

**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**BASES MOLECULARES DA DEFICIÊNCIA DA DESIDROGENASE DA GLICOSE
6-FOSFATO E SUA ASSOCIAÇÃO COM HEMOGLOBINAS VARIANTES EM UM
GRUPO DE RECÉM-NASCIDOS DA CIDADE DE SALVADOR-BAHIA**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
JOSÉ PEREIRA DE MOURA NETO**

**Rio de Janeiro
Setembro de 2004**

**C Pq G M
Biblioteca**

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Moura Neto, José Pereira de
M929b Bases Moleculares da Deficiência da Desidrogenase da Glicose
6-Fosfato e sua Associação com Hemoglobinas Variantes em um Grupo de
Recém-Nascidos da Cidade de Salvador-Bahia [manuscrito] / José Pereira
de Moura Neto. - 2004.

116 f. : il. ; 30 cm

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz, 2004.

Orientadora: Prof. Dra. Marilda de Souza Gonçalves, Laboratório de
Patologia e Biologia Molecular.

1. Glucosefosfato Desidrogenase - Deficiência.
2. Recém-nascidos.
3. Mutação.
4. Bahia. I. Título.

CDU 547.455.623:612.648(813.8)

L1111

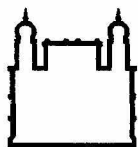
4.11.03
10/11/04

547.455.623:612.648(813.8)
19296

Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre
em ciências na área de
Biologia Molecular

Orientadora: Marilda De Souza Gonçalves

**Rio de Janeiro
2004**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

JOSÉ PEREIRA DE MOURA NETO

**BASES MOLECULARES DA DEFICIÊNCIA DA DESIDROGENASE DA
GLICOSE 6-FOSFATO E SUA ASSOCIAÇÃO COM HEMOGLOBINAS
VARIANTES EM UM GRUPO DE RECÉM-NASCIDOS DA CIDADE DE
SALVADOR-BAHIA**

Orientadora: Marilda de Souza Gonçalves

Aprovada em: 28 / 09 / 2004

EXAMINADORES:

- **Prof^ª Dra. Maria Betânia Toralles (Presidente)**
- **Prof^ª Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**
- **Prof^ª Dra. Camila Indiani de Oliveira**

- **Suplente: Prof^ª Dra. Lilia Maria de Azevedo Moreira**
- **Suplente: Prof^ª Dra. Maria da Glória Bonfim**

Rio de Janeiro, 28 de setembro de 2004

FONTES DE FINANCIAMENTO

- Auxílio do Programa de Apoio à Pesquisa Estratégica em Saúde (PAPES) – FIOCRUZ.
- FAPESB
- CPqGM – FIOCRUZ
- CNPq

*“SONHO QUE SE SONHA SÓ, É SÓ UM SONHO QUE SE SONHA SÓ,
MAS SONHO QUE SE SONHA JUNTO É REALIDADE ”
“A DESOBEDIÊNCIA É UMA VIRTUDE NECESSÁRIA À CRIATIVIDADE”*

RAUL SEIXAS

*“AGRADEÇO A DEUS TODOS OS MOMENTOS A MIM DESTINADOS.
PELAS OPORTUNIDADES E DESAFIOS APRESENTADOS E CONCLUÍDOS.
A FÉ DEPOSITADA E A ESPERANÇA DE NUNCA ESVAECER.
A ALEGRIA DE CONCRETIZAR MAIS UM PEDIDO “*

*“DEDICO ESTA TESE AOS MEUS PAIS RIVALDO E VIOLETA,
AOS MEUS IRMÃOS ANDRÉ, EDSON, RIVALDO,
MARLENE, EDVALDO, LEONOR E MARCOS.
PELA FORÇA, A ESPERANÇA, INCENTIVO E DETERMINAÇÃO
A MIM SEMPRE DADO; NECESSÁRIOS PARA VENCER
OS OBSTÁCULOS NA OBTENÇÃO DA VITÓRIA “*

*“A PROFESSORA E ORIENTADORA **DRA. MARILDA DE SOUZA GONÇALVES***

*ONDE DESDE A GRADUAÇÃO DESPERTOU EM MIM O INTERESSE
PELA HEMATOLOGIA E CIÊNCIA, SENDO UMA INTERLOCUTORA SEMPRE
DISPOSTA A OFERECER ESTÍMULOS E, PRINCIPALMENTE, A PERCORRER
NOVOS CAMINHOS, OUVIR COM INTERESSE E ÂNIMO TODAS AS
QUESTÕES, DÚVIDAS E PROBLEMAS QUE SURTIAM DURANTE O
PROCESSO DE REFLEXÃO.*

*PELA SUA EXTREMA GENEROSIDADE, CORAGEM
E OUSADIA DE TRABALHAR NOVAS IDÉIAS E CONCEITOS,
CORRENDO OS RISCOS INERENTES A ESTA ATITUDE.
AGRADECER SUA AMIZADE E COMPREENSÃO SILENCIOSA
DOS MOMENTOS DIFÍCEIS PELOS QUAIS PASSEI,
PERMITINDO QUE MEU TEMPO FLUÍSSE, RESPEITOSAMENTE,
PELA ALEGRIA E OUSADIA DE TRABALHARMOS JUNTOS,
MINHA ETERNA GRATIDÃO “.*

AGRADECIMENTOS

Considero que a elaboração desta Tese de Mestrado foi um produto coletivo embora, sua redação, responsabilidade e stress sejam predominantemente individuais. O trabalho apresentado contou com a colaboração de inúmeras pessoas e instituições. Sem menosprezar todas as outras contribuições, queria referir as que considero mais substanciais: Várias pessoas contribuíram para a conclusão deste trabalho. A todas elas registro minha gratidão.

A PROF. DRA. MARILDA DE SOUZA GONÇALVES, que tive a oportunidade de conhecer e trabalhar. Pela credibilidade a mim dado em todos os momentos de nossa convivência. Por ser extremamente generosa, pela sua disponibilidade irrestrita, suas formas exigentes, críticas e criativas de argüir as idéias apresentadas, facilitando o alcance de seus objetivos ate mesmo nos momentos que faltaram paciência, talvez pela sua posição e postura de líder, com a qual já nasceu.

