

# Basi molecolari dell'iperbilirubinemia congenita: sindromi di Gilbert e di Crigler-Najjar

Immacolata Andolfo<sup>1,2</sup> e Achille Iolascon<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università "Federico II" di Napoli

<sup>2</sup> CEINGE, Biotecnologie Avanzate, Napoli

## Riassunto

L'iperbilirubinemia neonatale interessa il 6-10% dei neonati durante la prima settimana di vita. In molti casi si tratta di un ittero senza gravi conseguenze; in altri casi, più gravi, si sviluppa *kernicterus*, che può provocare anomalie nello sviluppo neuronale, quali perdita dell'udito, atetosi e, raramente, deficit intellettuali. La coniugazione, l'assorbimento e l'escrezione della bilirubina possono essere inficiati in diverse condizioni, acquisite o ereditarie, che includono malattie infettive, ostruttive, immunitarie e malattie/sindromi genetiche. In questa *review* saranno prese in considerazione le basi molecolari dei disordini ereditari del metabolismo della bilirubina non coniugata, quali le sindromi di Gilbert e di Crigler-Najjar di tipo I e II, per spiegare l'impatto che la conoscenza di queste ha avuto sulla classificazione clinica e sulle valutazioni diagnostiche di queste patologie.

## Summary

*Neonatal hyperbilirubinemia affects 6-10% of infants during the first week of life. In many cases, it is a physiological jaundice without serious consequence, in other, more serious cases, kernicterus may develop and cause abnormalities in neuronal development, such as hearing loss, athetosis, and, rarely, intellectual deficits. Conjugation, absorption and excretion of bilirubin are abnormal in different, acquired or hereditary conditions that include infectious diseases, obstructive, immune and genetic diseases/syndromes. In this review, we will take into account the molecular basis of inherited metabolic disorders of unconjugated bilirubin, such as Gilbert syndrome and Crigler-Najjar syndromes type I and II, and explain the impact of their knowledge on the clinical and diagnostic classification of these diseases.*

## Metodologia di ricerca bibliografica

La ricerca degli articoli rilevanti è stata effettuata sulla banca bibliografica PubMed, utilizzando come parole chiave: "Bilirubin metabolism", "Bilirubin conjugation", "UGT1A1", "Gilbert syndrome", "Crigler-Najjar syndromes type I" and "Crigler-Najjar syndromes type II".

## Introduzione

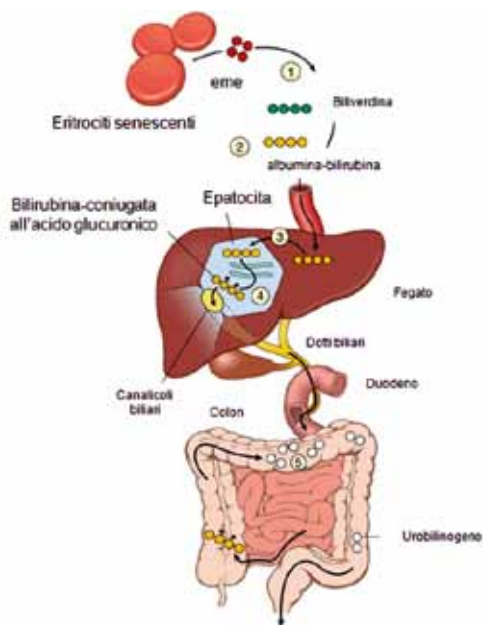
La bilirubina deriva dalla degradazione della protoporfirina del gruppo eme presente in alcune proteine, quali emoglobina, mioglobina, e citocromo P-450 (Kadokol et al., 2000). È un anione organico con scarsa solubilità in acqua e non trasportabile nella sua forma nativa. Nel fegato, la bilirubina è coniugata con l'acido glucuronico, divenendo bilirubina diglucuronide, solubile in acqua e secreta nella bile (Fig. 1). I livelli di bilirubina sierica aumentano quando la sua produzione eccede la capacità metabolica (4 mg/kg/die) e di escrezione (Roy Chowdhury et al., 2000). Lo sbilancio tra produzione ed eliminazione può risultare sia da un eccesso di rilascio di precursori nel circolo ematico, sia da un difetto di *uptake* epatico, di metabolismo o di escrezione. Le concentrazioni di bilirubina sierica in un soggetto normale variano da 0.3 a 1.0 mg/dL. L'ottanta per cento della bilirubina circolante deriva dai globuli rossi senescenti distrutti dalle cellule reticolo endoteliali. La restante parte origina da altre fonti, incluse l'eritropoiesi inefficace e le proteine contenenti eme, come i citocromi epatici e la mioglobina muscolare. Circa il 90% della bilirubina sierica circola legata all'albumina nella forma detta non coniugata (Roy Chowdhury et al., 2000). La bilirubina non coniugata entra negli epatociti per diffusione o trasporto attivo attraverso

la membrana plasmatica ed è legata alla proteina ligandina, che ne previene il suo efflusso nel plasma. Nel reticolo endoplasmatico degli epatociti avviene la detossificazione della bilirubina tramite la glucuronazione operata dall'enzima bilirubina UDP-glucuronosiltransferasi 1A1 (UGT1A1), che la rende solubile in acqua. La bilirubina coniugata all'acido glucuronico può a questo punto essere secreta dagli epatociti tramite la bile.

