

Distribución del genotipo A(TA)_nTAA asociado al síndrome de Gilbert en la población española

José Miguel Fernández Salazar^a, Ángel Remacha Sevilla^c, Elisabeth del Río Conde^b y Montserrat Baiget Bastús^b

^aLaboratorio Central. Complejo Hospitalario San Millán-San Pedro. Logroño.

^bServicio de Genética i ^cDepartament d'Hematología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

FUNDAMENTO: Se analiza la distribución del genotipo A(TA)_nTAA asociado al síndrome de Gilbert en la población española.

PACIENTES Y MÉTODO: Se han analizado 100 donantes de sangre utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para analizar el número de repeticiones del par de bases TA en el promotor del gen de la enzima UDP-glucuronosiltransferasa (*UGT-1*).

RESULTADOS: En población española, la frecuencia del genotipo homocigoto mutado (7/7) es del 9%. El 51% de los individuos analizados resultaron heterocigotos (6/7).

CONCLUSIONES: El porcentaje de alelos mutados detectados en la población analizada, similar al hallado en otras poblaciones caucasianas, plantea la inclusión del análisis genotípico del gen *UGT-1* en el protocolo diagnóstico de hiperbilirrubinemias no conjugadas, crónicas, de intensidad moderada, en ausencia de hemólisis y de enfermedad hepática.

Palabras clave: Síndrome de Gilbert; Gen *UGT-1*; Genotipo A(TA)_nTAA.

Variability in the *UGT-1* gene promoter and Gilbert's syndrome

BACKGROUND: We have examined the variation in the promoter region in the gene encoding *UGT-1*, associated with Gilbert's syndrome, in Spanish population.

PATIENTS AND METHOD: Blood DNA was obtained from 100 blood donors. Polymerase chain reaction (PCR) was used to examine the A(TA)_nTAA motif in the promoter region of the *UGT-1* gene.

RESULTS: The frequency of the abnormal 7/7 genotype in Spanish population was 9%. The heterozygous 6/7 genotype was identified in 51% of the subjects.

CONCLUSIONS: The frequency of the abnormal allele, similar in different caucasian populations, raise the question whether it would be worthwhile and cost-effective to introduce molecular screening for Gilbert's syndrome in the study of mild, chronic unconjugated hyperbilirubinemia, in the absence of haemolysis or evidence of hepatic injury.

Med Clin (Barc) 2000; 115: 540-541

Correspondencia: Dra. M. Baiget Bastús
Servicio de Genética.
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Avda. Sant Antoni M. Claret, 167. 08025 Barcelona.
Correo electrónico: mbaiget@hsp.santpau.es
Recibido el 3-4-2000; aceptado para su publicación el 7-9-2000

El síndrome de Gilbert se caracteriza por la presencia de una hiperbilirrubinemia no conjugada, en ausencia de alteración hepática o hemólisis¹. En el metabolismo de la conjugación de la bilirrubina, la enzima UGT-1 (UDP-glucuronosiltransferasa) EC2.4.1.17 tiene un papel fundamental y existe una relación entre la actividad de dicha enzima y las concentraciones de bilirrubina².

La localización del gen que codifica para la enzima UGT-1 en el brazo largo del cromosoma 2 (2q 37) y su posterior identificación ha permitido analizar la relación entre las mutaciones en el gen *UGT-1* y su expresión fenotípica, que causa el síndrome de Gilbert.

Aunque se han identificado distintos tipos de mutaciones en las regiones codificantes del gen, en la mayoría de los pacientes con síndrome de Gilbert se ha documentado la existencia de variantes en el promotor de dicho gen. La caja «TATA» del promotor del gen *UGT-1* tiene la estructura [A(TA)_nTAA], mientras que en los individuos con síndrome de Gilbert, existe un par de bases adicionales, por tanto presentan 7 repeticiones TA [A(TA)_nTAA] en lugar de las 6 habituales. La presencia de este par de bases adicionales produce una reducción de la actividad enzimática de la UGT-1, disminuyendo su capacidad de glucuronización hasta un 30%³. El objetivo de este trabajo ha sido analizar la distribución del genotipo A(TA)_nTAA en la población española y valorar la utilidad de este estudio molecular en el diagnóstico de las hiperbilirrubinemias indirectas.