A minha namorada JULIANA PERRONE MENEZES, pelo companheirismo, estímulo, amizade, carinho, críticas, sugestões nestes três anos de convivência. A sua família por ter se tornado minha segunda família, agradeço pelo afeto e acolhida.

Ao Professor e Amigo CLÁUDIO LIMA SOUZA, pela sua amizade fiel e conselheira. Pelas suas reflexões criativas sobre nosso objeto de estudo, pelo companheirismo e amizade as quais muito me ajudaram a realizar uma análise critica sobre o mesmo.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho: ARLETE ALBUQUERQUE, CYNARA BARBOSA, ELISÂNGELA ADORNO, FÁBIO COUTO, MARIA TEREZITA, MARIE DUPUIT, MARI INÊS TAVARES, JOELMA MENEZES,

JOSINETE PEREIRA, que contribuíram para o desenvolvimento prático deste trabalho, onde o mesmo não teria sido concluído sem a ajuda e o apoio permanentes dos mesmos.

Aos professores e técnicos dos laboratórios do CPqGM, que contribuíram para o aprendizado teórico/prático das disciplinas e para o desenvolvimento do senso crítico inerente à pesquisa;

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz por financiar parte do material para realização deste trabalho, toda a infra-estrutura, bem como pelo suporte financeiro através da bolsa de mestrado cedida durante os dois últimos anos e por tornar possível a realização de um sonho;

A diretora da Maternidade Tsylla Balbino, Enfa. EDELTRUDES DO ESPÍRITO SANTO, e as auxiliares de enfermagem: D. EDNA, D. JOSEFINA E D. MARILENE, bem como a todos os neonatologistas e enfermeiros que proporcionaram parte do desenvolvimento deste trabalho naquela unidade através da coleta das amostras de sangue dos recém-nascidos;

Ao DR. JOSÉ CARLOS GASPAR, diretor da Maternidade Santo Amaro, a DRA. LÍCIA MOREIRA, Coordenadora da Neonatologia, as Enfas. VIVALNITA MENDONÇA, RAFAELA CAMPELO e a auxiliar IVONE SANTOS pela atenção e colaboração feita na coleta de sangue dos recém-nascidos naquela unidade;

A D. BERNADETE SILVA do setor de arquivo médico da maternidade Santo Amaro pela compreensão e amizade e por resgatar dados referentes aos recém-nascidos sempre que necessário;

Aos professores da pós-graduação do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz;

A Ana Fiscina e Adelvany Araújo pela contribuição na organização das referências bibliográficas e ficha catalográfica;

A todos os colegas do LPBM - Laboratório de Patologia e Biologia Molecular/CPqGM, pelo incentivo durante a Pós-Graduação, em especial a HERMES, pela dedicação nas análises do sequenciamento;

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta **tese** desejo expressar o meu sincero reconhecimento.

....

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	01
	1.1 O ERITRÓCITO	02
	1.2 HEMOGLOBINAS	04
	1.3 DESIDROGENASE DA GLICOSE DE 6-FOSFATO (G6PD)	07
	1.4 MUTAÇÕES DA G6PD	07
	1.5 A DEFICIÊNCIA DA G6PD	09
2	OBJETIVOS	18
3	JUSTIFICATIVA	20
4	CASUÍSTICA	22
5	MÉTODOS	25
	5.1 COLETA DAS AMOSTRAS	26
	5.2 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS	26
	5.3 PERFIL DE HEMOGLOBINAS	26
	5.4 TRIAGEM DA G6PD (TESTE DE BREWER)	27
	5.5 ANÁLISE ELETROFORÉTICA	27
	5.6 ANÁLISE MOLECULAR	29
	5.6.1 Extração do Dna Genômico	29
	5.6.2 Análise Molecular das Mutações 202 e 376 no Gene da G6PD	30
	5.6.3 Protocolo da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	31

	5.6.4	Análise de Fragmentos de Restrição de Tamanhos Polimórficos (RFLP)	32
	5.6.5	Sequenciamento Gênico	34
	5.7	Análise Estatística	38
6		RESULTADOS	39
7		DISCUSSÃO	59
8		CONCLUSÕES	67
9		REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
10		ANEXOS	84

LISTA DE ABREVIATURAS

2,3 DPG	2,3 di-fosfoglicerato
AS	Hemoglobina S em heterozigose
Asp	Ácido aspartico
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BSA	Soro Albumina Bovina
BREWER	Teste da redução da metahemoglobina
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
ddNTP	didesoxinucleotídeo trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxiribonucleotídeos trifosfatos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
G6PD	Desidrogenase da Glicose de 6-fosfato
GSH	Glutatio Reduzido
Hb	Hemoglobina
HbS	Hemoglobina S
HCM	Hemoglobina corpuscular média
Hm	Hemácias
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
Ht	Hematócrito
Kb	Kilo bases
KD	Kilo daltons
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
Pb	Pares de bases
PCR	Do inglês, <i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PRIMERS	oligonucleotídeos sintéticos

RFLP	Do inglês, <i>Restriction fragment length polymorphism</i> (Fragmentos de restrição de tamanhos Polimórficos)
RNs	Recém-nascidos
rpm	Rotações por minuto
SESAB	Secretaria de Saúde do Estado da Bahia
SUS	Sistema Único de Saúde
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Taq DNA	DNA polimerase proveniente do organismo <i>Thermus aquáticus</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
U	unidade
VCM	volume corpuscular médio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Representação Esquemática do metabolismo dos eritrócitos. VIA DE EMBEN-MEYERHOFF (VIA GLICOLÍTICA). Adaptado de STRYER, 1995.	03
Figura 1.2	Representação Esquemática do metabolismo dos eritrócitos. VIA DAS PENTOSSES (SHUNT DA HEXOSE MONOFOSFATO). Adaptado de STRYER, 1995.	04
Figura 1.3	Distribuição mundial da deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato. Adaptado de MUDD <i>et al.</i> , 1995.	14
Figura 5.1.	Representação esquemática da eletroforese em acetato de Celulose pH 9,1 para a pesquisa da deficiência da Desidrogenase Da Glicose 6-fosfato.	28
Figura 5.2.	Eletroforese em acetato de celulose pH 9,1 para a pesquisa Da deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato. 1 = Amostra de RN portador da variante A ⁻ 2 e 3 = Amostras de RNs - 4 - Controle Normal.	29
Figura 5.3.	Gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X pH 8.3 demonstrando amplificação por PCR da mutação 202 no gene da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato. Posição M = marcador de pares de bases <i>Ladder</i> de 500; 1 a 4 – amostras amplificadas. As posições N correspondem a controles Negativos da reação.	31