Nella pratica clinica, l'iperbilirubinemia può essere divisa in due grandi categorie: iperbilirubinemia non coniugata o indiretta e iperbilirubinemia coniugata o diretta. La coniugazione, l'*uptake* e l'escrezione della bilirubina possono essere inficiati da numerose condizioni acquisite ed ereditabili che includono infezioni, tossicità, patologie immunitarie e genetiche. Questo lavoro è focalizzato sui disordini ereditari della coniugazione della bilirubina, quali la sindrome di Gilbert e le sindromi di Crigler-Najjar di tipo I e II. Tali patologie sono causate da mutazioni nel gene *UGT1A1* codificante per l'enzima responsabile della coniugazione della bilirubina all'acido glucuronico.

## La coniugazione della bilirubina ed il ruolo del gene UGT1A1

Negli epatociti, la bilirubina indiretta viene coniugata con l'acido glucuronico tramite l'attività dell'enzima UDP-glucuronosiltransferasi 1A1 (UGT1A1), che appartiene alla grande famiglia degli enzimi UDP-glucuronosiltransferasi (UGTs) (Fig. 2). Questa famiglia è composta da enzimi microsomiali legati alla membrana che catalizzano la coniugazione di bilirubina, steroidi, acidi biliari e xenobiotici con l'UDP- acido glucuronico (UDP-GlcUA) (Takashi et al., 1998). I geni *UGTs* sono divisi in due famiglie sulla base dell'identità della se-



**Figura 1.**

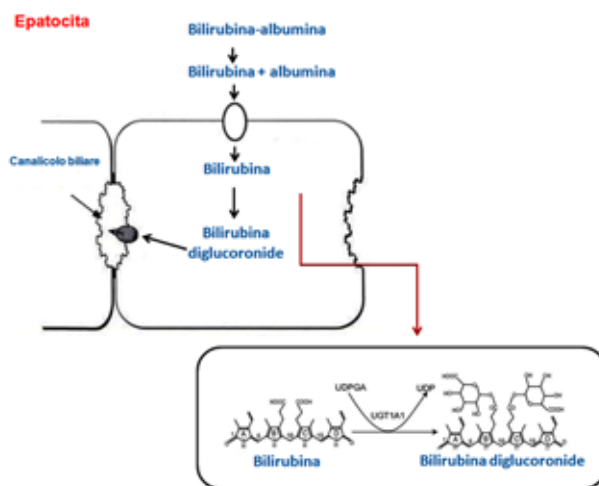
Tappe fondamentali del metabolismo della bilirubina nell'uomo.

1. L'eme derivante dalla degradazione di alcune proteine, quali emoglobina degli eritrociti, mioglobina, e citocromo P-450, viene trasformato in biliverdina, poi ridotta a bilirubina ad opera della biliverdina reductasi. 2. La bilirubina viene complessata all'albumina per essere trasportata nel circolo sanguigno. 3. La bilirubina viene separata dall'albumina ed entra nell'epatocita. 4. La bilirubina subisce il processo della coniugazione con l'acido glucuronico e viene secreta nei dotti biliari tramite la bile. 5. La bile arriva nell'intestino, dove nel colon, tramite l'azione degli enzimi della flora batterica intestinale, è scissa in acido glucuronico e bilirubina, la quale viene in seguito convertita in urobilinogeno, mesobilinogeno e stercobilinogeno.

quenza aminoacidica, UGT1 and UGT2, localizzati sul braccio lungo del cromosoma 2 e 4, rispettivamente. Le proteine da essi codificate condividono gli stessi 245 aminoacidi nella regione carbossi terminale, mentre hanno poca omologia nella regione amino-terminale (circa 37-49%) (Ritter et al., 1992).

