

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Letícia Cardoso Orlandini

**Análise comparativa das frequências alélicas e genotípicas dos
polimorfismos da Glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com
malária vivax e indivíduos não maláricos de áreas endêmicas no Brasil**

São José do Rio Preto

2018

Letícia Cardoso Orlandini

**Análise comparativa das frequências alélicas e genotípicas dos
polimorfismos da Glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com
malária vivax e indivíduos não maláricos de áreas endêmicas no Brasil**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, área de concentração Genética e Biologia Evolutiva, junto ao Programa de Pós-Graduação Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini
Domingos

São José do Rio Preto

2018

Orlandini, Leticia Cardoso.

Análise comparativa das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos da Glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com malária vivax e indivíduos não maláricos de áreas endêmicas no Brasil / Leticia Cardoso Orlandini. -- São José do Rio Preto, 2018

85 f. : il.

Orientador: Ricardo Luiz Dantas Machado

Coorientador: Claudia Regina Bonini Domingos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Anemia. 2. Malária - Tratamento. 3. Plasmodium vivax. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 616.936

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Letícia Cardoso Orlandini

**Análise comparativa das frequências alélicas e genotípicas dos
polimorfismos da Glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com
malária vivax e indivíduos não maláricos de áreas endêmicas no Brasil**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, área de concentração Genética e Biologia Evolutiva, junto ao Programa de Pós-Graduação Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado
UFF – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, RJ
Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Andréa Regina de Souza Baptista
UFF – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, RJ

Prof^ª. Dr^ª. Ana Regina Chinelato Fernandes
UNIP - Universidade Paulista, São José do Rio Preto, SP

São José do Rio Preto
01 de Março de 2018

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto, com auxílio do CNPq.

Dedico este trabalho aos meus pais, Jorge e Maria Cláudia, por me permitirem sonhar alto, sempre acreditarem em mim e por me apoiarem incondicionalmente em todos os momentos. E à minha tia-avó, Maria Aparecida Orlandini, estrela da minha vida e eterna saudade, que sempre fez da minha jornada mais leve e hoje não está comigo para celebrar mais uma conquista.

AGRADECIMENTOS

*Primeiramente, à minha família, meus pais **Maria Cláudia Cardoso Orlandini e Jorge Guilherme Orlandini**, que desde o início investiram muito para que eu pudesse estudar em uma das melhores universidades do país, o curso que sempre sonhei e desde sempre me deram apoio incondicional em todos os momentos e em todas as escolhas e caminhos que escolhi percorrer em busca dos meus sonhos! A vocês, meu amor e minha eterna gratidão!*

*Ao meu orientador **Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado** pela confiança e acolhimento em seu grupo de pesquisa, permitindo que eu explorasse um novo mundo científico, bem como pela oportunidade de conhecer novas regiões e realidades, além de todo conhecimento compartilhado. Este estudo me propiciou várias lições de vida e me trouxe sentimento de responsabilidade, como jovem e cientista, na mudança do atual cenário que se encontra o nosso país e a ciência.*

*À minha coorientadora **Prof^ª. Dr^ª. Claudia Regina Bonini Domingos** por ser um exemplo, minha amiga e me acolher desde os meus primeiros anos de PET Biologia. Sou muito grata pela oportunidade que você me abriu em um momento que eu mais me senti infeliz profissionalmente. Mais ainda pela paciência, incentivo, conselhos, experiências gastronômicas e por tudo que você me ensinou e me ensina todos os dias com muito amor e carinho!*

*Aos meus amigos do LHGDH + CEQ por me acompanharem durante essa trajetória, por todo aprendizado e paciência desde que cheguei ao laboratório e até nos últimos dias, em especial à **Patrícia Pereira, Jéssika Okumura, Gabriela Martins, Camila Zucchini, Nayara Chaves e a Letícia Sybuia!** Muito obrigada por serem essas capivarinhas, comprarem minhas ideias mirabolantes e alegrarem meus dias!*

*À minha família e companheiros de casa Riopretense, antigos e atuais: **Julia Audrey de Paula, Guilherme Henrique da Silva, Camila Ortigossa e Lara Bérghamo Silva** pela paciência, longas noites de estudo, bagunças pela casa e todas as alegrias compartilhadas diariamente!*

*Todos os amigos, tanto os de longa data e os que ganhei em Rio Preto, e familiares, que sempre me apoiaram e cuidaram de mim, viram-me crescer e amadurecer, fizeram meus dias mais leves e celebraram comigo minhas conquistas! Em especial, ao meu namorado e companheiro **Yan Okumura**, pela parceria, carinho e compreensão!*

À UNESP/IBILCE por ter sido minha casa nos últimos anos. Tenho muito orgulho de estudar nessa universidade!

À todos professores que me ensinaram, inspiraram e me proporcionaram a melhor formação que eu poderia ter, tanto pessoal quanto profissionalmente, durante a graduação e pós-graduação!

À FAPIZZA, a pizza de amparo à pesquisa, e todos que contribuíram com esta ideia e auxiliaram a financiar grande parte dos reagentes utilizados neste projeto!

E não menos importante, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado (processo:132946/2016-5)!

“De tudo ficaram três coisas...

A certeza de que estamos começando...

A certeza de que é preciso continuar...

*A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...*

Façamos da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro!”

Fernando Sabino

RESUMO

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é uma enzima metabólica e citoplasmática de importante papel na prevenção de danos oxidativos. Nos glóbulos vermelhos sua ausência é prejudicial à célula, devido à falta da maioria das organelas celulares e à sensibilidade ao estresse oxidativo. A deficiência da enzima G6PD (G6PDd) é, em geral, assintomática. Porém, fatores como a utilização da primaquina, de alto potencial hemolítico, no tratamento da malária *vivax*, podem levar o portador da deficiência a uma anemia hemolítica aguda. O gene *G6PD* apresenta vários sítios polimórficos, com cerca de 217 mutações e mais de 400 variantes bioquímicas significativas descritas. As variantes A- e Mediterrânea são encontradas com frequências consideráveis mundialmente, sendo essas variantes caracterizadas por redução considerável na atividade enzimática. No Brasil, devido à ausência de testes de rotina para detecção de G6PDd e a utilização de primaquina como droga principal de combate a malária *vivax*, responsável por cerca de 90% dos casos na região Amazônica Brasileira, faz-se necessário conhecer a frequência de G6PDd A- para implantação de novas estratégias a fim de melhorar a segurança no tratamento e reduzir o número de transfusões sanguíneas. Assim, o estudo avaliou a frequência da variante A- por PCR-RFLP em 476 indivíduos, 200 maláricos e 276 não maláricos, procedentes de áreas endêmicas de malária *vivax* na Região Norte do país. Após as análises, foram encontrados 14 indivíduos com a G6PDd A-, o que corresponde a 2,94% das amostras avaliadas, sendo seis indivíduos do grupo de maláricos e oito indivíduos do grupo controle. Esta frequência se encontra próxima ao que é relatado em outros estudos na região Norte. Porém, não houve diferenças significativas entre a frequência dos genótipos entre os grupos de estudo e entre as regiões avaliadas, de forma que, a associação entre a presença da mutação e as chances da infecção de malária se estabelecer e da doença se desenvolver em cada grupo de estudo e em cada região apresentam resultados divergentes e reforçam a necessidade de maiores investigações. Por fim, o cenário observado neste estudo, ressalta a importância do diagnóstico preciso da G6PDd em populações multiétnicas antes da administração de drogas antimaláricas de elevado potencial hemolítico, a fim de contribuir com a segurança do tratamento e a erradicação da malária na Região endêmica Brasileira.

Palavras-chave: *G6PDd*. Variante A-. *Plasmodium vivax*. Anemia.

ABSTRACT

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is a metabolic and cytoplasmic enzyme of important role in preventing oxidative damage. In red blood cells their absence is detrimental to the cell, due to the lack of most cellular organelles and the sensitivity to oxidative stress. Deficiency of the enzyme G6PD (G6PDd) is generally asymptomatic. However, factors such as the use of primaquine with a high hemolytic potential for treatment of vivax malaria, can lead the person with the deficiency to an acute hemolytic anemia. The G6PD gene has several polymorphic sites, with about 217 mutations and more than 400 significant biochemical variants described. The A- and Mediterranean variants are found with considerable frequencies worldwide, that variants being characterized by a considerable reduction in the enzymatic activity. In Brazil, is necessary to know the frequency of G6PDd A- to implement new strategies to improve treatment safety and reduce the number of blood transfusions, due to the absence of routine tests to detect G6PDd and the use of primaquine as the main drug to combat vivax malaria, responsible for about 90% of the cases in the Brazilian Amazon region. Thus, the frequency of the A-variant was evaluated by PCR-RFLP in 476 individuals, 200 malaria and 276 non malaria, from endemic areas of vivax malaria in the Northern Region of the country. After the analysis, 14 individuals were found with G6PDd A-, which corresponds to 2.94% of the samples evaluated, six of which were individuals from the malaria group and eight from the control group. This frequency is close to what is reported in other studies in the Northern region. However, there were no significant differences between the genotype frequency between the study groups and between the evaluated regions, so the association between the presence of the mutation and the chances of malaria infection was established and the disease developed in each group in each region present divergent results and reinforce the need for further investigation. Finally, the scenario observed in this study underscores the importance of accurate diagnosis of G6PDd in multiethnic populations prior to the administration of antimalarial drugs of high hemolytic potential, in order to contribute to the safety of treatment and eradication of malaria in the Brazilian endemic region.

Keywords: G6PDd. Variant A-. Plasmodium vivax. Anemia.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A produção de NADPH nos eritrócitos acontece pela ação das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e 6-fosfogliconato desidrogenase (6PGD)21
- Figura 2.** Ilustração do Ciclo de vida do parasito da malária26
- Figura 3.** Gel em agarose 3%, ilustrando: 1 – amostra de um indivíduo homozigoto/hemizigoto deficiente para o SNP G202A (AA/A) – fragmentos de 63 e 46 pb; 2 e 3 – amostra de um indivíduo heterozigoto para o SNP G202A (GA) – fragmentos de 109, 63 e 46 pb; e 4 e 5 - mostra de um indivíduo homozigoto/hemizigoto normal para o SNP G202A (GG/G) – fragmento 109 pb não digerido40
- Figura 4.** Gráfico ilustrando a presença de G6PDd A- entre os indivíduos dos grupos com malária e sem malária (controle) avaliados na Região Norte Brasileira40
- Figura 5.** Gráfico ilustrando a presença de G6PDd A- comparada entre os grupos, malária e controle, de cada uma das localidades avaliadas44
- Figura 6.** Gráfico ilustrando a presença de G6PDd A- comparada entre os grupos, somente malária e somente controle, entre cada uma das localidades avaliadas44
- Figura 7.** Gel em agarose 3%, ilustrando: 1 – amostra de um indivíduo homozigoto/hemizigoto normal para o SNP A376G (AA/A) – fragmento de 295 pb não digerido; 2 e 3 – amostra de um indivíduo heterozigoto para o SNP A376G (AG) – fragmentos de 295, 154 e 141 pb45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos grupos de estudo por região	36
Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho dos fragmentos amplificados por cada um durante a reação de PCR e enzima de restrição necessária para reconhecer a mutação	37
Tabela 3. Caracterização do grupo de estudo	39
Tabela 4. Frequência genotípica e alélica da mutação G6PD 202 G>A (rs1050828) nos grupos com malária e sem malária, de acordo com o sexo	41
Tabela 5. Frequência genotípica e alélica da mutação G6PD 202 G>A (rs1050828) encontrada em cada região estudada somando os dois grupos de estudo: malária e controle	42
Tabela 6. Frequência genotípica e alélica da mutação G6PD 202 G>A (rs1050828) em cada grupo, com malária e sem malária, por região estudada	43
Tabela 7. Resumo das análises de Odds ration para cada região, comparando os grupos maláricos e controle em relação a chances de adquirir malária na presença ou ausência da mutação	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6PGD	6-fosfoglicono-lactonase
6PGL	6-fosfogliconato -δ-lactona
ATP	adenosina trifosfato
BEL	Belém
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CoA	coenzima A
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	ácido desoxirribonucleico
Dntp	desoxinucleotídeo trifosfato
DP	desvio padrão
EDTA	ácido etileno diamino tetra-acético
ERRO	espécies reativas de oxigênio
FAD	dinucleotídeo de flavina e adenina
G6P	glicose-6-fosfato
G6PD	glicose-6-fosfato desidrogenase
G6PDd	deficiência de glicose -6-fosfato desidrogenase
GHS	monômero de glutiona reduzido
GPx	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase
GSSH	dímeros de glutaciona
Hb SS	homozigoto para a hemoglobina S (anemia falciforme)
HEMORIO	Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti do Rio de Janeiro

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	intervalo de confiança
IPA	índice parasitário anual
ITB	Itaituba
Kb	kilobase
LHGDH	Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas
MAF	frequência do alelo menos comum (do Inglês: minor allele frequency)
mg/kg	miligramas por quilogramas
NAD	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH	fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
PB	pares de bases
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	odds-ration
PQ	primaquina
PCR	reação em cadeia da polimerase (do Inglês: Polymorphism Chain Reaction)
PCR-RFLP	reação em cadeia da polimerase-polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (do Inglês: Polymorphism Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism)
pH	potencial hidrogênico
PM	Peso molecular
PVL	Porto Velho
q.s.p	quantidade suficiente para
RBR	Rio Branco
RNA	ácido ribonucleico
RPM	rotações por minuto
SOD	superóxido dimutase

SIVEP-Malária	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único (do Inglês: single nucleotide polymorphism)
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEB	tris-EDTA-borato
TQ	Tafenoquina
TRIS	tris (hidroximetil) aminometano
UV	Ultravioleta
WHO	Organização Mundial da Saúde (do Inglês: World Health Organization)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e via das pentoses-fosfato	19
1.2 Epidemiologia da deficiência da enzima G6PD.....	21
1.3 Aspectos genéticos e classificação das principais variantes de G6PD	21
1.4 Malária e G6PD	22
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. METODOLOGIA.....	33
4.1 Aspectos éticos.....	34
4.2 Casuística e áreas de estudo.....	33
4.3 Amostras biológicas.....	35
4.4 Diagnóstico de malária	35
4.5 Extração de DNA por fenol-clorofórmio.....	35
4.6 Análise da variante G6PD A- (G202A /A376G).....	35
4.7 Análise estatística	36
5. RESULTADOS.....	38
5.1 Caracterização dos grupos de estudo	38
5.2 Frequências alélica e genotípica da mutação G6PD 202 G>A (rs1050828)	38
5.3 Frequências alélica e genotípica da mutação G6PD 376 A>G (rs1050829).....	44
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÃO	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
9. ANEXOS.....	61

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e via das pentoses-fosfato

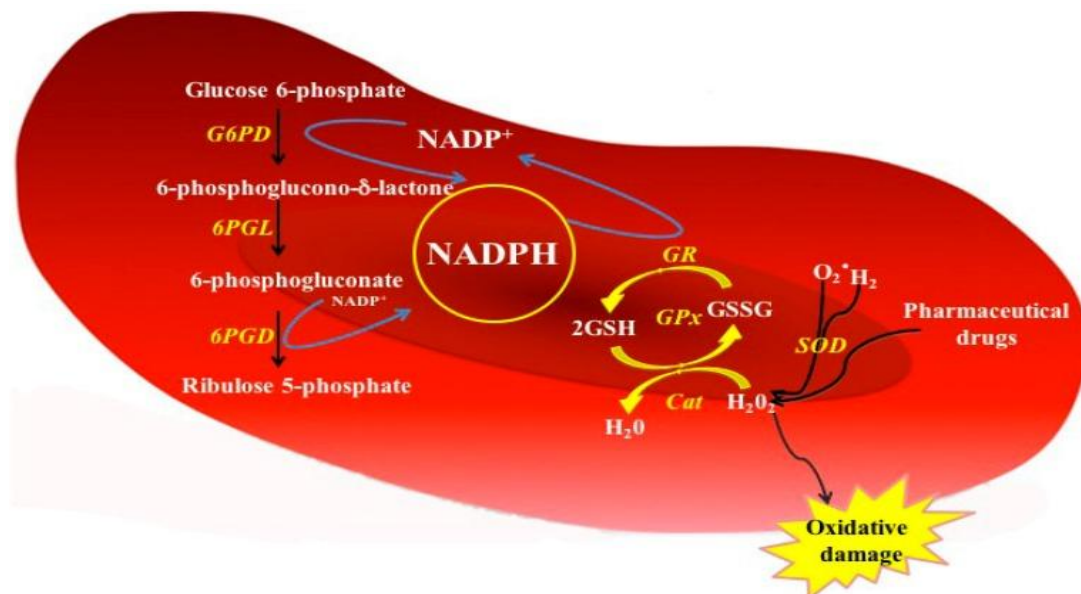
A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é uma enzima metabólica e citoplasmática que desempenha importante papel na prevenção de danos oxidativos nas células por meio de detoxificação de radicais livres (VALENCIA et al., 2016). Essa enzima catalisa o primeiro passo da via das pentoses fosfato que, por meio de uma série de reações, converte a glicose-6-fosfato (G6P) à ribose-5-fosfato (Figura 1), precursora de moléculas importantes como ácido ribonucleico (RNA), ácido desoxirribonucleico (DNA), adenosina trifosfato (ATP), coenzima A (CoA), dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD), dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) (TRIPATHY; REDDY, 2007).