Figura 5.4. Gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X pH 8.3 demonstrando amplificação por PCR da mutação 376 no gene da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato. Posição M = marcador de pares de bases <i>Ladder</i> de 100; Posições de 1-20 – amostras amplificadas. As posições P e N correspondem aos controles positivo e negativo, respectivamente.	32
Figura 5.5. Gel de Poliacrilamida a 8% demonstrando os fragmentos obtidos Após digestão do produto da PCR para a mutação 202 no gene da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato com a endonuclease de restrição <i>NlaIII</i> . Posição M = marcador de pares de bases <i>Ladder</i> de 50; posições 1 a 4 amostras amplificadas.	33
Figura 5.6. Gel de Poliacrilamida a 8% demonstrando os fragmentos obtidos após digestão do produto da PCR para a mutação 376 no gene da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato com a endonuclease de restrição <i>Fok I</i> . Posição M = marcador de pares de bases <i>Ladder</i> de 25; Posição 1 – Normal; Posições 2,5,6,7 e 9 – Heterozigotos; Posições 3,4 e 8 – Homozigotos.	34
Figura 5.7. Eletroferograma demonstrando o sequenciamento do gene da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato apresentando a seqüência Normal (A) e a mutação 202 (B)	36
Figura 5.8. Eletroferograma demonstrando o sequenciamento do gene da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato apresentando a seqüência Normal (A) e a mutação 376 (B)	37

Figura 6.1. Representação gráfica da distribuição dos perfis de hemoglobinas entre RNs das maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro -Salvador-Bahia.	40
Figura 6.2. Distribuição de nascimentos normais e prematuros entre RNs das maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro – Salvador-Bahia.	42
Figura 6.3. Eletroferograma demonstrando a inserção de uma ADENINA Na posição 643 do gene da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato.	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1. Relação de compostos potencialmente indutores de hemólise em indivíduos portadores da deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato (Adaptado de KODA-KIMBLE <i>et al.</i> , 2004).	11
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Variantes da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato caracterizadas a nível molecular.	08
Tabela 1.2. Prevalências da deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato em estudos descritos na população brasileira.	09
Tabela 5.1. Seqüências dos oligonucleotídeos sintéticos (<i>primers</i>) para investigação das mutações 202 e 376 no gene da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato (HIRONO & BEUTLER, 1988).	30
Tabela 6.1. Distribuição dos perfis de hemoglobinas entre RNs das maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro - Salvador-Bahia.	41
Tabela 6.2. Comparação do perfil de hemoglobinas apresentado pelos RNs nascidos a termo e prematuros - maternidade Tsylla Balbino /SESAB – Salvador - Bahia.	43
Tabela 6.3. Comparação do perfil de hemoglobinas apresentado pelos RNs nascidos a termo e prematuros - maternidade Santo Amaro – Salvador - Bahia.	43
Tabela 6.4. Média de peso por perfil de hemoglobinas apresentados pelos RNs das maternidades Tsylla Balbino (3A) e Santo Amaro (3B) – Salvador - Bahia.	44
Tabela 6.5. Distribuição dos perfis de hemoglobinas e classificação racial dos RNs da maternidade Tsylla Balbino - Salvador - Bahia.	45

Tabela 6.6. Médias dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm) e dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) em RNs das maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro - Salvador - Bahia.	46
Tabela 6.7. Médias e desvios padrões dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm) e dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) dos RNs nascidos a termos e prematuros – maternidade Tsylla Balbino - Salvador - Bahia.	47
Tabela 6.8. Médias e desvios padrões dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm) e dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) dos RNs nascidos a termos e prematuros - maternidade Santo Amaro - Salvador - Bahia.	48
Tabela 6.9. Médias dos valores e índices hematológicos por perfil de hemoglobinas nos RNs da maternidade Tsylla Balbino – Salvador – Bahia.	49
Tabela 6.10. Médias dos valores e índices hematológicos por perfil de hemoglobinas nos RNs da maternidade Santo Amaro – Salvador – Bahia.	50
Tabela 6.11. Distribuição da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato pelo Teste de redução da metahemoglobina (Teste de Brewer) em recém-nascidos das maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro – Salvador - Bahia.	51
Tabela 6.12. Distribuição da Deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato pelo teste de redução da metahemoglobina (Teste de Brewer) entre os gêneros dos recém-nascidos das maternidades Tsylla Balbino e do Hospital Santo Amaro - Salvador - Bahia.	52

Tabela 6.13. Associação da deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato e perfil de hemoglobinas apresentados pelos RNs das Maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro - Salvador / Bahia.	53
Tabela 6.14. Associação da deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato, dados hematológicos (Ht, Hb, Hm) e índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) dos RNs da maternidade Tsylla Balbino – Salvador - Bahia.	54
Tabela 6.15. Associação da deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato, dados hematológicos (Ht, Hb, Hm) e índices hematimétricos VCM, HCM, CHCM) dos RNs da maternidade Santo Amaro – Salvador - Bahia.	55
Tabela 6.16. Distribuição das mutações 202 e 376 presentes no gene da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato em RNs das maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro - Salvador -Bahia.	56
Tabela 6.17. Associação da deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato, dados hematológicos (Ht, Hb, Hm) e índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) nas diferentes mutações encontradas entre os RNs das maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro- Salvador - Bahia.	57
Tabela 7.1. Distribuição de hemoglobinas variantes em diversos estudos realizados no estado da Bahia e no Brasil.	61