La regolazione trascrizionale del locus *UGT* è molto particolare; il primo esone è specifico di ogni isoforma e codifica per i primi 287-289 aminoacidi della regione amino-terminale dell'enzima. Questa regione è critica per la determinazione della specificità del substrato. Gli altri 4 esoni, localizzati in una regione di 6 Kb, codificano per la regione carbossi-terminale e sono in comune tra tutte le isoforme degli enzimi UGTs. La serie degli esoni 1 (12 in totale) copre invece, una regione di 85Kb. Ogni esone 1 subisce un diverso processo di *splicing* per essere legato con i 4 esoni comuni e produrre un unico RNA maturo (Fig. 3). L'isoforma UGT1A1 è responsabile per il 99% dell'attività di glucuronazione della bilirubina; la sua espressione è modulata durante lo sviluppo: infatti, da 17 a 30 settimane di gestazione la sua attività è 0,1% rispetto ai livelli dell'adulto, per poi aumentare a 1% tra la 30<sup>a</sup>-40<sup>a</sup> settimana di gestazione e raggiunge i livelli dell'adulto dopo 14 settimane dopo la nascita (Ikushiro et al., 1995).

Il promotore dei geni UGTs contiene un elemento TATAA con 6 ripetizioni TA (A(TA)6TAA). Una variante polimorfica della sequenza TATAA, contenente una ripetizione TA in più (A(TA)7TAA) è stata associata ad una ridotta espressione del gene, responsabile della sindrome di Gilbert (Sampietro et al., 1999).

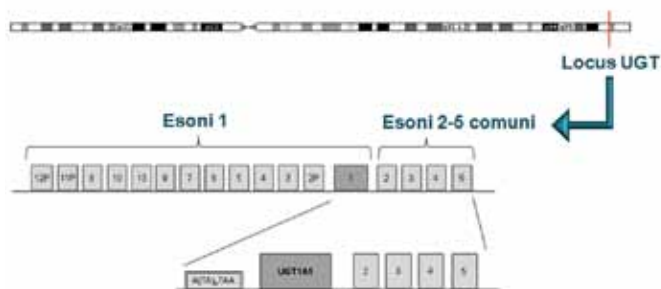


**Figura 2.**

Coniugazione della bilirubina nell'epatocita.

Rappresentazione schematica di un epatocita. La bilirubina entra dopo essere stata separata dall'albumina e viene coniugata con l'acido glucuronico tramite l'azione dell'enzima UDP-glucuronosiltransferasi 1A1 (UGT1A1); la reazione è schematizzata in basso, mostrando la struttura chimica della bilirubina e del prodotto della reazione di coniugazione, la bilirubina diglucuronide.

**Cromosoma 2**



**Figura 3.**

Organizzazione del locus UGT.

Il locus UGT è localizzato sul cromosoma 2 (2q37; in alto). In basso è mostrata una rappresentazione schematica dei singoli esoni 1 (12 esoni) della famiglia UGT e gli esoni 2-5 comuni a tutte le isoforme. Tramite il processo di *splicing* alternativo l'esone 1 è unito agli esoni 2-5 per formare il trascritto del gene UGT1A1, codificante per l'enzima responsabile della coniugazione della bilirubina all'acido glucuronico.

### Caratteristiche cliniche e genetiche della sindrome di Gilbert

All'inizio del secolo scorso, Gilbert e Lereboullette descrissero per la prima volta una nuova sindrome "*cholémie simple familiale*" (Gilbert et al., 1902). Questa sindrome è caratterizzata da lieve iperbilirubinemia in assenza di bilirubinuria o segni di emolisi e malattie epatiche. L'iperbilirubinemia non coniugata è solo lievemente aumentata (superiore a 3 mg/dL) e la glucuronazione è ridotta di circa 30% rispetto ad un soggetto sano (Berk et al., 1994; Arias et al., 1957; Black et al., 1969) (Tab. I). Questa sindrome è molto comune, infatti

**Tabella I.**

Caratteristiche cliniche e genetiche delle sindromi di Gilbert e Crigler Najjar.

Caratteristiche	Iperbilirubinemie congenite indirette		
	Gilbert	Crigler-Najjar tipo II	Crigler-Najjar tipo I
Severità clinica	Bassa	Media	Alta
Bilirubina totale	<5 mg/dL	<20 mg/dL	>20 mg/dL
Ereditarietà	AR <sup>#</sup>	AR <sup>#</sup>	AR <sup>#</sup>
Attività di UGT1A1*	50%	<10%	assente
Tipo di mutazione in UGT1A1*	Variante (TA)7 nel promotore	Missenso	Non-senso o di stop

\* UGT1A1. UDP-glucuronosiltransferasi 1A1.  
<sup>#</sup> AR. autosomica recessiva

è presente in circa il 9-15% della popolazione generale (Fretzayas et al., 2012). La caratterizzazione del gene UGT1A1 e delle sue varianti è stato uno strumento utile per capire i meccanismi genetici e l'epidemiologia della sindrome di Gilbert.

