



# Polimorfismo genético da glicose-6-fosfato desidrogenase na população da região de Araraquara, Estado de São Paulo

Rosecler Inácia de Paula Ferreira<sup>1</sup>, Fábio Renato Manzolli Leite<sup>2</sup>, Amauri Antiquera Leite<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista - UNESP - Araraquara, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Pelotas – Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista - UNESP - Araraquara, SP, Brasil.

## RESUMO

A importância da enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) no metabolismo eritrocitário está na obtenção de energia calórica e redutora para a proteção celular contra agressões oxidativas. A deficiência de G6PD é a eritroenzimopatia que causa mais frequentemente anemia hemolítica, com mais de 130 variantes moleculares identificadas. O objetivo deste estudo foi realizar a análise molecular da deficiência de G6PD em uma população masculina adulta da região de Araraquara, SP, para a identificação das mutações genéticas. Nos 5087 doadores de sangue do sexo masculino pesquisados, foram encontrados 89 deficientes de G6PD, confirmados pela determinação da atividade enzimática e eletroforese em acetato de celulose, com frequência de 1,75%, valores semelhantes aos encontrados por outros pesquisadores no Estado de São Paulo. A análise molecular realizada pela amplificação do DNA genômico com iniciadores específicos e digestão com enzimas de restrição, demonstrou que 96,6% dos deficientes apresentaram a variante G6PD A<sup>-</sup>, com as mutações 376(A<sup>-</sup>G) e 202(G<sup>-</sup>A) e atividade enzimática média de 1,31 UI.g de Hb-1.min<sup>-1</sup> a 37°C, correspondendo a 10,8% da atividade enzimática da enzima normal G6PD B. Não foram encontradas as formas variantes G6PD A<sup>-</sup> 680(G<sup>-</sup>T) e 968(T<sup>-</sup>C). Em 3,4% dos indivíduos deficientes, foi encontrada a variante G6PD Mediterrânea, mutação 563(C<sup>-</sup>T) e atividade enzimática média de 0,25 UI.g de Hb-1.min<sup>-1</sup> a 37°C, correspondendo a 2,1% da atividade enzimática da G6PD B. A utilização das técnicas tradicionais, aliadas à identificação da variante molecular, são importantes na compreensão das propriedades estruturais, funcionais e comportamento hemolítico dos glóbulos vermelhos do paciente.

Palavras-chave: Deficiência de G6PD. Biologia molecular. Polimorfismo genético.

*Autor correspondente:* Amauri Antiquera Leite. Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista - UNESP - Araraquara, SP, Brasil. Rua Expedicionários do Brasil, 1621, Centro. Araraquara, SP. CEP: 14801-360. E-mail: leite.amauri@gmail.com

## INTRODUÇÃO

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é uma proteína citoplasmática amplamente distribuída em todos os tecidos humanos, tendo importante função no metabolismo das hemácias, nas vias metabólicas utilizadas para obtenção de energia calórica e redutora, para a proteção celular contra agressões oxidativas (Beutler, 2001).

Através da via da hexose monofosfato, as enzimas G6PD e 6-fosfogliconato desidrogenase (6PGD) reduzem a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) à nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), que mantém a glutatona no estado reduzido (GSH), fazendo com que a glutatona redutase (GR) atue sobre o peróxido de hidrogênio, formado no metabolismo oxidativo, transformando em água e protegendo os glóbulos vermelhos dos danos provocados pelo estresse oxidativo; responsável pela redução da vida média dos eritrócitos (Beutler, 2008).

Nos eritrócitos deficientes de G6PD, a diminuição da redução do NADP em NADPH leva a um baixo potencial redutor que interfere na capacidade metabólica oxidativa do glóbulo vermelho, que não consegue eliminar o peróxido de hidrogênio formado e as espécies reativas de oxigênio, ficando vulnerável a hemólise por não proteger os grupos sulfidrilas da hemoglobina, o que possibilita a formação de corpos de Heinz e crises hemolíticas de intensidade variável após ingestão de certas drogas oxidantes, processos infecciosos e oxidativos (Beutler, 2008; Luzzatto, 2006).

