

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ALEXANDRE HIDEAKI TAKARA

**PADRONIZAÇÃO DA GENOTIPAGEM DA VARIANTE G202A DA G6PD A-:
ANÁLISE COMPARATIVA DA RELAÇÃO CUSTO-BENEFÍCIO ENTRE TETRA-
ARMS E SEQUENCIAMENTO SANGER**

Botucatu, SP

2018

ALEXANDRE HIDEAKI TAKARA

**PADRONIZAÇÃO DA GENOTIPAGEM DA VARIANTE G202A DA G6PD A-:
ANÁLISE COMPARATIVA DA RELAÇÃO CUSTO-BENEFÍCIO ENTRE TETRA-
ARMS E SEQUENCIAMENTO SANGER**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Botucatu, SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Takara, Alexandre Hideaki.

Padronização da genotipagem da variante G202A da G6PDA
: análise comparativa da relação custo-benefício entre
TETRA-ARMS e Sequenciamento Sanger / Alexandre Hideaki
Takara. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla
Capes: 20205007

1. Glucosefosfato Desidrogenase. 2. Deficiência de
Glucosefosfato Desidrogenase. 3. Genótipo. 4. DNA -
Análise. 5. Seqüenciamento de nucleotídeo.

Palavras-chave: G6PD; Genotipagem; Sequenciamento Sanger;
TETRA-ARMS.

Agradecimentos

Começo meus agradecimentos ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla, por ter me aceito para orientação e a Dra. Débora Colombi, pela oportunidade de aprimoramento acadêmico e profissional. Sou muito grato a ambos.

Ao Dr. Newton Hokama e a Dra. Marise Pereira da Silva da FMB pela participação na elaboração dessa dissertação. Aos enfermeiros Selma e Beto, companheiros nas minhas manhãs de coleta. À Nilza Castro e todas as mães da família “Mães Que Cuidam” que vêm lutando em prol da conscientização a respeito da deficiência G6PD, e a todos os voluntários que participaram deste trabalho.

Rebeca pela amizade de longa data e pelo auxílio na elaboração dessa minha dissertação. Aos amigos do trabalho Daíse, Caio, Pedro, Fabi, Camila, Larissa, Wivian, Samara, Carol, Nathália e Leticia pelo companheirismo e pelas risadas.

Agradeço sobretudo aos meus pais, pelo apoiado incondicional nas minhas decisões. Por toda ajuda e confiança que sempre depositaram em mim, pelo exemplo de carinho e dedicação que tiveram comigo. Meu muito obrigado a todos.

RESUMO

A deficiência da enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD) é uma anormalidade genética de alta prevalência populacional que resulta em uma menor reatividade do sistema de óxido-redução eritrocitário, geralmente sem repercussões clínicas; estima-se que mais de 300 milhões de pessoas são portadoras dessa alteração. A enzima é expressa em todos os tecidos e catalisa a primeira etapa da Via das Pentoses. Nas hemácias, essa via é de fundamental importância na manutenção do equilíbrio de seu estado redox e a deficiência dessa enzima pode favorecer eventos hemolíticos agudos e crônicos; e em recém nascidos, pode contribuir para o agravamento da icterícia neonatal.

O diagnóstico da deficiência baseia-se na atividade enzimática, identificada através de testes quantitativos e qualitativos. Os testes qualitativos limitam-se a agrupar indivíduos em “deficientes” e “não deficientes”, já os métodos quantitativos são mais precisos na inferência dessa atividade. Estas técnicas podem necessitar de repetições dos testes para confirmação de resultados incongruentes. Por outro lado, a variante genética responsável pela deficiência pode ser precisamente reconhecida através de testes de diagnóstico molecular.

O presente projeto tem como objetivo desenvolver uma metodologia de identificação molecular da variante G202A, frequentemente encontrada na população brasileira, e realizar uma comparação do custo-benefício com a metodologia de sequenciamento de Sanger. Ao todo, foram analisadas 107 amostras de sangue periférico coletado em papel filtro. Após a extração de DNA, foram realizados amplificação e sequenciamento do éxon 4 do gene G6PD, onde a mutação se encontra. A ferramenta *on line* “*Primer1*” foi utilizada para sintetizar os oligonucleotídeo alelo-específicos para a reação de genotipagem TETRA-ARMS. Foram identificados 22 indivíduos homozigotos para a variante deficiente, 84 indivíduos homozigotos para o alelo selvagem e 1 indivíduo heterozigoto, resultados conformados pelo sequenciamento direto das amostras. O custo por reação da TETRA-ARMS foi três vezes menor em comparação ao sequenciamento Sanger. Concluímos que TETRA-ARMS é um protocolo adequado para detecção da G202A em humanos.

Palavras-chave: G6PD, genotipagem, TETRA-ARMS-PCR, Sequenciamento Sanger.

ABSTRACT

Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency is a metabolic enzymatic defect affecting 300 million people worldwide. The enzyme is present in all tissues and catalyses the first reaction in the Pentose Phosphate pathway responsible for maintaining the redox equilibrium in red blood cell. Deficient enzyme may lead to acute and chronic haemolytic anaemia and neonatal jaundice.

Diagnosis for G6PD deficiency is based on biochemical quantitative or qualitative tests. Qualitative tests only classifies subjects as “deficient” or “non-deficient”, while quantitative tests are more precise, however both biochemical approaches need a confirmative assay to confirm ambiguous results. On the other hand molecular identification for the molecular variants are more accurate and precise.

We developed a new molecular assay to identify the G202A molecular variant present at high frequency on Brazilian population and compared it to Sanger sequencing. One hundred and seven peripheral blood samples were collected on filter paper. DNA extraction was performed followed by G6PD exon 4 amplification and sequencing. Online tool “Primer1” generated allele-specific primers for TETRA-ARMS genotyping. Twenty two subjects were deficient homozygote, eighty four wild homozygote and one heterozygote. All subjects genotype were confirmed by Sanger sequencing. TETRA-ARMS costs per reaction is three times lower than Sanger sequencing. We conclude that TETRA-ARMS is a suitable protocol to detect G202A mutation on humans.

Keywords: G6PD, genotyping, TETRA-ARMS-PCR, Sanger sequencing.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
6PG	Glucosamina-6-fosfato
A	Adenina
ARMS	Sistema de Amplificação Mutacional Refratária
ATP	Adenosina trifosfato
Bi-PASA	Amplificação alelo específica da polimerase bidirecional
C	Citosina
D	Aspartato
ddNTPs	didesoxinucleotídeos
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTPs	Deoxinucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FRET	Fluorescência ressonante por transferência de energia
G	Guanina
g	Grama
G6P	Glicose-6-Fosfato
G6PD	Glicose-6-Fosfato Desidrogenase
G6PD A-	Variante africana deficiente da enzima G6PD
G6PD A+	Isoforma A da enzima G6PD
G6PD B	Isoforma B da enzima G6PD
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
H ⁺	Íon de hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCV	Vírus da Hepatite C
HPV	Vírus Papiloma Humano
kb	Quilo base
L	Litro
Met (M)	Metionina
M	Molar
N	Asparagina
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NaOH	Hidróxido de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PASA-PCR	Amplificação alelo específica da polimerase
pb	Pares de base
PCR	Reação de polimerização de cadeia
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

RNA	Ácido ribonucleico
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
T	Timina
TETRA- ARMS	Sistema de Amplificação Mutacional Refratária <i>Tetra primer</i>
U/gHb	Unidade enzimática por grama de hemoglobina
V	Valina

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo das Pentose fosfato. Principais enzimas da via estão representadas em azul itálico. São destacados os principais produtos da Via, Ribose-5-fosfato e NADPH.

Figura 2: Ação de agentes oxidantes nos eritrócitos. Principais enzimas da via estão representadas em azul itálico. Fonte: Luzzatto e Poggi (2009).

Figura 3: Distribuição das variantes deficientes da G6PD na América Latina. Fonte: Monteiro *et al.*, 2014.

Figura 4: Sequenciamento Sanger. Após a reação de sequenciamento os fragmentos são separados de acordo com a massa molecular por eletroforese capilar, a fluorescência dos ddNTS incorporados são identificados e traduzidos na sequência do DNA alvo

Figura 5: Representação da reação TETRA-ARMS PCR para identificação da variante deficiente G202A. A reação é constituída por um oligonucleotídeo sense externo, denominado F(externo), oligo antisense externo, R (externo), e pelos oligos internos alelo específicos A, para o alelo mutado, e C, para o alelo selvagem. A) Na presença de uma amostra mutada, o oligonucleotídeo interno alelo específico A se anela ao DNA, enquanto o oligo alelo específico C torna-se refratário. B) Na presença de uma amostra selvagem ocorre o anelamento do alelo específico C em detrimento do oligonucleotídeo interno A. C) Representação dos produtos de PCR formados para amostras selvagem, mutada e heterozigota. 1: produto dos oligos externos, 2: produto alelo específico mutado, 3: produto selvagem.

Figura 6: PCR do éxon 4 do gene G6PD. Produto esperado de 571 pb amplificado para as amostras GD001 a GD027. NTC: Controle negativo. M: Marcador de peso molecular.

Figura 7: Sequenciamento do éxon 4 do gene G6PD. Os eletroferogramas das amostras foram alinhados com a sequência referência NG 009015 depositada no NCBI. O quadrado laranja indica a posição onde a variante G202A é encontrada. A: eletroferograma da amostra GD017. B: eletroferograma da amostra GD018.

Figura 8: Padronização da concentração de DNA *template* para reação de PCR alelo específica. Foi utilizada a amostra GD017, homozigota para o alelo A para todos os testes. A: PCR alelo específica para o alelo A utilizando os oligonucleotídeos 202A_F2 e G6PD_4R2. Linhas 1 a 6 representam diluições seriadas do DNA *template*, de cem vezes até dez milhões. B: PCR alelo específica para o alelo G utilizando os oligos 202G_R2 e G6PD_4F. Linhas 1 a 3 indicam diluições seriadas de cem a dez mil vezes. M: marcador de peso molecular 100 pb.

Figura 9: Gradiente de temperatura de anelamento variando de 64 a 54 °C para a reação TETRA-ARMS. Foram utilizadas as amostras GD017 e GD018 de genótipo conhecido. M: marcador de peso molecular.

Figura 10: Aumento gradual da concentração do oligonucleotídeos internos na reação de TETRA-ARMS. Foram testadas concentrações de 0,1 a 1 μ M dos oligonucleotídeos internos. M: marcador de peso molecular.

Figura 11: Reação ARMS-PCR. A: reação alelo específica para identificação do alelo mutado A. Amplificação da banda controle (318 pb) e da banda alelo específica para o alelo A (200 pb). B: reação alelo específica para identificação do alelo selvagem G. A. Amplificação da banda controle (446 pb) e da banda alelo específica para o alelo G (283 pb). M: marcador de peso molecular.

Figura 12: Reação TETRA-ARMS. Linhas 1 a 3 utilizaram a combinação Q202A_F4, 202G_R2.2, G6PD4_F2 e Q202_R4. Amplicon controle de 403 pb, alelo A de 289 pb e alelo G de 153 pb. Linhas 4 a 6 utilizaram a combinação Q202A_F4, 202G_R2, G6PD_4F2 e G6PD4_R2. *Amplicon* controle de 318 pb, alelo A de 200 pb e alelo G de 159 pb. Amostra GD017 (A/A) corresponde às linhas 1 e 4; GD018 (G/G) às linhas 2 e 4; e GD020 (G/A) às linhas 3 e 6. M: marcador de peso molecular.

Figura 13: Reação TETRA-ARMS. É esperada amplificação da banda controle (403 pb), do alelo específico A (289 pb) e do alelo específico G (153 pb). M: marcador de peso molecular 100 pb.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação das variantes de G6PD segundo critérios estabelecidos pelo OMS.

Tabela 2: Comparação entre TETRA-ARMS e Bi-PASA.

Tabela 3: Força refratária de *mismatch* entre oligos e *template*. Fonte: Little 1995.

Tabela 4: Tabela 4: Oligonucleotídeos para amplificação da região do éxon 4 do gene G6PD.

Tabela 5: Tabela 5 – Oligonucleotídeos utilizados para PCR alelo específicos. Nucleotídeos sublinhados correspondem a *mismatch* com o DNA *template*. As designações 202A e 202G no nome dos oligos internos são referentes aos alelos mutado e selvagem, respectivamente. G6PD_4F2 e G6PD_4R2 correspondem aos oligonucleotídeos externos.

Tabela 6: Genotipagem da variante c.202G>A. É possível comparar os resultados do sequenciamento Sanger com a metodologia TETRA-ARMS.

Tabela 7: Cotação dos insumos utilizados nas etapas de genotipagem da variante c.202G>A do gene G6PD.

Tabela 8: Cotação dos instrumentos necessários para implementação das técnicas de genotipagem.

Tabela 9: Resumo das vantagens e desvantagens das metodologias TETRA-ARMS e Sanger utilizadas neste trabalho.

Anexos

Anexo A: Sequenciamento do éxon 4 do gene G6PD. Os eletroferogramas das amostras foram alinhados com a sequência referência NG 009015 depositada no NCBI. O quadrado laranja indica a posição onde a variante G202A é encontrada.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 A Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e a via das pentoses	13
1.2 Aspectos Clínicos da deficiência	15
1.2.1 Agentes de estresse oxidativo e Manifestações Clínicas	15
1.2.2 Classificação das variantes	17
1.3 Aspectos genéticos da deficiência	19
1.3.1 Herança genética	19
1.3.2 Variantes moleculares	19
1.3.3 Variante Africana e sua distribuição geográfica	20
1.4 Genotipagem de SNPs	22
1.4.1 Discriminação alélica	23
1.4.2 Detecção alélica	25
1.4.3 Sequenciamento Direto	26
1.4.4 PASA-PCR e ARMS	27
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
4. METODOLOGIA	33
4.1 Extração de DNA e amplificação do éxon 4	33
4.2 Purificação da PCR	34
4.3 Sequenciamento Sanger	34
4.4 Padronização da reação de PCR alelo específica	34
4.5 Reação TETRA-ARMS	36
4.6 Comparação de custos	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Extração de DNA e Amplificação	37
5.2 Purificação e Normalização	38
5.3 Sequenciamento de Sanger	38
5.4 Padronização da PCR alelo específica	39
5.5 TETRA-ARMS PCR para identificação da variante G202A	43
5.6 Comparação de custos e benefícios	47
6. CONCLUSÃO	50

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS	51
8. ANEXOS	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e a via das pentoses

A Glicose-6-fosfato desidrogenase (E.C.1.1.1.49) é uma enzima citoplasmática envolvida na Via das Pentoses, com função fundamental na síntese de NADPH, além de fornecer precursores para síntese de ácidos nucleicos (Cappellini, 2008; Howes *et al.*, 2013).

A via inicia-se com a conversão da Glicose-6-fosfato (G6P) em Ácido-6-fosfoglicogênico lactona pela enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), em seguida, a enzima lactonase hidrolisa a lactona a Ácido-6-fosfogliconato, que por sua vez é convertido a Ribulose-5-fosfato pela 6-fosfogliconato desidrogenase (6PGDH). Nessa etapa, a Ribulose pode ser convertida em seu isômero, Ribose-5-fosfato, pela Fosfopentose isomerase e encaminhada para a síntese de ácidos nucleicos, ATP e coenzimas, ou ser interconvertida a G6P pelas enzimas Triose-P-fosfato isomerase e Transaldolase, realimentando a via (Cappellini, 2008; Luzzatto e Poggi, 2009; Howes *et al.*, 2013). Os intermediários da via das Pentoses ainda podem ser utilizados na via glicolítica (Figura 1).

A enzima G6PD é essencial na regeneração da forma reduzida da glutathiona (GSH). A enzima Glutathiona peroxidase atua oxidando a GSH a glutathiona oxidada (GSSG), e reduzindo o peróxido de hidrogênio. A restauração da GSSG à sua forma reduzida é catalisada pela enzima Glutathiona redutase, dependente de NADPH, metabolizada pela G6PD. Em condições metabólicas basais, a concentração celular de GSH, em relação à sua forma oxidada, encontra-se em uma razão maior que 500:1 (Cappellini e Fiorelli, 2008; Arese *et al.*, 2012).

Células com rápida divisão celular, como as da medula óssea, da pele e da mucosa intestinal, utilizam a Ribose-5-fosfato para síntese de DNA, RNA, ATP e coenzimas necessárias aos processos de divisão celular. Em outros tecidos, o produto essencial da via das pentoses não é a pentose, mas sim o doador de prótons NADPH, necessário para a manutenção do equilíbrio redox da célula (Cappellini, 2008; Luzzatto e Poggi, 2009).