In particolare, i pazienti presentano nel promotore del gene una ripetizione in più del dinucleotide (TA) nell'elemento TATAA che dà origine alla sequenza (A(TA)7TAA), piuttosto che (A(TA)6TAA). Questa ripetizione (TA) extra inficia l'attività trascrizionale riducendo, di conseguenza, l'attività dell'enzima UGT1A1 (Watchko et al., 2009). I soggetti con sindrome di Gilbert (GS) sono omozigoti per la variante (A(TA)7TAA) nel promotore. La frequenza genica della variante risulta pari a 0,3: quindi il 9% della popolazione generale è omozigote ed il 42% risulta eterozigote (Fretzayas et al., 2012).

## Correlazione tra sindrome di Gilbert ed altre patologie

### Ittero neonatale ed anemie emolitiche

Questa malattia è comunemente diagnosticata nell'adulto, ma è stato dimostrato che può contribuire all'aumento della bilirubinemia indiretta nel periodo neonatale (Sampietro et al., 1999). Gourley e collaboratori furono i primi a confermare l'associazione tra la sindrome di Gilbert e l'ittero neonatale (Bancroft et al., 1998). I neonati con la variante (A(TA)7TAA) nel promotore del gene *UGT1A1* mostrano un aumento dell'iperbilirubinemia in epoca neonatale ed una ridotta escrezione fecale di bilirubina mono e di- glucuronata. Roy-Chowdhury e collaboratori in uno studio analogo hanno dimostrato che la presenza della variante A(TA)7TAA è associata, nei neonati, a livelli più alti di bilirubina sierica rispetto ai neonati che non presentano la variante (Roy-Chowdhury et al., 2002).

L'iperbilirubinemia, in presenza di una normale funzione epatica, si riscontra spesso in condizioni associate ad elevata produzione di bilirubina. La causa più frequente di sovrapproduzione di bilirubina è l'emolisi, come accade nell'anemia falciforme, nella sferocitosi ereditaria, e nelle reazioni avverse a determinati farmaci. Tutte queste condizioni sono associate ad una distruzione prematura degli eritrociti. Inoltre, anche l'eritropoiesi inefficace presente nella talassemia ed in altri disordini ematologici è associata ad iperbilirubinemia (anemie diseritropoietiche). Lo studio delle varianti del gene UGT1A1 e della sindrome di Gilbert ha permesso di verificare l'associazione tra aumento di bilirubina e disordini ematologici ereditari (Sampietro et al., 1999).

La sferocitosi ereditaria (HS) è un'anemia emolitica ereditaria caratterizzata da anemia, ittero e splenomegalia. Diventa evidente a livello clinico nel periodo neonatale con ittero che richiede spesso

farmacoterapia. L'esame di 178 neonati con HS con 112 (63%) pazienti, che avevano ricevuto fototerapia durante i primi giorni di vita, ha permesso di verificare che l'ittero (curato con fototerapia) era presente nel 97% dei pazienti HS omozigoti per la variante (TA)7 della sindrome di Gilbert. Questi risultati indicano che, l'ittero, nei pazienti con HS, è aumentato dall'interazione tra emolisi e variazione genetica nel promotore del gene *UGT1A1*. La formazione di calcoli, inoltre, nei pazienti HS è più frequente di 4,5 volte in presenza della variante Gilbert (Miraglia del Giudice et al., 1998). Il rischio di sviluppo dei calcoli nei pazienti HS (e forse anche in altri pazienti emolitici) sembra aumentare in maniera diretta con la dose allelica, vale a dire in presenza di uno o due alleli mutati di *UGT1A1*.

Il deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) è il disordine enzimatico del globulo rosso più frequente nell'area mediterranea. L'esame della variante Gilbert in soggetti con G6PD, durante una crisi favica ha dimostrato che i soggetti con GS hanno livelli di bilirubina significativamente più alti rispetto ai soggetti senza la variante. Kaplan et al., in uno studio simile condotto in neonati ebrei sefarditi, hanno trovato che la G6PD in associazione con la GS aumenta l'incidenza dell'iperbilirubinemia (Kaplan et al., 1997). Sampietro et al. e Galanello et al., esaminando il ruolo di GS nella G6PD e nella  $\beta$ -talassemia evidenziarono la predominanza del genotipo (TA)7 tra i pazienti con alti livelli di bilirubina (Sampietro et al., 1997; Galanello et al., 1997). L'espressione di UGT1A1 sembra quindi essere un fattore modificatore nelle malattie emolitiche ereditarie. Questo è un chiaro esempio di gene modificatore che co-ereditato con un altro gene malattia determina l'eterogeneità clinica nelle malattie monogeniche.