RESUMO

BASES MOLECULARES DA DEFICIÊNCIA DA DESIDROGENASE DA GLICOSE DE 6-FOSFATO (G6PD) E SUA ASSOCIAÇÃO COM HEMOGLOBINAS VARIANTES EM UM GRUPO DE RECÉM-NASCIDOS DA CIDADE DE SALVADOR-BAHIA. JOSÉ PEREIRA DE MOURA NETO. A deficiência da G6PD é uma doença hereditária ligada ao cromossomo X, caracterizada pela presença de crises hemolíticas. Investigamos as características hematológicas, eletroforéticas e moleculares da deficiência da G6PD associando-as à presença de hemoglobinas variantes em 951 recém-nascidos (RNs), provenientes das maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro (Salvador-BA). As hemoglobinas foram investigadas por HPLC; a deficiência da G6PD por eletroforese e pelo método de Brewer e as mutações 202 e 376 por PCR/RFLP e sequenciamento gênico. Cinquenta e sete (6,9%) RNs foram FAS; 38 (4,6%) FAC (0,3%); cinco (0,6%) FSC e um (0,1%) FS. Setenta e um (9,60%) RNs foram deficientes da G6PD, sendo 17 (7,80%) do Santo Amaro e 54 (10,30%) da Tsylla Balbino. Cinquenta e sete (86,36%) RNs apresentaram as mutações 202 e 376; quatro (6,06%) somente a 202; dois (3,03%) somente a 376 e três (4,54%) foram normais para as mutações investigadas. A deficiência de G6PD nos RNs foi encontrada em uma prevalência de 9,60% no total dos RNs investigados, sendo de 7,80% na maternidade Santo Amaro e de 10,30% na Tsylla Balbino, apresentando prevalência de 11,55% quando analisada entre os afro-descendentes. A deficiência da G6PD foi encontrada em 14,24% dos RNs FAZ; apesar disso, não foram encontrados associação da deficiência da G6PD com os valores hematológicos e prematuridade. A presença das mutações 202/376 simultaneamente na maioria dos RNs investigados confirma o predomínio desta variante na nossa população. O encontro da mutação 376 isolada pode estar associada à mutações já descritas ou a variante A⁺. O encontro da mutação 202 isoladamente pode estar associada a uma variante nova na nossa população, merecendo estudos adicionais, uma vez foi descrita somente em um menino de origem japonesa. As amostras negativas requerem estudos adicionais, uma vez que podem corresponder a outras variantes. Nossa investigação encontrou uma inserção de uma adenina na posição 643 do gene da G6PD associada as mutações 202/376, o que pode representar uma mutação de mudança de matriz de leitura, necessitando estudos adicionais comprobatórios, principalmente relacionados ao RNA mensageiro destes portadores.

PALAVRAS CHAVES: Deficiência da Desidrogenase de Glicose 6 fosfato, Recém-nascidos, Mutação, Bahia.

SUMMARY

MOLECULAR BASES OF THE DEFICIENCY OF THE GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE AND ITS ASSOCIATION WITH VARIANT HEMOGLOBINAS IN A GROUP OF NEWBORNS FROM THE CITY SALVADOR – BAHIA. JOSE PEREIRA DE MOURA NETO. The Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is a hereditary disorder chromosome-X linked, characterized by hemolytic crises. We investigate the hematological, electrophoretic and molecular characteristics of the G6PD deficiency among a group of newborns from Salvador-Bahia. The epidemiologic inquiry was developed in the year of 2000 and was compound of 951 newborns from the Tsylla Balbino and Santo Amaro maternities. The study was approved by the Ethical Committee of the CPqGM-FIOCRUZ. The hemoglobin were evaluated by HPLC and the G6PD deficiency by electrophoresis and methemoglobin reduction test (Brewer). The hematologicals analyses were developed by electronic cells coulter and the 202 and 376 G6PD mutations by PCR/RFLP and DNA sequence. Fifty-seven (6,9%) newborns were FAS, 38 (4,6%) FAC (0,3%), five (0,6%) FSC and one (0,1%) FS. Seventy-one (9,60%) newborns had G6PD deficiency, with 17 (7.80%) from the Santo Amaro maternity and 54 (10.30%) from Tsylla Balbino, with statistical significance ($\chi^2 = 6,0$; $p = 0,0142$ and $OR = 2$). Statistical significance was also obtained between MCV and MCHC ($p = 0,0054$ and $0,0489$) among newborns from Tsylla Balbino and between Ht and MCV ($p=0,0423$ and $0,0015$) among newborns from Santo Amaro. Fifty-seven (86,36%) newborns had both mutations (202 and 376); four (6,06%) had only the 202 mutation; two (3,03%) had only the 376 and three (4,54%) did not show mutations. Our result showed an association among the G6PD deficiency and the FAS hemoglobins pattern groups, with a prevalence of 14,29%; the hematological data were compatible of hemolytic anemia. The find of the 202 and 376 mutations, confirmed the high frequency of the A⁻ variant in Bahia; the 202 mutation alone, may be a new G6PD variant, needing additional investigation. The 376 mutation can be associated with others mutations of the G6PD gene and the negative samples need search for the Mediterranean variant. The present study is the first molecular G6PD investigate developed in Bahia populations.

Key Words: Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency, Newborns, mutations, Bahia.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ERITRÓCITO

O eritrócito é uma célula anucleada, cuja membrana é composta por lipídeos e proteínas possuindo uma maquinária especializada e direcionada à manutenção da hemoglobina (STEINBERG & NECHELES, 1971).

O eritrócito possui um metabolismo relativamente simples que utiliza a glicose como fonte de energia, sendo metabolizada pela via de Embden-Meyerhoff (Via Glicolítica ou do metabolismo anaeróbico), gerando lactato, ATP e NADH (Figura 1.1). Noventa por cento da glicose presente nos eritrócitos, é metabolizada pela via anaeróbica de Embden-Meyerhof e 10% pela via aeróbica das pentoses, favorecendo a redução do NADPH, a estabilização da catalase, a regeneração do glutatião reduzido (GSH) e do 2,3 difosfoglicerato (2-3 DPG) (Figura 1.2) (BIRCHMEIER *et al.*, 1977).