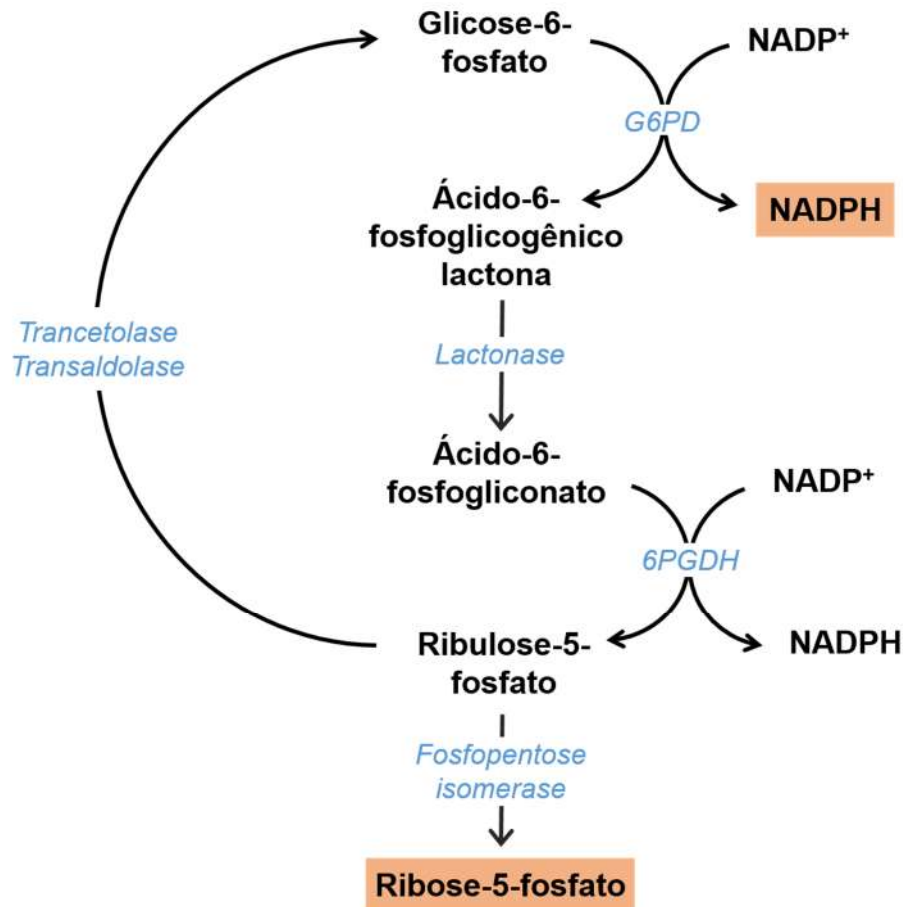


Figura 1: Ciclo das Pentose fosfato. Principais enzimas da via estão representadas em azul itálico. São destacados os principais produtos da Via, Ribose-5-fosfato e NADPH.

A importância do NADPH na manutenção do estado redox pode ser exemplificada nos eritrócitos de mamíferos que, por serem desprovidos de núcleo e mitocôndrias, estão constantemente expostos aos efeitos danosos dos radicais livres. As hemácias de portadores de deficiência G6PD deixam de regenerar quantidades suficientes de GSH (Figura 2), resultando na oxidação da hemoglobina em metahemoglobina. Com a precipitação da metahemoglobina ocorre a formação dos corpos de Heinz que se ligam à membrana celular, enrijecendo e deformando a hemácia (Bayenes, 2011; Prchal e Gregg, 2005; Beutler, 2008). Uma vez perdidas sua estrutura e função, os eritrócitos são fagocitados pelos macrófagos, podendo resultar em quadros de anemia hemolítica dependendo dos níveis de remoção desses eritrócitos da circulação.

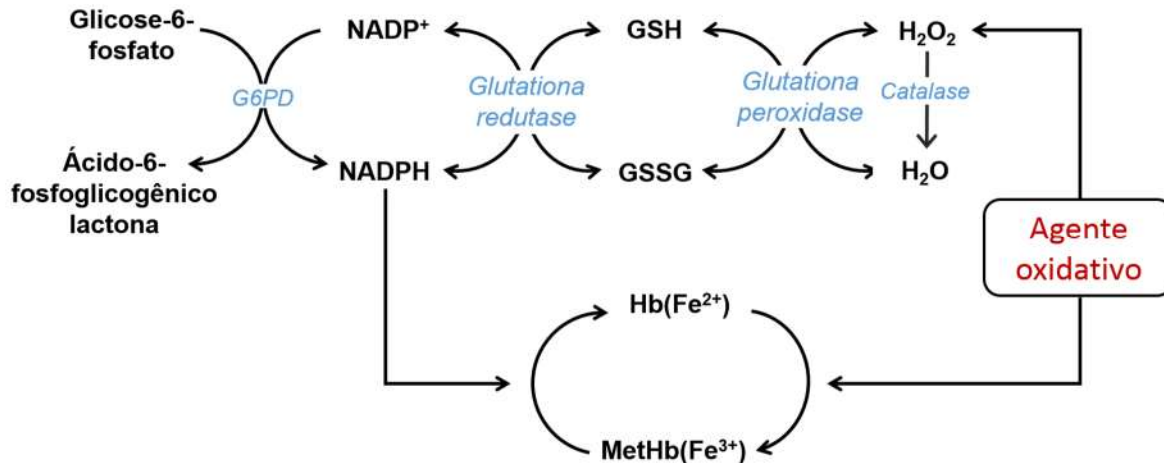


Figura 2: Ação de agentes oxidantes nos eritrócitos. Principais enzimas da via estão representadas em azul itálico. Fonte: Luzzatto e Poggi (2009).

1.2 Aspectos Clínicos da deficiência

1.2.1 Agentes de estresse oxidativo e Manifestações Clínicas

Algumas infecções podem desencadear uma resposta imunológica por parte do organismo infectado e resultar na síntese de agentes oxidativos; por exemplo, os vírus da Hepatite C (HCV) e do Papiloma Humano (HPV), que desencadeiam uma série de respostas celulares mediadas por espécies reativas de oxigênio (Ke e Chen, 2012; De Marco, 2013). Os agentes causadores da Hepatite A, B, pneumonia e Febre Tifóide são outros exemplos de infecções que também podem desencadear uma crise hemolítica em indivíduos deficientes em G6PD (Tugwell, 1973; Agarwal *et al.*, 1985; Hosnut, *et al.*, 2008).

Alguns alimentos também podem desencadear um ataque hemolítico em indivíduos deficientes em G6PD. O favismo, por exemplo, constitui evento hemolítico desencadeado pela ingestão da *Vicia faba*, comumente conhecida como feijão-fava, fava comum ou simplesmente fava, endêmica da região mediterrânea. A vidicina e isouramil são os compostos oxidantes resultantes da digestão da fava e acredita-se que sejam eles os responsáveis pela crise hemolítica (Chevion *et al.*, 1982).

Uma variedade de drogas foram reportadas como indutoras de crise hemolítica em indivíduos deficientes em G6PD, reduzindo a quantidade de glutathione disponível nos eritrócitos e, conseqüentemente, impossibilitando a regeneração do NADPH. Apesar das restrições, algumas drogas podem ser administradas em pequenas doses terapêuticas, enquanto outras somente desencadeiam crise em portadores de variantes mais severas da deficiência (Beutler, 1994; Mason, Bautista e Gilsanz, 2007).

O quadro clínico de Anemia Hemolítica Aguda é geralmente associado a variantes deficientes mais brandas. Após o contato com um agente oxidante, os eritrócitos de indivíduos portadores dessas variantes apresentam maior degradação da hemoglobina e outras proteínas estruturais, comprometendo suas funções. As hemácias mais afetadas são então removidas precocemente da circulação sanguínea, levando ao quadro hemolítico (Arese *et al.*, 2012).

A maioria dos deficientes em G6PD são assintomáticos até a exposição a agentes indutores oxidativos, no entanto, algumas variantes genéticas raras resultam em fenótipos com atividade enzimática residual inferior a 1%. Indivíduos portadores dessas variantes apresentam quadro de anemia hemolítica não esferocítica crônica, também conhecida como anemia hemolítica congênita, em que o quadro hemolítico ocorre sem prévia exposição a agentes oxidantes (Beutler, 1996). O quadro é marcado por concentração de NADPH insuficiente para reduzir os radicais livres sintetizados pelo próprio organismo, mesmo em condições metabólicas basais. Outras características clínicas são a presença de cálculo biliar, aumento da concentração sanguínea de reticulócitos e esplenomegalia. Os mesmos agentes oxidativos que desencadeiam quadros de anemia hemolítica aguda nos portadores das variantes brandas da deficiência também desencadeiam a hemólise intravascular nos portadores de variantes severas, sendo detectados os mesmos sintomas clínicos, porém mais acentuados (Beutler, 1996; Prchal e Gregg, 2005).

Apesar de não apresentar relação de causalidade direta, a deficiência de G6PD pode agravar o quadro de icterícia em neonatos (Kaplan *et al.*, 1998; Carvalho, 2009, Isa *et al.*, 2017). A icterícia se caracteriza por coloração amarelada da pele, escleróticas e membranas mucosas, conseqüente do acúmulo de bilirrubina nesses tecidos, principal metabólito

proveniente da degradação das hemoglobinas de eritrócitos senescentes removidos da circulação sanguínea (Martinelli, 2004; Martelli, 2012). Nos casos de hiperbilirrubinemia (aumento das concentrações séricas da bilirrubina) em recém-nascidos pode ocorrer a passagem de bilirrubina sérica para os tecidos nervosos, podendo causar distúrbios auditivos, visuais, cognitivos, e em casos mais graves, retardo mental e até óbito (Bhutani *et al.*, 2004; Facchini e Assis, 2005).

1.2.2 Classificação das variantes

A Organização Mundial da Saúde publicou em 1989 uma classificação das 300 variantes enzimáticas de G6PD descritas até aquele momento. A caracterização enzimática era baseada na redução de atividade enzimática nos casos de deficiência de G6PD, constante de Michaelis, estabilidade térmica, além da magnitude da manifestação clínica.

As variantes foram divididas em cinco classes (Tabela 1). A Classe I inclui variantes severas associadas a anemia hemolítica não esferocítica crônica e com atividade enzimática residual menor que 1%. Indivíduos dessa classe apresentam quadros frequentes e severos de anemia e hemólise, muitas vezes dependendo de transfusões sanguíneas frequentes (Prchal e Gregg, 2005). O caráter deletério dessas variantes mais severas explica, em parte, sua baixa frequência nas populações (Mason, Bautista e Gilsanz, 2007).

Variante da Classe II apresentavam atividade enzimática residual de até 10%, enquanto a Classe III reunia aquelas que apresentam atividade entre 10% e 60%. Indivíduos de ambas as classes eram assintomáticos em condições metabólicas basais, mas quando expostos a condições de estresse oxidativo, podiam desenvolver quadros de anemia hemolítica aguda, que se agravavam de acordo com a magnitude desse estresse (Prchal e Gregg, 2005; Luzzatto, 2006). A Classe IV correspondia às variantes com atividade enzimática normal, enquanto a Classe V reunia aquelas de atividade aumentada.

Tabela 1 - Classificação das variantes de G6PD segundo critérios estabelecidos pelo OMS.

Classe	Gravidade da deficiência	Atividade enzimática
I	Severa	Atividade inferior a 1%. Anemia hemolítica não esferocítica crônica
II	Severa	Inferior a 10%. Quadros de hemólise intermitentes
III	Moderada	Atividade entre 10 a 60%. Hemólise na presença de estresse oxidativos
IV	Branda ou Nenhuma	Atividade entre 60 a 100%. Sem quadros clínicos
V	Nenhuma	Atividade aumentada. Sem quadros clínicos

Os ensaios para o diagnóstico fenotípico baseiam-se na detecção da formação de NADPH e H⁺ catabolizados pela enzima G6PD a partir de uma amostra sanguínea (Arese *et al.*, 2012), sendo classificados em quantitativos e qualitativos.

Os testes qualitativos indicam a atividade enzimática de uma amostra em relação à atividade normal, podendo o indivíduo ser classificado como deficiente, não deficiente ou com deficiência intermediária. O teste de Brewer (Brewer *et al.*, 1960), também conhecido como teste de redução da metahemoglobina, é um teste *in vitro* que se baseia na formação artificial de metahemoglobina a partir da hemoglobina através da adição de nitrato de sódio, seguida da estimulação da via das pentose na amostra com adição de azul de metileno.

Amostras não deficientes são capazes de converter a metahemoglobina a hemoglobina, enquanto amostras G6PD deficientes não são capazes de tal conversão. A baixa sensibilidade dos testes qualitativos induz resultados ambíguos (Ferreira, 2014), limitando a classificação dos indivíduos (LaRue *et al.*, 2014; Roca-Felter *et al.*, 2014).

Já os testes quantitativos medem a atividade enzimática da G6PD em relação a quantidade de hemoglobina (U/gHb), detectando diretamente a formação e concentração do produto através de técnicas de espectrofotometria (OMS, 1967). Os métodos quantitativos

são mais sensíveis que os testes qualitativos, porém demandam mais tempo e recursos para serem realizados; por esse motivo, testes qualitativos são utilizados como triagem da deficiência e, em seguida, os testes quantitativos podem ser aplicados a fim de se confirmar os resultados da triagem.

Além da classificação baseada nos parâmetros estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde, as variantes também podem ser classificadas de acordo com a frequência em que são encontradas na população. Variantes polimórficas apresentam frequência populacional entre 1 a 70% em uma determinada área geográfica, geralmente correspondem às classes II e III e são associadas a quadros de anemia hemolítica aguda. Variantes esporádicas correspondem a mutações com frequência inferior a 1% na população. (Yoshida *et al.*, 1971 apud Howes, 2012; WHO, 1989; Mason, Bautista, Gilsanz, 2007).

1.3 Aspectos genéticos da deficiência

1.3.1 Herança genética

O gene G6PD localiza-se na porção telomérica do braço longo do cromossomo X, conferindo um padrão de herança ligada ao sexo e de forma que a deficiência é mais acentuada e frequente na população masculina (Beutler, 1994). Na população feminina, a deficiência pode manifestar-se de forma mais complexa: enquanto em homens a herança apresenta caráter binário no qual um indivíduo apresenta ou não a deficiência, em mulheres heterozigotas, é possível identificar quadros de mosaicismos devido ao efeito de compensação de dose do cromossomo X. Assim, um indivíduo fêmea pode expressar alelos diferentes, seja selvagem ou mutado, em células diferentes do corpo. Esses quadros de mosaicismos resultam em fenótipos que variam de selvagem até as formas deficientes (Peters e Van Noorden, 2009; Howes *et al.*, 2012).

1.3.2 Variantes moleculares

A G6PD é uma das enzimas mais polimórficas conhecidas. Duas formas selvagens são encontradas mundialmente, as isoformas G6PD B e a G6PD A+, sendo esta a mais abundante no continente africano e aquela, mundialmente. Entre os polimorfismos

deficientes mais frequentes estão as variantes G6PD A-, predominante no continente africano e nas Américas, e a variante Mediterrânea, predominante nas populações do Oriente Médio. No continente asiático encontra-se a maior diversidade de variantes polimórficas, sendo as Orissa, Mandiol, Union e Kaipling as mais abundantes (Beutler, 1996; Howes *et al.*, 2012; Luzzatto, 2006).

Levantamento bibliográfico de Beutler e colaboradores (2002) identificou 140 mutações para o gene G6PD, sendo a maioria SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) do tipo *missense*, em que a alteração do nucleotídeo resulta em uma troca de resíduo de aminoácido. Atualmente são descritas 186 mutações para a deficiência, das quais 85,4% foram caracterizadas como SNPs *missense*, 8% como mutações múltiplas, nas quais ocorrem duas ou mais substituições de nucleotídeos, 5,3% como deleções e 1% como mutações intrônicas. Constatou-se também que 68 variantes genéticas descritas (42,76%) pertenciam à Classe I, sendo 32 localizadas no éxon 10, 44 variantes (27,6%) pertenciam à Classe II e 33 variantes (20,7%), à Classe III (Minucci *et al.*, 2012).

1.3.3 Variante Africana e sua distribuição geográfica

A variante africana G6PD A (rs1050829) e sua forma deficiente, G6PD A- (rs1050828) são comumente encontradas nos continentes africano e americano, sendo a primeira caracterizada bioquimicamente por atividade enzimática normal e rápida migração eletroforética, enquanto a segunda apresenta o mesmo padrão de migração, mas atividade enzimática diminuída em torno de 10%.

O sequenciamento genético dessas variantes (Hinoro e Beutler, 1988; Vulliamy *et al.*, 1988) revelou que a alteração da variante africana G6PD A se trata de um SNP do tipo *missense*, com substituição de uma adenosina por uma guanidina no éxon 5, na posição 376 do cDNA (c.376G>A), resultando na troca de um resíduo de asparagina por um ácido aspártico (N126D). A variante deficiente G6PD A- apresenta uma segunda substituição, além do A376G, na posição 202, em que uma guanina é substituída por uma adenina (c.202G>A) no éxon 4 do gene, resultando na alteração de um resíduo de valina por metionina (V68M) na cadeia de aminoácido.