A deficiência de G6PD é a causa mais frequente de anemia hemolítica eritroenzimopática (Castro et al., 2003). Mais de 370 variantes de G6PD foram descritas utilizando como base a caracterização bioquímica da enzima deficiente (Beutler, 2008).

A atenção dos pesquisadores tem se voltado para a caracterização das mutações causadoras da deficiência de G6PD (Compri et al., 2000). Atualmente, através da análise do gene da G6PD foi possível uma classificação mais precisa das variantes moleculares, com identificação de aproximadamente 130 diferentes pontos mutacionais

causadores de heterogeneidade fenotípica (Maffia et al., 2002; Hamel et al., 2002). As mutações acabam criando ou abolindo um sítio específico reconhecido por uma endonuclease de restrição.

A maioria das isoenzimas da glicose-6-fosfato desidrogenase deriva de mutação de ponto, envolvendo a mudança de uma base nitrogenada no gene estrutural (Luzzatto et al., 2001). Dessa forma, elas podem ser rapidamente detectadas pela digestão ou não de um produto (DNA genômico) amplificado por reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) (Vives-Corróns et al., 1997). O propósito deste estudo foi realizar a análise molecular na população adulta masculina da região de Araraquara, Estado de São Paulo, deficiente de G6PD, para a identificação de mutações genéticas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O projeto recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF-UNESP de Araraquara sob número 11/2003.

Estudo prospectivo realizado com amostras de 5087 doadores de sangue do sexo masculino, com idade entre 18 e 59 anos, do Hemonúcleo Regional de Araraquara Profª Dra Clara Pechmann Mendonça, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), com abrangência na região central do Estado de São Paulo, coletadas entre outubro de 2003 e abril de 2004. Não foram coletados dados sobre a caracterização étnica da população em estudo pela inexistência desse campo no cadastro do doador de sangue no sistema informatizado utilizado.

As amostras sanguíneas foram triadas pelo teste de redução da metahemoglobina (Brewer et al., 1960), para a investigação da deficiência de G6PD. Os indivíduos supostamente deficientes encontrados foram confirmados através da determinação da atividade enzimática da G6PD, segundo método estabelecido por Beutler (1984) e determinação da mobilidade eletroforética da enzima G6PD em acetato de celulose com tampão Tris-EDTA-Borato pH 8,8, pela técnica descrita por Sparkes et al., (1969).

As amostras sanguíneas dos indivíduos deficientes de G6PD foram submetidas à análise molecular para caracterização das mutações após extração do DNA genômico, ampliações das regiões de interesse por PCR (Saiki et al., 1985). Foram utilizados iniciadores específicos para o exon 5 (mutação 376<sup>A→G</sup>), exons 3 e 4 (para a mutação 202<sup>G→A</sup> e mutação 968<sup>T→C</sup>) e exons 6 e 7 para a mutação 563<sup>C→T</sup>, descritos por Poggi et al., (1990). Após a obtenção dos fragmentos amplificados de DNA foram realizadas digestões enzimáticas a 37°C, com as enzimas de restrição Fok I para a mutação 376<sup>A→G</sup>, Nla III para 202<sup>G→A</sup>, Nci I para 968<sup>T→C</sup> e Mbo II para 563<sup>C→T</sup>. Os produtos da digestão de DNA foram analisados pela alteração no tamanho (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP).

## RESULTADOS

Através da metodologia de Brewer et al., (1960) foi aplicado o teste de triagem em 5087 doadores de sangue do sexo masculino e encontrados 89 portadores da deficiência de G6PD, confirmados pela determinação da atividade enzimática (Beutler, 1984) e eletroforese de G6PD (Sparkes et al., 1969), que corresponderam a uma frequência de 1,75% de deficientes em G6PD na população masculina adulta da região de Araraquara, estado de São Paulo.

Dentre os 89 deficientes de G6PD também foi observada a presença de hemoglobinas variantes, durante a realização da eletroforese, sendo dois indivíduos caracterizados por migração eletroforética como Hb AS e um com Hb AC.