Nos eritrócitos, devido à ausência da maioria das organelas celulares e à sensibilidade ao estresse oxidativo, a falta da enzima G6PD é prejudicial, pois essa via metabólica é a única fonte doadora de elétron de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), que participa continuamente, em, pelo menos, três caminhos antioxidantes: os ciclos da glutathiona, tioredoxina e glutaredoxina, como ilustra a Figura 1 (GÓMEZ-MANZO et al., 2016; VALENCIA et al., 2016).

No primeiro caminho, o elétron de NADPH passa para os dímeros de glutathiona (GSSG) durante a reação catalisada pela enzima glutathiona redutase que produz dois monômeros de glutathiona reduzidos (GSH), fornecendo a primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, a glutathiona peroxidase (GPX) remove o peróxido dos glóbulos vermelhos usando GSH como substrato, enquanto o NADPH é necessário para reduzir o GSSG oxidado. Dessa forma, os níveis de glutathiona reduzida (GSH) são regulados, o equilíbrio oxidativo dentro das células é assegurado e os eritrócitos são protegidos contra danos induzidos por peróxido de hidrogênio e radicais livres, convertidos em água (GHASHGHAIEINIA et al., 2016; GÓMEZ-MANZO et al., 2016).

Em alguns tecidos como fígado, tecido adiposo e glândulas mamárias, o NADPH é o doador de elétrons necessários para muitos processos biossintéticos, incluindo várias reações nas vias de síntese dos ácidos graxos, colesterol e hormônios esteroides, bem como para formação de ribose necessária para a síntese de DNA (LUZZATTO; NANNELLI; NOTARO, 2016).

Figura 1. A produção de NADPH nos eritrócitos acontece pela ação das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e 6-fosfogliconato desidrogenase (6PGD).



Cat = Catalase; GPx = Glutathione peroxidase; GR = Glutathione reductase; 6PGL = 6-fosfogliconato desidrogenase; 6PGD = 6-fosfogliconato desidrogenase; SOD = Superóxido dismutase; GSH = Glutathione reduzida; GSSG = Glutathione oxidada; H₂O₂ = Peróxido; O₂^{•-} = Superóxido. Fonte: (GOMEZ-MANZO et al., 2016).

1.2 Epidemiologia da deficiência da enzima G6PD

A deficiência de G6PD (G6PDd) é uma condição hereditária polimórfica que ocasiona desequilíbrio redox e se caracteriza como uma das enzimopatias mais prevalentes, afetando cerca de 400 milhões de pessoas em todo o mundo (BOONYUEN et al., 2017).

Em geral, a maioria dos indivíduos afetados são assintomáticos e a deficiência nunca é completa, pois seria fatal (LUZZATTO et al., 2016). No entanto, é observado um amplo espectro de manifestações clínicas, que podem ser desencadeadas por diversos fatores como fármacos e alimentos específicos. Entre os distúrbios observados, destaca-se o favismo (ingestão de feijão de fava), anemia hemolítica, anemia hemolítica não esferocítica crônica, aborto espontâneo e hiperbilirrubinemia neonatal, resultando em encefalopatia crônica por bilirrubina (kernicterus) (BOONYUEN et al., 2017; MASON; BAUTISTA; GILSANZ, 2007).

Atualmente, a G6PDd é encontrada em todo o mundo com diferentes frequências e está amplamente distribuída em países considerados endêmicos para malária, sendo as regiões da África Subsaariana (20%), seguida pelo Sudoeste da Ásia (10-20%), Mediterrâneo (4-30%) e América Latina (<2%), as áreas de maior

prevalência (BUBP; JEN; MATUSZEWSKI, 2015; MONTEIRO et al., 2014; PEIXOTO et al., 2015). No Brasil, devido à escassez de dados, não se conhece as reais frequências da G6PDd, estimando-se que sua prevalência seja menor do que 10% (MONTEIRO et al., 2014; ONDEI et al., 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem classificado a G6PDd em classes de I-V, de acordo com a atividade da enzima nos eritrócitos e suas manifestações clínicas consideradas de risco para eventos hemolíticos: Classe I: deficiência enzimática grave com anemia hemolítica crônica não esferocítica; Classe II: deficiência de enzima grave (<10% da atividade considerada normal – G6PD B); Classe III: deficiência da enzima leve (10-60% do normal); Classe IV: deficiência da enzima leve ou ausente (60-100% do normal); e Classe V: atividade da enzima aumentada (duas vezes mais do que o normal) (WHO, 2015).

1.3 Aspectos genéticos e classificação das principais variantes de G6PD

O gene *G6PD* abrange aproximadamente 18,5 Kb e apresenta 13 éxons, localizadas na região telomérica do cromossomo X (região Xq28), destacando-se como um dos genes mais estudados devido sua associação com a malária, vários tipos de anemia, favismo e outras afecções (MASON; BAUTISTA; GILSANZ, 2007). As mutações que causam deficiência de G6PD, geralmente, são ocasionadas pela substituição de um único aminoácido, as quais podem afetar ambos os sexos, de forma que há apenas dois genótipos possíveis para o sexo masculino: hemizigoto normal ou hemizigoto deficiente; e três genótipos possíveis para o sexo feminino: homozigoto normal, homozigoto deficiente ou heterozigoto, considerando que um cromossomo X é inativado aleatoriamente em cada uma das células dos organismos do sexo feminino como um fenômeno de compensação de dose; sendo o fenótipo deficiente e as manifestações clínicas mais frequentes em indivíduos do sexo masculino (AHN; LEE, 2008; KEMPINSKA-PODHORODECKA et al., 2013; MASON; BAUTISTA; GILSANZ, 2007; PEIXOTO et al., 2015).

O gene *G6PD* apresenta vários sítios polimórficos e cerca de 217 mutações foram descritas, das quais apenas em torno de 10% são estrutural e funcionalmente caracterizadas (GÓMEZ-MANZO et al., 2016). Essas mutações resultam em mais de 400 variantes bioquímicas significativas, sendo a maioria das mutações causadas pela substituição de um único aminoácido (KEMPINSKA-PODHORODECKA et al., 2013; VALENCIA et al., 2016).

As principais variantes do gene G6PD são: B, A+, e A- (KEMPINSKA-PODHORODECKA et al., 2013). A variante B (202G/376A), encontrada mais frequentemente, é utilizada como um padrão para a atividade da enzima normal e para mobilidade eletroforética. As variantes G6PD A- (202A/376G ou G680T, T968C, e C1159T) e G6PD A+ (A376G), de origem Africana, são encontradas com frequência em todo o mundo, estando entre as variantes mais comuns notificadas nas Américas (VALENCIA et al., 2016). A variante A+ pode exibir atividade enzimática normal e até uma deficiência sutil (Classe IV), enquanto que a variante A- (Classe III) apresenta apenas de 8-20% da atividade enzimática normal, sendo de grande importância médica (KEMPINSKA-PODHORODECKA et al., 2013; VALENCIA et al., 2016).

A variante G6PD A- (G202A /A376G) é caracterizada pela troca de uma guanina por uma adenina na posição de nucleotídeo 202, que provoca uma substituição de uma valina por uma metionina na posição de aminoácido 68, em combinação com uma substituição de adenina por guanina no nucleotídeo 376, que alterna uma asparagina por aspartato na posição aminoácido 126 (MONTEIRO et al., 2014).

Outra variante de importância médica é a variante do Mediterrâneo (Classe II), caracterizada por uma alteração na posição 56, trocando citosina para timina (C563T), amplamente encontrada na região do Mediterrâneo, Oriente Médio, Índia e Américas, apresentando menos de 5% de atividade enzimática, considerada grave (HOWES et al., 2013).

1.4 Malária e G6PD

A malária humana é causada por seis espécies de parasitos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e também *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium simium*; estes dois últimos são patógenos naturais de espécies selvagens de macacos no sudeste da Ásia e da Mata Atlântica, respectivamente, apontados como causa significativa da malária zoonótica (BRASIL et al., 2017; MOYES et al., 2014). A malária pelo *P. knowlesi* tem sido descrita com rápida progressão para uma infecção grave, além de casos fatais terem sido relatados (MOYES et al., 2014). No Brasil, somente quatro espécies são notificadas: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium simium* (BRASIL et al., 2017). Nas últimas décadas, de acordo com o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária) (SIVEP-MALÁRIA, 2018), o *P. vivax* tem sido a espécie mais prevalente no país,

responsável por cerca de 90% dos casos, enquanto o *P. falciparum* é responsável por aproximadamente 10%, e o *P. malariae* e os demais raramente detectados (SIVEP-MALÁRIA, 2018). Historicamente, casos clínicos graves por *P. vivax* são raros, no entanto, estudos recentes reforçam a associação dessa espécie com complicações clínicas e casos fatais, sendo este um motivo de preocupação para a saúde pública (ANDRADE et al., 2010; LACERDA; HIPÓLITO; PASSOS, 2008).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mundialmente, o *P. vivax* representa um grande problema para saúde pública e, somente no ano de 2015, foi a causa de 13,8 milhões de casos de malária e pelo número total de óbitos estimado entre 1.400 e 14.900 (WHO, 2015).

O Brasil é um país de dimensões continentais onde se verificam diferentes aspectos de transmissão de malária em três distintos ambientes: na região Amazônica e na Mata Atlântica (no litoral do país, mais frequente na região Sudeste), ambas com predomínio de casos autóctones e em outras áreas brasileiras com casos importados provenientes de viagem recente aos locais endêmicos de malária no próprio país ou de outros países da Américas Central e do Sul, África e Ásia (DE PINA-COSTA et al., 2014). A região Amazônica, que inclui os Estados Brasileiros do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, concentra a maioria dos casos de malária no país (PEIXOTO et al., 2016). Em 2017, foram notificados mais de 193 mil casos de malária nessa área, dos quais aproximadamente 90% dos casos foram causados por malária *vivax* (SIVEP-MALÁRIA, 2018). Em relação ao sexo, 60% dos casos relatados são em indivíduos do sexo masculino. Ainda segundo o Boletim Epidemiológico do SIVEP-MALÁRIA, comparado a 2016, o número de casos de malária no Brasil aumentou em quase 50%.

O ciclo dos parasitos causadores da malária humana é heteroxênico (seres humanos e fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*) e bastante similar entre as espécies de *Plasmodium* (CDC, 2017). A infecção do hospedeiro humano inicia-se quando a fêmea do mosquito inocula as formas infectantes, os esporozoítos, que entram na corrente sanguínea e atingem o fígado (fase pré-eritrocítica ou hepática). Durante a infecção dos hepatócitos, cada esporozoíto desenvolve-se em dezenas de milhares de merozoítos, que se rompem e são liberados para corrente sanguínea para infecção dos eritrócitos. Nos eritrócitos, o parasito inicia a multiplicação assexuada até o rompimento da célula sendo esta a fase denominada de eritrocítica. Nesta fase, os primeiros sintomas da doença começam a aparecer, tais como febre, calafrio, dor de cabeça e também

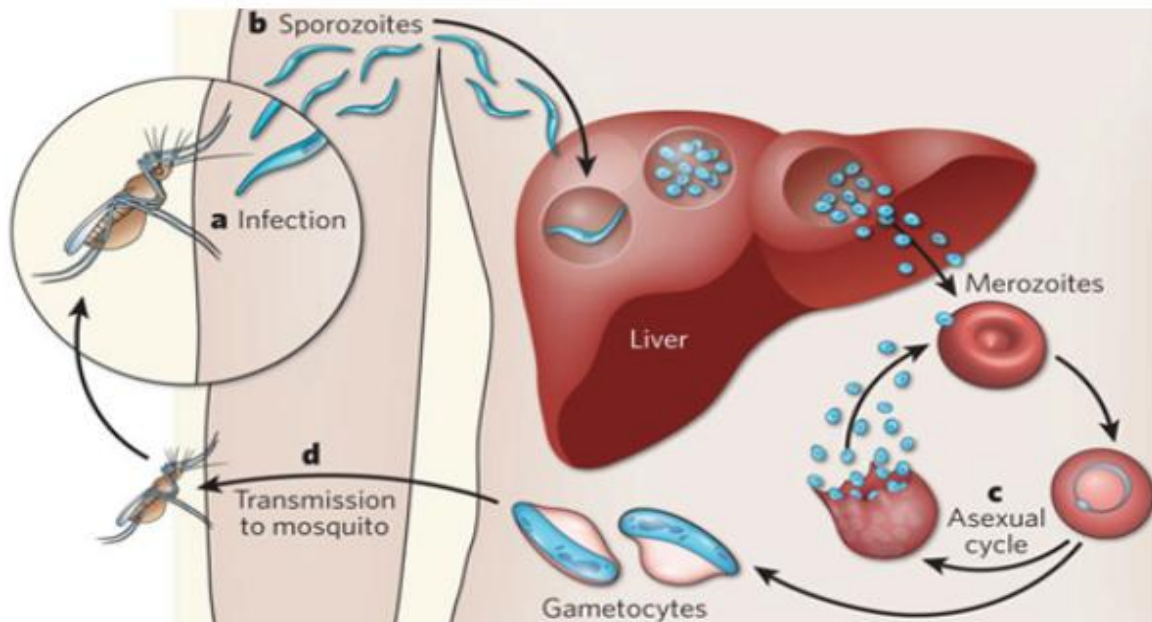
anemia grave. No ciclo de vida do *P. vivax*, os esporozoítos podem dar origem aos hipnozoítos, que permanecem no hepatócito em um estado dormente, desenvolvendo-se meses ou anos mais tarde, sendo responsável pelas recaídas da doença (TUTEJA, 2007). Para completar o ciclo de vida no hospedeiro humano, formas sexuais do parasito, denominadas gametócitos, desenvolvem-se, também dentro dos eritrócitos e, devido ao novo repasto sanguíneo pela fêmea do mosquito, perpetua o ciclo sexual no inseto. No estômago do mosquito, gametócitos se unem e geram zigotos. Os zigotos por sua vez, tornam-se móveis e alongados, denominando-se oocinetos, e invadem a parede do intestino médio do mosquito, onde se desenvolvem em oocistos, que crescem até se romperem e liberam novos esporozoítos, que se concentram nas glândulas salivares do mosquito para inoculação em um novo hospedeiro, reiniciando o ciclo (MILLER et al., 2002) (Figura 2).

O quadro de anemia na malária, complicação mais comumente associada a *P. vivax*, é uma problemática frequente e grave para crianças e mulheres grávidas, pois a etiologia da anemia é complexa e multifatorial em áreas endêmicas. Entre os principais fatores que influenciam neste quadro, podemos destacar a hemólise, atraso no diagnóstico e tratamento da malária, autoimunidade, deficiências nutricionais, inibição da eritropoiese, gravidez, fagocitose dos eritrócitos, infecção concomitante com helmintos intestinais ou Parvovírus B19, bem como desordens genéticas, tais como as hemoglobinopatias e a G6PDd (PRICE et al., 2007; MOURÃO et al., 2013).

Em países considerados endêmicos para malária, como algumas regiões da África Subsaariana, seguida pela Ásia e América Latina, estima-se que 353 milhões de pessoas são afetadas por G6PDd, dos quais 220 milhões são homens (PEIXOTO et al., 2015). Como evidenciado em outros estudos (HOWES et al., 2013; KEMPINSKA-PODHORODECKA et al., 2013), há uma associação direta entre a incidência de malária e frequência de determinadas variantes do gene *G6PD*; como em pacientes com o fenótipo A, nos quais a proteção contra a malária é incompleta assim como a atividade enzimática da G6PD é consideravelmente reduzida, 20% em comparação com o tipo selvagem. Por outro lado, a variante A- está associada a uma diminuição de 50% no risco de desenvolvimento de malária entre mulheres heterozigotas e homens hemizigotos deficientes, o que pode explicar essa associação é o fato de que uma defesa antioxidante prejudicada pode ser o mecanismo que confere resistência em indivíduos G6PDd, o que leva a danos na membrana das células vermelhas e provoca um aumento da eliminação de células infectadas por fagocitose, antes mesmo da

maturação do parasito aos estágios de trofozoíto e esquizontes (MASON; BAUTISTA; GILSANZ, 2007; MONTEIRO et al., 2014; TRIPATHY; REDDY, 2007).

Figura 2. Ilustração resumida do Ciclo de vida do parasito da malária.



Fonte: (MICHALAKIS; RENAUD, 2009).

Segundo o guia prático de tratamento da malária no Brasil do Ministério da Saúde (WHO, 2015), o serviço público de saúde, orientado pelo Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM), é responsável pelo diagnóstico e tratamento da malária no país e o teste de G6PDd não é realizado em sua rotina. Este manual recomenda o uso de primaquina (PQ) para todos os pacientes infectados por *P. vivax*, a fim de eliminar as formas parasitárias teciduais no fígado e para indivíduos infectados com o *P. falciparum* que tenham gametócitos circulantes na corrente sanguínea (HOWES et al., 2013). Sua prescrição não é recomendada para mulheres grávidas e crianças com menos de seis meses de idade devido sua ação teratogênica (VALENCIA et al., 2016; WHO, 2015). Contudo, considerando as propriedades da PQ, a utilização deste fármaco para um indivíduo G6PDd pode resultar em anemia grave, insuficiência renal e morte, como resultado de hemólise intensa, gerando consequente demanda por recursos do sistema público de saúde (PEIXOTO et al., 2015). A gravidade da hemólise depende do grau de deficiência de G6PD, da dose e da duração da exposição a este medicamento, sendo a gravidade da hemólise mais intensa na maioria dos casos de portadores das variantes Mediterrâneo e Africana A- (ASHLEY; RECHT; WHITE, 2014). Na Amazônia Brasileira, estudo avaliando os aspectos clínicos da hemólise em

pacientes infectados com *P. vivax*, observou que a febre e a leucocitose são os principais achados que acompanham o quadro de hemólise. Observaram também que estes pacientes desenvolveram falência renal aguda (RAMOS JUNIOR et al., 2010).

