome from Asia. *J Gastroentero Hepatol* 2004; 19(9):955-957.
- 126- Kaniwa N, Kurose K, Jinno H, Tananka-Kagawa T, Saito Y, Saeki M, et al. Racial variability in haplotype frequencies of UGT1A1 and glucuronidation activity of a novel single nucleotide polymorphism 686C>T (P229L) found in a african-american. *Drug metabolism and disposition* 2005; 33(3):458-465.
- 127- Maruo Y, Nishizawa K, Sato H, Sawa H, Shimada M. Prolonged unconjugated hyperbilirubinemia associated with breast milk and mutations of the bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase gene. *Pediatrics* 2000; 106(5):59-60.
- 128- Samilchuk E, Suleiman I, Usanga E, Awadi S. UDP Glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) Gene Promoter Polymorphism among Kuwaitis with Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficiency. *Kuwait Medical Journal* 2001; 33(5):22-25.
- 129- Yussoff S, Van Rostenberghe H, Yussoff NM, Talib NA, Ramli N, Ismail NZ, et al. Frequencies of A(TA)₇TAA, G71R, and G493R Mutations of the UGT1A1 Gene in the Malaysian Population. *Biology of the neonate* 2006; 89(3):171-176.
- 130- Huang MJ, Kua KE, Teng HC, Tang KS, Weng HW, Huang CS. Risk factors for severe hyperbilirubinemia in neonates. *Pediatric Research* 2004; 56(5):682-689.

- 131- Huang YY, Huang MJ, Yang SS, Teng HC, Huang CS. Variations in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene for the development of unconjugated hyperbilirubinemia in Taiwanese. *Pharmacogenomics* 2009; 9(9):1229-1235.
- 132- Liu CY, Chen PM, Chiou TJ, Liu JH, Lin JK, Lin TC, et al. UGT1A1*28 Polymorphism Predicts Irinotecan-induced Severe Toxicities Without Affecting Treatment Outcome and Survival in Patients With Metastatic Colorectal Carcinoma. *American Cancer Society* 2008; 112(9):1932-1940.
- 133- Tang K, Chiu H, Chen H, Eng HL, Tsai CJ, Teng HC, et al. Link between colorectal cancer and polymorphisms in the uridine-diphosphoglucuronosyltransferase 1A7 and 1A1 genes. *World J of Gastroenterology* 2005; 11(21):3250-3254.
- 134- Chaar V, Kéclard L, Diara JP, Leturdu C, Elion J, Clayton J, et al. Association of UGT1A1 polymorphism with prevalence and age at onset of cholelithiasis in sickle cell anemia. *Haematologica* 2005; 90(2):188-193.
- 135- Haverfield EV, Mckenzie CA, Forrester T, Bouzekri N, Harding R, Serjeant G, et al. UGT1A1 variation and gallstone formation in sickle cell disease. *Blood journal* 2005; 105(3):968-972.
- 136- Arámbula E, Vaca G. Genotyping by “Cold Single-Strand Conformation Polymorphism” of the UGT1A1 Promoter Polymorphism in Mexican Mestizos. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2002; 28(1):86-90.
- 137- Girard H, Butler LM, Villeneuve L, Millikan RC, Sinha R, Sandler RS, et al. UGT1A1 and UGT1A9 functional variants, meat intake, and colon cancer, among Caucasians and African Americans. *Mutat Res* 2008; 644(1-2):56-63.
- 138- Duguay Y, McGrath M, Lépine J, Gagné JF, Hankinson SE, Colditz GA, et al. The Functional UGT1A1 Promoter Polymorphism Decreases Endometrial Cancer Risk. *Cancer Research* 2004; 64(3):1202-1207.
- 139- Parodi L, Pickering E, Cisar LA, Lee D, Soufi-Mahjoubi R. Utility of Pretreatment Bilirubin Level and UGT1A1 Polymorphisms in Multivariate Predictive Models of Neutropenia Associated with Irinotecan Treatment in Previously Untreated Patients with Colorectal Cancer. *Archives of Drug Information* 2008; 1(3):97-106.
- 140- Liu J, Qu K, Sferruzza A, Bender RA. Distribution of the UGT1A1*28 polymorphism in Caucasian and Asian populations in the US: a genomic analysis of 138 healthy individuals. *Anticancer Drugs* 2007; 18(6):693-696.