### Sindrome di Gilbert e calcoli biliari

La sindrome di Gilbert è anche associata ad aumentato rischio di sviluppo di colelitiasi. In particolare, la co-eredità di GS e HS aumenta ancora di più questo rischio (Fretzayas et al., 2012). Il genotipo Gilbert influenza sia la prevalenza che l'età di sviluppo dei calcoli nei pazienti con talassemia major (Sampietro et al., 1998), e nei pazienti con anemia falciforme (Berk et al., 1998). Una significativa associazione è stata descritta anche nei pazienti con anemia diseritropoietica di tipo II (CDaII) e GS, che sviluppano un'aumentata incidenza di calcoli biliari. Gli effetti della GS sono chiaramente visibili quando i pazienti CDaII sono comparati ai pazienti della stessa famiglia, ma con diverso genotipo Gilbert (Perrotta et al., 2000).

### Sindrome di Gilbert e antiossidanti

La bilirubina ha potenti effetti antiossidanti, infatti, tra i pazienti con GS esiste una bassa prevalenza di ischemia cardiaca, forse spiegabile con l'aumentata concentrazione di antiossidanti in circolo

(Strassburg, 2010). Questi effetti protettivi si evidenziano nei pazienti GS anche per quanto riguarda il rischio inferiore di sviluppare cancro dell'endometrio ed una prognosi migliore nel linfoma di Hodgkin. D'altra parte, però, la ridotta glucuronazione degli estrogeni e dei mutageni aumenta il rischio di cancro del colon-retto e della mammella (Strassburg, 2010).

### Sindrome di Gilbert e farmacogenetica

Il sistema degli enzimi UDP-glucuronosiltransferasi è responsabile della glucuronazione di molti farmaci e la sua attività diminuita nei pazienti GS incide il metabolismo di alcuni farmaci.

GS rappresenta, infatti, un fattore di rischio farmacogenetico per la tossicità all'irinotecano (farmaco antineoplastico) e all'atazanavir (farmaco antivirale) (Strassburg, 2010). In particolare, in pazienti trattati con irinotecano la presenza della variante (TA)<sub>7</sub> di UGT1A1 determina un aumento dei livelli del metabolita attivo 7-etil-10-idrossicamptotecina (SN-38) con conseguenti effetti collaterali (mielosoppressione, diarrea). Nel caso di trattamento con atazanavir, la presenza della variante comporta un'ulteriore diminuzione dell'attività enzimatica, con conseguente iperbilirubinemia. L'analisi di tale polimorfismo può dunque essere di grande rilevanza clinica per individuare pazienti che possono maggiormente beneficiare di un trattamento o predire gravi effetti collaterali.

### Le sindromi di Crigler-Najjar di tipo I e II

La sindrome di Crigler-Najjar di tipo I (CN-I), fu descritta per la prima volta da Crigler e Najjar nel 1952 come un ittero congenito, severo e non emolitico, in assenza di disfunzioni epatiche o anomalie del sistema biliare (Crigler et al., 1962) (Tab. I). La sindrome è caratterizzata da sviluppo progressivo e severo di sintomi neurologici, quali *kernicterus*, che conduce i pazienti alla morte entro i primi due anni di vita. Studi necroscopici condotti sui pazienti con CN-I hanno mostrato l'accumulo massiccio di bilirubina in organi e tessuti, ittero della corteccia cerebrale, di altre strutture del sistema nervoso centrale e perdita neuronale (Sampietro et al., 1999). I livelli di bilirubina totale sono in un intervallo tra 15 e 50 mg/dL e tutta la bilirubina è di tipo indiretto. La dimostrazione del difetto di coniugazione della bilirubina si ebbe per la prima volta tramite studi *in vivo* sul metabolismo e poi tramite studi *in vitro*, che dimostrarono l'incapacità dei pazienti con CN-I di coniugare la bilirubina con l'acido UDP-glucuronico (Arias et al., 1969). Questo difetto è analogo a quello presente nel modello animale spontaneo, il ratto Gunn, che si presenta con una condizione fenotipicamente simile all'uomo (Gunn, 1938). L'esistenza di questo tipo di ratto fu descritta nel 1938, molto prima della sindrome di Crigler-Najjar, solo in seguito l'analisi molecolare permise di correlare il fenotipo osservato nel ratto Gunn alla sindrome di Crigler-Najjar. Questo modello animale ha contribuito notevolmente allo studio della patofisiologia e a possibili approcci terapeutici per la sindrome di Crigler-Najjar di tipo I. La malattia, sorta spontaneamente, era ereditata in maniera autosomica recessiva. Recentemente, mediante tecniche di manipolazione genetica, è stato sviluppato un topo *knock-out* (topo UGT1A1<sup>-/-</sup>) (Nguyen et al., 2008). In questo modello animale il locus genico UGT1 è stato reso non funzionale. Nei topi UGT1A1<sup>-/-</sup> i livelli di bilirubina non coniugata sono molto alti e tali animali generalmente muoiono entro 2 settimane dalla nascita. Questa sindrome è molto rara, con sole poche centinaia di casi descritti in letteratura. L'analisi degli alberi genealogici ha permesso di identificare una trasmissione autosomica recessiva, poi confermata dai dati genetici. L'unico trattamento per questi pazienti è il trapianto di fegato ortotopico, poiché non rispondono alla terapia con fenobarbitale, che