A formação de 2,3 DPG ocorre na via de desvio da glicólise, onde o 1,3 DPG gerado segue a via de Rapaport-Luebering. Nesta via o 1,3 DPG reage com a difosfoglicerato mutase, formando o 2,3-DPG, que seu aumento favorece a liberação do oxigênio das hemácias para os tecidos, desviando a curva de saturação da Hb para a esquerda (SHEPOTINOVSKII, 1984).

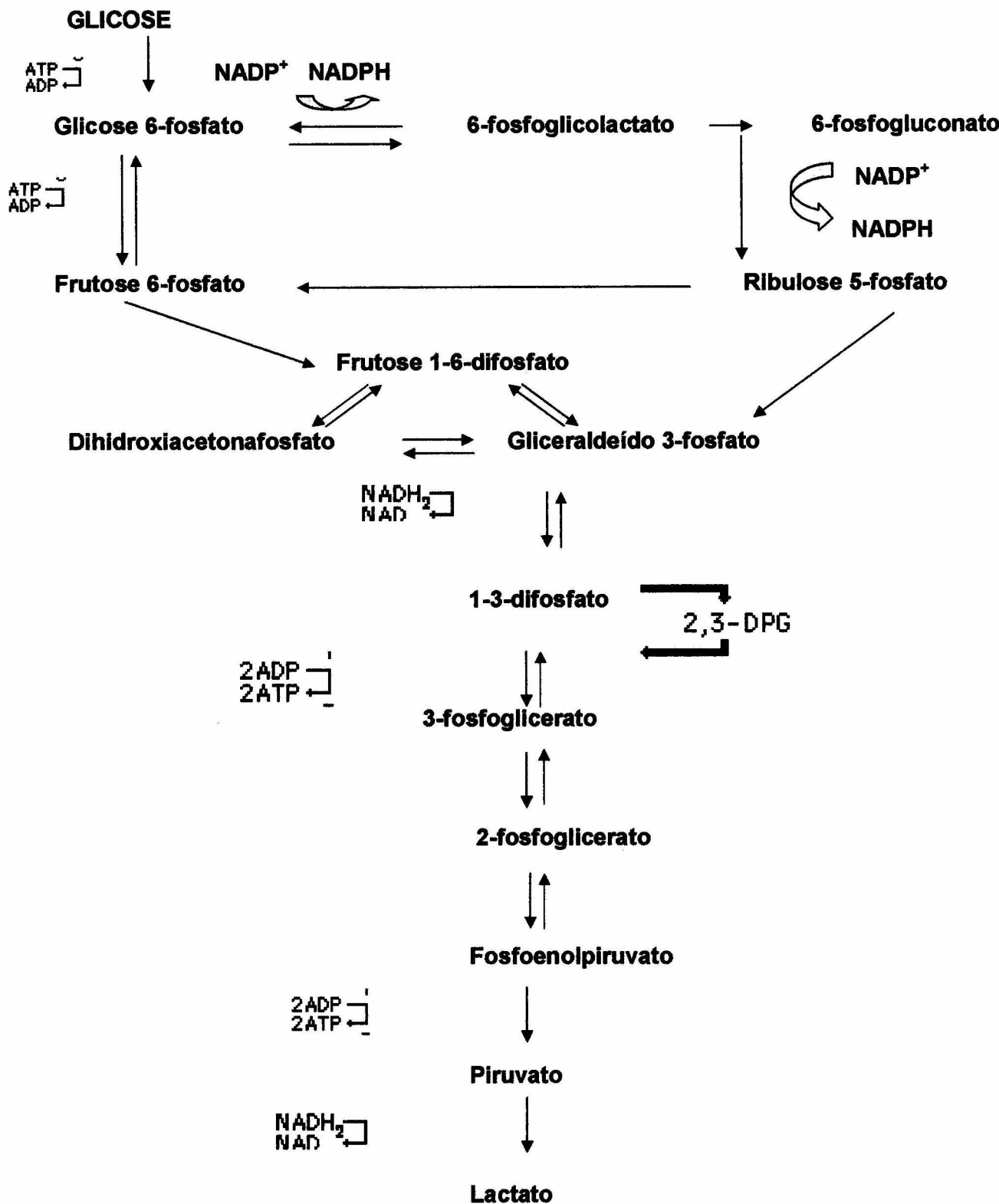


Figura 1.1. Representação Esquemática do metabolismo dos eritrócitos. VIA DE EMBEN-MEYERHOFF (VIA GLICOLÍTICA). Adaptado de STRYER, 1995.