A análise molecular, realizada através da amplificação do DNA genômico, seguida por digestão com enzimas de restrição específicas, demonstrou que em 86 indivíduos, perfazendo 96,6% dos deficientes de G6PD, foi observada a presença da variante G6PD A<sup>-</sup> com as mutações 376<sup>A→G</sup> e 202<sup>G→A</sup>, com atividade enzimática média de 1,31 UI.g de Hb-1.min-1 a 37°C, correspondendo a 10,8% da atividade enzimática da enzima normal G6PD B, que é de 12,1±2,09 UI.g de Hb-1.min-1 a 37°C (Beutler, 1984). No presente estudo não foram encontradas as outras duas formas variantes da G6PD A<sup>-</sup> 680<sup>G→T</sup> e 968<sup>T→C</sup>.

Nesta pesquisa, três indivíduos, 3,4% dos deficientes de G6PD, apresentaram a variante G6PD Mediterrânea com presença da mutação 563<sup>C→T</sup> e atividade enzimática média de 0,25 UI.g de Hb-1.min-1 a 37°C, correspondendo a 2,1% da atividade enzimática da enzima normal G6PD B.

## DISCUSSÃO

Durante muitos anos a caracterização bioquímica das variantes deficientes de G6PD foi realizada, principalmente, utilizando as técnicas padronizadas pela Organização Mundial de Saúde mediante determinação da atividade enzimática e mobilidade eletroforética da enzima (OMS, 1967; Beutler, 1984). Somente com o advento da biologia molecular é que foi possível conhecer as mutações responsáveis por suas propriedades bioquímicas e identificar outras variantes novas, contribuindo para melhor conhecimento da relação existente entre estrutura e função das enzimas variantes (Vives-Corróns et al., 1997).

Ao triarmos 5087 doadores de sangue do sexo masculino e encontrarmos 89 deficientes de G6PD, obtivemos uma frequência de 1,75% de deficientes na região de Araraquara. Este estudo está em acordo com outros trabalhos realizados na população brasileira, onde, dependendo da região estudada, a prevalência pode variar de 1 a 10%, dependendo da maior ou menor presença de indivíduos pardos e negros. Como exemplo, podemos citar que valor semelhante (1,74%) foi encontrado em doadores masculinos da região de Bragança Paulista (Compri et

al., 2000) e 2,38% em outro estudo na mesma região de Araraquara realizado por Leite et al. em 1996.

A análise molecular dos 89 deficientes de G6PD, na população da região de Araraquara, demonstrou que 96,6% dos deficientes encontrados apresentaram a variante G6PD A<sup>-</sup>(<sup>376A→G/202G→A</sup>). Somando-se os dados do presente trabalho aos encontrados por Saad et al. (1997), Weimer et al. (1998), Compri et al. (2000) e Hamel et al. (2002) foi possível constatar uma grande homogeneidade na população brasileira, quanto à notável preponderância da variante G6PD A<sup>-</sup>(<sup>376A→G/202G→A</sup>). Tal homogeneidade, em relação a essa variante, só é observada na África Tropical, uma vez que, na maioria das áreas de alta prevalência dessa enzimopatia, como é o caso do Mediterrâneo, da Índia, do Sudeste Asiático e da China, são encontrados múltiplos alelos polimórficos (Luzzatto et al., 2001).

É preciso considerar a participação dos imigrantes, que contribuíram para a miscigenação racial de nosso povo, uma vez que a variante G6PD A<sup>-</sup>(<sup>376A→G/202G→A</sup>) é frequente em populações Africanas, do Sul da Itália, Espanha, Portugal e Península Arábica (Luzzatto et al., 2001; Compri et al., 2000; Hamel et al., 2002).

Três dos indivíduos deficientes de G6PD (3,4%) apresentaram atividade enzimática menor que 0,35 UI.g de Hb-1.min-1 a 37°C o que impossibilitou a caracterização pela mobilidade eletroforética. A amplificação dos exons 6 e 7 e a digestão com a enzima de restrição *Mbo* II permitiu detectar a variante Mediterrânea com mutação no nucleotídeo 563(<sup>C→T</sup>). O encontro dessa mutação também foi confirmado em estudos moleculares realizados em comunidades pequenas e médias do interior do Estado de São Paulo, onde foi possível encontrar a variante Mediterrânea de G6PD, provavelmente pela influência da imigração italiana (Saad et al., 1997; Compri et al., 2000).