A primaquina, uma 8-aminoquinolina, foi licenciada para uso pela primeira vez na década de 1950 para o tratamento da malária *vivax* e desde então é a única droga disponível capaz de eliminar os hipnozoítos (RAJAPAKSE; RODRIGO; FERNANDO, 2015). O metabolismo da primaquina gera ERO, que rapidamente esgotam a glutatona em eritrócitos deficientes em G6PD, ocasionando danos à hemoglobina e proteínas de membrana, que permite a observação de inclusões chamadas de corpos de Heinz, visualizados no início de um episódio hemolítico induzido pela PQ. Além disso, há evidências de que a hemólise intravascular (hemoglobinúria) e hemólise extravascular (hiperbilirrubinemia) coexistem em todos os casos, pois é provável que os eritrócitos mais gravemente danificados sofram hemólise intravascular, enquanto outros são removidos por macrófagos no baço, assim, dando origem a hemólise extravascular (ASHLEY; RECHT; WHITE, 2014; RUEANGWEERAYUT et al., 2017). Atualmente, em busca de drogas alternativas a PQ, devido ao seu potencial hemolítico e outros efeitos colaterais indesejáveis, tais como metemoglobinemia e distúrbios gastrointestinais, a tafenoquina (TQ), um análogo sintético de PQ, tem sido a opção mais estudada nos últimos anos e tem mostrado resultados promissores tanto para a prevenção como para a cura. A grande vantagem deste fármaco é ser administrado como uma dose única ou em regimes de tratamento muito mais curtos do que a PQ, embora exista um maior risco de hemólise devido à meia-vida prolongada do mesmo (RAJAPAKSE; RODRIGO; FERNANDO, 2015; VIZZI et al., 2016).

Ademais, os testes de triagem para G6PDd disponíveis por cerca de meio século, eram considerados pouco confiáveis e fora da realidade econômica pelos países em que a malária é endêmica. Porém, apenas recentemente, a Organização Mundial da Saúde, autoridades de saúde pública e a indústria de diagnósticos tornaram-se favoráveis a utilização desses testes devido às consequências graves que a deficiência da enzima apresenta aos portadores, e aos valores dos kits de detecção, que podem custar, em um futuro próximo, menos US \$ 1 por teste (LUZZATTO; NANNELLI; NOTARO, 2016).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A G6PDd é uma das enzimopatias mais comum no mundo, afetando cerca de 400 milhões pessoas (BOONYUEN et al., 2017). No Brasil e em outros países da América Latina, no qual a malária apresenta-se como um problema de saúde pública, a recomendação de tratamento inclui o uso da primaquina, considerada, atualmente, a única droga aprovada para a eliminação completa das fases hepáticas latentes do *P. vivax* e dos estágios sanguíneos sexuais de todas as espécies de *Plasmodium* (HOWES et al., 2013; MONTEIRO et al., 2014; WHO, 2015). No entanto, as principais desvantagens no uso de PQ são sua hemotoxicidade e o risco de desencadear um quadro de anemia hemolítica aguda em pacientes G6PDd (PEIXOTO et al., 2015).

Anualmente, no Brasil, com a não realização de testes de rotina para detecção de G6PDd, estima-se que, cerca de 6000 indivíduos com G6PDd e infectados por *P. vivax* sejam hospitalizados como resultado do uso de PQ. Este procedimento gera custos em torno de US\$ 4.858.108,87 com hospitalizações para o Serviço Brasileiro de Saúde Pública (C/SUS) (PEIXOTO et al., 2016).

Alguns estudos vêm tentando padronizar testes rápidos para este fim no Brasil (PEIXOTO et al., 2016; PEIXOTO et al., 2017), mas esta ainda não é uma realidade inserida na rotina de diagnóstico de malária. Além disso, como a prevalência de G6PDd e a extensão das suas consequências clínicas não são bem conhecidas nas populações Latino Americanas, tal fato coloca em risco milhares de pacientes G6PDd com malária todos os anos, devido a complicações graves desencadeadas pelo uso deste medicamento potencialmente hemolítico (MONTEIRO et al., 2014; PEIXOTO et al., 2017). Assim, a possível detecção de G6PDd antes da prescrição de PQ pode contribuir para melhorar a segurança do tratamento em pessoas que sofrem com a enzimopatia, reduzir número de transfusões sanguíneas e auxiliar no controle e eliminação da malária (PEIXOTO et al., 2016).

Recentemente, o PNCM/MS está testando uma nova droga para a substituição da primaquina para a eliminação das formas hepáticas, a Tafenoquina, no entanto, seus efeitos hemolíticos também precisam ser investigados (RAJAPAKSE; RODRIGO; FERNANDO, 2015).

Dessa maneira, como a relação entre a frequência dos polimorfismos no gene *G6PD* na região endêmica de malária não é conhecida no Brasil e a doença ainda se faz prevalente no país, avaliar e conhecer a frequência dos polimorfismos mais prevalentes que afetam a atividade da enzima de forma drástica, como a variante A-, nesta região,

faz-se necessário para melhorar a adesão e segurança no tratamento, bem como para implantação de novas estratégias para o controle e eliminação da doença.

A população Brasileira é bem conhecida pela sua heterogeneidade e por contribuições ancestrais de nativos americanos, europeus e africanos para sua formação. Com a progressão de um complexo processo de colonização em um território de dimensões quase continentais, hoje, é possível observar uma grande variação genética na composição das populações atuais (SALOUM DE NEVES MANTA et al., 2013). Sendo assim, além da importância médica, avaliar as frequências da variante A- do gene G6PD no Brasil, pode evidenciar a composição genética da população que foi incorporada ao longo da história por povos de origem africana.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a frequência alélica e genotípica comparativamente dos polimorfismos no gene *G6PD* em indivíduos com e sem malária, provenientes da região Norte Brasileira.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a frequência da deficiência de G6PD, causada pela variante G6PD A-, em pacientes com malária e indivíduos não maláricos provenientes da região Norte Brasileira.
- Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs G202A e A376G (variante G6PD A-) no gene *G6PD* em pacientes com malária e indivíduos sem malária de municípios da região Norte Brasileira.
- Comparar a frequência alélica e genotípica dos SNPs G202A e A376G (variante G6PD A-) no gene *G6PD* entre os municípios estudados.
- Avaliar as chances da infecção de malária se estabelecer e da doença se desenvolver em cada um dos grupos.

METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

As amostras utilizadas nesse projeto foram inclusas no projeto “Influência de marcadores de hipóxia e da síntese de óxido nítrico no processo hemolítico em Anemia Falciforme (HbSS) e Malária *vivax*” que foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – (parecer 948.491, atendendo às normas vigentes no país), e também no projeto “Infecção pelo *Plasmodium vivax* no município de Anajás, Estado do Pará: Associação de polimorfismos dos genes do receptor do Linfócito T, *Toll-like* e citocinas envolvidas na resposta imune com os aspectos clínicos” (CAAE: 20123413.0.0000.0019). Todas as amostras foram coletadas por profissional habilitado, somente após os indivíduos receberem esclarecimentos e manifestarem sua concordância em participar da pesquisa por meio da assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXOS 1 e 2), conforme estabelecido pela Resolução CNS 466/2012. Os indivíduos participantes da pesquisa estavam sujeitos a risco mínimo referente à possibilidade de dor e hematoma no local da punção venosa decorrente da coleta da amostra.

4.2 Casuística e áreas de estudo

O projeto resultou na avaliação de 476 amostras de indivíduos residentes na Região Norte, sendo 200 de pacientes maláricos (infectados por *P. vivax*) e 276 de indivíduos não maláricos, convidados a participar da pesquisa e assim compor o grupo controle. Foram incluídos neste estudo os indivíduos provenientes de hemocentros ou que buscaram atendimento no posto de notificação de malária nos postos de diagnóstico de malária de cada localidade. Não foram incluídos no estudo indivíduos com doença degenerativa, tuberculose, leishmaniose e com malária pelo *P. falciparum* e infecções mistas com outras espécies de plasmódio.

As amostras que constituíram os grupos de estudos foram pareadas de acordo com localidade e sexo, a fim de se realizar um estudo comparativo entre os grupos. As localidades avaliadas foram: Belém - PA, Itaituba - PA, Porto Velho – RO e Rio Branco – AC.

Itaituba é um município do Estado do Pará, pertencente à Mesorregião do Sudoeste Paraense e localizado no Norte brasileiro, com população estimada em 98.523 habitantes (IBGE, 2017). A cidade é conhecida pela intensa atividade de mineração de ouro no Vale do Rio Tapajós. Em virtude do garimpo, houve um crescimento

desorganizado da cidade, com um significativo aumento da pobreza em áreas periféricas, bem como uma grande degradação ambiental causada pelo mercúrio (PREFEITURA ITAITUBA, 2017). No ano de 2017, foram notificados 2122 casos de malária no município, dos quais cerca de 80% são causados por *P. vivax*, registrados no boletim epidemiológico do SIVEP-Malária (SIVEP-MALÁRIA, 2018). O Índice Parasitário Anual (IPA= Número de exames positivos de malária por local provável de infecção/População total residente no período determinado x 1000) para malária foi de 65,4 casos/mil habitantes, configurando um local de alto risco de transmissão de malária.

O município de Belém, frequentemente chamada de Belém do Pará, é a capital do Estado do Pará, situado na região Norte do país, pertencendo à mesorregião metropolitana de Belém, com população estimada em 1.452.245 habitantes (IBGE, 2017). É uma cidade histórica e portuária, localizada ao extremo nordeste da maior floresta tropical do mundo, sendo a capital mais chuvosa do Brasil devido a seu clima equatorial, influenciada diretamente pela Amazônia (PREFEITURA BELÉM, 2017). Em 2017, foram notificados 244 casos de malária no município, quase quatro vezes mais do que em 2016 (SIVEP-MALÁRIA, 2018). No entanto, observou-se um baixo IPA de 0,2 casos/mil habitantes, configurando risco mínimo de transmissão na área, utilizada como grupo controle neste estudo.

Porto Velho é a capital do Estado de Rondônia, com uma população estimada de 519.436 habitantes, é o mais populoso do estado (IBGE, 2017). Localiza na parte oeste da Região Norte do Brasil, na área abrangida pela Amazônia Ocidental no Planalto Sul-Amazônico (PREFEITURA PORTO VELHO, 2017). Foram notificados 3567 casos de malária, também com predominância de *P. vivax* (SIVEP-MALÁRIA, 2018). O IPA observado foi de 5,5 casos/mil habitantes, caracterizando uma área de baixo risco de transmissão.

Finalmente, o município Rio Branco é capital do Estado do Acre, também situado na Região Norte, localizado às margens do Rio Acre, no Vale do Acre, clima quente e chuvoso, com população estimada de 402.057 habitantes (IBGE, 2017). No ano de 2017 foram notificados 643 casos de malária. O IPA do estado do Acre dos últimos anos configura o local de maior número de casos/mil habitantes no Brasil, em 2017, o índice foi de 44,9 casos/mil habitantes (SIVEP-MALÁRIA, 2018).

A tabela 1 ilustra a distribuição dos grupos de estudo por região avaliada.

Tabela 1. Distribuição dos grupos de estudo por região.

LOCAL	MALÁRICOS	NÃO MALÁRICOS	TOTAL
Belém – PA	0	90	90
Itaituba – PA	118	31	149
Porto Velho – RO	47	82	129
Rio Branco – AC	35	73	108
TOTAL	200	276	476

4.3 Amostras biológicas

Amostras de sangue periférico (4 mL) foram coletadas em tubos contendo EDTA como anticoagulante. Logo após a coleta, o diagnóstico para malária foi realizado e, posteriormente, as amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o procedimento de extração de DNA genômico para análises futuras.

4.4 Diagnóstico de malária

Em todos os indivíduos que buscaram atendimento no posto de notificação de malária, frente à presença dos sintomas clínicos da doença, foi realizado o diagnóstico laboratorial pela Gota Espessa e, posteriormente, confirmados por PCR aninhado (SNOUNOU et al., 1993) para confirmação do diagnóstico.

4.5 Extração de DNA por fenol-clorofórmio

O DNA genômico foi extraído de leucócitos do sangue periférico, segundo a técnica de extração por fenol-clorofórmio e precipitação por etanol (SAMBROOK, 1989 modificado por PENA et al., 1991). Neste método, as proteínas contaminantes sofrem desnaturação e são mantidas na fase orgânica ou na interface entre as fases orgânica e aquosa, enquanto que os ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa. A adição de etanol faz com que os sais e outros solutos, como os resíduos da extração com fenol/clorofórmio, permaneçam em solução, enquanto os ácidos nucleicos precipitam-se e podem ser separados facilmente por centrifugação. Dessa forma, o DNA obtido deste processo de extração é adequado para amplificação por PCR. O protocolo completo pode ser encontrado no ANEXO 3.

4.6 Análise da variante G6PD A- (G202A /A376G)

As identificações dos alelos G202A e A376G foram efetuadas por meio do método de PCR-RFLP. As reações seguiram protocolos já estabelecidos na literatura

(Tabela 2), sendo adequados quando necessários. Para todas as mutações utilizou-se um volume final de 25µL contendo 50mM de MgCl₂, 1,25.mM de DNTPs, 10 µM de iniciadores, 0.5 U de Taq polimerase 5U e aproximadamente 150ng do DNA alvo.

Todos os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 3%, com brometo de etídio, após eletroforese de 30 minutos á 80V, posteriormente visualizados sob luz UV em um transiluminador. Após a amplificação e análise em gel de agarose, os produtos de PCR foram submetidos à digestão com enzimas de restrição (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism). Resumidamente, 10µL do produto amplificado foram digeridos com 2 unidades da enzima correspondente a 37°C por cerca de 16 horas. Ao final, os produtos da digestão foram analisados também em gel de agarose 3%, com brometo de etídio, nas mesmas condições descritas.

O protocolo completo para cada mutação pode ser encontrado no ANEXO 4.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho dos fragmentos amplificados por cada um durante a reação de PCR e enzima de restrição necessária para reconhecer a mutação.

Mutação	Sequência	Fragmento Amplificado	Enzima	Referência
G202A	5' GTG GCT GTT CCG GGA TGG CCT TCT G 3' 5' CTT GAA GAA GGG CTC ACT CTG TTT G 3'	109 pb	Hin1II (NlaIII)	BOUANGA <i>et al.</i> , 1998
A376G	5' CTG TCT GTG TGT CTG TCT GTC C 3' 5' GGC CAG CCT GGC AGG CGG GAA GG 3'	295 pb	BseGI (BstCI)	VULIAMY <i>et al.</i> , 1991 CITTADELLA <i>et al.</i> , 1997

Fonte: (BOUANGA *et al.*, 1998; CITTADELLA *et al.*, 1997; VULLIAMY *et al.*, 1991)

4.7 Análise estatística

A frequência dos polimorfismos, encontrada para os diferentes grupos de estudo e localidades, bem como a comparação entre os mesmos, foi avaliada pelo Teste do Qui-Quadrado (χ^2). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Além disso, foi realizada uma análise de *Odds ratio* para avaliar as chances da infecção de malária se estabelecer e da doença se desenvolver em cada um dos grupos. Utilizou-se os softwares *Statistica 8.0*, bem como o *GraphPad Prisma 5.0* para elaborar gráficos.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização dos grupos de estudo

O estudo avaliou 476 indivíduos, sendo 200 maláricos e 276 não maláricos. A caracterização dos grupos avaliados de acordo com o sexo, média de idade e região encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Caracterização do grupo de estudo

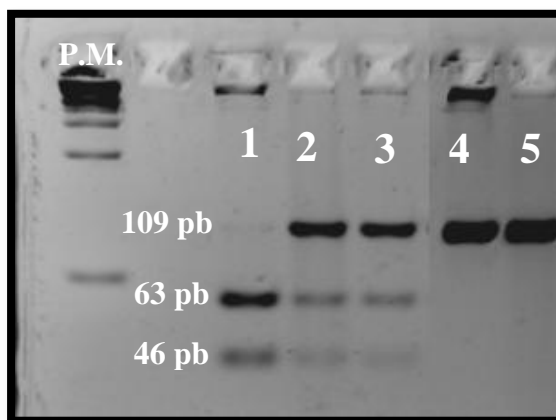
GRUPO DE ESTUDO	REGIÃO	SEXO		TOTAL	IDADE
		♀	♂	N (476)	(anos) Média ± DP
MALÁRICOS	ITB	27	91	118	31,72± 9,99
	PVL	9	38	47	31,10±11,61
	RBR	15	20	35	25,17±11,54
NÃO MALÁRICOS	ITB	15	16	31	39,33±10,80
	BEL	14	76	90	31,28±8,52
	PVL	16	66	82	30,36±9,57
	RBR	18	55	73	28,80±7,68

DP: Desvio padrão; BEL: Belém; ITB: Itaituba;; PVL: Porto Velho; RBR: Rio Branco.