Town e colaboradores (1992) estudaram os efeitos da introdução das mutações presentes na variante africana em um sistema de expressão bacteriano. Quando as mutações eram introduzidas individualmente às sequências que codificam enzimas G6PD recombinantes selvagens não era observada queda significativa da atividade enzimática, mas ao serem introduzidas concomitantemente as mutações reduziam a atividade da enzima recombinante. Estudos estruturais destas enzimas revelaram que a introdução das mutações promovia uma instabilidade em suas estruturas secundárias, desestabilizando a α -hélice no resíduo 68 e a dobra β no resíduo 126 (Gomez-Gallego *et al.*, 1999). Concluíram que o comprometimento do dobramento correto da enzima desestabilizava sua estrutura quaternária, corroborando com a suposição levantada por Town e colaboradores (1992) de que a sinergia entre as mutações c.202G>A e c.376A>G promovia uma instabilidade enzimática que resultava em decréscimo de sua atividade.

Foi relatado na literatura apenas um único caso descrevendo a presença da mutação 202A na ausência da 376G (Hinoro *et al.*, 2002). O paciente apresentava atividade enzimática reduzida e o sequenciamento completo do gene G6PD revelou somente a presença da alteração 202G>A e uma deleção de um nucleotídeo na região intrônica do gene. A nova variante, nomeada Asahi, teria surgido independentemente da mutação encontrada no continente africano e, ao contrário do que foi observado *in vitro*, os processos de formação e dobramento enzimático dentro da célula podem ocorrer de maneiras ainda não conhecidas.

Howes e colaboradores (2013) verificaram a distribuição espacial das diferentes variantes nas regiões endêmicas de malária. Nos continentes africano e americano, a diversidade de variantes levantada foi restrita, sendo encontrada predominantemente a variante G202A, atingindo frequências de até 20% na Nigéria e Costa do Marfim. O número de trabalhos realizados no continente americano foi menor do que o encontrado para as outras regiões. Apenas a variante G6PD A- foi predominante entre os fenótipos deficientes, correspondendo a 91 % dos indivíduos pesquisados em todos os trabalhos levantados.

O levantamento bibliográfico a respeito das variantes genéticas encontradas na América Latina e Caribe, realizado por Monteiro e colaboradores (2014), corroborou com os achados descritos por Howes e colaboradores (2013). Ao todo foram conduzidos 30 estudos

a nível molecular em 13 comunidades distribuídas por 5 países (Brasil, Costa Rica, Cuba, México e Panamá). Foi constatada ampla predominância do genótipo G6PD A-²⁰², seguido do G6PD A-⁹⁶⁸, G6PD Mediterrâneo, Santamaria, Seagle, Belém e Chatham. No Brasil, a variante G6PD A-²⁰² predominava, estando presente em cerca de 80% dos indivíduos portadores da deficiência (Figura 3).

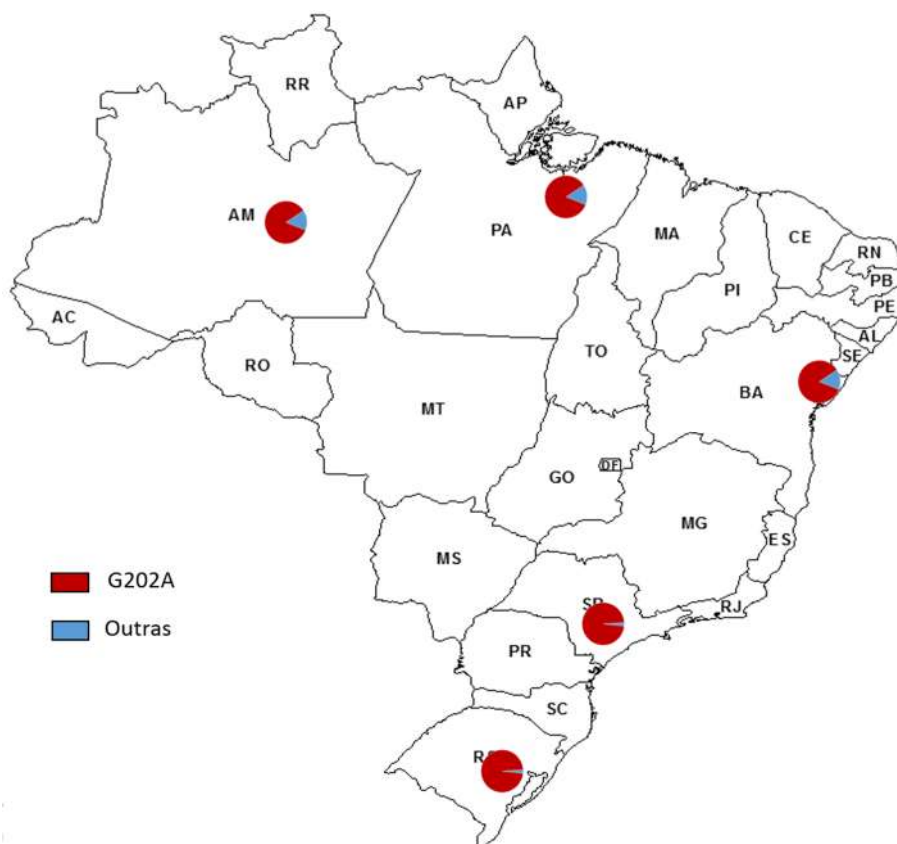


Figura 3 - Distribuição das variantes deficientes da G6PD na América Latina. Fonte: Monteiro *et al.*, 2014.

1.4 Genotipagem de SNPs

As alterações de nucleotídeos do tipo *SNP* podem ser por transição (purina > purina ou pirimidina > pirimidina) ou transversão (purina > pirimidina e vice versa) (Vignat *et al.*, 2002). A alteração é considerada um polimorfismo quando a frequência populacional do alelo menos frequente é de, no mínimo, 1%; caso seja inferior, a alteração é considerada como uma mutação rara. Alterações do tipo SNP representam cerca de 90% da variedade genética na espécie humana (Twyman, 2004) e no âmbito da deficiência de G6PD, são

responsáveis por cerca de 85% das variantes descritas (Minucci *et al.*, 2012), entre as quais encontra-se a variante deficiente G6PD Africana, frequentemente encontrada no Brasil.

As técnicas de genotipagem de *SNPs* consistem em basicamente duas etapas, a primeira sendo a discriminação alélica através da geração de produtos alelo específicos, sendo mais comumente empregadas as técnicas por hibridização, extensão de oligonucleotídeo, reação de ligação e clivagem enzimática. A segunda etapa envolvendo os mecanismos de detecção dos produtos alelo específicos gerados, entre os quais estão a detecção por fluorescência, fluorescência ressonante por transferência de energia e polarização fluorescente.

1.4.1 Discriminação alélica

Hibridização

A hibridização utiliza-se da estabilidade térmica do DNA dupla fita para distinguir uma sonda perfeitamente pareada ao seu DNA alvo de uma sonda imperfeitamente pareada. São sintetizadas duas sondas alelo específicas, cada qual ligando-se perfeitamente em seu alelo correspondente. As condições de hibridização devem ser estritas o suficiente de modo a permitir a hibridização correta entre sonda e *template* e ao mesmo tempo impedir a hibridização inespecífica.

A técnica é amplamente utilizada por ser relativamente simples e dispensar reações enzimáticas, no entanto isso torna a reação demorada, sendo necessários períodos de incubação de 16 a 24 horas (Kim e Misra, 2007). A manutenção constante da temperatura de hibridização e o desenho das sondas alelo específicas são etapas essenciais no ensaio de hibridização (Kwok, 2001), além disso outros parâmetros como a sequência do DNA que flanqueiam o SNP e a estrutura secundária da sequência alvo também podem interferir na eficiência da reação (Syvänen, 2001).

Extensão de oligonucleotídeo

O processo por extensão de oligonucleotídeo se baseia na capacidade da enzima DNA Polimerase de incorporar dNTPs complementares à sequência alvo, tendo um oligo anelado

ao DNA como sequência iniciadora da polimerização. A discriminação por extensão pode seguir a abordagem por mini sequenciamento ou alelo específica (Kwok, 2001; Vignal *et al.* 2002; Kim e Misra, 2007; Twyman, 2009). No mini sequenciamento, o oligonucleotídeo se anela imediatamente antes do SNP, de forma que a identificação do primeiro nucleotídeo incorporada ao oligo permite a genotipagem do SNP em questão.

A abordagem alelo específica se baseia na capacidade da enzima DNA Polimerase de amplificar uma sequência alvo a partir de um oligonucleotídeo alelo específico perfeitamente complementar ao DNA *template* (Kwok, 2001; Twyman, 2009). O *mismatch* resultante entre um oligo alelo específico com um alvo inespecífico causa instabilidade no sistema de amplificação suficiente para inibir a extensão pela polimerase. Dessa forma, a amplificação ocorre apenas na presença do oligonucleotídeo alelo específico com seu alvo correspondente (Kim e Misra, 2007; Twyman, 2009).

Reação de Ligação

A reação de ligação pela enzima DNA Ligase ocorre através da formação da ligação fosfodiéster entre dois fragmentos de DNA adjacentes. A ligação enzimática somente ocorrerá se ambos os fragmentos estiverem perfeitamente anelados ao DNA *template*. Para a técnica são sintetizados um oligonucleotídeo, comum aos dois alelos, e um segundo alelo específicos contendo o SNP, de modo que o sítio do polimorfismo esteja localizado entre os dois oligonucleotídeos (Kwok, 2001). Caso ocorra anelamento perfeito entre o oligo alelo específico e o oligo comum com o DNA alvo, a enzima DNA Ligase é capaz de unir esses dois fragmentos de DNA, enquanto um anelamento inespecífico inibe a ação da enzima. Através da detecção do tamanho dos produtos de ligação é possível determinar o genótipo de uma amostra.

Clivagem Enzimática

A técnica de RFLP utiliza-se de enzimas capazes de clivar DNA ao reconhecerem sítios com uma sequência de DNA altamente específica, denominada sítio de restrição. É necessário que o SNP esteja contido em um sítio de restrição de modo que um dos alelos permita o reconhecimento enzimático enquanto o segundo alelo acabe por destruir o sítio de

restrição (Kim e Mirsa, 2007). A discriminação alélica pode ser determinada através da identificação dos produtos de restrição.

1.4.2 Detecção alélica

Detecção por Fluorescência

É uma técnica simples e de fácil implementação, podendo ser incorporada por meio de intercalantes que se ligam a DNA dupla fita. Brometo de etídio e GelRed® são comumente utilizados para identificação de produtos de restrição e amplificação por sondas alelo específicas.

A incorporação também pode ser alcançada por meio de ddNTPs, sondas de hibridização ou oligonucleotídeos marcados com fluorescência. (Vignal, *et al.*, 2002). A genotipagem por mini sequenciamento utiliza desse tipo de detecção para identificar os ddNTPs incorporados ao oligo iniciador.

Fluorescência por transferência de energia ressonante (FRET)

O evento de transferência de energia ressonante ocorre quando 2 fluoróforos fisicamente próximos na sonda, um doador e um receptor, apresentam seus espectros tal que o espectro de emissão do doador se sobrepõe ao espectro de excitação do receptor.

Quando o fluoróforo doador é excitado, a energia proveniente dessa excitação é transferida através de interação dipolo-dipolo ao receptor, excitando-o. Ao ser excitado, o doador emite fluorescência em seu comprimento de onda específico (Vignal *et al.*, 2002; Kim e Mirsa, 2007). De modo geral, qualquer reação de genotipagem que venha a separar ou aproximar o fluoróforo doador do receptor de modo a destrói ou promove a FRET. Os kits comerciais TaqMan® são ensaios de genotipagem que utilizam a atividade exonuclease 5' da enzima polimerase para distinção alélica e a FRET como estratégia de identificação genotípica.

O ensaio Taqman®, além das sondas que flanqueiam a região do SNP de interesse, é constituído por um segundo par de sondas, as sondas Taqman®, cada qual designada para

um alelo específico. Ancoram-se às sondas Taqman® um fluoróforo reportador e um “quencher” com propriedade de capturar sinais de fluorescência, promovendo a FRET e inibindo a emissão de fluorescência do reportador. Quando a sonda Taqman® se hibridiza ao seu alvo alelo específico, a atividade exonuclease 5’ da polimerase cliva a sonda de modo a cessar a FRET, permitindo a emissão da fluorescência do indicador.

Polarização Fluorescente

Quando uma molécula fluorescente é excitada por uma luz plano polarizada, ela pode emitir uma fluorescência polarizada em diferentes graus, detectada por um analisador de polarização fluorescente. O grau de polarização da emissão está relacionado à velocidade de rotação da molécula na solução, que por sua vez, é inversamente proporcional à sua massa molecular Kwok, 2001; Twyman, 2009). Moléculas de baixa massa molecular rotacionam mais rapidamente e em diferentes planos, promovendo maior despolarização da luz, enquanto moléculas de maior massa molecular tendem a rotacionar mais lentamente e em um plano fixo, de modo a permitir a reflexão polarizada. Diferentemente das outras técnicas de detecção por fluorescência, a fluorescência polarizada se baseia na relação entre os ângulos de polarização da fluorescência, independentemente da intensidade da fluorescência, desde que esteja acima do limite de detecção do instrumento.

A técnica pode ser utilizada para detectar produtos de diferentes massas moleculares, variando de nucleotídeos livres até oligonucleotídeos de 60 bases (Kwok, 2002), como os produzidos pelas estratégias de extensão de oligonucleotídeo, clivagem enzimática e ligação enzimática (Chen *et al.*, 1998; Mein *et al.*, 2000; Kwok, 2001).

1.4.3 Sequenciamento Direto

O sequenciamento direto do gene, também conhecido como método de Sanger ou método de terminação de cadeia (Sanger *et al.*, 1977), ainda vem sendo utilizada como padrão ouro na identificação de mutações pontuais na sequência do DNA. A reação se utiliza dos desoxinucleotídeos (dNTPs) e de didesoxinucleotídeos (ddNTPs) que diferem daqueles pela ausência do grupamento hidroxila no carbono 3’ da pentose, impossibilitando a continuidade da polimerização da cadeia, além da presença de uma fluorescência específica para cada

didesoxinucleotídeo. A razão dNTP/ddNTP na reação de sequenciamento é tal que gera fragmentos de diversos tamanhos que se diferenciam em um nucleotídeo. Os diferentes fragmentos são separados por eletroforese, seja por eletroforese em gel de poliacrilamida ou eletroforese capilar, e à medida que os fragmentos vão migrando ao longo da matriz, o sequenciador realiza a identificação de cada fluorescência correspondente ao ddNTP incorporado ao fragmento (Sanger *et al.*, 1977, Shendure e Ji, 2008) (Figura 4)

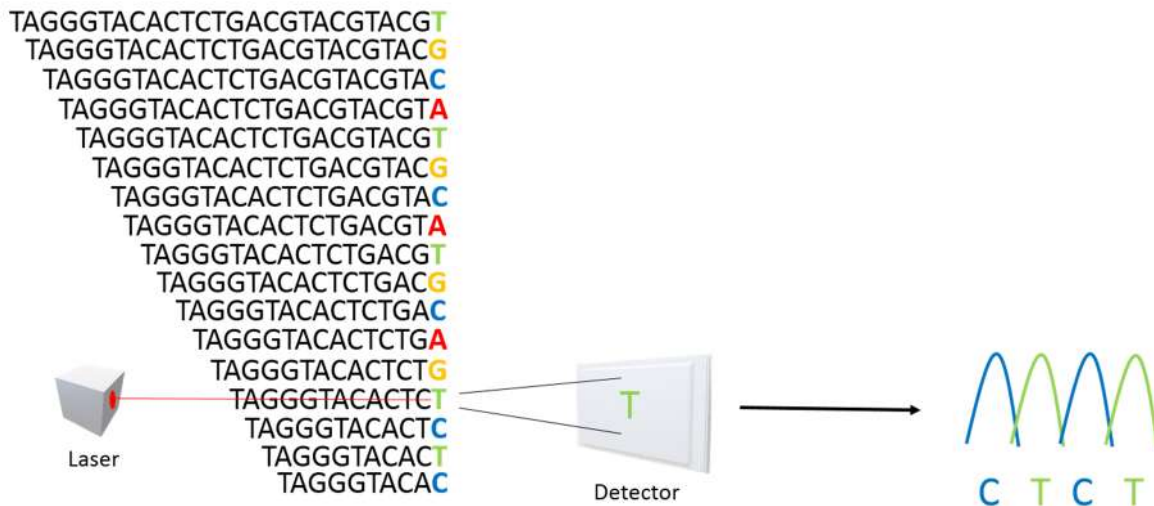


Figura 4: Sequenciamento Sanger. Após a reação de sequenciamento os fragmentos são separados de acordo com a massa molecular por eletroforese capilar, a fluorescência dos ddNTPs incorporados são identificados e traduzidos na sequência do DNA alvo.