induce l'attività enzimatica di UGT1A1 (Sampietro et al., 1999). La fototerapia è utilizzata per ridurre i livelli di bilirubina nei bambini, ma alcuni soggetti si vedono costretti ad utilizzarla per tutta la vita. Trasfusioni e plasmaferesi sono utilizzate come misura di emergenza prima del trapianto di fegato. Il primo trapianto di fegato riuscito con successo in un paziente CN-I fu fatto nel 1982 (Sampietro et al., 1999). In questi pazienti è importante programmare il trapianto in epoca precoce per prevenire danni neurologici irreversibili.

Per quanto riguarda la sindrome di Crigler-Najjar tipo II, i primi pazienti furono descritti da Arias et al. nel 1962. (Arias et al., 1962). CN-II è un ittero congenito, non emolitico, in assenza di disfunzioni epatiche o anomalie del sistema biliare, con livelli di bilirubina più bassi rispetto ai pazienti con CN-I (10-20 mg/dL) (Tab. I). I danni al sistema nervoso centrale sono rari e la maggior parte dei pazienti sopravvive alla vita adulta senza complicazioni (Arias et al., 1962). La somministrazione di fenobarbitale induce l'attività enzimatica di UGT1A1 riducendo i livelli di bilirubina.

La modalità di trasmissione della CN-II era stata inizialmente ipotizzata come autosomica dominante con penetranza incompleta (Arias et al., 1962), le analisi genetiche hanno invece mostrato un'eredità autosomica recessiva o eterozigotità composita con la sindrome di Gilbert (i pazienti hanno un allele con una mutazione missenso di UGT1A1, ereditata *in trans* con la variante (TA)<sub>7</sub> sull'altro allele) (Sampietro et al., 1999). L'analisi del gene *UGT1A1*, che causa le sindromi di CN ha permesso di classificare le mutazioni in due categorie: i) mutazioni che inducono la sintesi di un enzima disfunzionale e ii) mutazioni che aboliscono completamente l'attività enzimatica. Mutazioni in omozigosi o in eterozigosi composita per il primo tipo causano CN-II, mentre la CN-I è associata a mutazioni in omozigosi o in eterozigosi composita per il secondo tipo. La posizione della mutazione nel gene (per esempio esone 1 o esoni 2-5) non è critica nel determinare la gravità del quadro clinico, mentre il tipo di mutazione è discriminante; infatti, mutazioni non-senso o di stop prevalgono nella CN-I. La variante nel promotore (A(TA)<sub>7</sub>TAA) non ha un ruolo nella CN-I, poiché l'espressione del gene è già abolita o molto ridotta dalle mutazioni nella regione codificante. Nella CN-II, l'interazione tra la variante nel promotore con mutazioni missenso nella regione codificante può complicare il fenotipo; infatti, pazienti che presentano un allele con una mutazione esonica di UGT1A1 e uno con la variante (TA)<sub>7</sub> nel promotore hanno CN-II (Chalasan et al., 1997). Lo studio della genetica molecolare di *UGT1A1* ha permesso di definire la complessità della GS e la sua differenziazione con la CN-II.

In conclusione, nella pratica clinica lo studio delle mutazioni genetiche di UGT1A1 consente la classificazione delle sindromi di Gilbert e Crigler-Najjar e la diagnosi differenziale, permettendo di spiegare la variabilità fenotipica sulla base dell'eterogenità genetica.

### Conclusioni

L'iperbilirubinemia comprende un'ampia gamma di condizioni che richiedono un vasto lavoro di diagnosi, oggi coadiuvato anche dalle indagini genetiche. Le sindromi di Gilbert e di Crigler-Najjar sono caratterizzate da iperbilirubinemia congenita causata da deficit dell'attività dell'enzima UGT1A1, che conducono a differenti gradi di severità della malattia, ma le variazioni nel gene *UGT1A1* e nel suo promotore non spiegano tuttavia tutti i casi di iperbilirubinemia non coniugata. L'esperienza maturata dall'analisi clinica e genetica dei nostri pazienti, infatti, ci dimostra che circa il 10% dei pazienti presenti nella nostra casistica non presenta mutazioni nel gene *UGT1A1*. A conferma della nostra esperienza, in un recente lavoro di Datta et al. è stato effettuato uno studio di *genome-wide association*

in 200 pazienti con iperbilirubinemia, che non presentavano mutazioni nel gene *UGT1A1*, al fine di poter identificare altri geni causativi (Datta et al., 2012). Lo studio ha condotto all'identificazione di una variante genetica vicina al gene *NUP153*, significativamente associata all'iperbilirubinemia. *NUP153* codifica per una nucleoporina associata al trasporto della biliverdina riduttasi, un enzima fondamentale nel processo di coniugazione della bilirubina.