5.2 Frequências alélica e genotípica da mutação G6PD 202 G>A (rs1050828)

Após as análises moleculares do SNP G202A nos grupos de estudo (Figura 3), foram encontrados quatorze indivíduos com a deficiência causada pela variante G6PD A- (G6PDd A-), o que corresponde a 2,94% das amostras avaliadas, sendo cinco indivíduos do grupo de maláricos e oito indivíduos do grupo não maláricos (Figura 4). Em relação aos grupos de estudos, observou-se uma frequência 2,9% no grupo sem malária e de 3,0% no grupo com malária. A Tabela 4 ilustra a frequência genotípica e alélica da mutação nos grupos de estudo, de acordo com o sexo. Não houve diferenças estatísticas significativas entre a frequência dos genótipos, no modelo dominante GG X AA/AG, entre os grupos de estudo ($p=1,00$)

Figura 3. Gel em agarose 3%, ilustrando: 1 – amostra de um indivíduo homocigoto/hemizigoto deficiente para o SNP G202A (AA/A) – fragmentos de 63 e 46 pb; 2 e 3 – amostra de um indivíduo heterocigoto para o SNP G202A (GA) – fragmentos de 109, 63 e 46 pb; e 4 e 5 - amostra de um indivíduo homocigoto/hemizigoto normal para o SNP G202A (GG/G) – fragmento 109 pb não digerido.



pb= pares de bases; P.M. = Peso molecular

Figura 4. Gráfico ilustrando a presença de G6PDd A- entre os indivíduos dos grupos com malária e sem malária (controle) avaliados na Região Norte Brasileira.

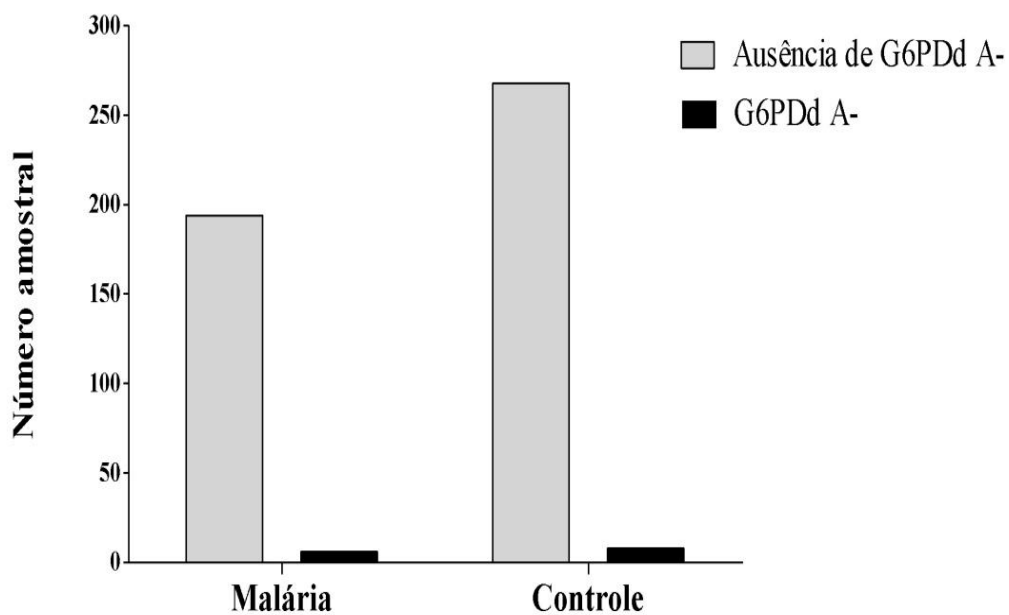


Tabela 4. Frequência genotípica e alélica da mutação G6PD 202 G>A (rs1050828) nos grupos com malária e sem malária, de acordo com o sexo.

GRUPO DE ESTUDOS	TOTAL N(476)	GENOTÍPICA			ALÉLICA	
		GG	GA	AA	G	A
MALÁRICOS						
♀	51	92,15%	5,89%	1,96%	0,951	0,049
♂	149	-	-	-	0,987	0,013
TOTAL	200	94,12%	3,92%	1,96%	0,973	0,024
NÃO MALÁRICOS						
♀	63	93,65%	6,35%	0%	0,968	0,032
♂	213	-	-	-	0,981	0,019
TOTAL	276	93,65%	6,35%	0%	0,977	0,023

Ainda, a fim de comparar as regiões, as Tabelas 5 e 6, representam a frequência genotípica e alélica da mutação G6PD 202 G>A (rs1050828) entre as regiões avaliadas (Figura 5) e entre os grupos de estudos em cada região (Figura 6). As frequências de G6PDd A- encontradas em cada localidade foram de 2,51% em ITB + BEL, 2,32% em PVL e 4,63% em RBR. Em relação aos grupos de estudo, para maláricos as frequências foram de 2,54% em ITB, 4,25% em PVL e 2,86% em RBR; para o grupo controle, as frequências encontradas foram de 2,47% em ITB + BEL, 1,21% em PVL e 5,47% em RBR. Contudo, não houve diferenças estatísticas significativas, no modelo dominante, entre as localidades ($p=0,4953$) e também entre os grupos comparados em cada região, maláricos ($p=0,8429$) e controle ($p=0,2692$).

Tabela 5. Frequência genotípica e alélica da mutação G6PD 202 G>A (rs1050828) encontrada em cada região estudada somando os dois grupos de estudo: malária e controle.

REGIÕES	TOTAL N(476)	GENOTÍPICA			ALÉLICA	
		GG	GA	AA	G	A
BEL						
♀	14	100%	0%	0%	1	0
♂	76	-	-	-	0,973	0,026
TOTAL	90	100%	0%	0%	0,980	0,019
ITB						
♀	42	94,12%	3,92%	1,96%	0,960	0,040
♂	107	-	-	-	0,987	0,013
TOTAL	149	94,12%	3,92%	1,96%	0,950	0,050
PVL						
♀	25	92,00%	8,00%	0%	0,960	0,040
♂	104	-	-	-	0,991	0,009
TOTAL	129	92,00%	8,00%	0%	0,981	0,019
RBR						
♀	33	87,83%	12,12%	0%	0,940	0,060
♂	75	-	-	-	0,981	0,019
TOTAL	108	87,83%	12,12%	0%	0,965	0,035

BEL: Belém; ITB: Itaituba; PVL: Porto Velho; RBR: Rio Branco.

Tabela 6. Frequência genotípica e alélica da mutação G6PD 202 G>A (rs1050828) em cada grupo, com malária e sem malária, por região estudada.

GRUPO DE ESTUDOS	TOTAL	GENOTÍPICA			ALÉLICA	
	N(476)	GG	GA	AA	G	A
MALÁRICOS						
ITB						
♀	27	96,30%	0%	3,70%	0,963	0,037
♂	91	-	-	-	0,978	0,022
TOTAL	118	96,30%	0%	3,70%	0,972	0,027
PVL						
♀	9	77,78%	22,22%	0%	0,888	0,112
♂	38	-	-	-	1	0
TOTAL	47	77,78%	22,22%	0%	0,964	0,356
RBR						
♀	15	93,33%	6,67%	0%	0,967	0,033
♂	20	-	-	-	1	0
TOTAL	35	93,33%	6,67%	0%	0,980	0,020
NÃO MALÁRICOS						
BEL						
♀	14	100%	0%	0%	1	0
♂	76	-	-	-	0,973	0,026
TOTAL	90	100%	0%	0%	0,980	0,019
ITB						
♀	15	93,33%	6,67%	0%	0,978	0,021
♂	16	-	-	-	1	0
TOTAL	31	96,55%	3,55%	0%	0,973	0,021
PVL						
♀	16	100%	0%	0%	1	0
♂	66	-	-	-	0,985	0,015
Total	82				0,990	0,010
RBR						
♀	18	83,33%	16,67%	0%	0,917	0,083
♂	55	-	-	-	0,982	0,018
TOTAL	73	83,33%	16,67%	0%	0,956	0,044

BEL: Belém; ITB: Itaituba; PVL: Porto Velho; RBR: Rio Branco

FIGURA 5. Gráfico ilustrando a presença de G6PDd A- comparada entre os grupos, malária e controle, de cada uma das localidades avaliadas.

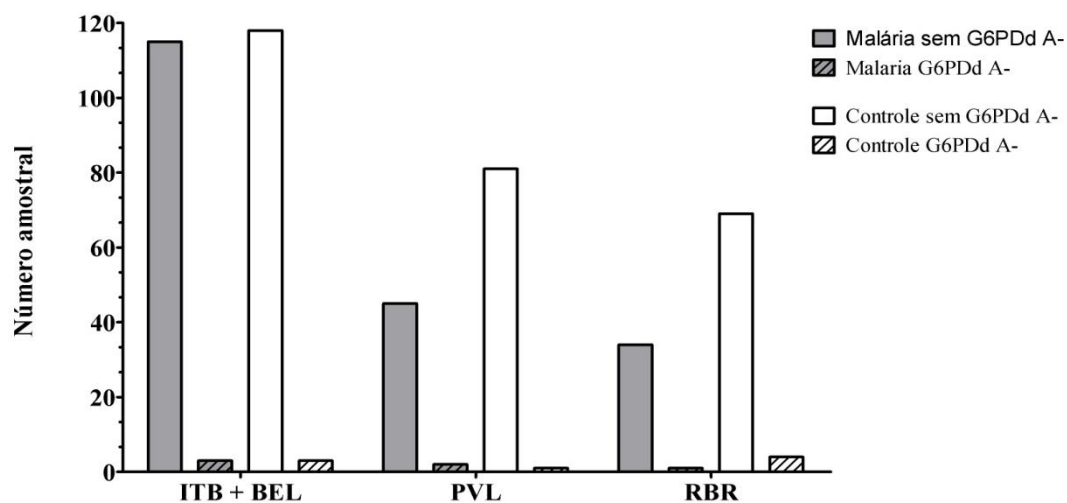
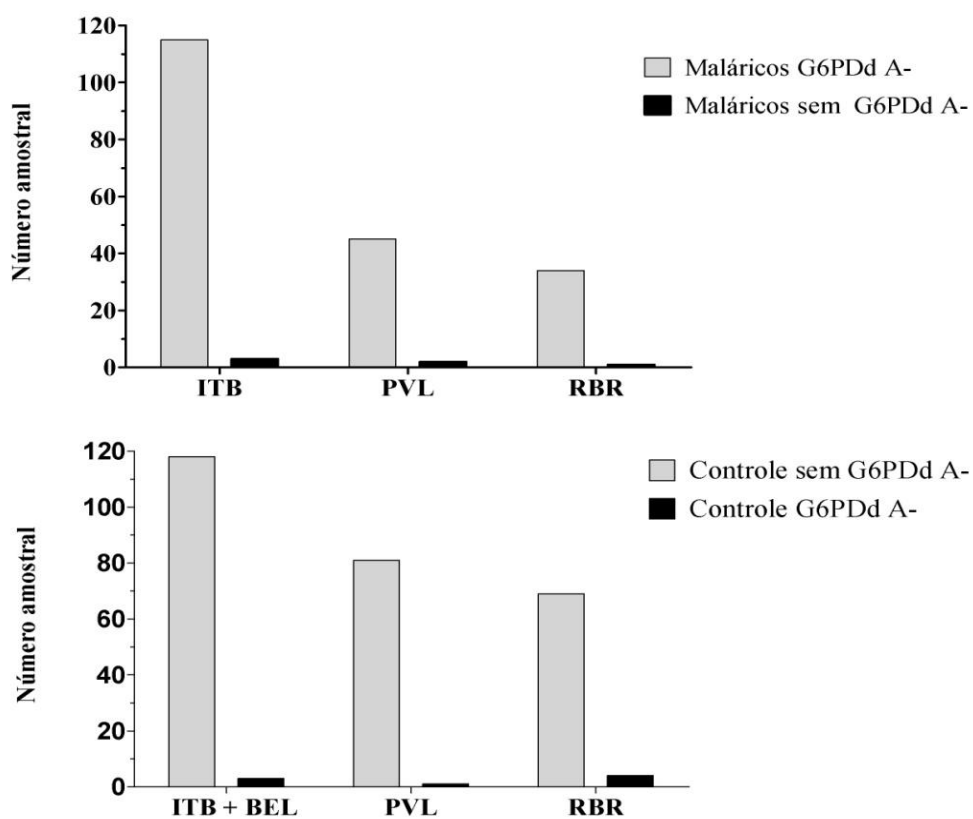


FIGURA 6. Gráfico ilustrando a presença de G6PDd A- comparada entre os grupos, somente malária e somente controle, entre cada uma das localidades avaliadas.



A análise de *Odds ratio* (OR) (Tabela 7) sugere que, nos municípios de ITB+BEL (IC 95% 0,2028-5,191; OR=1,026) e PVL (IC 95% 0,3213-41,33; OR=3,644), os indivíduos G6PDd A- têm maiores chances da infecção de malária se estabelecer e da doença se desenvolver, enquanto que no município RBR (IC 95% 0,0545-4,71; OR=0,5074) os indivíduos G6PDd A- possuem menores chances da infecção de malária se estabelecer e da doença se desenvolver.

Tabela 7. Resumo das análises de *Odds ratio* para cada região, comparando os grupos maláricos e controle em relação a chances da infecção de malária se estabelecer e da doença se desenvolver na presença ou ausência da mutação.

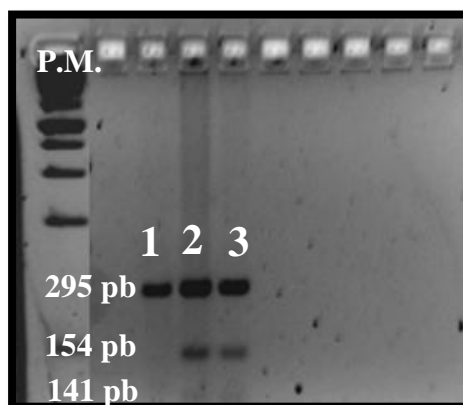
REGIÕES	OR	IC 95%
ITB + BEL	1,026	0,2028-5,191
PVL	3,644	0,3213-41,33
RBR	0,5074	0,0545-4,71

BEL: Belém; ITB: Itaituba; PVL: Porto Velho; RBR: Rio Branco; OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confiança

5.3 Frequências alélica e genotípica da mutação G6PD 376 A>G (rs1050829)

O SNP A376G também foi analisado em ambos os grupos, no entanto, por problemas amostrais não foi possível rastrear a mutação em todos os indivíduos avaliados. Foram genotipados 60 indivíduos (12,60%), dos quais, a mutação também foi avaliada nos quatorze indivíduos que apresentaram a mutação G6PD 202 G>A (G6PDA A-) (Figura 7) e os demais que não apresentaram a mutação G6PD 202 G>A também não apresentam a mutação G6PD 376 A>G.

Figura 7. Gel em agarose 3%, ilustrando: 1 – amostra de um indivíduo homocigoto/hemizigoto normal para o SNP A376G (AA/A) – fragmento de 295 pb não digerido; 2 e 3 – amostra de um indivíduo heterocigoto para o SNP A376G (AG) – fragmentos de 295, 154 e 141 pb.



pb= pares de bases; P.M. = Peso molecular

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Atualmente, dados sobre a prevalência de G6PDd em áreas endêmicas de malária no Brasil são escassos, de forma que a frequência exata desta deficiência enzimática é desconhecida para estas regiões. Enquanto isso, os pacientes infectados por *P. vivax* continuam recebendo o tratamento combinado de cloroquina e primaquina, sem que a presença de G6PDd seja previamente investigada (DOMBROWSKI et al., 2017). De acordo com o Ministério da Saúde, em geral, as doses recomendadas para o tratamento são: uma dose por três dias de cloroquina (25 mg/kg do peso corporal) combinada com sete dias (0,5 mg/kg) (esquema curto) ou 14 dias (0,25 mg/kg) (esquema longo) com PQ, para evitar episódios de recidivas de malária (WHO, 2015; MONTEIRO et al., 2014).

O presente estudo avaliou 476 indivíduos provenientes da região Norte do país e encontrou uma prevalência total de 2,94% de G6PDd. Esta foi ocasionada pela variante G6PD A-, caracterizada pela presença da mutação G6PD 202 G>A (rs1050828), de grande importância médica por apresentar apenas de 8-20% da atividade enzimática considerada normal (VALENCIA et al., 2016). Esta frequência já se encontra próxima ao que é relatado em outros estudos, que estimam uma prevalência menor do que 10% (CARDOSO et al., 2012; MONTEIRO et al., 2014) e uma média de 5,2%, compilada por DOMBROWSKI et al., 2017 de outros estudos realizados no Brasil. Como por exemplo, um estudo realizado no Vale do Juruá - AC encontrou uma frequência de 4,5% de prevalência de G6PDd (DOMBROWSKI et al., 2017), similar à frequência de 3% encontrada também em outro estudo realizado em uma comunidade situado nos arredores de Manaus - AM (SANTANA et al., 2009), ambos locais situados na Região Norte onde a malária é endêmica.