1.4.4 PASA-PCR e ARMS

As técnicas de PASA-PCR (Polymerase Amplification of Specific Alleles) (Sommer *et al.*, 1989) e ARMS (Amplification Refractory Mutation System) (Newton *et al.*, 1989), utilizadas na genotipagem de marcadores moleculares do tipo SNPs, são métodos baseados na extensão de oligonucleotídeos alelo específicos com detecção por intercalante fluorescente. Os oligos alelo específicos se hibridizam especificamente a um determinado alelo. O *mismatch* entre o oligonucleotídeo com o alelo não específico torna a amplificação pela DNA polimerase refratária, ou seja, ineficiente. O design dos oligonucleotídeo alelo específicos de Newton (1989) apenas se diferenciava do proposto por Sommer e colaboradores (1989) pela presença do nucleotídeo alelo específico na posição 3' terminal, além de um segundo *mismatch* na penúltima posição da porção 3' terminal. Os autores

constatarem que a presença do *mismatch* adicional conferia maior especificidade à reação de amplificação. A tabela 2 elenca as principais características das reações de PCR-PASA e ARMS.

Tabela 2: Comparação entre TETRA-ARMS e Bi-PASA.

	TETRA-ARMS	Bi-PASA
Posição <i>mismatch</i> alelo específico	3' terminal	3' terminal
<i>Mismatch</i> adicional	presente	ausente
Cauda	ausente	facultativo
Razão entre oligo interno/externo	10:1	1:1

Tanto a técnica de PASA quanto a ARMS necessitavam de 2 reações de amplificação independentes, uma para a amplificação do alelo selvagem e uma para o alelo mutado, cada qual utilizando seu respectivo oligonucleotídeo alelo específico. Lo e colaboradores (1991) propuseram uma adaptação da abordagem proposta por Newton em que a reação de amplificação para ambos os alelos ocorria em uma única reação. A estratégia “*double-ARMS*”, ou TETRA-ARMS como viria a ser conhecida mais tarde, era constituída por uma PCR em que os oligos alelo específicos para os alelos selvagem e mutado, um no sentido *sense* e outro no sentido *antisense*, encontravam-se presentes na mesma reação (Figura 5).

Liu e colaboradores (1997b) propuseram uma abordagem baseada em PASA análoga ao TETRA-ARMS, com a amplificação bidirecional de alelos específicos (Bi-PASA), diferenciando do TETRA-ARMS em 2 quesitos: a) a presença de uma cauda rica em CG na porção 5' dos oligonucleotídeos alelo específicos, em detrimento do *mismatch* adicional da TETRA-ARMS; e b) a proporção entre os oligos alelo específicos/oligos externos do sistema refratário pode ser até 35 vezes mais concentrada, enquanto a Bi-PASA utilizava quantidades equimolares.

A primeira abordagem de identificação molecular de variante de G6PD baseada na amplificação de alelos específicos foi proposta por Liu e colaboradores (1997a). Através dos ensaios de PASA, os pesquisadores puderam determinar a frequência populacional da variante C1311T da deficiência G6PD em diferentes etnias. Outros autores também aplicaram a metodologia para identificar a variante africana A- (G202A e A376G) (Liese, Siddiqi e Spolarics, 2000; Haloui *et al.*, 2016; Laouini *et al.*, 2017), corroborando com os resultados das análises por RFLP.

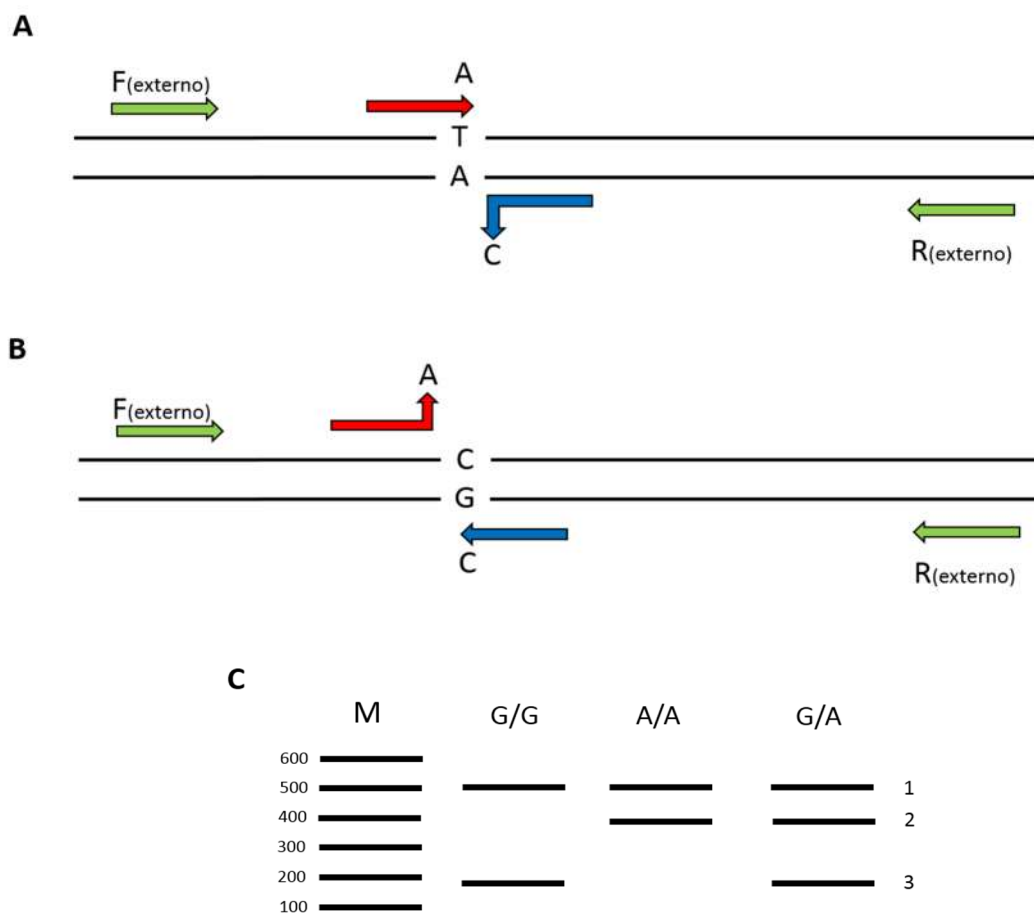


Figura 6 - Representação da reação TETRA-ARMS PCR para identificação da variante deficiente G202A. A reação é constituída por um oligonucleotídeo sense externo, denominado F(externo), oligo antisense externo, R (externo), e pelos oligos internos alelo específicos A, para o alelo mutado, e C, para o alelo selvagem. **A)** Na presença de uma amostra mutada, o oligonucleotídeo interno alelo específico A se anela ao DNA, enquanto o oligo alelo específico C torna-se refratário. **B)** Na presença de uma amostra selvagem ocorre o anelamento do alelo específico C em detrimento do oligonucleotídeo interno A. **C)** Representação dos produtos de PCR formados para amostras selvagem, mutada e heterozigota. **1:** produto dos oligos externos, **2:** produto alelo específico mutado, **3:** produto selvagem.

Du e colaboradores (1999) sintetizaram oligonucleotídeos para ensaios de PASA na tentativa de genotipar as mutações G1388A e G1376T, comumente presentes na população chinesa, no entanto, observaram que esses oligos não eram específicos o suficiente para discriminar os alelos. Somente com a abordagem baseada em ARMS os pesquisadores conseguiram genotipar as variantes. Os pesquisadores concluíram que alguns *mismatches* entre oligos/*template*, como C/T, A/A e T/T, eram mais refratários que outros, conforme observado anteriormente (Newton, 1989). A intensidade de cada tipo de *mismatch* é apresentada na tabela 3. Os ensaios de ARMS também se mostraram efetivos na genotipagem das variantes Mediterrânea C563T (Maffi *et al.*, 2002; El-Gezeiry *et al.*, 2005; Armaout *et al.*, 2010; Osman *et al.*, 2014).

Tabela 3: Força refratária de *mismatch* entre oligos e *template*. Fonte: Little 1995.

Força refratária	<i>Mismatch</i>
Máxima	GA, CT, TT
Forte	CC
Média	AA, GG
Fraca	CA, GT
Nenhuma	AT, GC

2. JUSTIFICATIVA

As metodologias empregadas no diagnóstico da deficiência de G6PD se baseiam na inferência da atividade enzimática, seja por meios quantitativos ou qualitativos. Apesar dos parâmetros de atividade enzimática serem estabelecidos pela OMS, alguns autores defendem a utilização de outros valores de referência (Kilicdag *et al.*, 2013; Miao *et al.*, 2013). Além disso, alguns aspectos clínicos também podem interferir na atividade enzimática, por exemplo, um elevado número de reticulócitos na corrente sanguínea, que pode induzir resultado falso negativo, uma vez que esse tipo de célula possui atividade enzimática mais elevada em relação aos eritrócitos maduros.

Além desses fatores intrínsecos à técnica, as condições de armazenamento e transporte das amostras também interferem nos resultados, pois a exposição a longos períodos de condições inadequadas de armazenamento promove degradação da enzima presente na amostra (Minucci *et al.*, 2009), induzindo redução da atividade enzimática e, conseqüentemente, podendo levar a resultado falso positivo.

Os métodos moleculares para genotipagem eliminam os vieses da abordagem bioquímica, permitindo um diagnóstico mais preciso da deficiência. No entanto as metodologias disponíveis são de custos elevados e demandam estrutura laboratorial especializada, dificultando a implementação desse tipo de diagnóstico. Técnicas alternativas vêm sendo estudadas visando a diminuição desses custos e a facilitação da implementação do diagnóstico molecular da deficiência de G6PD. No presente trabalho, a abordagem por TETRA-ARMS é apresentada como alternativa ao sequenciamento Sanger para identificar a variante deficiente c.202G>A.

3. OBJETIVOS

Objetivos

- 1) Desenvolver uma metodologia de genotipagem para a variante G202A baseada em PCR alelo específica;
- 2) Comparar o método proposto com a metodologia de sequenciamento Sanger, utilizada para a identificação da variante em questão, avaliando o custo-benefício.

4. METODOLOGIA

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), número do parecer 2105909, CAAE número 67052317.6.0000.5411.

Foram analisadas 107 amostras de sangue periférico colhidas em papel filtro de pacientes atendidos pelo setor de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP, de faixa etária entre 0 e 11 anos de idade, após consentimento dos responsáveis. A amostragem foi constituída por 27 indivíduos com suspeita da deficiência de G6PD, recebendo a designação GD, e 80 indivíduos sem qualquer suspeita, designados GE. Gotas de sangue foram pingadas em um cartão de coleta contendo papel filtro absorvente. Após a secagem do material, os cartões foram armazenados até o momento da extração.

4.1 Extração de DNA e amplificação do éxon 4

A extração de DNA foi realizada através do protocolo de extração alcalina adaptado de Klintschar e Neuhuber (1999). Para cada amostra, um pedaço de 3 mm² do papel filtro foi cortado e incubado com 10 µL NaOH (0,1M) a 75° C por 15 minutos. Após incubação, foram adicionados 90 µL de Tris-Hcl (0,02M, pH 8,0).

Os oligonucleotídeos utilizados na amplificação do éxon 4, onde encontra-se a variante G202A, foram desenhados com auxílio da ferramenta “Primer3plus” (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), disponível em 30/10/2016) (Untergasser *et al.*, 2012). As sequências dos oligos encontram-se na tabela 4:

Tabela 4: Oligonucleotídeos para amplificação da região do éxon 4 do gene G6PD.

Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'	SNP	T melt
G6PD_3+4F	AGTGCCCGATCACCAAGGG	G202A	60° C
G6PD_3+4R	TGATTGGCGGAGAAAACG		

Foi utilizado kit GoTaq®DNA Polymerase (PROMEGA) nas seguintes condições: 1X tampão de reação GoTaq®DNA Polymerase (200 µM dNTPs, 1,5mM MgCl₂, pH 8,5), 0,15 µM de cada par de oligonucleotídeo, 5 µL de extrato do DNA, em volume final de 20 µL de reação. O ciclo de PCR foi constituído por uma desnaturação inicial de 95° C por 3 minutos seguida por 30 ciclos de 95° C por 30 segundos, 59° C por 30 segundos e extensão de 72°C por 30 segundos, seguida por extensão final de 72° C por 5 minutos, realizada em equipamento VERITI (Applied Biosystems). O *amplicon* de 571 pb gerado na PCR pode ser visualizado em gel de agarose 1,5 %.

4.2 Purificação da PCR

Após a confirmação da PCR, os *amplicons* foram purificados utilizando beads magnéticas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Life Sciences), segundo instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 e em seguida suas concentrações foram normalizadas a 20 ng/µL.

4.3 Sequenciamento Sanger

Os amplicons foram sequenciados pela metodologia de Sanger em sequenciador capilar automático ABI3500 (Applied Biosystems). Foi utilizado o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) com as seguintes adaptações de protocolo: 1,5 uL de BigDye™ Terminator v3.1 Buffer (5X), 2,5 pmol do oligo G6PD 4R, 15ng do *amplicon* purificado em 10 µL de volume de reação. A purificação da reação de sequenciamento foi realizada utilizando etanol e EDTA, conforme recomendações do fabricante. Os eletroferogramas foram analisados no programa Genious (Kearse *et al.*, 2012) e alinhados com a sequência de referência do gene G6PD (NG_009015.2) depositada no banco de dados do NCBI.

4.4 Padronização da reação de PCR alelo específica

Foi utilizada a ferramenta online “primer1” (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>, disponível em 12/06/2017) (Ye *et al.*, 2001) para o desenho dos oligonucleotídeos TETRA-ARMS, sendo os oligos internos alelo específicos designados 202A_F2 e 202G_R2 e os

externos, G6PD4_F2 e G6PD4_R2 (Figura 4). Baseado em desenhos gerados pelo “primer1”, foram sintetizados outros oligonucleotídeos alelo específicos pelo nosso laboratório: 202A_F2.2 e 202G_R2.2. Q202A_F4, Q202G_F4 e Q202_4R foram inicialmente sintetizados para a reação de ARMS. A sequência encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 – Oligonucleotídeos utilizados para PCR alelo específicos. Nucleotídeos sublinhados correspondem a *mismatch* com o DNA *template*. As designações 202A e 202G no nome dos oligos internos são referentes aos alelos mutado e selvagem, respectivamente. G6PD_4F2 e G6PD_4R2 correspondem aos oligonucleotídeos externos.

Oligonucleotídeos	Sequência 5'-3'	T melt
202A_F2	CCCGAAAACACCTTCAG <u>CA</u>	55,7 °C
202G_R2	GGAACGGGCATAGCC <u>AA</u> C	56,6 °C
G6PD_4F2	GTGTGTCCCACCACTGCC	59,7 °C
G6PD_4R2	GCAGGAGAGGAGGAGAGCAT	58,6 °C
202A_F2.2	CCGAAAACACCTTGAT <u>CA</u>	49,9 °C
202G_R2.2	GAACG <u>AG</u> CATAGCC <u>CA</u> C	53,2 °C

Antes de iniciar a padronização da PCR alelo específica, foram realizados testes para determinar a concentração adequada de DNA *template* a ser utilizada na PCR. Como *template* foi utilizada a reação de PCR para o sequenciamento de Sanger, purificada e normalizada a 20ng/μL (item 3.2). A amostra GD017 homozigota para o alelo mutado foi utilizada em uma série de ampliações com os oligos 202A_F2 e G6PD_4R2, gerando um fragmento de 200 pb para o alelo mutado, e 202G_R2 com G6PD_3+4F, gerando *amplicon* de 282 pb para o alelo selvagem, com diluições do DNA *template* variando de cem até um milhão.

O teste de TETRA-ARMS PCR inicial consistia em um gradiente de temperatura de anelamento, variando de 64°C até 54°C. Foram utilizados 1X tampão de reação GoTaq®DNA Polymerase (200 μM dNTPs, 1,5mM MgCl₂, pH 8,5), concentração equimolar de 100 nM dos oligonucleotídeos 202A_F2, 202G_R2, G6PD_4F2 e G6PD_4R2 e 1 μL de DNA *template* descrito no item 3.2. O ciclo de PCR foi realizado no equipamento VERITI (Applied Biosystems) com a seguinte ciclagem: ciclo de 95° C por 3 minutos seguido por 30 ciclos de 95° C por 30 segundos, ciclos de temperatura de anelamento variando de 64°C a

54°C por 30 segundos e extensão de 72°C por 30 segundos, seguida por uma extensão final de 72° C por 5 minutos.