Studi futuri nei campi della biologia molecolare e della genetica medica permetteranno di identificare nuovi geni causativi di queste sindromi, per migliorare la diagnosi di questi pazienti. La crescente letteratura sulla terapia genica della sindrome di Crigler-Najjar di tipo I ci incoraggia a pensare che presto verrà sviluppata una terapia genica efficace anche nell'uomo, che permetterà di evitare il trapianto di fegato.

## Box di orientamento

### Cosa si sapeva prima

Le sindromi Gilbert e di Crigler-Najjar di tipo I e II sono itteri congeniti non emolitici, che si manifestano in assenza di disfunzioni epatiche o anomalità del sistema biliare e con diverso grado di severità. Esse rappresentano un gruppo di disordini genetici della coniugazione della bilirubina con l'acido glucuronico.

### Cosa sappiamo adesso

Mutazioni a carico del gene *UGT1A1*, codificante per l'enzima responsabile della coniugazione della bilirubina all'acido glucuronico sono causative delle sindromi di Gilbert e di Crigler-Najjar di tipo I e II. Lo studio di queste condizioni dal punto di vista genetico, anche nel modello animale, il ratto Gunn, ha permesso di definire il ruolo essenziale giocato dal gene *UGT1A1* nel metabolismo epatico della bilirubina.

### Ricadute in ambito clinico

L'identificazione delle basi molecolari di queste iperbilirubinemie non coniugate ha permesso di eseguire una diagnosi clinica più dettagliata e di stabilire il rischio prognostico nei singoli pazienti. Lo studio delle mutazioni genetiche in *UGT1A1* permette la classificazione delle sindromi di Gilbert e Crigler-Najjar e la diagnosi differenziale, consentendo di distinguere la variabilità fenotipica sulla base dell'eterogeneità genetica.