Na comparação entre os grupos de estudos foram encontradas prevalências de aproximadamente 2,9% no grupo sem malária e 3,0% no grupo com malária. No entanto, estatisticamente, não houve diferença significativa entre a frequência dos genótipos no modelo dominante GG x AA/AG encontrada entre os indivíduos com e sem malária ($p=1,00$). Por outro lado, nossos resultados encontraram frequências alélicas de 0,024 para o alelo mutante do SNP 202 G>A (rs1050828) no grupo com malária e de 0,023 no grupo não malárico. As frequências por nós observadas são próximas às reportadas no estudo de Auton e colaboradores, que mostraram um MAF = 0,037 no projeto de 1000 Genomas, em dados amostrados de 26 populações na África, Ásia Oriental, Europa, Sul da Ásia e Américas (AUTON et al., 2015).

Além disso, comparando a frequência genotípica entre as localidades estudadas (ITB+BEL, PVL e RBR), também não houve diferença estatisticamente significativa entre elas ($p=0,4953$). Assim como quando comparados os grupos maláricos e grupos controles entre as regiões: ITB Maláricos x ITB+BEL Não Maláricos ($p=0,9752$); PVL Maláricos x PVL Não Maláricos ($p=0,2657$); RBR Maláricos x RBR Não Maláricos ($p=0,5439$). Ademais, segundo as análises de OR, nos municípios ITB+BEL (IC 95% 0,2028-5,191; OR=1,026) e PVL (IC 95% 0,3213-41,33; OR=3,644), sugere-se que os indivíduos com a deficiência apresentam maiores chances da infecção de malária se estabelecer e da doença se desenvolver, enquanto que no município RBR (IC 95% 0,0545-4,71; OR=0,5074) indivíduos com a deficiência possuem chances menores da infecção de malária se estabelecer e da doença se desenvolver. Este fato evidencia de que a Amazônia brasileira não pode ser vista como um bloco único.

Devido à frequência considerável de G6PDd ser observada em regiões onde a malária é também endêmica, alguns estudos sugerem que portadores de G6PDd são menos suscetíveis à infecção de malária, principalmente, contra a malária *P. falciparum* que, por infectar eritrócitos de todas as idades, a depuração dessas células acontece mais rapidamente nesses indivíduos com a deficiência, prejudicando o desempenho do parasito. Em relação ao *P. vivax*, sugere-se que um mecanismo similar possa ocorrer, no entanto, este parasito possui preferência por reticulócitos, que são menos vulneráveis ao estresse oxidativo, o que faz necessários mais estudos para a compreensão dessa associação (CLARK et al., 2009; NGO; STEINBERG, 2015; SANTANA et al., 2013). No estudo de SANTANA et al., 2013, realizado em Manaus – AM, foi observado que os indivíduos G6PDd A- apresentaram 87,7% menos episódios de malária ao longo de suas vidas do que aqueles não deficientes, em uma área onde *P. vivax* é a espécie predominante. Já no nosso estudo, a inferência a respeito dessa associação difere entre as regiões avaliadas, no qual apenas em RBR pode se afirmar que as chances de adquirir malária são menores, quando a mutação está presente.

Portanto, há necessidade de maiores investigações da correlação entre os fenótipos de G6PD e ocorrência de malária, pois essa ausência de associação pode estar relacionada a outros fatores, tais como ao reduzido número amostral estudado, diferentes espécies de *Plasmodium* e também por possível associação com outras hemoglobinopatias (MOIZ et al., 2017; SANTANA et al., 2009)

Apesar de rastreamos uma variante de origem Africana, diversos estudos não encontraram relação e/ou não há diferença estatística observada entre a cor da pele dos

indivíduos e a presença de G6PDd (DOMBROWSKI et al., 2017; SANTANA et al., 2009). Assim como relataram fraca relação entre o fenótipo, como a cor da pele, olhos e cabelos e a ancestralidade genética do indivíduo, de forma que, classificá-los apenas pelo fenótipo, considera apenas uma pequena parcela dos genes presentes neste indivíduo, ignorando uma série de outros envolvidos com a ancestralidade. A grande variabilidade de pigmentação da pele, olhos e cabelos na população Brasileira pode ser explicada pela intensa miscigenação que ocorreu nos últimos séculos, proveniente de três raízes ancestrais: ameríndios, europeus e africanos, o que resultou em uma (PENA et al., 2011). Além disso, alguns estudos evidenciaram que polimorfismos farmacogenéticos são melhores marcadores de ascendência do que a autodeclaração de etnia, que é um indicador pobre de descendência genômica (PENA et al., 2011; SUAREZ-KURTZ et al., 2012).

Nossa casuística é constituída por indivíduos oriundos da população da região Norte, nas quais as principais etnias encontradas, segundo o IBGE, são: parda (67,2%), branca (23,2%), negro (6,5%), indígena (1,9%) e amarela (1,1%) (IBGE, 2017). Ainda segundo o estudo de Pena e colaboradores, diferentemente das etnias que compõe a população da Região Norte estimada pelo IBGE, a porcentagem dos ancestrais que compões essa população são: 10,9% Africanos, 69,7% Europeus e 19,4% Ameríndios, o que pode explicar a prevalência considerável da variante G6PD A- na região em torno de 10% (MONTEIRO et al., 2014; PENA et al., 2011). Outro estudo realizado na população de Goianésia do Pará - PA, localizada também no Norte do país, utilizando polimorfismos farmacogenéticos, evidencia a contribuição de 43,9% ascendência Europeia e contribuições de 31,6% e 24,5% de ancestrais Africanos e Ameríndios, respectivamente. Esta variação pode ser explicada pela grande presença de indivíduos da região Nordeste do Brasil nesta população (CASSIANO et al., 2015; PENA et al., 2011).

No Brasil, os casos de hemólise desencadeados pelo uso de PQ são subestimados e não há farmacovigilância antimalárica, embora se faça necessário, devido ao número de episódios de hemólises seguido de morte, descritos em vários estudos em pacientes G6PDd (LACERDA et al., 2012; MONTEIRO et al., 2016; RAMOS JÚNIOR et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2016). Além disso, apesar da constante diminuição do número de casos de malária, no ano de 2017 observou-se um aumento em cerca de 50% dos casos, de forma que o país enfrenta diversos desafios para erradicar a doença, que ainda é um problema de saúde pública (SIVEP, 2018). Em um estudo realizado em Oiapoque

– AP, fronteira com a Guiana Francesa, onde há intenso fluxo de migração e alta incidência da doença, mostrou que com medidas como diagnóstico precoce, ajuste exato da dose de primaquina para o peso do paciente, a qualidade dos fármacos e o acompanhamento e avaliação da adesão ao tratamento prescrito podem contribuir com a alta eficácia do tratamento padrão utilizado (GOMES et al., 2015). Na Guiana Francesa a prescrição de primaquina somente é realizada após o rastreamento de G6PDd, que também é realizado, logo após o nascimento, em neonatais de áreas endêmicas e devidamente registrado, a fim de facilitar um futuro tratamento da doença e recaídas causadas pelo *P. vivax* (NACHER et al., 2013). Outro estudo realizado no estado do Pará, o qual avaliou o perfil clínico e imunológico da anemia em crianças e adolescentes infectados por *P. vivax*, evidenciou que quando a primaquina é administrada na dose recomendada nenhuma manifestação clínica sugestiva de hemólise, como a icterícia ou a urina escura, ocorreu após o tratamento, mesmo em crianças com G6PDd, que representava uma frequência de 3,8% dos avaliados (DA SILVA VENTURA et al., 2018, no prelo).

Dentre os desafios para o controle da malária destacam-se: a falta de compreensão da diversidade e ecologia dos vetores, que são pouco estudados; a resistência do parasito às drogas antimaláricas; a malária na gravidez; a malária assintomática; aumento da malária nas áreas urbanas devido a migração constante favorecida por questões econômicas, assim como atividade de garimpo, que muitas vezes é ilegal e favorece o desmatamento, sendo responsável por cerca de 6% dos casos de malária no Brasil (HOWES et al., 2013; RECHT et al., 2017; SAMPAIO et al., 2015).

É importante destacar que, embora o portador de deficiência de G6PD seja assintomático, ao entrar em contato com agentes oxidantes, há risco de danos e anemia hemolítica, o que faz o acesso dos pacientes a esse tipo de informação de extrema relevância para mantê-los saudáveis. Segundo o manual do paciente do HEMORIO sobre Anemia Hemolítica Hereditária, os fatores precipitantes para a oxidação dos eritrócitos são: o uso de altas doses de determinados medicamentos de uso rotineiro que vão desde analgésicos, antibacterianos, antiarrítmicos, antihipertensivos e até mesmo ingestão de vitaminas, como ácido ascórbico e vitamina K1; contato com substâncias oxidantes como naftalina, corantes usados em alguns alimentos industrializados e ingestão de feijão de fava; e, ainda, infecções bacterianas e virais em gerais (HEMORIO, 2014). Ademais, somente com a não realização de testes de rotina para

detecção de G6PDd em pacientes infectados por *P. vivax* já implica em gastos exorbitantes para o Serviço Brasileiro de Saúde Pública (C/SUS) (PEIXOTO et al., 2016). Tais fatos consistem em mais barreiras e desafios para o controle da doença, bem como má administração dos recursos públicos para esta finalidade.

Trazendo de volta a discussão às atividades de garimpo, onde as condições de trabalho são exaustivas e há dificuldades de aderência ao tratamento, além do risco de hemólise aguda, um estudo desperta atenção para o risco de miólise durante atividade intensa em indivíduos G6PDd mesmo que assintomáticos, que leva ao aumento de dano oxidativo e, conseqüentemente, mioglobínúria significativa, que pode comprometer a função renal (MANGAT et al., 2014). Muitos indivíduos avaliados da região de ITB são trabalhadores em garimpos, região na qual houve aumento significativo no número de casos de malária no último ano, de forma que o IPA atual da área passou de um local de médio para alto risco de transmissão da doença (SIVEP, 2018). Diante deste cenário e dos resultados obtidos neste estudo a respeito da frequência de cerca de quase 3% de G6PDd A-, a necessidade do rastreamento da deficiência antes da administração de drogas antimaláricas de potencial hemolítico faz-se imprescindível.

Finalmente, este estudo ressalta a importância de se considerar o diagnóstico de G6PDd em uma população multiétnica antes de se realizar o tratamento com PQ, ou outras drogas antimaláricas de potencial hemolítico, como a tafenoquina, por exemplo, para reduzir o risco de hemólise aguda nesses pacientes, aumentar segurança e a adesão ao tratamento de malária *vivax* e, assim, contribuir com o controle e erradicação desta parasitose, além de oferecer melhor qualidade de vida aos indivíduos portadores de G6PDd.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Assim, com os resultados obtidos podemos concluir:

- A frequência da variante G6PD A- (G202A /A376G) de 2,94% para área endêmica de malária *vivax* encontra-se próximo ao que é descrito na literatura e em estudos em outras áreas da Região Norte.
- O perfil da G6PDd na Amazônia brasileira não pode ser visto de forma única, visto que a associação entre a presença da mutação e as chances de adquirir malária em cada grupo de estudo e em cada região apresentam resultados divergentes e reforçam a necessidade de maiores investigações.

Por fim, o cenário observado neste estudo, ressalta a importância do diagnóstico preciso da deficiência de G6PDd em populações multiétnicas antes da administração de drogas antimaláricas de elevado potencial hemolítico, a fim de contribuir com a segurança do tratamento e a erradicação da malária na Região endêmica Brasileira.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHAJANI, F. et al. Identification of β -globin haplotypes linked to sickle hemoglobin (Hb S) alleles in Mazandaran province, Iran. **Genes & Genetic Systems**, v. 91, n. 6, p. 311–313, 13 maio 2016.
- AHN, J.; LEE, J. X chromosome: X inactivation. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p.24, 2008.
- ANDRADE, B. B. et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria journal**, v. 9, n. 1, p. 13, 13 jan. 2010.
- ASHLEY, E. A.; RECHT, J.; WHITE, N. J. Primaquine: the risks and the benefits. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 418, 3 nov. 2014.
- AUTON, A. et al. A global reference for human genetic variation. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 68–74, 30 set. 2015.
- BOONYUEN, U. et al. A trade off between catalytic activity and protein stability determines the clinical manifestations of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. **International journal of biological macromolecules**, v. 104, n. Pt A, p. 145–156, nov. 2017.
- BOUANGA, J. C. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and homozygous sickle cell disease in Congo. **Human heredity**, v. 48, n. 4, p. 192–7, [s.d.].
- BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet. Global health**, v. 5, n. 10, p. e1038–e1046, out. 2017.
- BUBP, J.; JEN, M.; MATUSZEWSKI, K. Caring for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD)-Deficient Patients: Implications for Pharmacy. **P & T : a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 40, n. 9, p. 572–4, set. 2015.
- CARDOSO, M. A. et al. Underlying factors associated with anemia in Amazonian children: a population-based, cross-sectional study. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36341, 2012.
- CASSIANO, G. C. et al. Impact of population admixture on the distribution of immune response co-stimulatory genes polymorphisms in a Brazilian population. **Human Immunology**, v. 76, n. 11, p. 836–842, 2015.
- CITTADELLA, R. et al. Genetic heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in south-east Sicily. **Annals of Human Genetics**, v. 61, n. 3, p. 229–234, maio 1997.
- CDC - Malaria Biology. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>. Acesso em 13 de Novembro de 2017.
- CLARK, T. G. et al. Allelic heterogeneity of G6PD deficiency in West Africa and severe malaria susceptibility. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, n. 8, p. 1080–1085, 18 ago. 2009.
- DA SILVA VENTURA, ANA MARIA REVOREDO, FERNANDES, A. et al. Clinical and immunological profiles of anaemia in children and adolescents with *Plasmodium*

- vivax* malaria in the Para state, Brazilian Amazon. **Acta Tropica**, 2018. No Prelo.
- DE PINA-COSTA, A. et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 618–33, ago. 2014.
- DOMBROWSKI, J. G. et al. G6PD deficiency alleles in a malaria-endemic region in the Western Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 253, 15 dez. 2017.
- FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 4, p. 850–8, abr. 2007.
- GHASHGHAEINIA, M. et al. Pharmacological targeting of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes by Bay 11-7082, parthenolide and dimethyl fumarate. **Scientific reports**, v. 6, p. 28754, 29 jun. 2016.
- GOMES, M. D. S. M. et al. Efficacy in the treatment of malaria by *Plasmodium vivax* in Oiapoque, Brazil, on the border with French Guiana: the importance of control over external factors. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2015.
- GÓMEZ-MANZO, S. et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Update and Analysis of New Mutations around the World. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 12, 9 dez. 2016.
- GUEYE TALL, F. et al. Genetic Background of the Sickle Cell Disease Pediatric Population of Dakar, Senegal, and Characterization of a Novel Frameshift β -Thalassemia Mutation [*HBB* : c.265_266del; p.Leu89Glu*2]. **Hemoglobin**, v. 41, n. 2, p. 89–95, 4 mar. 2017.
- HABARA, A.; STEINBERG, M. H. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 241, n. 7, p. 689–96, abr. 2016.
- HEMORIO - Manual do Paciente: Anemias Hemolíticas Hereditárias. Disponível em: <http://www.hemorio.rj.gov.br/html/pdf/manuais_2010/anemia_hemolitica_2.pdf> Acesso em: 23 de Fevereiro de 2018.
- HOBAN, M. D.; ORKIN, S. H.; BAUER, D. E. Genetic treatment of a molecular disorder: gene therapy approaches to sickle cell disease. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 839–48, 18 fev. 2016.
- HOWES, R. E. et al. G6PD Deficiency. In: **Advances in parasitology**. [s.l: s.n.]. v. 81p. 133–201, 2013.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 12 de Fevereiro de 2018.
- KEMPINSKA-PODHORODECKA, A. et al. Analysis of the genetic variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase in inhabitants of the 4th Nile cataract region in Sudan. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 50, n. 2, p. 115–118, fev. 2013.
- LACERDA, M. V. G. et al. Postmortem Characterization of Patients With Clinical Diagnosis of *Plasmodium vivax* Malaria: To What Extent Does This Parasite Kill?

Clinical Infectious Diseases, v. 55, n. 8, p. e67–e74, 15 out. 2012.

LACERDA, M. V. G. DE; HIPÓLITO, J. R.; PASSOS, L. N. DA M. Chronic *Plasmodium vivax* infection in a patient with splenomegaly and severe thrombocytopenia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 522–3, 2008.

LAHIRI, D. K. et al. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 25, n. 4, p. 193–205, dez. 1992.

LINDENAU, J. D. et al. The effects of old and recent migration waves in the distribution of HBB*S globin gene haplotypes. **Genetics and molecular biology**, v. 39, n. 4, p. 515–523, 2016.

LUZZATTO, L.; NANNELLI, C.; NOTARO, R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 373–393, abr. 2016.

MANGAT, C. et al. Acute haemolytic anaemia and myolysis due to G6PD deficiency. **BMJ case reports**, v. 2014, 18 set. 2014.

MASON, P. J.; BAUTISTA, J. M.; GILSANZ, F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. **Blood reviews**, v. 21, n. 5, p. 267–83, set. 2007.

MILLER, L. H. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673–9, 7 fev. 2002.