Pacientes y método

Se han analizado las muestras de ADN genómico de 100 donantes voluntarios de sangre, provenientes del Banco de Sangre de nuestro centro. El ADN se obtuvo a partir de los leucocitos de la sangre periférica por procedimientos convencionales. El ADN de cada paciente fue utilizado para amplificar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la región del promotor del gen de la *UGT-1A* que flanquea la caja TATA donde se encuentra el polimorfismo (GenBank M84125), utilizando los cebadores descritos por Monaghan et al⁴ que amplifican una región de 98 pares de bases correspondiente a un alelo [A(TA)_nTAA] y de 100 pares de bases correspondiente a un alelo [A(TA)_nTAA].

La amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl que contenían 1,5 mmol/l de Cl₂Mg, 0,2 mmol/l de dNTP's, cebadores a 10 pmol, tampón ×10 y 5 U de Taq polimerasa en un termociclador MINICYCLER™ (MJ Research, Inc., 590 Lincoln Street, Waltham, MA, 02451, EE.UU.) con las siguientes condiciones: desnaturación a 95 °C durante 5 min seguida de 30 ciclos a 95 °C de 30 s, a 58 °C de 40 s y a 72 °C de 40 s, con una extensión final a 72 °C durante 2 min. Los productos de PCR se separaron mediante una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% (38:2 acrilamida: bisacrilamida) en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE).

La identificación definitiva de los distintos patrones electroforéticos obtenidos se efectuó mediante secuenciación automática.

Resultados

En la figura 1 se expone el patrón de separación electroforética de los distintos alelos de la región promotora del gen *UGT-1*. Los resultados obtenidos en la población estudiada se resumen en la tabla 1. De los 100 sujetos analizados, 9 (9%) resultaron homocigotos para el alelo A(TA)_nTAA mutado (7/7). Un 51% resultó ser heterocigoto (6/7), mientras que el 40% restante presentó los 2 alelos nor-

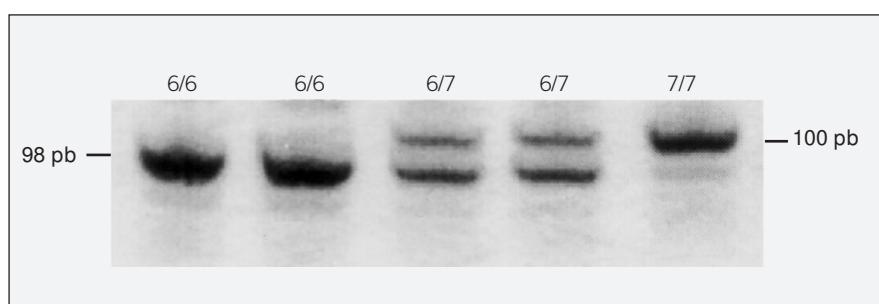


Fig. 1. Separación en gel de poliacrilamida de los fragmentos de ADN de 98 pares de bases (alelo con 6 repeticiones TA) y de 100 pares de bases (alelo con 7 repeticiones TA). En la parte superior se indican los genotipos correspondientes a las distintas muestras.

males A(TA)₆TAA (6/6). En la **tabla 1** se exponen, además, las frecuencias halladas en otras poblaciones caucásicas analizadas.

Discusión

Ante un paciente con episodios de hiperbilirrubinemia indirecta, habitualmente se efectúa el diagnóstico de síndrome de Gilbert después de excluir la existencia de una hepatopatía o de un síndrome hemolítico. A menudo se somete al paciente a pruebas de estimulación, como el test del ayuno prolongado, que incrementan la producción de bilirrubina. Estas pruebas, además de ser incómodas para el paciente, son poco específicas. Por otra parte, los individuos con síndrome de Gilbert presentan unos valores de bilirrubina variables, incluso dentro de la normalidad teórica, y que se incrementan por diferentes factores, como ejercicio físico, ayuno, estrés, enfermedad, menstruación, etc.¹.

Distintas mutaciones en el gen *UGT-1* se han asociado a los síndromes hereditarios de hiperbilirrubinemia no conjugada: los síndromes de Crigler-Najjar y de Gilbert⁵. La forma más moderada de síndrome de Gilbert tiene un patrón de herencia autosómica recesiva y está asociado a la inserción del dinucleótido TA en el promotor del gen *UGT-1*³. Así, aunque en el contexto clínico la clasificación de los síndromes de Crigler-Najjar y Gilbert mantiene su utilidad, desde el punto de vista genético ambos síndromes representan los 2 extremos de una alteración que afecta al mismo *locus*.