## Bibliografia

- Arias IM, Gartner LM, Cohen M, et al. *Chronic nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with glucuronyl transferase deficiency: clinical, biochemical, pharmacologic and genetic evidence for heterogeneity*. Am J Med 1969;47:395-409.
- Arias IM, London IM. *Bilirubin glucuronide formation in vitro; demonstration of a defect in Gilbert's disease*. Science 1957;126:563-4.
- Arias IM. *Chronic unconjugated hyperbilirubinemia without overt signs of hemolysis in adolescents and adults*. J Clin Invest 1962;41:2233-45.
- Bancroft JD, Kreamer B, Gourley GR. *Gilbert syndrome accelerates development of neonatal jaundice*. J Pediatr 1998;132:656-60.
- Berk PD, Noyer CM. *The familial unconjugated hyperbilirubinemias*. Semin Liver Dis 1994;14:356-85.
- Berk PD, Noyer CM. *The familial unconjugated hyperbilirubinemias*. Semin Liver Dis 1994;14:356-85.
- Black M, Billing BH. *Hepatic bilirubin UDP-glucuronyltransferase activity in liver disease and Gilbert's syndrome*. N Engl J Med 1969;280:1266-71.
- Chalasan N, Chowdhury NR, Chowdhury JR, et al. *Kernicterus in an adult who is heterozygous for Crigler-Najjar syndrome and homozygous for Gilbert type genetic defect*. Gastroenterology 1997;112:2099-103.
- Crigler JF, Najjar VA. *Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus*. Pediatrics 1952;10:169-80.
- Datta S, Chowdhury A, Ghosh M, et al. *A genome-wide search for non-UGT1A1 markers associated with unconjugated bilirubin level reveals significant association with a polymorphic marker near a gene of the nucleoporin family*. Ann Hum Genet 2012;76:33-41.
- Fretzayas A, Moustaki M, Liapi O, et al. *Gilbert syndrome*. Eur J Pediatr 2012;171:11-5.
- Galanello R, Perseu L, Melis MA, et al. *Hyperbilirubinaemia in heterozygous b-thalassaemia is related to co-inherited Gilbert's syndrome*. Br J Haematol 1997;99:433-6.
- Gilbert A, Lereboulette P. *La cholémie simple familiale*. Semaine Médicale 1906;21:241-5.
- \*\* Primo lavoro di descrizione della sindrome di Gilbert.
- Gunn CH. *Hereditary acholuric jaundice in a new mutant strain of rats*. J Hered 1938;29:137-9.
- \*\* Lavoro di identificazione del primo modello animale, il ratto Gunn.
- Ikushiro S, Emi Y, Iyanagi T. *Identification and analysis of drug-responsive expression of UDP-glucuronosyltransferase family 1 (UGT1) isozyme in rat hepatic microsomes using anti-peptide antibodies*. Arch Biochem Biophys 1995;324:267-72.
- Kadakol A, Ghosh S, Sappal B, et al. *Genetic Lesions of Bilirubin Uridine-diphosphoglucuronate Glucuronosyltransferase (UGT1A1) Causing Crigler-Najjar and Gilbert Syndromes: Correlation of Genotype to Phenotype*. HUMAN MUTATION 2000;16:297-306.
- \*\* Lavoro fondamentale per la prima correlazione genotipo-fenotipo di queste patologie.
- Kaplan M, Renbaum P, Levy-Lahad E, et al. *Gilbert's syndrome and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a dosedependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia*. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:12128-32.
- Miraglia del Giudice E, Perrotta S, Nobili B, et al. *Coinheritance of Gilbert's syndrome increases the risk for developing gallstones in patients with hereditary spherocytosis (HS)*. Blood 1998;92:470a.
- Miranda PS, Bosma PJ. *Towards liver-directed gene therapy for Crigler-Najjar syndrome*. Curr Gene Ther 2009;9:72-82.
- Nguyen N, Bonzo JA, Chen S, et al. *Disruption of the ugt1 locus in mice resembles human Crigler-Najjar type I disease*. J Biol Chem 2008;283:7901-11.
- Pastore N, Nusco E, Vaníkova J, et al. *Sustained reduction of hyperbilirubinemia in Gunn rats after adeno-associated virus-mediated gene transfer of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase isozyme 1A1 to skeletal muscle*. Hum Gene Ther 2012;23:1082-9.
- Perrotta S, del Giudice EM, Carbone R, et al. *Gilbert's syndrome accounts for the phenotypic variability of congenital dyserythropoietic anemia type II (CDA-II)*. J Pediatr 2000;136:556-9.
- Ritter JK, Chen F, Sheen YY, et al. *A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini*. J Biol Chem 1992 267:3257-61.
- \* Primo lavoro che ha caratterizzato il complesso UGT.
- Roy Chowdhury J, Wolkoff AW, Roy Chowdhury N, et al. *Hereditary jaundice and disorders of bilirubin metabolism*. In: Scriver RC, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw Hill, Inc. 2000.
- \*\* Libro che racchiude le basi molecolari di tutti i disordini del metabolismo della bilirubina.
- Roy-Chowdhury N, Deocharan B, Bejjanki HR, et al. *Presence of the genetic marker for Gilbert syndrome is associated with increased level and duration of neonatal jaundice*. Acta Paediatr 2002;91:100-1.
- Sampietro M, Iolascon A. *Molecular pathology of Crigler-Najjar type I and II and Gilbert's syndromes*. Haematologica 1999;84:150-7.
- \* Primo lavoro di revisione delle nuove scoperte in campo genetico su queste patologie.

Sampietro M, Lupica L, Perrero L, et al. *TATA-box mutant in the promoter of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase gene in Italian patients with Gilbert's syndrome*. Ital J Gastroenterol Hepatol 1998;30:194-8.

Sampietro M, Lupica L, Perrero L, et al. *The expression of uridine diphosphate glucuronosyltransferase gene is a major determinant of bilirubin level in heterozygous b-thalassaemia and in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*. Br J Haematol 1997;99:437-9.

Strassburg C.P. *Hyperbilirubinemia syndromes (Gilbert-Meulengracht, Crigler-*

*Najjar, Dubin-Johnson, and Rotor syndrome)*. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology 2010;24:555-71.

\*\* Importante *review* sugli aspetti clinici e genetici di queste sindromi.

Takashi I, Yoshikazu E, Shin-ichi I. *Biochemical and molecular aspects of genetic disorders of bilirubin metabolism*. Biochimica et Biophysica Acta 1998;1407:173-84.

Watchko JF, Lin Z, Clark RH, et al. *Complex multifactorial nature of significant hyperbilirubinemia in neonates*. Pediatrics 2009;124:e868-77.

## Corrispondenza

Immacolata Andolfo, CEINGE Biotecnologie Avanzate, Via Gaetano Salvatore, 486, 80145 Napoli. Tel.: +39 081 3737898. Fax: +39 081 3737804.  
E-mail: andolfo@ceinge.unina.it