Um Trabalho realizado no Brasil sobre caracterização molecular de deficientes em G6PD, realizado por Hamel et al., 2002, na região da Amazônia, descreve a presença e identificação de algumas variantes com a mutação no exon 5/376<sup>A→G</sup>, porém apresenta uma segunda mutação ou no exon 4/202<sup>G→A</sup>, exon 9/968<sup>T→C</sup>, exon 6/542<sup>A→T</sup> (G6PD Santamaria), e exon 9/871<sup>G→A</sup> (G6PD Ananindeua).

Apesar de nossa amostragem ser significativa e abranger doadores de várias cidades da região de Araraquara, não evidenciamos as outras mutações da G6PD A<sup>-</sup> ou outras variantes deficientes importantes descritas na população brasileira até a presente data.

A técnica da PCR-RFLP tornou-se uma ferramenta muito importante para a caracterização de um elevado número de variantes deficientes de G6PD (Vives-Corróns et al., 1997). Ao mesmo tempo, é preciso ressaltar que a determinação da atividade enzimática e mobilidade eletroforética da enzima continuam sendo importantes para a avaliação inicial do tipo de variante deficiente presente e seu possível comportamento frente às situações de estresse oxidativo. Utilizando adequadamente o conjunto destas técnicas, aliada à identificação da variante molecular, fica

mais previsível conhecer o efeito das mutações no gene da G6PD e como estas influenciarão sobre as propriedades estruturais e funcionais da enzima deficiente, bem como o comportamento hemolítico dos glóbulos vermelhos do paciente (Vives-Corróns et al., 1997; Montemuros et al., 1997).

Um aspecto importante a ser considerado quando realizamos a pesquisa rotineira da atividade de G6PD em doadores de sangue, é que, além da identificação dos indivíduos deficientes, também tentamos evitar a transfusão de hemácias com essa enzimopatia em pacientes expostos ao risco de uma crise hemolítica (Ramalho & Beiguelman, 1976). De fato, apesar da sobrevivência das hemácias com deficiência de G6PD A<sup>-</sup>, variante mais comumente encontrada, se der em condições normais de 80 a 100 dias, se o receptor ingerir medicação de caráter oxidante ou for acometido por processos infecciosos e oxidativos, poderá ocorrer uma rápida destruição das hemácias deficientes, sendo esse processo hemolítico indesejável (Beutler, 2001; Onde et al., 2009). Além disso, existem evidências da diminuição da viabilidade das hemácias deficientes de G6PD durante a estocagem do sangue (Compri et al., 2000).

## ABSTRACT

*Genetic polymorphism of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the population of Araraquara, State of São Paulo*

**The most important role played by the enzyme Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) in erythrocyte metabolism is in generating energy and reducing power used to protect the cell against oxidative attack. G6PD deficiency is the erythroenzymopathy that most frequently causes hemolytic anemia, and more than 130 molecular variants have already been identified. The aim of this study was to analyze the genetic mutations in the G6PD-deficient adult males in the population of the region of Araraquara, São Paulo State. Out of 5087 male blood donors, 89 were deficient for G6PD, as confirmed by assaying the enzyme activity and electrophoresis on cellulose acetate. Thus, a frequency of 1.75% of G6PD-deficient patients was found, this value being similar to other investigations in São Paulo state. Molecular analysis was performed by amplification of genomic DNA with specific primers and digestion with restriction enzymes. In 96.6% of the patients, the G6PD A<sup>-</sup> variant was observed, with mutations at residues 376(<sup>A→G</sup>) and 202(<sup>G→A</sup>). Mean G6PD specific activity among the patients was 1.31 IU.g Hb-1.min-1 at 37°C, that is 10.8% of the normal activity of the G6PD B enzyme. The variant forms G6PD A<sup>-</sup> 680(<sup>G→T</sup>) and 968(<sup>T→C</sup>) were not found. In 3.4% of the deficient individuals, the G6PD Mediterranean variant was found, with a mutation at 563(<sup>C→T</sup>). In these cases, mean enzymatic activity was 0.25 IU.g Hb-1.min-1 at**

**37°C, or 2.1% of the enzymatic activity of G6PD B. The use of traditional techniques, allied to the identification of the different molecular variants, is important for the understanding of the structural and functional properties and hemolytic behavior of the red blood cells of the patient.**

Keywords: Glucosephosphate dehydrogenase deficiency. Molecular biology. Genetic polymorphism.