El estudio genotípico de la región promotora del gen *UGT-1* facilita la identificación de individuos con variantes aleáticas asociadas a hiperbilirrubinemias no conjugadas y confirma el diagnóstico de síndrome de Gilbert que en la actualidad se realiza por exclusión de otros procesos patológicos.

El estudio genotípico del gen *UGT-1* en pacientes con un proceso hemolítico (ta-

TABLA 1
Genotipo del gen *UGT-1* en distintas poblaciones

Genotipo	Población			
	España n (%)	EE.UU. ^a n (%)	Holanda ^b n (%)	Escocia ^c n (%)
6/6	40 (40)	24 (33,8)	19 (34,5)	– (40)
6/7	51 (51)	39 (54,9)	28 (50,9)	– (48)
7/7	9 (9)	8 (11,2)	8 (14,5)	– (12)
Total	100	71	55	–

^aBeutler E et al¹⁰. ^bBosma PJ et al³. ^cMonaghan G et al⁴.

lasemias, déficit de G6PD, esferocitosis, etc.) ha demostrado que el estado homocigoto para el alelo de 7 repeticiones puede explicar la gran variabilidad de las concentraciones de bilirrubina que presentan estos enfermos⁶⁻⁸. Monaghan et al⁹, tras el estudio del promotor del gen *UGT-1* en recién nacidos, han demostrado una asociación entre una icteria neonatal prolongada y la presencia del genotipo 7/7.

En un interesante estudio, Beutler et al¹⁰ analizan la distribución del número de repeticiones TA en tres poblaciones: europea, asiática y africana. Aunque la frecuencia más elevada del alelo (TA)₇ (0,426) aparece en individuos de origen africano, en la población caucásica es también considerable (0,387), mientras que resulta significativamente más baja en asiáticos (0,160). Estos autores atribuyen al número de repeticiones TA la capacidad de ajustar la bilirrubina sérica a unas concentraciones suficientemente elevadas para que aquella proteja contra el daño oxidativo sin provocar querñíctero en el recién nacido.

Los valores obtenidos en este estudio para cada uno de los genotipos son similares a los de otros estudios realizados en la población caucásica (**tabla 1**): aproximadamente un 10% de sujetos son homocigotos mutados (7/7) y un 50% son portadores heterocigos de un alelo de 7 repeticiones. Estos resultados nos permiten plantear la idoneidad del escru-

tinio molecular para el síndrome de Gilbert como una prueba adicional, tanto en el protocolo diagnóstico de hiperbilirrubinemias no conjugadas, crónicas, de intensidad moderada, en ausencia de enfermedad hepática en el adulto, como en recién nacidos con ictericia neonatal prolongada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chowdhury JR, Wolkoff AW, Chowdhury NR, Arias IM. Hereditary jaundice and disorders of bilirubin metabolism. En: Sriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editores. The metabolic and molecular basis of inherited diseases. Nueva York: McGraw-Hill, 1995; 2161-2208.
- Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem* 1994; 269: 17960-17964.
- Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra B et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333: 1171-1175.
- Monaghan G, Ryan M, Seddon R, Hume R, Burcell B. Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *Lancet* 1996; 347: 578-581.
- Sampietro M, Iolascon A. Molecular pathology of Crigler-Najjar type I and II and Gilbert's Syndrome. *Haematologica* 1999; 84: 150-157.
- Galanello R, Cipollina MD, Dessì C, Giagu N, Lai E, Cao A. Co-inherited Gilbert's syndrome: a factor determining hyperbilirubinemia in homozygous beta-thalassaemia. *Haematologica* 1999; 84: 103-105.
- Sampietro M, Lupica L, Perrero L, Comino A, Martínez F, Cappellini D et al. The expression of uridine diphosphate glucuronosyltransferase gene is a major determinant of bilirubin level in heterozygous β-thalassaemia and in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Br J Haematol* 1997; 99: 437-439.
- Miraglia del Giudice E, 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: 2259-2262.
- 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: 441-446.
- Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT-1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8170-8174.