Após os ensaios para determinar a temperatura de anelamento a ser utilizada no ciclo de PCR alelo específica, foi testado o efeito do aumento da concentração dos oligonucleotídeos internos em relação aos externos da reação, atingindo concentrações até 10 vezes maiores. As recomendações dos testes de gradiente de anelamento e do aumento das concentrações dos oligos internos foram sugeridas por Medrano e Oliveira (2014) em seu guia para padronização de reação TETRA-ARMS.

Os oligonucleotídeos desenhados com o programa “*primer1*” somente possibilitaram o desenvolvimento da PCR ARMS, sendo necessário uma reação de amplificação independente para cada alelo da variante testada. A reação era constituída por 1 µL de DNA *template* descrito no item 3.2, 1X tampão de reação GoTaq®DNA Polymerase (200 µM dNTPs, 1,5mM MgCl₂, pH 8,5), 300 nM do oligo alelo específico 202A_F2.2, 300 nM do G6PD_4R2 e 30 nM do G6PD_4F2 para o alelo A. São esperadas bandas de 318 pb para o *amplicon* externo e 200 pb referente ao alelo mutado. Para o alelo G foi utilizado 1X tampão de reação GoTaq®DNA Polymerase (200 µM dNTPs, 1,5mM MgCl₂, pH 8,5), 300 nM do oligo alelo específico 202G_R2, 300 nM do G6PD_3+4F e 30 µM do G6PD_4R2. São esperadas bandas de 446 pb para o *amplicon* controle e 283 pb referente ao alelo selvagem.

O ciclo de PCR *touchdown* utilizado para ambas as reações alelo específicas era constituído por ciclo de 95° C por 3 minutos seguido por 10 ciclos de 95° C por 30 segundos, 65° C com redução de 0,5°C a cada ciclo por 30 segundos e extensão de 72° C por 30 segundos, seguida por 28 ciclos de 95° C por 30 segundos, 60° C por 30 segundos, extensão de 72° C por 30 segundos e uma extensão final de 72° C por 5 minutos.

4.5 Reação TETRA-ARMS

A reação de TETRA-ARMS foi realizada com os reagentes GoTaq®DNA Polymerase (PROMEGA) nas seguintes condições: 1X tampão de reação GoTaq®DNA Polymerase (200 µM dNTPs, 1,5mM MgCl₂, pH 8,5), 200 nM dos oligonucleotídeos alelo específicos Q202A_F4 e 202G_R2.2, 75 nM dos oligos externos G6PD_4F2 e Q202_R4, e

1 µL de DNA *template* descrito no item 3.2. Para a ciclagem de PCR foi utilizado um ciclo *touchdown* com denaturação inicial de 95°C por 3 minutos, 9 ciclos *touchdown* de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos com decréscimo de 0,5°C a cada ciclo, extensão de 72°C por 30 segundos, seguida por 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Os resultados da amplificação foram visualizados em gel de agarose 3%. São esperados *amplicon* controle de 403 pb referente aos oligos externos, 289 pb para o alelo mutado A e 153 pb para o alelo selvagem G.

4.6 Comparação de custos

Os custos para a realização da genotipagem da variante G202A pelas técnicas de TETRA-ARMS e sequenciamento de Sanger foram baseados nos valores praticados no período da elaboração desse trabalho. Para a elaboração dos custos de cada metodologia foi realizado o levantamento de custos dos insumos utilizados, como reagentes, kits, ponteiras e microtubos, e da implementação dos equipamentos necessários para a realização de cada técnica. A lista dos equipamentos e insumos necessários encontram-se nas tabelas 7 e 8, respectivamente.

Os equipamentos e reagentes não foram, necessariamente, os mesmos utilizados durante a elaboração do presente trabalho, porém suas funcionalidades e configurações atenderam as necessidades para a realização dessas técnicas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração de DNA e Amplificação

Após a realização da coleta, as amostras passaram pela etapa de extração de DNA alcalina segundo protocolo descrito no item 3.1. A região do éxon 4 do gene G6PD foi amplificada pela técnica de PCR e os *amplicons* foram visualizados em gel de agarose 1,5%. A amplificação foi bem-sucedida para a maioria das amostras e, naqueles casos em que não houve amplificação, foi realizada uma nova reação de amplificação com aumento no volume

de extrato de DNA na reação. Nos casos de repetições os volumes variaram de 6 a 10 μL . Os resultados da PCR podem ser visualizados na figura 5.

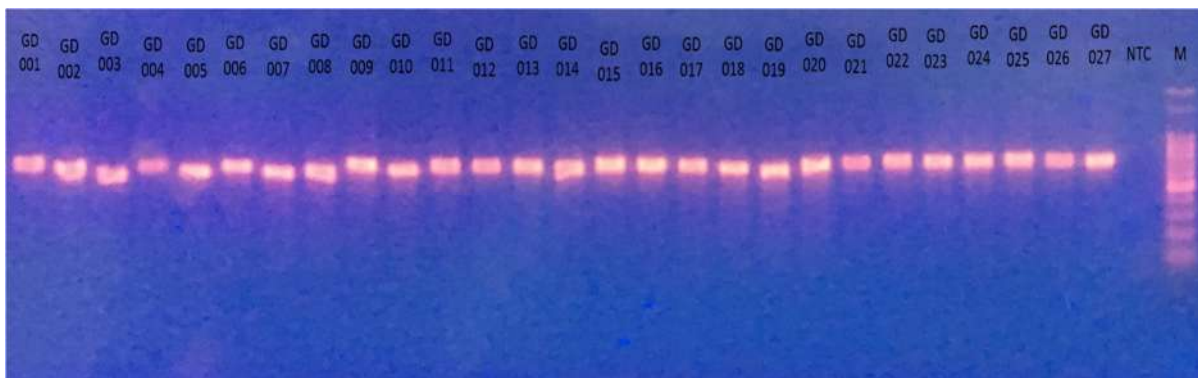


Figura 7: PCR do éxon 4 do gene G6PD. Produto esperado de 571 pb amplificado para as amostras GD001 a GD027. NTC: Controle negativo. M: Marcador de peso molecular.

5.2 Purificação e Normalização

Após a purificação descrita no item 3.2, os *amplicons* foram quantificados no espectrofotômetro NanoDrop 1000 e em seguida as concentrações das amostras foram normalizadas para 20 ng/ μL para as etapas seguintes de sequenciamento e para padronização da PCR alelo específica.

5.3 Sequenciamento de Sanger

Inicialmente foi realizado o sequenciamento direto das 2 amostras. GD017 e GD018 já haviam sido diagnosticadas previamente como mutada e selvagem para a variante africana, respectivamente. (Figura 8). O programa *Genious* permitiu indicar a posição na sequência referência do gene G6PD onde encontra-se a variante africana, para facilitar a localização do SNP. O sequenciamento confirmou o diagnóstico prévio das amostras controle. As demais 105 amostras foram sequenciadas após a padronização da reação PCR alelo específica. Os eletroferogramas encontram-se no Anexo A.

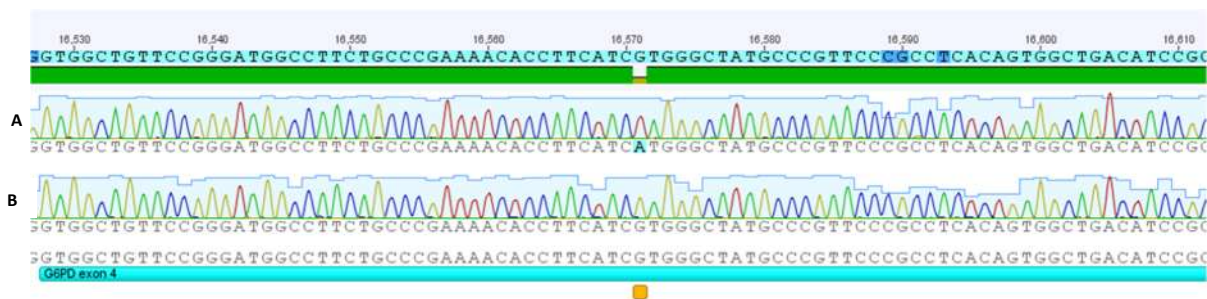


Figura 8: Sequenciamento do éxon 4 do gene G6PD. Os eletroferogramas das amostras foram alinhados com a sequência referência NG 009015 depositada no NCBI. O quadrado laranja indica a posição onde a variante G202A é encontrada. **A:** eletroferograma da amostra GD017. **B:** eletroferograma da amostra GD018.

5.4 Padronização da PCR alelo específica

Os testes de concentração do DNA *template* permitiram estabelecer a concentração ideal de material a ser utilizado nas reações de amplificação. É possível observar que a amostra GD017, homocigota para o alelo mutado A, apresentou amplificação detectável em diluições de até cem mil vezes para a reação específica para o alelo selvagem (Figura 7A). Já os resultados da reação de amplificação que utilizava oligonucleotídeos específicos para o alelo selvagem G (Figura 7B) apresentaram falso positivo para a amostra nas diluições de cem e mil vezes, evidenciado pela presença da banda de 319 pb correspondente ao alelo selvagem.

Esses resultados revelaram que, nas reações de PCR alelo específicas, concentrações elevadas de *template* podem resultar em amplificações inespecíficas, induzindo a identificação incorreta da variante. Sendo assim, a diluição de cem mil vezes foi adotada como ideal, de modo a permitir a visualização da amplificação do alelo específico no gel de agarose e ao mesmo tempo inibir a amplificação inespecífica.

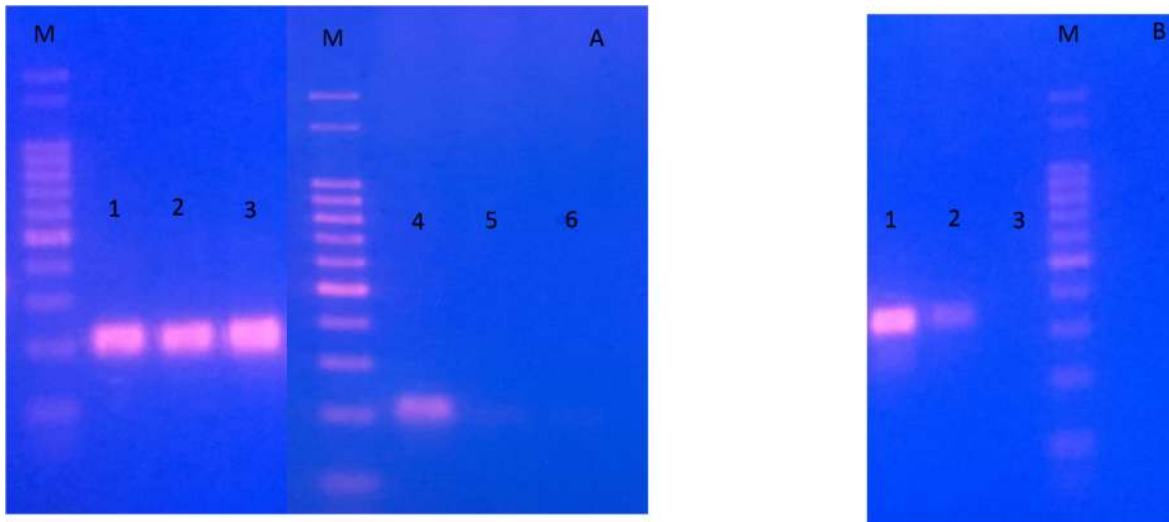


Figura 9: Padronização da concentração de DNA *template* para reação de PCR alelo específica. Foi utilizada a amostra GD017, homocigota para o alelo A para todos os testes. **A:** PCR alelo específica para o alelo A utilizando os oligonucleotídeos 202A_F2 e G6PD_4R2. Linhas 1 a 6 representam diluições seriadas do DNA *template*, de cem vezes até dez milhões. **B:** PCR alelo específica para o alelo G utilizando os oligos 202G_R2 e G6PD_4F. Linhas 1 a 3 indicam diluições seriadas de cem a dez mil vezes. M: marcador de peso molecular 100 pb.

Os *oligonucleotídeos* para a reação de TETRA-ARMS foram desenhados com o programa “*primer1*”. Para os testes foram utilizados na reação de PCR os oligos externos G6PD_4F2 e G6PD_4R2, juntamente com os oligos internos 202A_F2 e 202G_R2. As primeiras tentativas da TETRA-ARMS PCR para a variante africana não foram bem-sucedidas. Foram testadas temperaturas de anelamento de 64°C a 54°C com concentrações equimolares dos oligos. Houve amplificação do fragmento controle, com tamanho de 318 pb, em contrapartida, não houve amplificação alelo específica, mesmo em temperatura de anelamento de 54°C (Figura 8). O aumento da concentração dos oligonucleotídeos internos na reação de PCR também não surtiram resultado esperado (Figura 9).

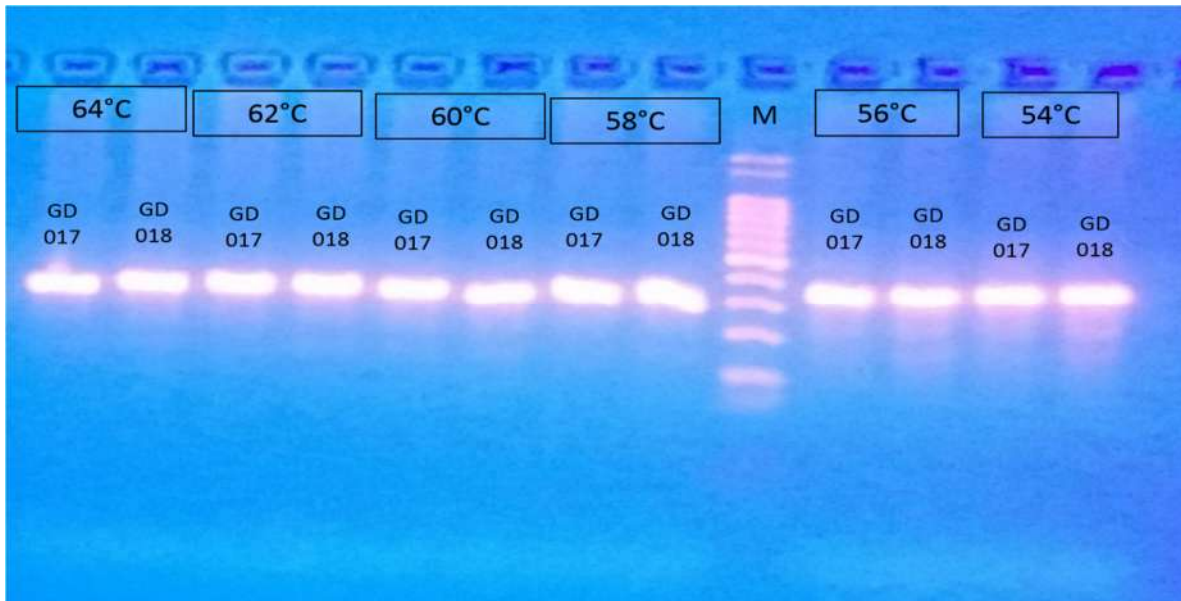


Figura 10: Gradiente de temperatura de anelamento variando de 64 a 54 °C para a reação TETRA-ARMS. Foram utilizadas as amostras GD017 e GD018 de genótipo conhecido. M: marcador de peso molecular.

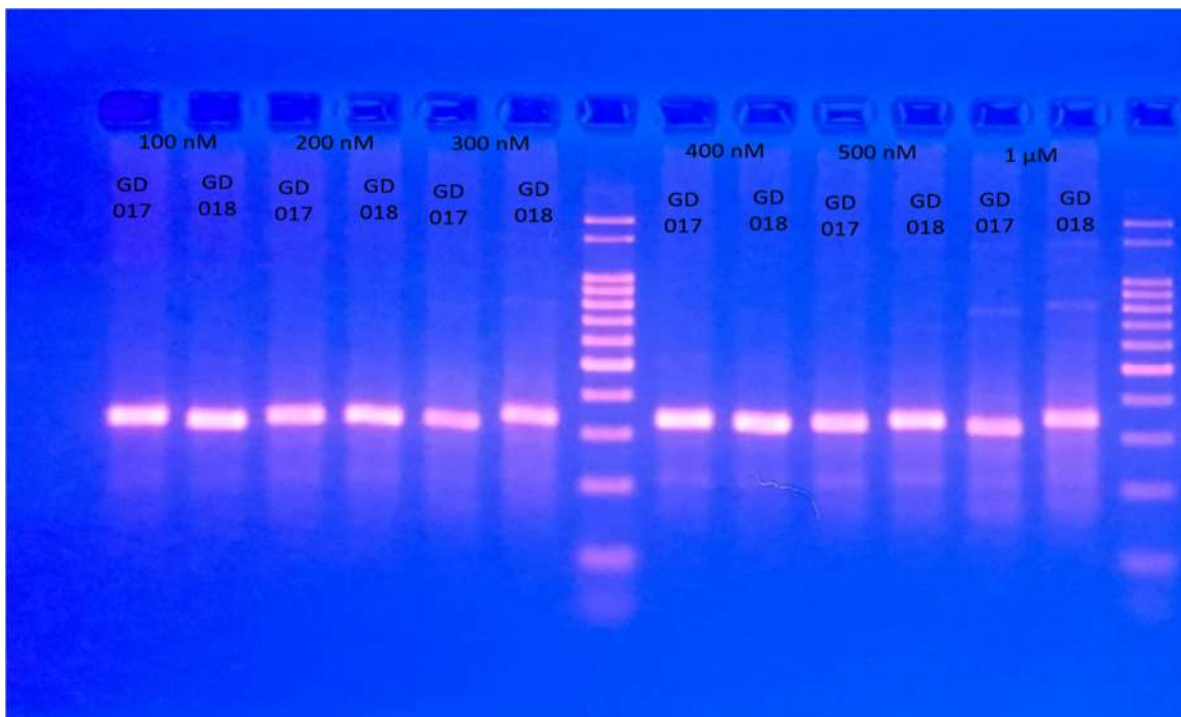


Figura 11: Aumento gradual da concentração do oligonucleotídeos internos na reação de TETRA-ARMS. Foram testadas concentrações de 0,1 a 1 μM dos oligonucleotídeos internos. M: marcador de peso molecular.