## REFERÊNCIAS

- Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. 3rd ed. New York: Grune & Stratton; 1984.
- Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and other red cell enzyme abnormalities In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. Williams Hematology. 6th. ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p.527-39.
- Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. *Blood*, 2008;111:16-24.
- Brewer GJ, Tarlov AR, Alving AS. Methaemoglobin reduction test. A new, simple, in vitro test for identifying primaquine-sensitivity. *Bull WHO*.1960;22:633-40.
- Castro SM, Wagner SC, Goldbeck AE, Dadalt VC, Giugliani R. Incidência da deficiência de G6PD na população do Estado do Rio Grande do Sul. Dados preliminares. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2003;25(supl 2):16.
- Compri MB, Saad STO, Ramalho AS. Investigação genético-epidemiológica e molecular da deficiência de G6PD em uma comunidade brasileira. *Cad Saúde Pública*. 2000;16:335-42.
- Hamel AR, Cabral IR, Sales TSI, Costa FF, Saad STO. Molecular heterogeneity of G6PD deficiency in an Amazonian population and description of four new variants. *Blood Cells Mol Dis*. 2002;28(3):399-406.
- Leite ERM, Lessi JHC, Mascarin DB, Leite AA. Pesquisa de deficientes em G-6-PD nos doadores de sangue da região de Araraquara. *Bol Soc Bras Hematol Hemoter*. 1996; 18(supl):337.
- Luzzatto L. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: from genotype to phenotype. *Haematologica*. 2006;91:1303-6.
- Luzzatto L, Mehta A, Vulliamy T. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic & molecular basis of inherited disease. 8ª ed. New York: Mc Graw-Hill; 2001. p.4517-53.
- Maffia D, Pasquino MT, Capraria P, Caforio MP, Cianciullib P, Sorrentinob F, Cappabiancac MP, Salvatia AM. Identification of G6PD Mediterranean mutation by amplification refractory mutation system. *Clin Chim Acta*. 2002;321:43-7.
- Montemuros FM, Dotti C, TAVAZZI O, Fiorelli G, Capprellini MD. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Italy. *Haematologica*. 1997; 82:440-6.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. Normalización de las técnicas de estudio de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. 1967. Serie de Informes Técnicos n. 366.
- Ondei LS, Silveira LM, Leite AA, Souza DR, Pincel MA, Percário S, Ricci Júnior O & Bonini-Domingos CR. Lipid peroxidation and antioxidant capacity of G6PD-deficient patients with A-(202G>A) mutation. *Genet Mol Res*. 2009;8:1345-51.
- Poggi V, Town M, Foulkes NS, Luzzato L. Identification of a single base change in a new human mutant glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by polymerase-chain-reaction amplification of the entire coding region from genomic DNA. *Biochem J*. 1990;271:157-60.
- Ramalho AS, Beiguelman B. Deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glucose (G6PD) em doadores de sangue brasileiros. *Folha Med*. 1976;73:281-3.
- Saad STO, Salles TSI, Carvalho MHM, Costa FF. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Brasil. *Hum Hered*. 1997;47:17-21.
- Saiki R, Scharf S, Fallona F, Mullis KB, Hornig T, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230:1350-4.
- Sparkes RS, Baluda MC, Townsend DE. Cellulose acetate electrophoresis of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Lab Clin Med*.1969;73:531-4.
- Vives-Corrans JL, Zarza R, Aymerich JM, Boixadera J, Carrera A, Colomer D, Corbella M, Castro M, Crespo JM, Del Arco A et alii. Análises molecular del déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) en España. *Sangre*. 1997;42:391-8.
- Weimer TA, Salzano FM, Westwood B, Beutler E. G6PD variants in three south American ethnic groups: population distribution and description of two new mutation. *Hum Hered*. 1998;48:92-6.

Recebido em 11 de outubro de 2013

Aceito em 2 de dezembro de 2013