- 141- Li Y, Buckley D, Wang S, Klaassen CD, Zhong XB. Genetic Polymorphisms in the TATA Box and Upstream Phenobarbital-Responsive Enhancer Module of the UGT1A1 Promoter Have Combined Effects on UDPGlucuronosyltransferase1A1 Transcription Mediated by Constitutive Androstane Receptor, Pregnane X Receptor, or Glucocorticoid Receptor in Human Liver. *Drug Metabolism and Disposition* 2009; 37(6):1978-1986.
- 142- Lin JP, Schwaiger JP, Cupples LA, O'Donnell CJ, Zheng G, Shoenborn V, et al. Conditional linkage and genome-wide association studies identify UGT1A1 as a major gene for anti-atherogenic serum bilirubin levels – The Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* 2009; 206(1):228-233.
- 143- Navarro S, Peterson S, Chen C, Makar KW, Schwarz Y, King IB, et al. Cruciferous vegetable feeding alters UGT1A1 activity: diet- and genotype-dependent changes in serum bilirubin in a controlled feeding trial. *Cancer Prev Res* 2009; 2(4):345-352.
- 144- Saracino M, Bigler J, Schwarz Y, Chang JL, Li S; Li L, et al. Citrus Fruit Intake Is Associated with Lower Serum Bilirubin Concentration among Women with the UGT1A1*28 Polymorphism. *Journal of Nutrition* 2009; 139(3):555-560.
- 145- Lin Z, Fontaine J, Watchko J. Coexpression of Gene Polymorphisms Involved in Bilirubin Production and metabolism. *J of American Academy of Pediatrics* 2008; 122(1):156-162.
- 146- Chang JL, Bigler J, Schwarz Y, Li SS, Li L, King IB, et al. UGT1A1 Polymorphism Is Associated with Serum Bilirubin Concentrations in a Randomized, Controlled, Fruit and Vegetable Feeding Trial. *Journal of nutrition* 2007; 137(4):890-897.
- 147- Lin JP, O'Donnell CJ, Schwaiger JP, Cupples LA, Lingenhel A, Hunt SC, et al. Association Between the UGT1A1*28 Allele, Bilirubin Levels, and Coronary Heart Disease in the Framingham Heart Study. *J of American heart association* 2006; 114(14):1476-1481.
- 148- Shatalova EG, Walther SE, Favorova OO, Rebbeck TR, Blanchard RL. Genetic polymorphisms in human SULT1A1 and UGT1A1 genes associate with breast tumor characteristics: a case-series study. *Brest Cancer Research* 2005; 7(6):909-921.

- 149- Peterson S, Bigler J, Horner NK, Potter JD, Lampe JW. Cruciferae Interact with the UGT1A1*28 Polymorphism to Determine Serum Bilirubin Levels in Humans. *J of Nutrition* 2010; 135(5):1051-1055.
- 150- Carlini LE, Meropol NJ, Bever J, Andria ML, Hill T, Gold P, et al. UGT1A7 and UGT1A9 Polymorphisms Predict Response and Toxicity in Colorectal Cancer Patients Treated with Capecitabine/Irinotecan. *Clinical Cancer Research* 2005; 11(3):1226-1236.
- 151- Fang JL, Lazarus P. Correlation between the UDP-Glucuronosyltransferase (UGT1A1) TATAA Box Polymorphism and Carcinogen Detoxification Phenotype: Significantly Decreased Glucuronidating Activity against Benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol in Liver Microsomes from Subjects with the UGT1A1*28 Variant. *Cancer Epidemiology* 2004; 13(1):102-109.
- 152- Guillemette C, Millikan RC, Newman B, Housman DE. Genetic Polymorphisms in Uridine Diphospho-Glucuronosyltransferase 1A1 and Association with Breast Cancer among African Americans. *Cancer Research* 2000; 60:950-956.
- 153- Abnet CC, Fagundes RB, Strickland PT, Kamangar F, Roth MJ, Taylor PR, et al. The influence of genetic polymorphisms in Ahr, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, GST M1, GST T1 and UGT1A1 on urine 1-hydroxypyrene-glucuronide concentrations in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil. *Carcinogenesis* 2006; 28(1):112-117.
- 154- Carvalho CG, Castro SM, Santin AP, de Azevedo LA, Pereira ML, Giugliani R. Polymorphic Variants of UGT1A1 in Neonatal Jaundice in Southern Brazil. *Journal of Tropical Pediatrics* 2010; 56(5):366-367.
- 155- Fertrin K, Gonçalves M, Saad S, Costa F. Frequencies of UDP-Glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) gene promoter polymorphisms among distinct ethnic groups from Brasil. *A J of Medical Genetics* 2002; 108:117-119.
- 156- Harraway JR, George PM. Use of Fully Denaturing HPLC for UGT1A1 Genotyping in Gilbert Syndrome. *Clinical Chemistry* 2005; 51(11):2183-2185.
- 157- Kemp DC, Fan PW, Stevens JC. Characterization of raloxifene glucuronidation in vitro: contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance. *Drug Metab Dispos* 2002; 30(6):694-700.
- 158- Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, et al. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical

trial. Multiple outcomes of raloxifene evaluation (MORE) investigators. JAMA 1999; 282(7):637-645.

- 159- <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/2007/ucm108981.htm>
- 160- Gallagher PG, Forget BG, Lux SE. Disorders of the erythrocyte membrane. Nathan and Oski's Hematology of infancy and childhood 1998; 1:544.
- 161- Trotman BW. Pigment gallstone disease. Gastroenterol Clin North America 1991; 20(1):111-126.
- 162- Ebner T, Rimmel RP, Burchell B. Human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase catalyzes the glucuronidation of ethinylestradiol. Mol Pharmacol 1993; 43(4):649-654.
- 163- Lépine J, Bernard O, Plante M, Têtu B, Pelletien G, Labrie F, et al. Specificity and regioselectivity of the conjugation of the estradiol, estrone and their catecholestrogen and methoxyestrogen metabolites by human uridine diphospho-glucuronosyltransferases expressed in endometrium. J Clin Endocrinol Metb. 2004; 89(10):5222-5232.