MOIZ, B. et al. Frequency of G6PD Mediterranean in individuals with and without malaria in Southern Pakistan. **Malaria journal**, v. 16, n. 1, p. 426, 24 out. 2017.

MONTEIRO, W. M. et al. G6PD deficiency in Latin America: systematic review on prevalence and variants. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 553–68, ago. 2014.

MONTEIRO, W. M. et al. Fatal Primaquine-Induced Hemolysis in a Patient With *Plasmodium vivax* Malaria and G6PD A(–) Variant in the Brazilian Amazon. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 9, p. 1188.1–1188, 1 maio 2016.

MOURÃO L. C.; GOMES, T.C.; BRAGA, E.M. Malarial Anemia: A Multifactorial Hematological Outcome. In Colloquium series on integrated systems Physiology: from moleCule to funCtion to disease - Malaria. ISBN: 9781615046379, 2013.

MOYES, C. L. et al. Defining the geographical range of the *Plasmodium knowlesi* reservoir. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 3, p. e2780, 27 mar. 2014.

NACHER, M. et al. The burden of *Plasmodium vivax* relapses in an Amerindian village in French Guiana. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 1–5, 2013.

NGO, D. A.; STEINBERG, M. H. Genomic approaches to identifying targets for treating β hemoglobinopathies. **BMC medical genomics**, v. 8, p. 44, 29 jul. 2015.

ONDEI, L. S. et al. Lipid peroxidation and antioxidant capacity of G6PD-deficient patients with A-(202G>A) mutation. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 1345–1351, 2009.

OKUMURA, J. V.; LOBO, C. L. DE C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 35, n. 1, p. 71–2, 2013.

PEIXOTO, H. M. et al. G6PD deficiency in male individuals infected by *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: a cost study. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 126, 24 dez. 2015.

PEIXOTO, H. M. et al. Cost-effectiveness analysis of rapid diagnostic tests for G6PD deficiency in patients with *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon. **Malaria journal**, v. 15, p. 82, 11 fev. 2016.

PEIXOTO, H. M. et al. Rapid diagnostic test for G6PD deficiency in *Plasmodium vivax*-infected men: a budget impact analysis based in Brazilian Amazon. **Tropical Medicine & International Health**, v. 22, n. 1, p. 21–31, 1 jan. 2017.

PENA, S. D. J. et al. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. **Electrophoresis**, v. 12, n. 2-3, p. 146-152, 1991.

PENA, S. D. J. et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS one**, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011.

PREFEITURA BELÉM. Disponível em: <<http://www.belem.pa.gov.br/>>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2018.

PREFEITURA ITAITUBA. Disponível em: <<http://www.itaituba.pa.gov.br/paginas/apresentacao>>. Acesso em: 12 de Fevereiro de 2018.

PREFEITURA PORTO VELHO. Disponível em: <<https://www.portovelho.ro.gov.br/>>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2018.

PRICE, R. N. et al. Vivax malaria: neglected and not benign. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 6 Suppl, p. 79–87, dez. 2007.

RAHIMI, Z. Genetic epidemiology, hematological and clinical features of hemoglobinopathies in Iran. **BioMed research international**, v. 2013, p. 803487, 2013.

RAJAPAKSE, S.; RODRIGO, C.; FERNANDO, S. D. Tafenoquine for preventing relapse in people with *Plasmodium vivax* malaria. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, p. CD010458, 2015.

RAMOS JÚNIOR, W. M. et al. Clinical aspects of hemolysis in patients with *P. vivax* malaria treated with primaquine, in the Brazilian Amazon. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 410–2, 2010.

RECHT, J. et al. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. **Malaria journal**, v. 16, n. 1, p. 273, 4 jul. 2017.

RUEANGWEERAYUT, R. et al. Hemolytic potential of tafenoquine in female volunteers heterozygous for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficiency (G6PD Mahidol Variant) versus G6PD-Normal volunteers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 702–711, 2017.

- SALOUM DE NEVES MANTA, F. et al. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e75145, 2013.
- SAMBROOK, J.; FRITCSH, E.F.; MANATIS. T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. ed.2. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 1989.
- SAMPAIO, V. S. et al. Malaria in the State of Amazonas: a typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. suppl 1, p. 4–11, jun. 2015.
- SANTANA, M. S. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in an endemic area for malaria in Manaus: a cross-sectional survey in the Brazilian Amazon. **PloS one**, v. 4, n. 4, p. e5259, 2009.
- SANTANA, M. S. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient variants are associated with reduced susceptibility to malaria in the Brazilian Amazon. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 5, p. 301–306, 1 maio 2013.
- SIQUEIRA, A. M. et al. *Plasmodium vivax* Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 95, n. 6 Suppl, p. 87–96, 28 dez. 2016.
- SIVEP-MALÁRIA - Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária. Disponível em: <http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/> Acesso em: 02 de Fevereiro de 2018.
- SNOUNOU, G. et al. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 58, p. 283-292, 1993.
- SUAREZ-KURTZ, G. et al. Pharmacogenomic diversity among Brazilians: Influence of ancestry, self-reported color, and geographical origin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3 NOV, n. November, p. 1–7, 2012.
- SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E. E.; NAGEL, R. L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. **American journal of hematology**, v. 32, n. 1, p. 66–9, set. 1989.
- TRIPATHY, V.; REDDY, B. M. Present status of understanding on the G6PD deficiency and natural selection. **Journal of postgraduate medicine**, v. 53, n. 3, p. 193–202, 2007.
- TUTEJA, R. Malaria – an overview. **FEBS Journal**, v. 274, n. 18, p. 4670–4679, set. 2007.
- VALENCIA, S. H. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency prevalence and genetic variants in malaria endemic areas of Colombia. **Malaria journal**, v. 15, p. 291, 2016.
- VIZZI, E. et al. Prevalence and molecular characterization of G6PD deficiency in two *Plasmodium vivax* endemic areas in Venezuela: predominance of the African A-(202A/376G) variant. **Malaria journal**, v. 15, p. 19, 11 jan. 2016.

VULLIAMY, T. J. et al. Polymorphic sites in the African population detected by sequence analysis of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene outline the evolution of the variants A and A-. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 19, p. 8568–71, 1 out. 1991.

WHO. Guideline for The Treatment of Malaria. 2015. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127_eng.pdf?ua=1&ua=1>. Acesso em: 15 de Novembro de 2017.

ANEXOS

9. ANEXOS

ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – Resolução nº 466/2012 – CNS)

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

NOME (PACIENTE): _____

ENDEREÇO COMPLETO: _____

BAIRRO: _____ CEP: _____ CIDADE:

_____ ESTADO: _____ FONE 1: _____

FONE 2: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____

II – DADOS SOBRE O ESTUDO

1. Título: *Infecção pelo Plasmodium vivax no município de Anajás, Estado do Pará: Associação de polimorfismos dos genes do receptor do Linfócito T, Toll-like e citocinas envolvidas na resposta imune com os aspectos clínicos*

2. Equipe responsável: Ricardo Luiz Dantas Machado PhD, Martin Joannes Enk PhD, Ana Maria Revoredo da Silva Ventura PhD, José Luiz Fernandez Vieira PhD, Rosana Maria Feio Libonati PhD e Stefan Geiger PhD.

III. EXPLICAÇÕES SOBRE O PROJETO DE PESQUISA AO PACIENTE

1. A malária é uma doença muito frequente na Amazônia e causada por parasitos chamados plasmódios;

2. A infecção de vermes intestinais com o agente de malária pode ter o quadro de anemia acentuado;

3. Visando esclarecer alguns desses aspectos, convidamos você a participar desta pesquisa. Para conduzir os estudos, precisaremos realizar uma coleta do sangue da ponta dos dedos para preparação de lâminas de Gota Espessa (GE) e Distensão Sanguínea

para diagnóstico da doença. Serão também coletadas amostras de sangue (10 mL) da veia do braço para realizar os estudos genéticos e sorológicos e fezes para realização do exame parasitológico. As coletas de sangue serão realizadas com materiais descartáveis e estéreis. Geralmente, não há dor no local da coleta, mas pode ocorrer de intensidade limitada e por pouco tempo, em casos de coletas de sangue da veia. Serão entregues frascos limpos para o exame de fezes;

4. Algumas complicações decorrentes da coleta de sangue podem ocorrer como manchas roxas no local da coleta devido à retirada da agulha pelo profissional antes do garrote ou por perfuração da veia; alergia ao álcool a 70% usado para limpeza local ou contaminações devido à má limpeza feita ou uso de material não-descartável (estéril) contaminado;

5. É assegurado o diagnóstico e o tratamento de todos os pacientes com malária, independente da participação neste estudo;

6. A participação neste estudo é voluntária e você poderá retirar o seu consentimento a qualquer momento sem prejuízo do seu tratamento regular;

7. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes/indivíduos, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente/indivíduo;

8. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exame e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à participação;

9. O material biológico obtido poderá ser utilizado para esta pesquisa e será armazenado uma alíquota no Laboratório de Malária e no Laboratório de Parasitoses Intestinais, Esquistossomose e Malacologia da Seção de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas para a realização em outras pesquisas decorrentes deste estudo. Nova solicitação de utilização dessas amostras será realizada junto ao Comitê de Ética;

10. Para obtenção de quaisquer informações e esclarecimentos, o paciente poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis no Instituto Evandro Chagas, situado na Rodovia Br 316, s/ nº - Bairro: Levilândia, CEP: 67030-000. Telefone para contacto: (0xx91) 3214-2150. Poderá também contactar o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas, situado no mesmo endereço citado anteriormente. Telefone para contacto: (0xx91) 3214-2237, sob Coordenação do Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro.

11. Todas as informações coletadas serão mantidas em sigilo.

IV. AFIRMAÇÕES DO PACIENTE OU DE SEU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Fui esclarecido sobre os objetivos da pesquisa, os procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos? **SIM** **NÃO**

2. Fui esclarecido sobre a liberdade de retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto à continuidade do meu tratamento ou do menor do qual sou responsável?

SIM **NÃO**

3. Fui esclarecido de que não haverá remuneração financeira além do previsto para as despesas do estudo?

SIM **NÃO**

4. Fui esclarecido de que não haverá indenização além das previstas pela lei, em reparação a dano imediato ou tardio, causado pela pesquisa em questão?

SIM **NÃO**

5. Fui esclarecido de que a segurança da minha identidade ou do menor do qual sou responsável será preservada, mantendo-se as informações em caráter confidencial?

SIM **NÃO**

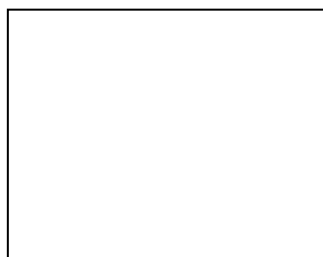
V. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido dos riscos e benefícios deste estudo, conforme acima definido, autorizo a minha participação ou do menor do qual sou responsável, na qualidade de paciente no Projeto de Pesquisa referido no inciso II.

Itaituba, _____ de _____ de 2016.

Assinatura Paciente ou do Responsável Legal

Assinatura e carimbo do Pesquisador



Impressão digital

Documento em duas vias. Rubrica em todas as páginas do TCLE do participante da pesquisa e o pesquisador responsável

ANEXO 2 - TERMO DE PARTICIPAÇÃO E CONSENTIMENTO

**FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
Polimorfismos eritrocitários e a suscetibilidade à Malária na Amazônia brasileira.**

TERMO DE PARTICIPAÇÃO E CONSENTIMENTO

A malária é uma doença encontrada principalmente na Região Amazônica, e os principais sintomas são febre intermitente, calafrio e cefaléia. Este projeto visa avaliar as diferenças genéticas de várias populações do plasmódio da Região Amazônica brasileira, tentando oferecer informações sobre as diversidades encontradas deste parasita, bem como obter subsídios relevantes para o desenvolvimento de estratégias de controle. Sua participação será de extrema importância no estudo da diversidade deste parasita e lhe será garantido sigilo sobre todas as informações coletadas.

Para sua segurança o material utilizado na coleta de sangue será individual e não contaminado, isto é, um material (seringa, agulha, lâmina, algodão com álcool) para cada pessoa, e que depois será colocado em saco de lixo e descartado em local seguro.

De acordo com as recomendações que resultaram da Conferência Internacional de Helsinque (1964) e Tóquio (1975), o presente termo de participação e consentimento apenas confirma sua aprovação, autorização e colaboração ao estudo proposto, em obediência à portaria 196/96 do Ministério da Saúde do Brasil.

Declaro para os devidos fins, que tomei conhecimento do conteúdo do projeto “Malária na Amazônia brasileira.”, e que concordo em participar do mesmo, cedendo sangue venoso, bem como que o material cedido destina-se apenas a análise científica e não pode ser comercializado.

....., de de

Pais ou responsável

Pesquisador Responsável
Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado
Prof. Carlos Eugênio Cavasini
FAMERP - Centro de Investigação de Microrganismos
FONE: (0xx17) 2275733 R. 1143/1187
Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416
Vila São Pedro – CEP 15090-000

ANEXO 3 – EXTRAÇÃO DE DNA POR FENOL-CLOROFÓRMIO

Protocolo:

Extração de DNA por fenol-clorofórmio

- Reagentes necessários

1. Solução de lise 1 para extração de DNA (lise de células vermelhas):

- Sacarose 0,32 M	10,95g
- Tris HCl 10 mM	1 mL
- MgCl ₂ 5mM	0,5 mL
- Triton 1% 100x	1 mL
- Água ultrapura autoclavada	100 mL

2. Solução de lise 2 para extração de DNA (lise de células brancas):

- NaCl 0,075 M	2,19 g
- EDTA 0,02 M (solução estoque pH 8,0)	20 mL
- Água ultrapura	500 mL

3. Proteinase K (20 mg/mL) (lise proteica):

- Proteinase K	20 mg
- Água ultrapura	1 mL

4. Clorofórmio/álcool isoamílico 24:1:

- Clorofórmio.....	24 mL
- Álcool isoamílico	1 mL

5. SDS 10%:

- SDS	10 g
- Água ultrapura	100 mL

6. Etanol 70%

7. Fenol

8. KCl 2M:

- KCl (peso molecular 74,55 g)	14,91 g
--------------------------------------	---------

- Água ultra pura autoclavada q.s.p. 100 mL

- Procedimentos:

1. Cerca de 800 uL de amostras de sangue periférico, colhidas em tubos contendo EDTA, foram colocados em tubos plásticos e o volume foi completado para 1,5 mL com solução de lise 1. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 6500 rpm.

2. O sobrenadante foi descartado, deixando-se aproximadamente 300 uL de pellet no tubo, e a esse precipitado adicionou-se novamente solução de lise 1, até completar 1,0 mL. As amostras foram agitadas até dissolução do pellet e descansaram por 10 a 15 minutos em temperatura ambiente antes de serem centrifugadas novamente por 5 minutos a 6500 rpm. O sobrenadante foi descartado e esse procedimento de lavagem foi realizado mais uma vez.

3. Ao pellet foram adicionados 450 µL de solução de lise 2, 25 µL de SDS 10% e 5 µL de proteinase K (20 mg/mL). Após homogeneização, as amostras ficaram incubadas em banhomaria a 37°C overnight ou a 42°C por 3 horas. Após o período de incubação, foram adicionados 500 µL de fenol e as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 6500 rpm durante 5 minutos.

4. A fase superior foi transferida para outro tubo e foram adicionados 500 µL de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por mais 5 minutos a 6500 rpm e o procedimento foi repetido por mais uma vez.

5. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 50 µL de KCL gelado e foi adicionado 500 µL de etanol 100%, também gelado. O tubo foi invertido várias vezes, até ocorrer a precipitação do DNA, e centrifugado por 30 segundos a 14000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o DNA, que ficou aderido ao tubo, com 200 µL de etanol 70% gelado. As amostras foram centrifugadas por 30 segundos a 14000 rpm, o sobrenadante foi descartado e os tubos passaram cerca de 15 minutos secando.

6. O DNA foi re-hidratado com 30 µL de água ultra pura e foi colocado em banho-maria overnight em temperatura de 37°C para total solubilização da amostra. As amostras foram estocadas a -20°C para posterior análise.

ANEXO 4 - MÉTODO DE PCR-RFLP

Protocolos:

Método de PCR-RFLP para análise de variante G6PD A- (G202/A376G)

- Reação 202G→A) - (GTG > ATG códon 68 Val→Met)

Para cada tubo de reação um volume final de 25 µL:

H ₂ O Mili Q.....	12,2 µL
Buffer.....	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM).....	1,5 µL
DMSO 30%.....	0,5 µL
dNTP (1,25 mM)	2,5 µL
Primer Forward 10 µM	2,0 µL
Primer Reverse 10 µM.....	2,0 µL
Taq Polimerase 5U.....	0,3 µL
DNA 100 ng/µL.....	2,0 µL

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições: Desnaturação a 94°C durante 5 minutos seguidos de ciclo de 35 repetições com desnaturação inicial durante 1 minuto a 94°C, anelamento durante 1 minuto a 72°C e extensão de 55 segundos a 72°C, seguida de um ciclo de extensão final durante 5 minutos a 72°C. A visualização dos produtos amplificados, que devem conter 109 pb, foi feita em Gel de agarose 3% com brometo de etídio, após eletroforese em 80 volts por 30 minutos.