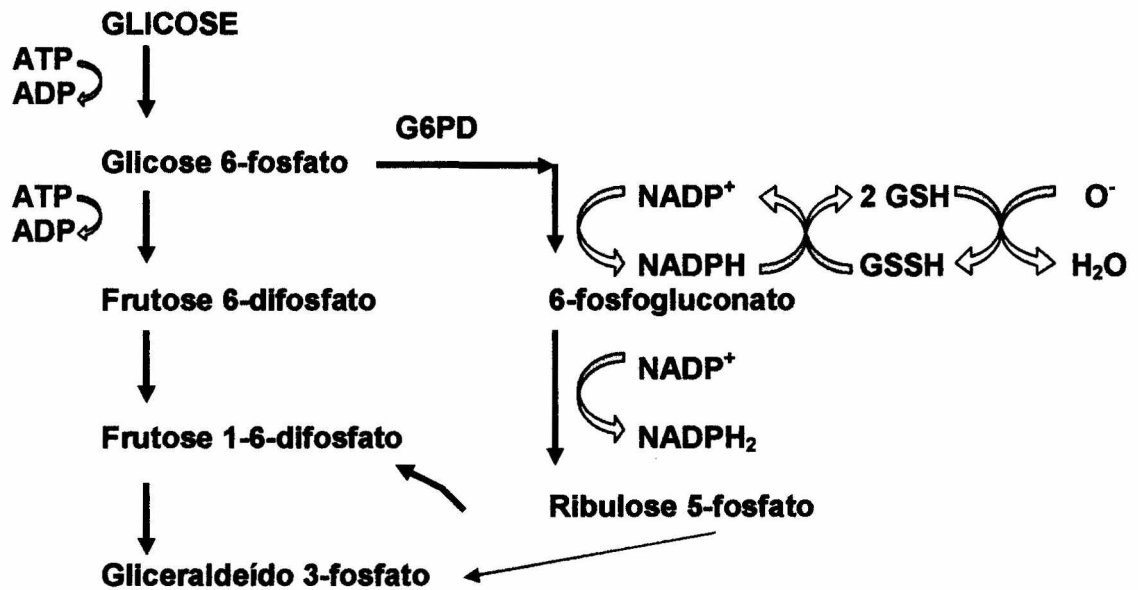


Figura 1.2. Representação Esquemática do metabolismo dos eritrócitos. VIA DAS PENTOSAS (SHUNT DA HEXOSE MONOFOSFATO). Adaptado de STRYER, 1995.

O eritrócito é altamente sensível a oxidação, possuindo enzimas envolvidas na defesa de agentes oxidantes, especialmente a glutatião, que estequiometricamente, por ação da glutatião peroxidase, converte a H_2O_2 à H_2O (AYI *et al.*, 2004).

1.2 AS HEMOGLOBINAS

As hemoglobinas (Hb) humanas constituem um grupo de moléculas com função de promover a absorção, o transporte e a liberação do oxigênio aos tecidos, além do transporte de parte do CO_2 (gás carbônico). Na espécie humana, as mudanças no tipo de hemoglobina ocorrem durante o desenvolvimento ontogênico, sendo determinadas por mecanismos que regulam a expressão dos genes das cadeias de globina (BUNN & FORGET, 1986).

As hemoglobinopatias constituem um grupo de doenças genéticas, caracterizadas por alterações da porção globínica da molécula de hemoglobina, sendo classificadas em dois grupos: estruturais e de síntese. As alterações estruturais incluem mutações gênicas decorrentes de substituições, deleções e inserções de um ou mais nucleotídeos, e as alterações na síntese da hemoglobina

(talassemias), ocorrem devido a mutações que promovem a redução ou ausência da síntese de um ou mais tipos de cadeias (BUNN, 1994; BUNN, 1997; NAOUM, 1997).

A grande maioria das variantes estruturais da hemoglobina é consequência de mutações pontuais que podem ocorrer nos códons dos genes da globina, resultando na substituição de um único aminoácido. Entre as variantes estruturais mundialmente mais frequentes, podemos citar as hemoglobinas S, C, D e E (CHARACHE, 1990).

A hemoglobina S (HbS) é caracterizada pela substituição do ácido glutâmico por valina, decorrente da mutação pontual **GAG** → **G^TIG** no sexto códon do gene da globina β, possuindo distribuição geográfica preferencial na África Tropical (Central e Ocidental) (DOVER *et al.*, 1981). A HbS tende a polimerizar-se em baixas tensões de oxigênio, formando estruturas filamentosas (polímeros de HbS desoxigenada) que se depositam nas hemácias, modificando a sua forma e tornando-as falciformes (*sickle-cell*). O fenômeno de falcização pode ser revertido, quando níveis de oxigênio são restabelecidos, sendo que após sucessivas falcizações, as hemácias podem adquirir formas irreversivelmente falcizadas (SMITH *et al.*, 1981; ANTONARAKIS *et al.*, 1984).

Os heterozigotos para a HbS (AS) possuem aproximadamente 20 a 45% de HbS, além das hemoglobinas A₁, A₂ e fetal (SMITH *et al.*, 1981; EMBURY, 1995; WEATHERALL & PROVAN, 2000), sendo hematologicamente normais e assintomáticos (NAOUM, 1997). Os homozigotos para a HbS (SS) apresentam a anemia falciforme, cujos eritrócitos possuem 80% ou mais de HbS. A quantidade elevada de HbS causa rigidez aos eritrócitos, levando a obstrução dos vasos sanguíneos de calibre pequeno e médio, com formação de trombos e infarto de tecidos, que podem ser acompanhado por fibrose e calcificação (WANG & LUKENS, 1999).

Os portadores da anemia falciforme possuem quadro clínico heterogêneo apresentando retardo no crescimento, desenvolvimento e alterações múltiplas em diversos órgãos, sempre provenientes da hemólise contínua e dos fenômenos de vaso-oclusão (AZEVEDO *et al.*, 1980; BUNN & FORGET, 1986; RAMALHO, 1986; GONÇALVES *et al.*, 1994; SERJEANT *et al.*, 1996; BUNN, 1997).

A asplenia funcional que ocorre progressivamente dificulta a opsonização de bactérias capsuladas, favorecendo a ocorrência de infecções, sendo a maior causa de morbidade e mortalidade entre portadores de anemia falciforme. As crianças com menos de cinco anos de idade são bastante susceptíveis à infecções bacterianas,

principalmente, pelo *Streptococcus pneumoniae*, enquanto que nos adultos, os agentes bacterianos mais frequentemente envolvidos em infecções são *Staphylococcus aureus* ou *Haemophilus sp*, além de outras bactérias menos freqüentes, tais como, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella sp* e *Shigella* (BUNN & FORGET, 1986; EMBURY, 1995).

No Brasil, vários estudos relatam a freqüência elevada de hemoglobinas anormais. KALMUS em 1957 encontrou 15,7% de freqüência para a HbS em habitantes da cidade de Amoreiras - Bahia e PEIXOTO *et al.* (1963) detectaram 4,5% de HbS em habitantes de Paulo Afonso - Bahia. No estudo realizado por AZEVEDO *et al.* (1980) em 1.200 escolares do estado da Bahia foi registrada a freqüência de 7,42% para os heterozigotos AS e 3,42% para os AC, variando de acordo com o grupo populacional investigado, atingindo níveis de 4,4% entre indivíduos caucasóides e 14% entre a população de descendência africana. RAMALHO (1986) detectou freqüência de 6,6% na população negróide do sul e sudeste brasileiro, com prevalência de 0,1% para os homozigotos.