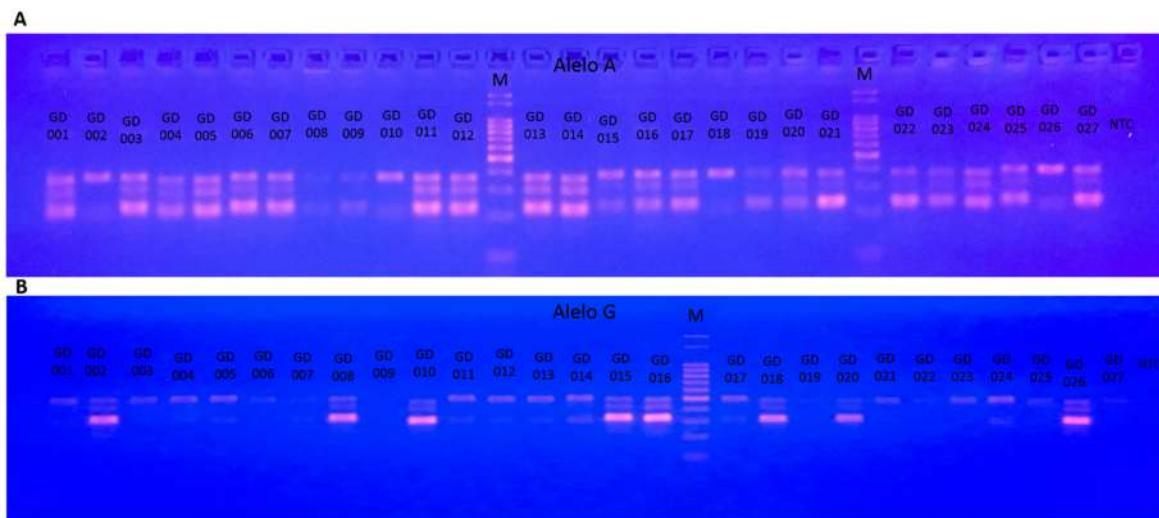


Figura 12: Reação ARMS-PCR. **A:** reação alelo específica para identificação do alelo mutado A. Amplificação da banda controle (318 pb) e da banda alelo específica para o alelo A (200 pb). **B:** reação alelo específica para identificação do alelo selvagem G. A. Amplificação da banda controle (446 pb) e da banda alelo específica para o alelo G (283 pb). M: marcador de peso molecular.

A genotipagem da variante utilizando os oligonucleotídeos sintetizados pelo programa “*primer1*” permitiram a distinção dos alelos apenas na conformação ARMS-PCR, sendo necessária a realização de uma reação para cada alelo testado (Figura 10B).

Posteriormente a esses resultados, novos oligonucleotídeos foram desenhados na tentativa de padronizar a reação de TETRA-ARMS. Os oligos internos 202A_F2.2 e 202G_R2.2 foram baseados naqueles desenhados no *primer1*, porém mais curtos, o que resultava em menor temperatura de *melt*. Foram realizados os mesmos testes de temperatura de anelamento e alteração na concentração dos oligonucleotídeos internos, mas assim como constatado anteriormente, a genotipagem só foi possível com a estratégia de ARMS-PCR. (Figura 10A).

Durante o desenvolvimento de ensaios Bi-PASA, Liu e colaboradores (1997b) constataram que a adição de uma cauda rica em GC na extremidade 5' do oligonucleotídeo promovia aumento na eficiência de amplificação, além de evitar a formação de *megapriming*, evento que ocorre quando o fragmento amplificado age como uma sequência iniciadora para um fragmento maior. Partindo dessa premissa, foram sintetizados os oligonucleotídeos Q202A_F4 e Q202G_F4, alelos específicos mutado e selvagem, respectivamente, e o oligo externo Q202_R4.

O teste inicial consistia em reação de TETRA-ARMS utilizando Q202A_F4 alelo específico para o alelo A, 202G_R2.2 ou 202G_R2 como alelos específicos para o alvo selvagem G, G6PD4_F2 e G6PD_4R2 ou Q202R4, como oligonucleotídeos externos da reação. Foi utilizada uma razão 2:1 da concentração dos oligos internos em relação aos externos e a ciclagem de PCR *touchdown* descrita no item 3.5 da secção de Metodologia.

O resultado do teste de TETRA-ARMS revelou que as duas combinações de funcionaram como esperado (Figura 12). Foi escolhida a combinação Q202A_F4, 202G_R2.2, G6PD4_F2 e Q202R4 pois esta gerou *amplicons* de maior tamanho, que facilitaram a identificação dos seus respectivos alelos.

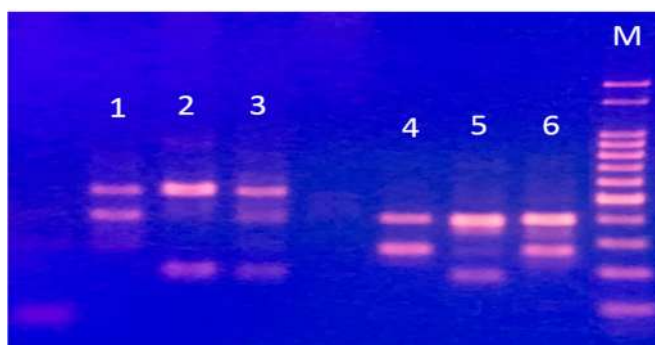


Figura 13: Reação TETRA-ARMS. Linhas 1 a 3 utilizaram a combinação Q202A_F4, 202G_R2.2, G6PD4_F2 e Q202_R4. *Amplicon* controle de 403 pb, alelo A de 289 pb e alelo G de 153 pb. Linhas 4 a 6 utilizaram a combinação Q202A_F4, 202G_R2, G6PD_4F2 e G6PD4_R2. *Amplicon* controle de 318 pb, alelo A de 200 pb e alelo G de 159 pb. Amostra GD017 (A/A) corresponde às linhas 1 e 4; GD018 (G/G) às linhas 2 e 4; e GD020 (G/A) às linhas 3 e 6. M: marcador de peso molecular.

5.5 TETRA-ARMS PCR para identificação da variante G202A

As condições ideais de TETR-ARMS PCR descritas na metodologia nos permitiram detectar a troca de um único resíduo de nucleotídeo que corresponde à variante G202A. Nos testes de padronização anteriores foi estabelecido o uso dos oligonucleotídeos internos Q202AF4, 202G_R2.2, e dos externos G6PD_4F2 e Q202_R4 para a realização da técnica de TETRA-ARMS. Os resultados da genotipagem encontram-se na figura 13.

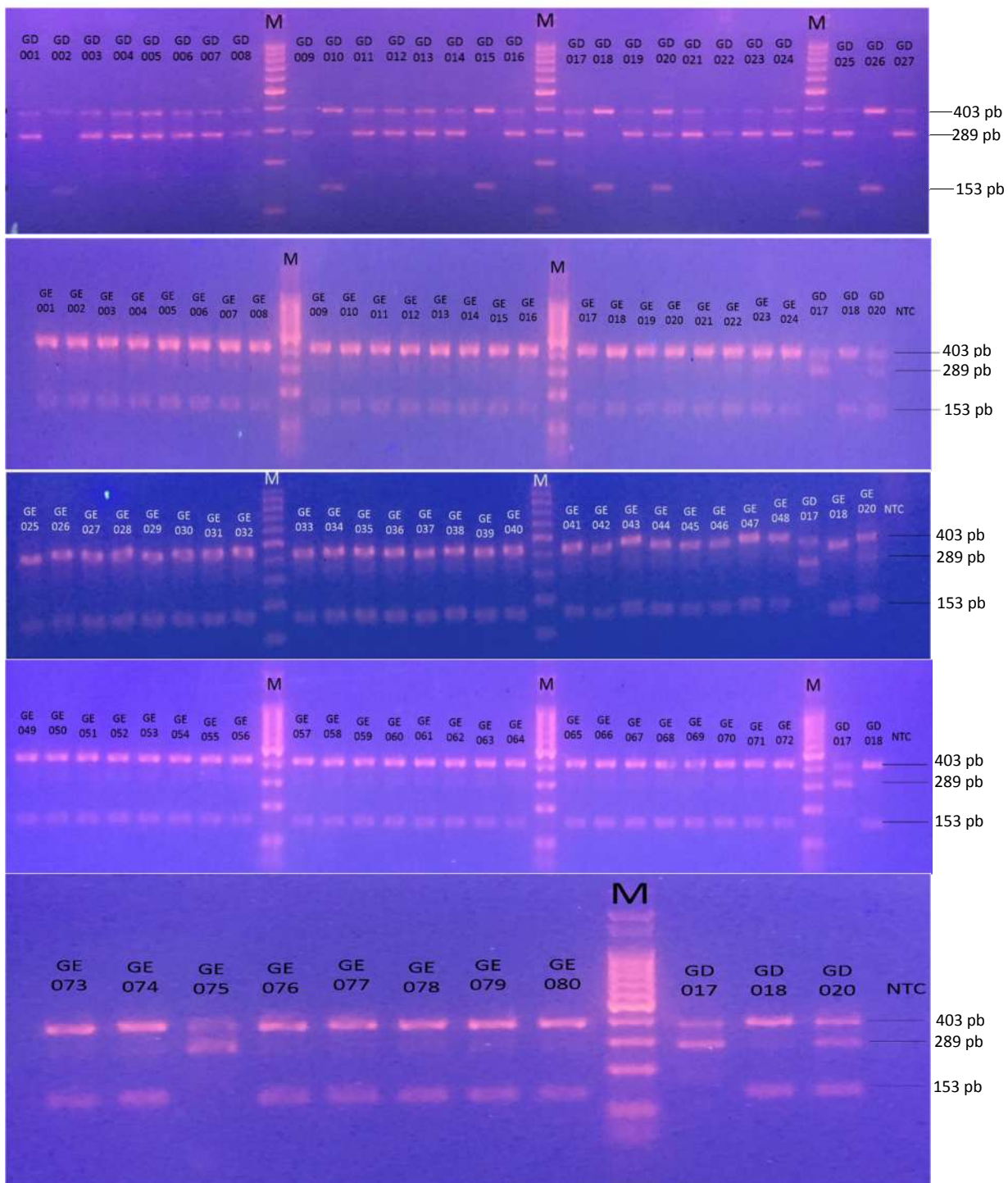


Figura 14: Reação TETRA-ARMS. É esperada amplificação da banda controle (403 pb), do alelo específico A (289 pb) e do alelo específico G (153 pb). M: marcador de peso molecular 100 pb.

Utilizando a técnica de TETRA-ARMS foi possível identificar, ao todo, 22 indivíduos hemizigotos para a variante G202A, 84 indivíduos hemizigotos para o alelo selvagem e 1 indivíduo heterozigoto. Ao concluir os ensaios de genotipagem, foi realizado o sequenciamento Sanger das amostras, conforme descrito na sessão 5.3. Os resultados de genotipagem através da metodologia TETRA-ARMS proposta foram confirmados pelo sequenciamento Sanger (Tabela 6).

Tabela 6: Genotipagem da variante c.202G>A. É possível comparar os resultados do sequenciamento Sanger com a metodologia TETRA-ARMS.

Amostra	Genótipo	
	Sanger	TETRA-ARMS
GD001	A	A
GD002	G	G
GD003	A	A
GD004	A	A
GD005	A	A
GD006	A	A
GD007	A	A
GD008	A	A
GD009	A	A
GD010	G	G
GD011	A	A
GD012	A	A
GD013	A	A
GD014	A	A
GD015	G	G
GD016	A	A
GD017	A	A
GD018	G	G
GD019	A	A
GD020	G/A	G/A
GD021	A	A
GD022	A	A
GD023	A	A
GD024	A	A
GD025	A	A
GD026	G	G
GD027	A	A

Tabela 6: (continuação)

Amostra	Genótipo		Amostra	Genótipo	
	Sanger	TETRA-ARMS		Sanger	TETRA-ARMS
GE001	G	G	GE041	G	G
GE002	G	G	GE042	G	G
GE003	G	G	GE043	G	G
GE004	G	G	GE044	G	G
GE005	G	G	GE045	G	G
GE006	G	G	GE046	G	G
GE007	G	G	GE047	G	G
GE008	G	G	GE048	G	G
GE009	G	G	GE049	G	G
GE010	G	G	GE050	G	G
GE011	G	G	GE051	G	G
GE012	G	G	GE052	G	G
GE013	G	G	GE053	G	G
GE014	G	G	GE054	G	G
GE015	G	G	GE055	G	G
GE016	G	G	GE056	G	G
GE017	G	G	GE057	G	G
GE018	G	G	GE058	G	G
GE019	G	G	GE059	G	G
GE020	G	G	GE060	G	G
GE021	G	G	GE061	G	G
GE022	G	G	GE062	G	G
GE023	G	G	GE063	G	G
GE024	G	G	GE064	G	G
GE025	G	G	GE065	G	G
GE026	G	G	GE066	G	G
GE027	G	G	GE067	G	G
GE028	G	G	GE068	G	G
GE029	G	G	GE069	G	G
GE030	G	G	GE070	G	G
GE031	G	G	GE071	G	G
GE032	G	G	GE072	G	G
GE033	G	G	GE073	G	G
GE034	G	G	GE074	G	G
GE035	G	G	GE075	A	A
GE036	G	G	GE076	G	G
GE037	G	G	GE077	G	G
GE038	G	G	GE078	G	G
GE039	G	G	GE079	G	G
GE040	G	G	GE080	G	G

Diferentemente da técnica de ARMS e PASA PCR, a TETRA-ARMS permitiu a realização da genotipagem da variante africana em uma única reação, enquanto aquelas necessitam de 2 reações independentes. Os benefícios de uma reação unificada de PCR, além da economia de tempo e reagentes, incluem o aumento da especificidade da reação de amplificação e a redução de riscos de contaminação cruzada e trocas de amostras.

É possível observar que tanto a reação de ARMS-PCR para o alelo mutado A (figura 10A), quanto para o alelo selvagem G (figura 10B), geram *amplicons* inespecíficos, o que pode interferir na interpretação dos resultados da genotipagem. A reação unificada de TETRA-ARMS promove condições de maior competição entre os oligonucleotídeo alelo específicos, aumentando a especificidade da reação. Essa constatação já havia sido observada por Lo e colaboradores (1991) em seu trabalho que compara a especificidade da reação de TETRA-ARMS e ARMS PCRs para a genotipagem da região 5' da δ -globina. Liu e colaboradores (1997b) atribuíram a formação desses artefatos de PCR à formação de *megaprimers*, evento que ocorre quando o *amplicon* formado nos primeiros ciclos da PCR atua como oligonucleotídeo iniciador para um *template*. A introdução de uma cauda rica em GC na extremidade 5', conforme sugerida por Liu, inibiu a amplificação inespecífica dos ensaios de PCR alelo específica de nosso estudo.

5.6 Comparação de custos e benefícios

Para o levantamento dos custos da PCR TETRA-ARMS, proposta neste trabalho, e o sequenciamento de Sanger foram realizadas cotações dos insumos utilizados em cada técnica, bem como os equipamentos necessários para a elaboração de cada metodologia. Os itens e seus respectivos valores estão discriminados nas tabelas 7 e 8, além do gasto para a análise de cada amostra.

Os procedimentos para a extração de DNA, amplificação do éxon 4 e purificação da PCR foram os mesmos, tanto para a genotipagem por TETRA-ARMS quanto por sequenciamento de Sanger, com o valor dos insumos estimado em R\$7,26 por amostra (Tabela 7). O valor final para a realização da genotipagem pela TETRA-ARMS foi de R\$9,30 por amostra e o custo de implementação dos equipamentos termociclador, eletroforese e fotodocumentador foi estipulado em R\$ 47.673. Já a realização da genotipagem por sequenciamento foi estimado em R\$25,66 por amostra e o custo de implementação dos equipamentos termociclador, eletroforese e fotodocumentador e

sequenciador foi de R\$ 332.672,80. Os valores discriminados de implementação dos equipamentos encontram-se na tabela 8.