Após a amplificação, o fragmento de 109 pb foi digerido seguindo o protocolo abaixo:

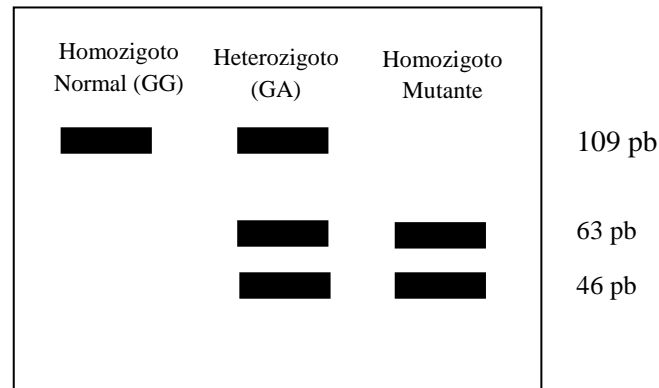
Mutação G202A (GTG>ATG) (rs1050828)

H ₂ O milli-Q.....	7,5 µL
Tampão 10x	2,0 µL
Enzima Hin1II (NlaIII).....	0,5 µL
Produto de PCR.....	10,0 µL

A digestão enzimática foi realizada em banho-maria a 37°C overnight (~16h). Os produtos de digestão foram visualizados após separação eletroforética em gel de agarose 3%, com brometo de etídio, sob luz UV.

A Mutação (GTG>ATG) cria um sítio de restrição da Enzima Hin1II (Nla III) (*Thermo Scientific*). Assim, após a digestão, o alelo normal gera um fragmento de 109 pb e o alelo mutante dois fragmentos, de 63 pb e 46 pb.

Produtos de Digestão: genótipos possíveis



Sítios de reconhecimento: 5'...CATG ↓ ...3'
3'... ↑GTAC...5'

- **Reação (376A→G) - (AAT > GAT códon 126 Asn→Asp)**

Para cada tubo de reação um volume final de 25 µL:

H ₂ O milli-Q.....	11,7 µL
Buffer.....	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM).....	1,5 µL
DMSO 30%.....	0,5 µL
dNTP (1,25 mM)	2,5 µL
Primer Forward (10 µM).....	2,0 µL
Primer Reverse (10 Mm).....	2,0 µL
Taq Polimerase 5U.....	0,3 µL
DNA 100 ng/µL.....	2,0 µL

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições: Desnaturação a 94°C durante 5 minutos seguidos de ciclo de 35 repetições com desnaturação inicial durante 1 minuto a 94°C, anelamento durante 1 minuto a 70°C e extensão de 55 segundos a 72°C, seguida de um ciclo de extensão final durante 5 minutos a 72°C. A visualização dos produtos amplificados, de 295 pb, foi feita em Gel de agarose 3% com brometo de

etídio, após eletroforese em 80 volts por 30 minutos. Após a amplificação, o fragmento de 295 pb foi digerido seguindo o protocolo abaixo:

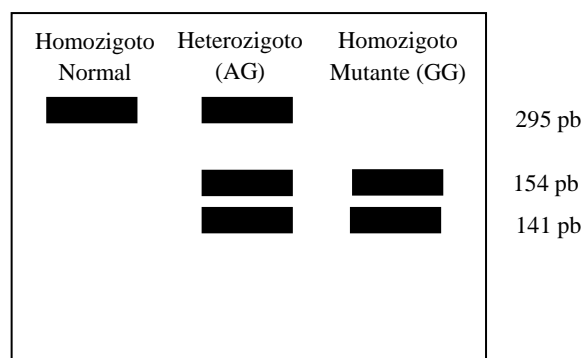
Mutação A376G (AAT > GAT) (rs1050829)

H₂O Mili-Q.....7,5 µL
 Tampão 10x2,0 µL
 Enzima BseGI (BtsCI).....0,5 µL
 Produto de PCR.....10,0 µL

A digestão enzimática foi realizada em banho-maria a 37°C overnight (~16h). Os produtos de digestão foram visualizados após separação eletroforética em gel de agarose 3%, com brometo de etídio, sob luz UV.

A Mutação (AAT > GAT) cria um sítio de restrição da Enzima BseGI (BstCI) (*Thermo Scientific*). Assim, após a digestão, o alelo normal gera um fragmento de 295 pb e o alelo mutante dois fragmentos, de 154 pb e 141 pb.

Produtos de Digestão: genótipos possíveis



Sítios de reconhecimento:

5'...GGATGNN ↑ ...3'

3'...CCTAC↑NN ...5'

ANEXO 5 - ARTIGO

Artigo aceito para publicação na revista Journal of Molecular and Genetic Medicine.

(Impact Factor 0,35)

--- Forwarded message -----

From: **Journal of Molecular and Genetic**

Medicine <molgenmedicine@molecularbiologyjournals.com>

Date: 2018-02-08 6:32 GMT-02:00

Subject: Ms. No: JMGM-16-325

To: claudiabonini@sjrp.unesp.br

Dear Dr. Claudia Regina Bonini-Domingos,

Hope you are doing well!!!

We are happy to inform you that we have successfully completed the peer review process and your article entitled **The laboratorial diagnosis for G6PD deficiency in multiethnic population** got accepted in our journal. We will be sending you the galley proof within a couple of days.

We also would like to inform you that our finance manager will be raising an invoice of 2019\$. Kindly do the payment as early as possible and also please send us the payment receipt in order to cross check with our bank.

Best Wishes!!!

With Regards,

Rita Martina

Journal Coordinator

Journal of Molecular and Genetic Medicine

molgenmedicine@molecularbiologyjournals.com

The laboratorial diagnosis for G6PD deficiency in multiethnic population

Luciana de Souza Onde^I, Lara Maria Silveira^{II}, Amauri Antiquera Leite^{III}, Octávio Ricci Júnior^{IV}, Letícia Cardoso Orlandini^{II}, Ricardo Luiz Dantas Machado^V, Claudia Regina Bonini-Domingos^{II}

^IUniversidade Estadual de Goiás, Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas-Henrique Santillo, Anápolis, GO, Brasil.

^{II}Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

^{III}Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas, Araraquara, SP, Brasil.

^{IV}Hemocentro, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

^VUniversidade Federal Fluminense, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

Endereço para correspondência:

Claudia Regina Bonini-Domingos

UNESP/IBILCE, Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas

Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth

São José do Rio Preto, SP, CEP 15054-000

Telefone: (17) 3221-2392; E-mail: claudiabonini@sjrp.unesp.br

Abstract

The deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is the most frequent of the causes of hemolytic anemias by enzymopathies. Considering the high prevalence of these alterations and the miscegenated characteristic of the Brazilian population, the objective of this study was to investigate the frequency of this genetic affection, correlating them with the ethnic aspects and with the importance of the methodologies used for the routine laboratory diagnosis. A total of 544 peripheral blood samples collected after informed consent were analyzed from individuals aged 16-65, including 426 blood donors and 118 from individuals in an educational institution. The samples were submitted to the classic laboratory diagnosis methods for G6PD deficiency, with

subsequent confirmation by complementary and specific methodologies. For the G6PD deficiency, a frequency of 3.86% was found, with 81.48% of the samples presenting the mutation A-202 (G>A), of African origin. The high frequency of G6PD deficiency reinforces the importance of investigating these hereditary conditions with due laboratory confirmation especially in mixed populations.

Palavras-chave: Enzimopatie, A-202 (G>A) variant, Frequency, Brazilian population

Introduction

Globally, the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is the most common enzymopathy, affecting about 400 million people, as a result of mutations that alter normal expression of the enzyme¹. The G6PD provide nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) that participates, continuously, in glutathione cycle (GSH) to protect erythrocytes against induced damage by hydrogen peroxide and free radicals and prevent acute hemolytic anemia^{2,3,4,5}. Since, G6PD deficiency become the erythrocytes more vulnerable to the effects of oxidizing agents, such as anti-malarial drugs, analgesics composed of acetylsalicylic acid and sulfone, that makes the diagnosis of deficiency essential to warn patients about the risk of hemolytic crisis⁶.

In Brazil, G6PD deficiency has high incidence, which is due to miscegenation characteristic of the population composed of different ethnic groups. This deficiency have different prevalences throughout the country and are important genetic markers of ethnic groups and populations^{7,8}.

Thus, observing the high prevalence of G6PD deficiency and miscegenation characteristic of the Brazilian population, we consider of great importance to adequate laboratory investigation makes the diagnosis of deficiency essential to warn patients about the risk of hemolytic crisis⁹. For diagnosis, are described in the literature various qualitative techniques, quantitative and molecular with varying degrees of sensitivity and specificity, making it important to the association methodologies¹⁰. In this way, the G6PD deficiency screening in individuals without clinical symptoms has done through various methods of diagnosis available in the laboratory routine in this study.

Methods

Blood samples, population and study sites

This study analyzed 544 samples of peripheral blood collected after informed consent from individuals aged between 16 and 65 years, 346 men (63.60%) and 198 women (36.40%). According to ethnicity, 382 were Caucasian (70.22%), 74 african descendants (13.60%) and 88 from different ethnic backgrounds (16.18%), including Eastern and crosses between Caucasian and african descent. Of the total assessed 426 samples were from the Blood Center of São José do Rio Preto, receiving donors from different cities of the northwest region of São Paulo and 118 university students.

Screening for G6PD deficiency

For the G6PD deficiency screening the samples were evaluated by the qualitative method of Brewer (1960), which is based on the formation of methemoglobin (Fe^{+3}) by oxidative action of nitrite on hemoglobin (Fe^{+2}). In the presence of methylene blue, there is stimulation of the pentose phosphate pathway with production of NADPH, converting the oxidized hemoglobin to its reduced form. Reduction rate is proportional to erythrocyte G6PD activity. However, the test is not specific for G6PD deficiency¹¹.

G6PD activity

The G6PD activity was determined for the positives in screening, using the method proposed by Beutler (1984)¹², which measures the reduction rate NADP to NADPH when a hemolysate is incubated with glucose 6-phosphate. The enzymatic activity is expressed in $\text{UI.gHb}^{-1}.\text{min}^{-1}$ at 37 in pH 8.0 being a unit of enzyme activity (IU) defined as the amount of enzyme that reduces 1 μmol NADP^+ per minute at 37° C¹⁴. The normal reference range used under the conditions local laboratory testing and population group ranged from 8.03 to 14.80 $\text{UI.gHb}^{-1}.\text{min}^{-1}$ at 37° C.

Molecular analysis to detect G6PD A-202 variant

The primer sense 5' CAG CCA CTT CTA ACC AC 3' and the primer antisense 5' AAC CAG GCT GGG GGA G 3' were used for the A-202 (G> A) mutation for G6PD deficiency by PCR-RFLP, amplifying a 314 bp fragment. The amplification process was performed by prior denaturation of 94° C for five minutes, plus 35 cycles

of 94° C for one minute, 55° C for one minute, 72° C for 50 seconds, followed by a final 72° C for five minutes. After digestion with the Nla III enzyme (New England BioLabs), the normal allele generates a 314 bp fragment and the mutant allele two fragments, one of 218 bp and the other of 96 bp¹³.

Results

For screening for G6PD deficiency, the samples were first evaluated by Brewer Test (1960). Of the 544 samples, 20 (3.68%) were positive, six females and 14 males; 37 (6.80%) were the result of intermediate color (between positive and negative), being classified as doubtful. Of these, 15 were female and 22 male. In 487 (89.52%) remaining samples, the result was negative. As this is a very sensitive colorimetric method, it is common the presence of intermediate results. Table 1 was related to test positivity according to gender and origin of the sample.

Table 1: Positivity in Brewer test according to gender and origin of the sample.

Results	Female Gender		Male Gender	
	Positive	Intermediate	Positive	Intermediate
Blood Center	3	11	12	22
Educational Institution	3	4	2	0
Total	6	15	14	22

The samples which showed positive and equivocal result in the screening test were subjected to the test Beutler (1984), to determine the activity of G6PD enzyme. Of the 57 samples with suspected G6PD deficiency in Brewer test, the enzyme deficiency was confirmed in 27 of them, 20 with positive preliminary results in the screening test, and seven of the 37 who had dubious results (Table 2). Thus, we found a positive rate at 47% test, and the error percentage was 53%. The frequency of G6PD deficiency for the studied group was equal to 4.96% and removing this group of six related individuals, the frequency obtained was 3.86%. Considering only the sample group consisting of the male blood donors, there were 14 samples with G6PD deficiency, corresponding to 4.59%.

Evaluating A-202 mutation (G> A) in 27 samples with G6PD deficiency, as confirmed by enzyme dosage, the mutation was found in 22 of them, which corresponds to 81.48% of group G6PD deficiency and 4.04% of the study sample. We also point out

that in a female sample, there was the presence of the mutation A-202 (G> A) for G6PD.

Table 2: G6PD activity for the positives and dubious result in the Brewer test.

Brewer test	G6PD activity (UI.gHb-1.min-1 at 37° C)				
	Mean	Median	Standard deviation	Minimum	Maximum
Positive	1.76	1.77	1.12	0.00	4.43
Dubious	6.67	7.06	0.98	4.70	7.54

Discussion

In the present study, the trace of G6PD deficiency was performed in healthy adults. Whereas most polymorphisms to G6PD deficiency is asymptomatic and the hemolytic crisis is usually triggered by external factors, the trace to individuals without signs or symptoms of hemolytic anemia is of great importance as it allows alert wearers on the susceptibility to hemolytic crisis during infections, after ingestion of certain drugs or other oxidizing agents.

Tracking the G6PD deficiency was carried out primarily by Brewer's test, which is widely spread in routine laboratory screening of enzyme deficiency, due to the low cost of reagents and equipment, and its simple execution. The samples showed positive result in the test of Brewer, G6PD deficiency was confirmed in 100% when the enzyme was quantified by Beutler's method. However, in samples with dubious results, only 20% confirmed the change, demonstrating the need for additional specific methodologies.

The percentage equal to 53% false positive results that we found for the Brewer method was superior to 6% described by Long et al. (2000)¹⁴. This high frequency may have been due to the implementation of the enzyme dosage in all samples with dubious results, once the G6PD deficiency can go unnoticed in those samples that do not present a totally positive result for Brewer's test.

The frequency of G6PD deficiency of 3.86%, described in this work, was superior to the 2.38% for the northwestern region of São Paulo State¹⁵. In Rondonia, the estimated frequency, using only the method of Brewer for the diagnosis, was 3.3%¹⁶. Other researches, using specific methodologies, showed for the southern region, frequency equal to 1.4% of the total deficiency of G6PD and 6.4% for partial disability¹⁷. It should be noted that the frequency of enzyme deficiency among male

blood donors was greater than those described for the others Brazilian region with 1.73%¹⁴ and 3.65%¹⁸.

Most of the samples with G6PD deficiency (81.48%) presented the mutation at-202 (G > A), which is a variant of African origin, clinically benign, and the most frequent in Brazil. In the region of Campinas/SP a frequency of 97.3% was found for the mutation-202 (G > A) among blood donors with G6PD deficiency, a proportion similar to that described in our work¹⁹. Other studies also show the presence of rare changes in Brazil, as the Mediterranean variants, A-(968T > C, 376 > G), G6PD Seattle (844G > C), G6PD Santamaria (542A > T, 376A > G), G6PD Tokyo (1246G >), and others^{13, 18, 19}.

From the results obtained it was concluded that the high frequency of G6PD deficiency in the examined population, reinforces the importance of research of these hereditary diseases, including blood donors, in which the search of G6PD deficiency is recommended, with a view to improving the quality of the blood to be transfused, as well as the orientation of the carriers for a better quality of life¹⁴.

Considering the low specificity of screening tests and the racially mixed Brazilian population characteristics there is the need of proper laboratory confirmation, through the combined use of methodologies. The great participation of various ethnic groups in the formation of the population can be confirmed through the screening for genetic diseases, whose ID allows a better educational intervention and guidance to carriers for the risk of hemolysis by the use of drugs, or contact with oxidizing agents.