A hemoglobina C resulta da substituição da guanina por adenina (GAG → AAG) no sexto códon do gene da globina β , conduzindo à substituição do ácido glutâmico por lisina (Glu → Lys) na sexta posição da cadeia β ; esta Hb é comum no Oeste Africano, apresentando freqüências de 7 e 22% nas populações da Nigéria e Norte de Ghana, respectivamente. Os heterozigotos têm 30 a 40% de HbC, são assintomáticos, não apresentam anemia e possuem de 6 a 40% de hemácias em alvo. Os homozigotos apresentam anemia moderada, caracterizada por numerosas hemácias em alvo e esplenomegalia (BUNN & FORGET, 1986; BUNN, 1994; NAOUM, 1997).

A hemoglobina é a segunda Hb variante de maior freqüência no Brasil. RAMOS & PEDREIRA *et al.* (1970) encontraram na cidade do Salvador, freqüências de 1,5% para os heterozigotos (AC) e OLIVEIRA (1999), em estudo envolvendo 1953 gestantes da maternidade Tsylla Balbino de Salvador-Bahia, registrou freqüências de 3,28% para os heterozigotos AC e 0,05% para os homozigotos CC. Os indivíduos portadores da associação entre as hemoglobinas S e C, possuem a doença SC, caracterizada por anemia menos grave que a presente na anemia falciforme (SS), exceto pela ocorrência de doença vascular da retina e necrose das extremidades dos ossos longos (BUNN & FORGET, 1986; LANE *et al.*, 1995; BUNN, 1997; NAOUM, 1997).

1.3 A DESIDROGENASE DA GLICOSE 6-FOSFATO

A Desidrogenase da glicose 6-fosfato (G6PD) é uma enzima de localização citoplasmática responsável pela catálise da primeira etapa da via metabólica da hexose monofosfato, que atua no primeiro passo do ciclo das hexoses, participando da produção de NADPH. A G6PD é importante para a manutenção da estrutura tridimensional das proteínas da membrana eritrocitária, atuando como doadora de hidrogênio em várias vias metabólicas (STRYER, 1995).

O gene da G6PD humana está localizado na região telomérica do cromossomo X, na posição q28, apresentando 13 exons e 12 íntrons e tamanho total de 20 kilobases (Kb). A função da enzima é determinada, entretanto, pela seqüência e tamanho do gene e do Ácido Ribonucléico mensageiro (RNAm) sintetizado e composto por 2269 pares de bases (pb). A estrutura funcional ativa da molécula da G6PD é composta por duas ou quatro subunidades idênticas, cada uma contendo peso molecular de aproximadamente 59 kilo-Daltons (KD), constituídas por 515 aminoácidos, com tamanho três vezes maior que a molécula da hemoglobina (MUDD *et al.*, 1995).

1.4 MUTAÇÕES DA DESIDROGENASE DA GLICOSE 6-FOSFATO

A caracterização bioquímica tem levado a descrição de mais de 400 variantes da G6PD. Aproximadamente 290 destes foram caracterizadas por métodos de acordo com a Organização Mundial da saúde (WHO) (BETKE *et al.*, 1967). Métodos moleculares baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) facilitaram a detecção de mutações envolvidas na deficiência da G6PD (BEUTLER *et al.*, 1991; TANG *et al.*, 1992). A Tabela 1.1 demonstra algumas das mutações já descritas em nossa população e no mundo.

Tabela 1.1. Variantes da G6PD caracterizadas a nível molecular.

VARIANTE	NU. SUBSTITUIDO	CLASSE	AA SUBSTITUIDO	AUTOR
A- Distrito Federal "Matera" Castilha Alabama Betica Ferrara	[202 G → A] [376 A → G]	3	[68 Val → Met] [126 Asn → Asp]	HIRONO & BEUTLER, 1988. BEUTLER <i>et al.</i> , 1991. VULLIAMY <i>et al.</i> , 1988. BEUTLER <i>et al.</i> , 1991. BEUTLER & KUHL, 1991. BEUTLER <i>et al.</i> , 1989. CAPPELLINI <i>et al.</i> , 1994.
A A+	[376 A → G]	4	[126 Asn → Asp]	TAKIZAWA <i>et al.</i> , 1987.
Santamaria	[542 A → T] [376 A → G]	3	[181 Asp → Val] [126 Asn → Asp]	BEUTLER & KUHL, 1991,
Mediterranean Dallas Panama	[563 A → T]	3	[188 Ser → Phe]	VULLIAMY <i>et al.</i> , 1988. BEUTLER & KUHL, 1990. BEUTLER & KUHL, 1991.
A-	[680 G → T] [376 A → G]	3	[277 Arg → Leu] [126 Asn → Asp]	HIRONO & BEUTLER, 1988.
A-	[968 T → C] [376 A → G]	3	[323 Leu → Pro] [126 Asn → Asp]	HIRONO & BEUTLER, 1988.
"Mt. Sinai"	[1159 C → T] [376 A → G]	1	[387 Arg → Cys] [126 Asn → Asp]	VLACHOS <i>et al.</i> , 1988.

NU: Nucleotídeo

AA: Aminoácido

A Tabela 1.2 demonstra a prevalência da deficiência da G6PD em diversos estudos realizados na Bahia e no Brasil.

Tabela 1.2. Prevalências da deficiência da G6PD em estudos descritos na população brasileira.