Tabela 7: Cotação dos insumos utilizados nas etapas de genotipagem da variante c.202G>A do gene G6PD

Procedimento	Item	Cotação	Preço por reação
Extração de DNA	Papel filtro	R\$ 170,00	R\$ 1,70
	Lanceta	R\$ 37,45	R\$ 0,37
	Microtubo (0,2mL)	R\$ 239,00	R\$ 0,24
	Ponteira (10uL)	R\$ 103,20	R\$ 0,10
	Ponteira (200uL)	R\$ 51,60	R\$ 0,05
	TOTAL		R\$ 2,47
PCR convencional	Go Taq MasterMix	R\$ 2.760,00	R\$ 0,55
	Microtubo (0,2mL)	R\$ 239,00	R\$ 0,24
	Ponteira (10uL)	R\$ 103,20	R\$ 0,41
	Ponteira (200uL)	R\$ 51,60	R\$ 0,15
	Gel Agarose (500g)	R\$ 1804,00	R\$ 0,21
	TOTAL		R\$ 1,62
Purificação	AmPure XP (60mL)	R\$ 5.438,30	R\$ 2,72
	Microtubo (0,2mL)	R\$ 239,00	R\$ 0,24
	Ponteira (200uL)	R\$ 51,60	R\$ 0,26
	TOTAL		R\$ 3,22
TETRA-ARMS	Microtubo (1,5mL)	R\$ 74,25	R\$ 0,45
	Go Taq MasterMix	R\$ 2.760,00	R\$ 0,28
	Microtubo (0,2mL)	R\$ 239,00	R\$ 0,24
	Ponteira (10uL)	R\$ 103,20	R\$ 0,62
	Ponteira (200uL)	R\$ 51,60	R\$ 0,15
	Gel Agarose (500g)	R\$ 1804,00	R\$ 0,21
	TOTAL		R\$ 1,94
Sequenciamento Sanger	BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing	R\$ 5.454,00	R\$ 3,41
	Microtubo (0,2mL)	R\$ 239,00	R\$ 0,24
	Ponteira (10uL)	R\$ 103,20	R\$ 0,31
	Ponteira (200uL)	R\$ 51,60	R\$ 0,05
	SeqStudio™ Cartridge	R\$ 7.200,00	R\$ 14,40
	TOTAL		R\$ 18,41

Além de ser uma metodologia mais barata, a interpretação dos resultados de TETRA-ARMS é binária, presença ou ausência do *amplicon* alelo específico, facilitando análise dos genótipos. Já os eletroferogramas do sequenciamento requerem um *software* para analisar e interpretar os resultados de genotipagem. Por outro lado, a metodologia de TETRA-ARMS revelou-se onerosa quanto sua

padronização, mesmo seguindo diretrizes para padronização da PCR alelo específica. Somente após as modificações sugeridas por Liu e colaboradores (1997 b) foi possível padronizar a reação de PCR alelo específica na configuração de de TETRA-ARMS. Quanto a escalabilidade, tanto a técnica de PCR alelo específica proposta quanto o sequenciamento de Sanger apresentaram escalabilidade semelhantes, da ordem de dezenas de amostras por dia, sendo necessário cerca de 6,5 horas para a conclusão da genotipagem por TETRA-ARMS e 8 horas para o sequenciamento de Sanger.

Tabela 8: Cotação dos instrumentos necessários para implementação das técnicas de genotipagem

EQUIPAMENTOS			
Item	Modelo	Marca	Preço
Termociclador	BIOG-GT9612	Bio-Gener	R\$ 27.945,00
	Biometra T-One 96G	Analytik Jena	R\$ 33.492,00
Cuba de eletroforese	LCH-13X15	LOCCUS	R\$ 1.867,00
	LPS-300V	LOCCUS	R\$ 2.220,00
Fotodocumentador	L-PIX STI	LOCCUS	R\$ 15.640,80
Sequenciador	SeqStudio™	Applied Biosystems	R\$ 285.000,00

Tabela 9: Resumo das vantagens e desvantagens das metodologias TETRA-ARMS e Sanger utilizadas neste trabalho

Técnica	Vantagens	Desvantagens
TETRA-ARMS	Baixo custo; Fácil implementação	Padronização onerosa; Necessário uso de amostras controles
Sanger	Padronização simples	Custo elevado para aquisição de equipamentos e reagentes; Treinamento de pessoal especializado; Software para análise

6. CONCLUSÃO

- A coleta realizada através de papel de filtro se mostrou adequada para as propostas do projeto;
- A ferramenta *on line* “*Primer1*” necessitou de algumas modificações na síntese dos oligonucleotídeos alelo específico;
- A padronização da PCR TETRA-ARMS foi realizada com sucesso;
- O custo da genotipagem por PCR TETRA-ARMS é inferior ao do sequenciamento Sanger.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

- AGARWAL, R. K.; MOUDGIL, A.; KISHORE, K.; SRIVASTAVA, R. N.; TANDON, R. K. Acute viral hepatitis, intravascular haemolysis, severe hyperbilirubinaemia and renal failure in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patients. **Postgrad Medical Journal**, v. 61, n. 721, p. 971–975, 1985.
- AHLAWAT, S.; SHARMA, R.; MAITRA, A.; ROY, M.; TANTIA, M.S. Designing, optimization and validation of tetra-primer ARMS PCR protocol for genotyping mutations in caprine Fec genes. **Meta Gene**. vol.2, p. 339-349. 2014
- ARNAOUT, H. H.; EL-GHARBAWY, N.; SHAHEEN, I.; AFIFI, R. A.; EL-DAYEM, O, Y. A. Incidence and association of 563 C/T Mediterranean and the silent 1311C/T G6PD mutations in G6PD-deficient egyptian children. **Science**. v.42, n.6, p. 355-360. 2010.
- ARESE, P.; GALLO, V.; PANTALEO, A.; TURRINI, F. Life and death of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficient erythrocytes-role of redox stress and band 3 modifications. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 39, n. 5, p. 328–334, 2012.
- ARESE, P.; TURRINI, F.; SCHWARZER, E. Band 3 / Complement-mediated Recognition and Removal of Normally Senescent and Pathological Human Erythrocytes. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 16, n. 4–6, p. 133–146, 2005.
- AU, S. W. N.; GOVER, S.; LAM, V. M. S.; ADAMS, M. J. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase : the crystal structure reveals a structural NADP⁺ molecule and provides insights into enzyme deficiency. **Structure**, v. 8, n. 3, p. 293–303, 2000.
- Bayenes, J. W. in BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica Médica**. 3^a ed. 2011. Rio de Janeiro: Elsevier. p. 502-508.
- BEUTLER, E.; KUHL W.; VIVES-CONNORS, J. L.; PRCHAL, J. T. Molecular Heterogeneity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase A. **Blood**, v.74, n. 7, p. 2550-2555, 1989.
- BEUTLER, E. The molecular biology of G6PD variants and other red cell enzyme defects. **Annual Review of Medicine**, v. 43, n. 1, p. 47–59, 1992.

- BEUTLER, E. G6PD Deficiency. **Blood**, v. 84, n. 11, p. 3613–3636, 1994.
- BEUTLER, E. G6PD: Population genetics and clinical manifestations. **Blood Reviews**, v. 10, n. 1, p. 45–52, 1996.
- BEUTLER, E.; VULLIAMY, T. J. Hematologically Important Mutations : Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. **Bood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 28, n. 2, p. 93–103, 2002.
- BEUTLER, E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency : a historical perspective Early history. **Blood**, v. 111, n. 1, p. 16–24, 2008.
- BHUTANI, V. K.; JOHNSON, L. H.; SHAPIRO, S. M. Kernicterus in sick and preterm infants (1999-2002): A need for an effective preventive approach. **Seminars in Perinatology**, v. 28, n. 5, p. 319–325, 2004.
- BREWER, G.J.; TARLOV, A.R; ALVIN, A.S. Methaemoglobin reduction test: a new, simple, in vitro test for identifying primaquine-sensitivity. *Bulletin of the World Health Organization*. v.22, p. 633-640. 1960.
- CAPPELLINI, M. D.; FIORELLI, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **The Lancet**, v. 371, n. 9606, p. 64–74, 2008.
- CARSON, P. E.; FLANAGAN, C. L.; ICKES, C. E.; ALVING, A. S. Enzymatic Deficiency in Primaquine-Sensitive Erythrocytes. **Science**, v. 124, n. 3220, p. 484–485, 1956.
- CASTRO, S. M. De; WEBER, R.; MATTE, Ú.; GIUGLIANI, R. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in patients from the southern Brazilian city of Porto Alegre , RS. **Genetics and Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 10–13, 2007.
- CASTRO, S. M. **Aspectos laboratoriais do diagnóstico da deficiência de glicose-6-fosfato**. 2006. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
- CHEN, X.; LIVAK, K.; KWOK, P. Y. A homogeneous, ligase-mediated DNA diagnostic test. **Genome Research**. vol. 8, n. 5, p. 549-556. 1998.

CHEVION, M.; NAVOK, T.; GLASER, G.; MAGER, J. The chemistry of favism-inducing compounds. The properties of isouramil and divicine and their reaction with glutathione. **European Journal of Biochemistry**, v. 127, n. 2, p. 405–409, 1982.

COHEN, P.; ROSEMEYER, M. A. Subunit Interactions of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocytes. **European Journal of Biochemistry**, v. 8, n. 1, p. 8–15, 1969.

DAMESHEK, W.; SCHWARTZ, S. O. Acute hemolytic anemia (acquired hemolytic icterus, acute type). **Medicine**, v. 19, n. 2, p. 231–327, 1940.

DE MARCO, F. Oxidative Stress and HPV Carcinogenesis. **Viruses**, v. 5, n. 2, p. 708–731, 2013.

DOMINGO, G. J.; SATYAGRAHA, A. W.; ANVIKAR, A.; BAIRD, K.; BANCONE, G.; BANSIL, P.; CARTER, N.; CHENG, Q.; CULPEPPER, J.; EZIEFULA, C.; FUKUDA, M.; GREEN, J.; HWANG, J.; LACERDA, M.; MCGRAY, S.; MENARD, D.; NOSTEN, F.; NUCHPRAYOON, I.; OO, N. N.; BUALOMBAL, P.; PUMPRADIT, W.; QIAN, K.; RECHT, J.; ROCA, A.; SATIMAI, W.; SOVANNAROTH, S.; VESTERGAARD, L.; VON SEIDLEIN, L. G6PD testing in support of treatment and elimination of malaria: recommendations for evaluation of G6PD tests. **Malaria journal**, v. 12, n. 391, p. 1–12, 2013.

DU, C. S.; REN, X.; CHEN, L.; JIANG, W.; HE, Y. Detection of the most common G6PD gene mutations in chinese using amplification Refractory Mutation System. **Human Heredity**. v.49, p.133-138. 1999.

EL-GEZEIRY, D.; EL-GENDY, W.; EL-KAFFASH, S.; HASSAB, H.; MOEZ, P. Comparative study for the detection of 563 C-T G6PD mutation using Restriction Enzyme assay and Amplification and Refractory Mutation System (ARMS). **Alexandria Journal of Pediatrics**. v. 19, n.1, p.51-55. 2005.

FACCHINI, F. P.; ASSIS, A. M. Hiperbilirrubinemia neonatal prolongada devido à associação entre síndrome de Gilbert e doença hemolítica por incompatibilidade RhD. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 5, p. 421-424, 2005.

FERNANDO, D.; RODRIGO, C.; RAJAPAKSE, S. Primaquine in vivax malaria : an update and review on management issues. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 351, 2011. Disponível em: <<http://www.malariajournal.com/content/10/1/351>>.

FERREIRA, M. de F. C. Triagem neonatal de deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase e prevalência das mutações G202A (G6PD A-) e C563T (G6PD Mediterrâneo) em Mato Grosso / Brasil. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2014 (Tese de Doutorado)

HALOUI, S.; LAOUNI, N.; SAHLI, C. A.; DABOUBI, R.; BECHER, M.; JOUINI L.; KAXDAGHLI, K.; TINSA, F.; CHERIF, S.; KHRMIRI, M.; FREDIJ, S. H.; OTHMANI, R.; OUALI, F.; SAIALA, H.; TOUMI, N. H.; BARSAUOI, S.; BIBI, A.; MESSAOUD, T. Molecular identification of Gd A- and Gd B- G6PD deficient variants by ARMS-PCR in a Tunisian population. **Annales de Biologie Clinique**. v.74, n.2, p. 219-226. 2016.

HAMEL, A. R.; CABRAL, I. R.; SALES, T. S. I.; COSTA, F. F.; OLALLA SAAD, S. T. Molecular heterogeneity of G6PD deficiency in an Amazonian population and description of four new variants. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v. 28, n. 3, p. 399–406, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12367584>%5Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entre>>.

HAY, S. I.; SNOW, R. W. The Malaria Atlas Project: Developing global maps of malaria risk. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 12, p. 2204–2208, 2006.

HEIDRICH, E.M. Icterícia hemolítica neonatal: estudos genéticos e epidemiológicos. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Genética e Bio. Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1992 (Dissertação de Mestrado).

HILL, D. R.; BAIRD, J. K.; PARISE, M. E.; LEWIS, L. S.; RYAN, E. T.; MAGILL, A. J. Primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 402–415, 2006.

HIRONO, A.; BEUTLER, E. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 11, p. 3951–4, 1988.

HOSNUT, F. O.; OZCAY, F.; BAYRAKCI, U. S.; AVCI, Z.; ÖZBEK, N. Etiology of hemolysis in two patients with hepatitis A infection : glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency or autoimmune hemolytic anemia. **European Journal of Pediatrics**, v. 127, n. 2, p. 1435–1439, 2008.

HOWES, R. E.; DEWI, M.; HOGG, M. M.; BATTLE, K. E.; PADILLA, C. D.; BAIRD, J. K.; HAY, S. I. G6PD Deficiency Prevalence and Estimates of Affected Populations in Malaria Endemic Countries : A Geostatistical Model-Based Map. **PLoS Medicine**, v. 9, n. 11, p. 1–15, 2012.

HOWES, R. E.; DEWI, M.; PIEL, F. B.; MONTEIRO, W. M.; BATTLE, K. E.; MESSINA, J. P.; SAKUNTABHAI, A.; SATYAGRAHA, A. W.; WILLIAMS, T. N.; BAIRD, J. K.; HAY, S. I. Spatial distribution of G6PD deficiency variants across malaria-endemic regions. **Malaria Journal**, v. 12, n. 418, p. 1–15, 2013.

ISA, H. M.; MOHAMED, M. S.; MOHAMED, A. M.; ABDULLA, A.; ABDILLA, F. Neonatal indirect hyperbilirubinemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Korean Journal of Pediatrics**. v.60 , n. 4. p. 106-111. 2017.

KAPLAN, M.; MURACA, M.; HAMMERMAN, C.; VILEI, M.T.; LEITER, C. RUDENSKY, B.; RUBALTELLI, F.F. . Bilirubin conjugation, reflected by conjugated bilirubin fractions, in G6PD deficiente neonates: a determining factor in the pathogenesis of hyperbilirubinemia. **Pediatrics**. v. 102, n. 3. 1998. Disponível em: <http://pediatrics.aappublications.org/content/102/3/e37.long>.

KAWAMURA, T. Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica: eficiência de um teste. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, n. 4, p. 437–441, 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066782X2002001300015&lng=en&nrm=iso&tlng=pt

KE, P.; CHEN, S. S. Hepatitis C Virus and Cellular Stress Response: Implications to Molecular Pathogenesis of Liver Diseases. **Viruses**, v. 4, n. 10, p. 2251–2290, 2012.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG M.; STURROCK, S.; BUXTON S.; COOPER, A.; MARKOWITZS.; DURAN, C.; THIERS, T.; ASHTON, B.; MENTIJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v.28, n.12, p.1647-1649. 2012.

KELLY, T. J.; SMITH, H. O. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*: II. Base sequence of the recognition site. **Journal of Molecular Biology**. v. 51, n. 2, p. 393 – 409. 1970.

KILICDAG, H.; GÖKMEN, Z.; OZKIRAZ, S.; GULCAN, H.; TARCAN, A. Is it Accurate to Separate Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activity in Neonatal Hyperbilirubinemia as Deficient and Normal?. **Pediatrics and Neonatology**. vol.54, n.6, p.1-6. 2013

KIM, S.; MISRA, A. SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. *Annual Reviews of Biomedical Engineering*. n. 9, p. 289-320. 2007

KIM, S.; NGUON, C.; GUILLARD, B.; DUONG, S.; CHY, S.; SUM, S.; NHEM, S.; BOUCHIER, C.; TICHIT, M.; CHRISTOPHEL, E.; TAYLOR, W. R. J.; BAIRD, J. K.; MENARD, D. Performance of the CareStart G6PD deficiency screening test, a point-of-care diagnostic for primaquine therapy screening. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. 1–9, 2011.