References

1. BUBP, J.; JEN, M.; MATUSZEWSKI, K. Caring for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD)-Deficient Patients: Implications for Pharmacy. **P T**, v. 40, n. 9, p. 572-4, Sep 2015. ISSN 1052-1372.
2. HOWES, R. E. et al. G6PD deficiency: global distribution, genetic variants and primaquine therapy. **Adv Parasitol**, v. 81, p. 133-201, 2013. ISSN 2163-6079
3. MONTEIRO, W. M. et al. G6PD deficiency in Latin America: systematic review on prevalence and variants. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 553-68, Aug 2014. ISSN 1678-8060
4. GHASHGHAEINIA, M. et al. Pharmacological targeting of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes by Bay 11-7082, parthenolide and dimethyl fumarate. **Scientific Reports**. 2016

5. VALENCIA, S. H. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency prevalence and genetic variants in malaria endemic areas of Colombia. **Malar J**, v. 15, n. 1, p. 291, 2016. ISSN 1475-2875
6. Sánchez TA, DP Núñez, Luengo MS. Anemia hemolítica por deficiência de G6PD y estrés oxidativo. **Rev Cuba de Invest Bioméd**. 2003;22:186-91.
7. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. *Blood*. 2008;111:16-24.
8. 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.
9. Minucci A, Giardina B, Zuppi C, Capoluongo E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase laboratory assay: How, when, and why? **IUBMB Life**. 2009 Jan;61(1):27-34. doi: 10.1002/iub.137.
10. Johnson MK, Clark TD, Njama-Meya D, Rosenthal PJ, Parikh S. Impact of the method of G6PD deficiency assessment on genetic association studies of malaria susceptibility. **PLoS One**. 2009 Sep 30;4(9):e7246. doi: 10.1371/journal.pone.0007246.
11. Brewer GJ, Tarlov AR, Alving AS. Methaemoglobin reduction test. A new, simple, in vitro test for identifying primaquine-sensitivity. **Bull World Health Organ**. 1960;22:633-40.
12. Beutler E. Red Cell Metabolism. A manual of Biochemical Methods. 3 ed. **London: Grune & Stratton, Inc**; 1984.
13. Hamel AR, Cabral IR, Sales TS, Costa FF, Olalla Saad ST. Molecular Heterogeneity of G6PD Deficiency in an Amazonian Population and Description of Four New Variants. **Blood Cells Mol Dis**. 2002;28:399-406.
14. Compri MB, Polimeno NC, Vieira MJA, Saad STO, Ramalho AS. Programa comunitário e deficiência de G-6-PD no Brasil. **Rev Bras Hematol Hemoter**. 2000;22:33-9.
15. Leite ERM, Lessi JHC, Mascarin DB, Leite AA. Pesquisa de deficientes em G6PD nos doadores de sangue da região de Araraquara. **Bol Soc Bras Hematol Hemot** 1996;18(supl):337.
16. KatsuragawaTH, Soares Gil LH, Stábile RG, Pires MG, Bonini-Domingos CR. Avaliação da incidência da deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD) e perfil hematológico em indivíduos de uma região de Rondônia. **Rev Bras Hematol Hemoter**. 2004;26:268-73.
17. Castro S, Weber R, Dadalt V, Tavares V, Giugliani R. Prevalence of G6PD deficiency in newborns in the south of Brazil. **J Med Screen**. 2006;13:85-6.
18. Nicolielo DB, Ferreira RIP, Leite AA. Atividade da 6-fosfogliconato desidrogenase em deficientes de glicose-6-fosfato desidrogenase. **Rev Bras Hematol Hemoter**. 2006;28:135-38.]
19. Saad STO, Salles TSI, Carvalho MHM, Costa, FF. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Brazil. **Hum Hered**. 1997;47:17-21.

ANEXO 6 - ARTIGO

Artigo a ser submetido à revista Archives of Medical Science.

(Impact Factor 1.969)

Relato de caso: Co-herança entre Hb S e deficiência de G-6PD em núcleo familiar brasileiro

ORLANDINI, L. C.¹; NASCIMENTO, P. P.¹; OKUMURA, J. V.¹; COMNINOS, L. F. G.¹; SANTOS, M. R.¹; CHAVES, N. A.¹; SYBUIA, L. S.¹, BONINI-DOMINGOS, C. R.¹

1 - Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) – Departamento de Biologia
UNESP, São José do Rio Preto - São Paulo, Brasil.

Introdução

As hemoglobinopatias constituem uma família de distúrbios hereditários mais comuns entre seres humanos, devido ao padrão de herança autossômico recessivo, cuja fisiopatologia está relacionada à estrutura ou síntese de hemoglobina (RAHIMI, 2013).

A doença falciforme é decorrente de uma mutação pontual, no primeiro éxon do gene da β -globina, com a substituição de uma adenina por uma timina, e a consequente troca de um ácido glutâmico por uma valina na posição 6 ($\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}$) da cadeia, produzindo a hemoglobina S (Hb S). Essa Hb, em baixas concentrações de oxigênio, polimeriza-se, resultando em deformação dos eritrócitos, que adotam formato inflexível de uma foice e alteram a viscosidade do sangue, sendo a causa imediata da oclusão vascular e da anemia (HOBAN; ORKIN; BAUER, 2016; NGO; STEINBERG, 2015). Em homozigose, a mutação para Hb S caracteriza a anemia falciforme (Hb SS), condição mais comum e grave da doença, enquanto que, em heterozigose, caracteriza o traço falciforme (Hb AS), assintomático (FRENETTE; ATWEH, 2007). Outros genótipos podem ocorrer quando há interação da mutação para a HbS com outras, relacionadas com o gene da β -globina, como as variantes de hemoglobina HbC, HbE e HbD, ou também com outros genótipos de talassemia-beta (HbS- β) (HABARA; STEINBERG, 2016).

Os haplótipos da globina beta-S (haplótipos β^S) são um conjunto de polimorfismos da família gênica da *beta-globina* que podem ser reconhecidos por endonucleases específicas, nomeados de acordo com suas origens étnicas e geográficas

em: Bantu (CAR, África do Sul e Central), Benin (BEN, Centro-Oeste da África), Senegal (SEN, Atlântico Oeste da África), Camarões (CAM, Costa Oeste da África) e Árabe-indiano (ARAB, subcontinente Indiano e península Oriental Árabe) (LINDENAU et al., 2016). Trata-se de marcadores importantes para a compreensão da origem e evolução das mutações para a Hb S, bem como da expressão fenotípica de pessoas com anemia falciforme (AGHAJANI et al., 2016; OKUMURA; LOBO; BONINI-DOMINGOS, 2013).

Por sua vez, a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é uma enzima metabólica, citoplasmática, que catalisa o primeiro passo na via das pentoses fosfato, e conduz à redução de NADP⁺ a NADPH, que participa continuamente do ciclo da glutathiona (GSH), protegendo as células contra danos oxidativos e prevenindo um quadro de anemia hemolítica aguda (GHASHGHAEINIA et al., 2016; VALENCIA et al., 2016). A deficiência de G6PD é uma doença genética, ligada ao cromossomo X, no qual mais de 400 diferentes variantes bioquímicas são descritas, devido à heterogeneidade genética do locus do gene, envolvendo mutações de substituições ou deleções únicas de aminoácidos (VIZZI et al., 2016). A variante G6PD A-G202A/A376G ocorre pela troca de uma guanina por uma adenina na posição de nucleotídeo 202, que provoca uma substituição, na cadeia, de uma valina por uma metionina na posição de aminoácido 68, em combinação com uma substituição de adenina por guanina no nucleotídeo 376, que alterna asparagina por aspartato na posição aminoácido 126. Trata-se de variante de origem Africana que está entre as mais notificadas nas Américas, representando apenas de 8-20% da atividade enzimática considerada normal (MONTEIRO et al., 2014; VALENCIA et al., 2016).

Assim, devido à composição da população e da frequência dessas anemias hemolíticas no Brasil, o rastreamento e caracterização dessas anemias são de grande importância para a saúde pública. Nessa vertente, descrevemos o estudo de caso em um núcleo familiar que porta as três mutações concomitantemente, bem como a possível origem dessas mutações.

Metodologia

As amostras de sangue periférico foram coletadas e armazenadas em EDTA, dos indivíduos da família: Mãe - R. A. S - 47 anos; pai - C. A. S. - 50 anos; filhas: - L. P. S. - 27 anos; L. L. S. - 20 anos; e filho: M. R. S. - 25 anos, após consentimento informado.

Foram submetidas aos testes clássicos para a triagem de hemoglobinopatias e ao método qualitativo de Brewer (1960) para triagem de G6PD, dentro de 24h de coleta das amostras, para não haver interferência de degradação na atividade enzimática. Os testes clássicos para a triagem de hemoglobinopatias compreendem: Análise da morfologia eritrocitária (BONINI-DOMINGOS, 2006), Resistência globular osmótica em solução de cloreto de sódio a 0,36% (SILVESTRONI-BIANCO, 1975), Eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino (8.6) (MARENCO-ROWE, 1965), Eletroforese de hemoglobinas em pH ácido (6.8) (VELLA, 1968), perfil hemoglobínico e quantitativo das frações por Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Ultra2/Resolution - TRINITY Biotech).

Em seguida, o DNA das amostras foi extraído pelo método salting-out (LAHIRI et al., 1992) e as análises moleculares do perfil hemoglobínico (Hb S, Hb C, Hb D e β -talassemia), pesquisa das mutações para G6PD, G202A (Hin1II) (BOUANGA et al., 1998) e A376G (CITTADELLA et al., 1997) (BseGI) e determinação dos haplótipos do gene β^S (XmnI, HindIII, HincII, HinfI) (SUTTON; BOUHASSIRA; NAGEL, 1989) foram realizados pelo método de PCR-RFLP.

Resultados e Discussão

Após as análises, constatou-se a presença de traço falciforme (Hb AS) no pai e em todos os filhos e a deficiência de G6PD (variante G6PD A- G202A/A376G) na mãe (heterozigota GA), no filho (hemizogoto G) e em uma das filhas (heterozigota GA), como pode ser visualizado no heredograma na Figura 1. Em relação aos haplótipos do gene β^S , foram encontrados os seguintes padrões haplotípicos: Mãe: Senegal/Atípico; pai: Bantu/Camarões, todos os filhos: Bantu/Senegal, e estão resumidos na Tabela 1.

Figura 2 - Heredograma do núcleo familiar analisado ilustrando o histórico de descendência familiar.

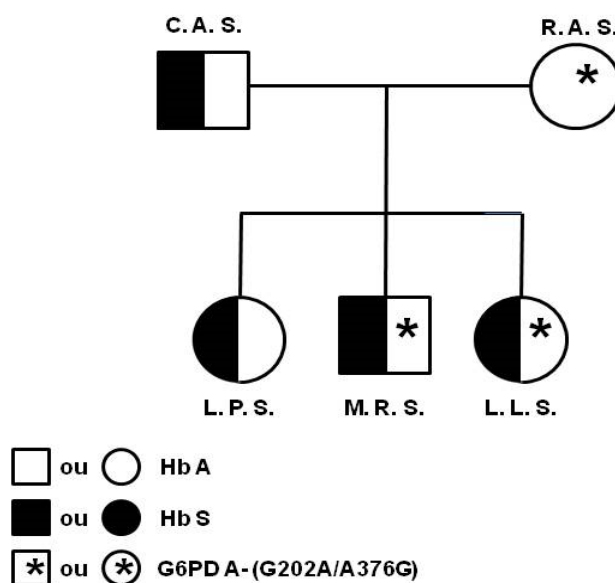


Tabela 3 – Resumo das mutações e dos padrões haplotípicos encontrados dentro do núcleo familiar.

Voluntários	Hb	G6PD A- (G202A /A376G)	Haplótipo Beta-S
Pai	AS	G/A	Bantu/Camarões
Mãe	AA	GA/AG (G6PD A-)	Senegal/Atípico
Filha 1	AS	GG/AA	Bantu/Senegal
Filho 2	AS	A/G (G6PD A-)	Bantu/Senegal
Filha 3	AS	GA/AG (G6PD A-)	Bantu/Senegal

Discussão

Os resultados encontrados estão de acordo com os haplótipos esperados na população Brasileira, Bantu e Senegal, associados às Regiões Oriental e Atlântico Ocidental da África, de onde, historicamente, houve intensa migração forçada de Africanos para o Brasil (LINDENAU et al., 2016).

O haplótipo Camarões, por estar associado a uma região pequena, na Costa Ocidental Africana, é pouco frequente no Brasil, e a presença de haplótipos atípicos, deve-se a grande miscigenação da população e também por vários eventos genéticos,

como mutações pontuais e recombinações cromossômicas que aconteceram nesses mais de 500 anos de Brasil (OKUMURA; LOBO; BONINI-DOMINGOS, 2013).

O haplótipo Bantu está relacionado com a maior gravidade clínica da doença falciforme, enquanto que o Senegal com baixas complicações clínicas (GUEYE TALL et al., 2017), haplótipos esses observados no indivíduo M.R.S., o qual relata anemia grave durante toda a infância e que somente foi diagnosticado com a co-herança de Hb S e deficiência de G6PD quando adulto.

Além disso, é importante destacar que, embora o portador de deficiência de G6PD é assintomático, ao entrar em contato com agentes oxidantes, há risco de danos e anemia intensa, dessa forma, o acesso dos pacientes a essas informações são de extrema relevância na condução de ocorrências clínicas. Segundo o manual do paciente sobre Anemia Hemolítica Hereditária do HEMORIO, os fatores precipitantes para a oxidação dos eritrócitos são o uso de altas doses de determinados medicamentos que vão desde analgésicos, antibacterianos, antiarrítmicos, antihipertensivos e até mesmo ingestão de vitaminas, como ácido ascórbico e vitamina K1. Além de contato com substâncias oxidantes como naftalina, corantes usados em alguns alimentos industrializados, ingestão de feijão de fava e infecções bacterianas e virais (HEMORIO, 2014).

Conclusão

Sendo assim, embora os indivíduos analisados sejam traço falciforme ou portem hemoglobinas normais, o estudo contribuiu de forma significativa para o diagnóstico preciso, prognóstico e orientação genética a respeito da deficiência de G6PD e co-herança com hemoglobinopatias. Os estudos com o haplótipo Bantu é relacionado à maior gravidade clínica da anemia falciforme. Nesse caso, mesmo sendo portador de Hb AS, a associação com a hemizigose da G6PDd e os haplótipos herdados, podem contribuir com uma maior suscetibilidade a eventos hemolíticos. A correta orientação pode garantir melhor qualidade de vida e acesso a medidas preventivas, além e informações para decisões reprodutivas futuras.

Referências

- AGHAJANI, F. et al. Identification of β -globin haplotypes linked to sickle hemoglobin (Hb S) alleles in Mazandaran province, Iran. **Genes & Genetic Systems**, v. 91, n. 6, p. 311–313, 13 maio 2016.
- BONINI-DOMINGOS, C.R. **Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias**. São José do Rio Preto-SP: HN Editora, 2006.
- BREWER G.J., TARLOV A.R., ALVING A.S. Methaemoglobin reduction test. A new, simple, in vitro test for identifying primaquine-sensitivity. **Bull World Health Organ**. 1960.
- BOUANGA, J. C. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and homozygous sickle cell disease in Congo. **Human heredity**, v. 48, n. 4, p. 192–7, [s.d.].
- CITTADELLA, R. et al. Genetic heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in south-east Sicily. **Annals of Human Genetics**, v. 61, n. 3, p. 229–234, maio 1997.
- FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 4, p. 850–8, abr. 2007.
- GHASHGHAEGINIA, M. et al. Pharmacological targeting of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes by Bay 11-7082, parthenolide and dimethyl fumarate. **Scientific reports**, v. 6, p. 28754, 29 jun. 2016.
- GUEYE TALL, F. et al. Genetic Background of the Sickle Cell Disease Pediatric Population of Dakar, Senegal, and Characterization of a Novel Frameshift β -Thalassemia Mutation [*HBB* : c.265_266del; p.Leu89Glufs*2]. **Hemoglobin**, v. 41, n. 2, p. 89–95, 4 mar. 2017.
- HABARA, A.; STEINBERG, M. H. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 241, n. 7, p. 689–96, abr. 2016.
- HEMORIO - Manual do Paciente: Anemias Hemolíticas Hereditárias. Disponível em: <http://www.hemorio.rj.gov.br/html/pdf/manuais_2010/anemia_hemolitica_2.pdf>
Acesso em: 23 de Fevereiro de 2018.
- HOBAN, M. D.; ORKIN, S. H.; BAUER, D. E. Genetic treatment of a molecular disorder: gene therapy approaches to sickle cell disease. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 839–48, 18 fev. 2016.
- KEMPINSKA-PODHORODECKA, A. et al. Analysis of the genetic variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase in inhabitants of the 4th Nile cataract region in Sudan. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 50, n. 2, p. 115–118, fev. 2013.
- LAHIRI, D. K. et al. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 25, n. 4, p. 193–205, dez. 1992.
- LINDENAU, J. D. et al. The effects of old and recent migration waves in the

distribution of HBB*S globin gene haplotypes. **Genetics and molecular biology**, v. 39, n. 4, p. 515–523, 2016.

LUZZATTO, L.; NANNELLI, C.; NOTARO, R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 373–393, abr. 2016.

MASON, P. J.; BAUTISTA, J. M.; GILSANZ, F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. **Blood reviews**, v. 21, n. 5, p. 267–83, set. 2007.

MONTEIRO, W. M. et al. G6PD deficiency in Latin America: systematic review on prevalence and variants. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 553–68, ago. 2014.

NGO, D. A.; STEINBERG, M. H. Genomic approaches to identifying targets for treating β hemoglobinopathies. **BMC medical genomics**, v. 8, p. 44, 29 jul. 2015.

OKUMURA, J. V.; LOBO, C. L. DE C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 35, n. 1, p. 71–2, 2013.

RAHIMI, Z. Genetic epidemiology, hematological and clinical features of hemoglobinopathies in Iran. **BioMed research international**, v. 2013, p. 803487, 2013.

VALENCIA, S. H. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency prevalence and genetic variants in malaria endemic areas of Colombia. **Malaria journal**, v. 15, p. 291, 2016.

VIZZI, E. et al. Prevalence and molecular characterization of G6PD deficiency in two Plasmodium vivax endemic areas in Venezuela: predominance of the African A-(202A/376G) variant. **Malaria journal**, v. 15, p. 19, 11 jan. 2016.

VULLIAMY, T. J. et al. Polymorphic sites in the African population detected by sequence analysis of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene outline the evolution of the variants A and A-. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 19, p. 8568–71, 1 out. 1991.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 05/04/2018

Leticia Cardoso Orlandini

Assinatura do autor