KLINTSCHAR, M.; NEUHUBER, F. Evaluation of an alkaline lysis method for the extraction of DNA from whole blood and forensic stains for STR analysis. **Journal of forensic sciences**, v. 45, n. 3, p. 669–73, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10855975>>.

KWOK, P. Y. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**. n. 2, p. 235-258. 2001

KWOK, P. Y. SNP Genotyping With Fluorescence Polarization Detection. **Human Mutation**. vol. 19, p. 315-323. 2002.

LAOUINI, N.; SAHLI, C. A.; JOUINI L; HALOUI, S.; FREDIJ, S. H.; DABOUBI, R.; SAIALA, H.; OUALI, F.; BECHER, M.; TOUMI, N. H.; BIBI, A.; MESSAOUD, T. Determination of glucose-6-phosphate dehydrogenase cut-off values in a Tunisian population. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v.55, n.8, p. 1193-1201. 2017.

LARUE, N.; KAHN, M.; MURRAY, M.; LEADER, B. T.; BANSIL, P.; MCGRAY, S.; KALNOKY, M.; ZHANG, H.; HUANG, H.; JIANG, H.; DOMINGO, G. J. Comparison of quantitative and qualitative tests for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 4, p. 854–861, 2014.

LEY, B.; LUTER, N.; ESPINO, F. E.; DEVINE, A.; KALNOKY, M.; LUBELL, Y.; THRIEMER, K.; BAIRD, J. K.; POIROT, E.; CONAN, N.; KHEONG, C. C.; DYSOLEY, L.; KHAN, W. A.; BERBOSO, A. G. D.; BANCONE, G.; HWANG, J.; KUMAR, R.; PRICE, R. N.; SEIDLEIN, L.

Von; DOMINGO, G. J. The challenges of introducing routine G6PD testing into radical cure : a workshop report. **Malaria Journal**, v. 14, n. 377, p. 1–12, 2015.

LIESE, A. L.; SIDDIQI, M. Q; SPOLARICS, Z. Rapid Detection of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Type A-202A/376G Deficiency by Allele-Specific Polymerase Chain Reaction. **American Journal of Hematology**. v.63, p.159-162. 2000.

LITTLE, S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. In: Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, *et al*, eds. **Current Protocols in Human Genetics**. New York, NY: John Wiley & Sons 1995. p. 9.8.1-9.8.9.

LIU, Y.; PHELAN, J.; Go R. C.; PRCHAL, J.F.; PRCHAL, J. T. Rapid determination of clonality by detection of two closely-linked X chromosome exonic polymorphisms using allele-specific PCR. **Journal of Clinical Investigation**. v.99, n.8, p.1984-1990. 1997. (a)

LIU, Q; THORLAND E. C.; HEIT, J. A.; SOMMER, S. S. Overlapping PCR for Bidirectional PCR Amplification of Specific Alleles: A Rapid One-Tube Method for Simultaneously Differentiating Homozygotes and Heterozygotes. **Genome Research**. 1997. v.7, n.4, p.389-398. 1997.(b)

LO, Y. M.; PATEL, P.; NEWTON, C. R.; MARKHAM, A. F.; FLEMING, K. A.; WAINSCOAT, J. S. Direct haplotype determination by double ARMS: specificity, sensitivity and genetic applications. **Nucleic Acids Research**, v.19, n.13, p.3561–3567. 1991.

LUZZATTO, L. Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase deficiency: From genotype to phenotype. **The Hematology Journal**, v. 91, n. 10, p. 1303–1306, 2006.

LUZZATTO, L; POGGI, V. Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. In ORKIN, S.H.; NATHAN, D.G.; GINSBURG, D.; LOOK, A.T.; FISHER, D.E.; LUX, S. eds. **Hematology of Infancy and Childhood**. 7^a ed. Saunders, Philadelphia. 2009. Cap 17, p 883-907.

MAEDA, M.; MURAYAMA, N.; ISHII H.; URYU, N.; OTA, M. TSUJI, K.; INOKO, H. A simple rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. **Tissue Antigens**. v. 34, p. 290-298. 1989.

MARTINELLI, A. L. C. Ictericia. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v,37, n. 3/4, p. 246-252, 2004.

- MARTELLI, A. Síntese e metabolismo da bilirrubina e fisiopatologia da hiperbilirrubinemia associados à Síndrome de Gilbert : revisão de literatura. **Revista de Medicina de Minas Gerais**, v. 22, n. 2, p. 216–220, 2012.
- MARTINI, G.; TONIOLO, D.; VULLIAMY, T.; LUZZATTO, L.; DONO, R.; VIGLIETTO, G.; PAONESSA, G.; D'URSO, M.; PERSICO, M. G. Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase. **The EMBO Journal**, v. 5, n. 8, p. 1849–1855, 1986.
- MASON, P. J.; BAUTISTA, J. M.; GILSANZ, F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. **Blood Reviews**, v. 21, n. 5, p. 267–283, 2007.
- MAFFI, D.; PASQUINO, M. T. P.; CAPRARI, P.; CAFORIO, M. P.; CIANCIULLI, P.; SORRETINO, F.; CAPPABIANCA, M. P.; SALVATI, A. M. Identification of G6PD Mediterranean mutation by amplification refractory mutation system. **Clinica Chimica Acta**. v.321, p. 43-47. 2002.
- MEIN, C.A.; BARRATT, B.J.; DUNN, M.G.; SIEGMUND, T.; SMITH, A.N.; ESPOSITO L.; NUTLAND, S.; STEVENS, H.E.; WILSON, A.J.; PHILLIPS, M.S.; JARVIS, N.; LAW, S.; DE ARRUDA, M.; TODD, J.A. Evaluation of single nucleotide polymorphism typing with invader on PCR amplicons and its automation. **Genome Research**. vol.10, n.3, p.330–343. 2000.
- MIAO, J.; CHEN, Q.; BAO, L.; HUANG, Y.; ZHANG, J.; WAN, K.; YI, J.; WANG, S.; ZOU, L.; LI, T. Determination of optimal cutoff value to accurately identify glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient heterozygous female neonates. **Clinica Chimica Acta**. vol.424, p.131-135. 2013.
- MINUCCI, A.; GIARDINA B.; ZUPPI, C.; CAPOLUONGO, E. Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Laboratory Assay: How, When and Why? **International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc**. vol.61, n.1. p 27-34. 2009.
- MINUCCI, A.; MORADKHANI, K.; HWANG, M. J.; ZUPPI, C.; GIARDINA, B.; CAPOLUONGO, E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: Review of the “old” and update of the new mutations. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 48, n. 3, p. 154–165, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2012.01.001>>.

MONTEIRO, W. M.; VAL, F. F. A.; SIQUEIRA, A. M.; FRANCA, G. P.; SAMPAIO, V. S.; MELO, G. C.; ALMEIDA, A. C. G.; BRITO, M. A. M.; PEIXOTO, H. M.; FULLER, D.; BASSAT, Q.; ROMERO, G. A. S.; OLIVEIRA, M. R. F.; LACERDA, M. V. G. G6PD deficiency in Latin America : systematic review on prevalence and variants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 553–568, 2014.

NEWTON, C. R.; GRAHAM, A.; HEPINSTALL, L. E.; POWELL, S. J.; SUMMERS, C.; KALSHEKER, N.; SMITH, J. C.; MARKHAM, A. F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). **Nucleic Acids Research**. v.17, n.7, p. 2503–2516. 1989.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 575-580.

NKHOMA, E. T.; POOLE, C.; VANNAPPAGARI, V.; HALL, S. A.; BEUTLER, E. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A systematic review and meta-analysis. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 42, n. 3, p. 267–278, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmed.2008.12.005>>.

OLIVEIRA, R. A. G.; OSHIRO, M.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C.; RIBEIRO, G. S.; MEDEIROS, T. M. D.; BARRETTO, O. C. de O. A novel point mutation in a class IV glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD São Paulo) and polymorphic G6PD variants in São Paulo State, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 2, p. 251–254, 2009.

OSMAN, H. G.; ZAHRAN, F. M.; EL-SOKKARY, A. M. A.; EL-SAID, A.; SABRY, A. M. Identification of Mediterranean mutation in Egyptian favism patients. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. v.18, p.2821-2827. 2014.

OSORIO, L.; CARTER, N.; ARTHUR, P.; BANCONE, G.; GOPALAN, S.; GUPTA, S. K.; NOEDL, H.; KOCHAR, S. K.; KOCHAR, D. K.; KRUDSOOD, S.; LACERDA, M. V.; LLANOS-CUENTAS, A.; RUEANGWEERAYUT, R.; SRINIVASAN, R.; TREIBER, M.; MÖHRLE, J. J.; GREEN, J. Performance of binaxNOW G6PD deficiency point-of-care diagnostic in *P. vivax*-infected subjects. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 1, p. 22–27, 2015.

PERSICO, M. G.; VIGLIETTO, G.; MARTINI, G.; TONIOLO, D.; PAONESSA, G.; MOSCATELLI, C.; DONO, R.; VULLIAMY, T.; LUZZATTO, L.; D'URSO, M. Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clone: primary structure of the protein and unusual 5' non-coding region. **Nucleic acids research**, v. 14, n. 6, p. 2511–2522, 1986.

PETERS, A. L.; NOORDEN, C. J. F. Van. Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency and Malaria : Cytochemical Detection of Heterozygous G6PD Deficiency in Women The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 57, n. 11, p. 1003–1011, 2009.

PRCHAL, J. T.; GREGG, X. T. Red cell enzymes. **Hematology. American Society of Hematology Education Program**, n. 1, p. 19–23, 2005.

ROCA-FELTRER, A.; KHIM, N.; KIM, S.; CHY, S.; CANIER, L.; KERLEGUER, A.; TOR, P.; CHUOR, C. M.; KHENG, S.; SIV, S.; KACHUR, P. S.; TAYLOR, W. R. J.; HWANG, J.; MENARD, D. Field trial evaluation of the performances of point-of-care tests for screening G6PD deficiency in Cambodia. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–16, 2014.

SAAD, S. T. O.; SALLES, T. S. I.; CARVALHO, M. H. M.; COSTA, F. F. Molecular Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Brazil. **Human Heredity**, v. 47, n. 1, p. 17–21, 1997.

SANGER, F., NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.74, n.12, p. 5463–5467. 1977.

SANTANA, M. S.; MONTEIRO, W. M.; SIQUEIRA, A. M.; COSTA, M. F.; SAMPAIO, V.; LACERDA, M. V.; ALECRIM, M. G. 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. 301–6, 2013.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**. v.26, p.1135-1145. 2008.

SOMMER, S. S.; CASSADY J. D.; SOBELL, J. L.; BOTTEMA, C.D.K. A Novel Method for Detecting Point Mutations or Polymorphisms and Its Application to Population Screening for Carriers of Phenylketonuria. **Mayo Clinic Proceedings**. v.64, n.11, p. 1361-1372. 1989.

SYVÄNEN, A. C. Accessing Genetic Variation: Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms. **Nature Reviews Genetics**. vol. 2, p. 930-942. 2001.

TAKIZAWA, T.; HUANG, I. Y.; IKUTA, T.; YOSHIDA, a. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: primary structure and cDNA cloning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 12, p. 4157–4161, 1986.

TINLEY, K. E.; LOUGHLIN, A. M.; JEPSON, A.; BARNETT, E. D. Evaluation of a Rapid Qualitative Enzyme Chromatographic Test for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 2, p. 210–214, 1 fev. 2010. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/cgi/doi/10.4269/ajtmh.2010.09-0416>>.

TUGWELL, P. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Nigerians with jaundice associated with lobar pneumonia. **The Lancet**, v. 301, n. 7810, p. 968-970, 1973.

TWYMAN, R.M. Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis – An Overview. In FUCHS, J.; PODDA, M. **Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics**. Nova York, p. 871-875. 2004

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B.C.; REMM, M.; ROZEN, S.G. Primer3 – New capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v.410, n. 15. 2012.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SAN CRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution, BioMed Central*. Vol 34, n.3, p. 275-305. 2002.

VULLIAMY, T. J.; D'URSO, M.; BATTISTUZZI, G.; ESTRADA, M.; FOULKES, N. S.; MARTINI, G.; CALABRO, V.; POGGI, V.; GIORDANO, R.; TOWN, M. Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 14, p. 5171–5175, 1988.

WANG, X.; CHAN, T. F.; LAM, V. M. S.; ENGEL, P. C. What is the role of the second “structural” NADP + -binding site in human glucose 6-phosphate dehydrogenase? **Protein Science**, v. 17, n. 8, p. 1403–1411, ago. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1110/ps.035352.108>>.

WANG, X.-T.; ENGEL, P. C. Clinical mutants of human glucose 6-phosphate dehydrogenase: Impairment of NADP+ binding affects both folding and stability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1792, n. 8, p. 804–809, ago. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.05.003>>.

WEIMER, T. A.; SALZANO, F. M.; WESTWOOD, B.; BEUTLER, E. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants from Brazil. **Human biology**, v. 65, n. 1, p. 41–47, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8436389>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Scientific Group on the standardization of procedures for the study of gluco-6-phosphate dehydrogenase. World Health Organization Technical Report Series, Geneva, n. 336. 1967.

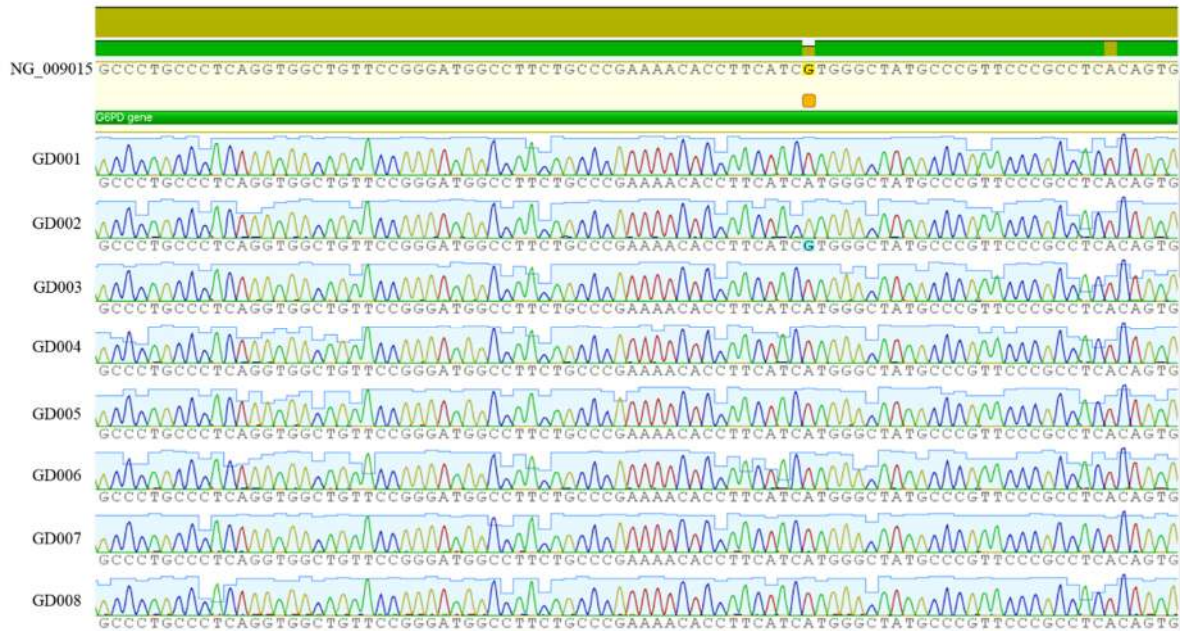
WORLD HEALTH ORGANIZATION Health Organization. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Bulletin of the World Health Organization, v. 67, n. 6, p. 601-611. 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evidence Review Group. The Safety and effectiveness of single dose primaquine as a P. falciparum gametocytocide. In: Malaria Policy Advisory Committee Meeting, n. 5, 2012, Bangkok. Meeting Report. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/mpac/sep2012/primaquine_single_dose_pf_erg_meeting_report_aug2012.pdf?ua=1>. Acesso em: 05/03/2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the Treatment of Malaria. 3^a ed. Geneva. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>>. Acesso em 05/04/2016

8. ANEXOS

Anexo A: Sequenciamento do éxon 4 do gene G6PD. Os eletroferogramas das amostras foram alinhados com a sequência referência NG 009015 depositada no NCBI. O quadrado laranja indica a posição onde a variante G202A é encontrada.



Anexo A: (continuação)





Anexo A: (continuação)



Anexo A: (continuação)



Anexo A: (continuação)



Anexo A: (continuação)



Anexo A: (continuação)