Autor	Saldanha <i>et al.</i> Azevedo & Yoshida	Barreto	Ramalho & Beiguelman	Saldanha <i>et al.</i>	Azevedo <i>et al.</i>	Saad & Costa
Ano	1969	1970	1976	1976	1978	1992
Local	SP e MG	SP	CA / SP	MS	SSA / BA	CA / SP
Freq.	10% (Homens) 2% (Mulheres)	3,27% (Homens) 1,59% (Mulheres)	10,42 (Negros) 2,56% (Caucasóides)	Zero (Índios)	11,39% (negros) 7,85% (ME) 6,98% (MM)	5,56% (SS) 5,56 (SC) 1,85% (Sβtal)

Freq.: Frequência

1.5 A DEFICIÊNCIA DA DESIDROGENASE DA GLICOSE 6-FOSFATO

A deficiência de G6PD é uma herança genética ligado ao cromossomo X. Os homens portadores da deficiência são denominados hemizigotos, possuindo apenas uma cópia do gene; as mulheres, por possuírem dois cromossomos X, podem ser heterozigotas ou homozigotas (SENOZAM & THIELMAN, 1991). A herança da deficiência da G6PD quando transmitida pelos homens, acomete todas suas filhas, já as mulheres que possuem pelo menos uma cópia do gene deficiente podem transmiti-lo a metade de seus descendentes (HAMEL *et al.*, 2002).

Devido ao fenômeno de inativação do cromossomo X, as mulheres apresentam hemácias que expressam tardiamente genes normal ou variante. (SENOZAM & THIELMAN, 1991). Este fenômeno concede vantagem evolucionária as mulheres heterozigotas, o que parece conferir resistência à infecção pelo *Plasmodium falciparum*, quando comparadas aos homens hemizigotos deficientes da G6PD (BEUTLER, 1975; MEHTA & MEHTA, 1991).

A prevalência da deficiência da G6PD coincide com regiões onde a malária foi uma doença endêmica. Esta distribuição é típica de outras alterações genéticas, como a HbS, HbE, talassemia e persistência hereditária da hemoglobina fetal (PHHF) (ORZALESI *et al.*, 1984; MEHTA, 1994; CLARK *et al.*, 1997).

As mudanças estruturais decorrentes do “stress” oxidativo nos eritrócitos deficientes de G6PD geram bissulfetos e causam a desnaturação e a precipitação da hemoglobina, formando os corpúsculos de Heinz. Os corpúsculos formados se integram à membrana do eritrócito, alterando sua carga, elasticidade e permeabilidade, tornando-o susceptível a remoção pelo sistema reticulomonocitário do baço, fígado e medula, iniciando desta forma o processo hemolítico (ORZALESI *et al.*, 1984; BRIGELIUS, 1985; METHA, 1994; SENOZAM & THIELMAN, 1991). O processo de lesão celular pode ser intensificado pela formação de radicais livres e decomposição de hidroperóxidos lipídicos através da ação de complexos de ferro, como metahemoglobina, heme e hemeina gerados pelas espécies ativas de oxigênio (LABEQUE & MARNETT, 1988; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984). A oxidação da membrana está diretamente relacionada ao acúmulo dos grupos sulfidrilas que levam a formação de agregados polipeptídicos, presumidamente, devido a ligações dissulfetos formadas entre os dímeros de espectrina e entre a espectrina e outras proteínas da membrana (LEE *et al.*, 1999).

A formação dos corpúsculos de Heinz também pode ser induzida por agentes oxidantes, como compostos amino e nitroaromáticos, envenenamento químico, intoxicação medicamentosa, e na presença de hemoglobinas instáveis (DACIE & LEWIS, 1995).

Os portadores da deficiência de G6PD apresentam sintomas variados, podendo ocorrer nos primeiros dias de vida ou mais tardiamente, sempre após exposição a algum tipo de alimento, medicamento e infecção, ou permanecer assintomáticos por anos. A deficiência da G6PD é conhecida também como “favismo”, uma vez que indivíduos com deficiência da enzima podem desenvolver crises hemolíticas graves decorrentes da ingestão dos feijões da fava (*Vicia fava*) (BEUTLER, 1984).

Em pesquisa realizada no exército dos Estados Unidos, onde se investigou em um grupo de soldados a etiologia da sensibilidade elevada a primaquina, 15% dos soldados negros sensíveis a droga apresentaram a deficiência da G6PD (BEUTLER *et al.*, 1955; CARSON *et al.*, 1956; SENOZAM & THIELMAN, 1991) (Quadro 1.1).

<p><u>ANALGÉSICOS/ ANTIPIRÉTICOS</u></p> <p>Acetanilida Aminoprilina Antipirina Aspirina Fenacetina Probenecida Piramidona</p>	<p><u>ANTIMALÁRICOS</u></p> <p>Cloroquina Hidroxicloroquina Pamaquina Pentaquina Primaquina Quinino Quinocida</p>	<p><u>DROGAS CARDIOVASCULARES</u></p> <p>Procainamida Quinidina</p>
<p><u>DROGAS CITOTÓXICOS E BACTERICIDAS</u></p> <p>Ácido nalidíxico Ácido para-aminosalicílico Cloranfenicol Co-trimoxazol Furazolidona Furmetonol Neoarsfenamina Nitrofurazona</p>	<p><u>SULFONAMIDAS/ SULFONAS</u></p> <p>Dapsona Sulfacetamida Sulfametoxipirimidina Sulfanilamida Sulfapiridina Sulfasalazina Sulfisoxazole Sulfadiazina</p>	<p><u>OUTRAS DROGAS</u></p> <p>Acido ascórbico Adriamicina Diuréticos Tiazídicos Fenilhidrazina L-Dopa Tolbutamida Vitamina K</p>

Quadro 1.1. Relação de compostos potencialmente indutores de hemólise em indivíduos portadores da deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato (Adaptado de KODA-KIMBLE *et al.*, 2004).

Os reticulócitos e eritrócitos jovens de portadores africanos deficientes da G6PD possuem 10% de atividade enzimática reduzida, não apresentando sintomas mesmo quando expostos ao stress oxidativo. Os episódios de hemólise são geralmente brandos, devido ao fato das hemácias jovens possuírem atividade comparável à normal. O tipo Mediterrâneo não possui atividade da G6PD mesmo nas hemácias jovens, contribuindo para o estabelecimento de episódios hemolíticos graves (BEUTLER, 1991a; SENOZAM & THIELMAN, 1991)

Mais de 400 variantes do gene da G6PD já foram descritas (BEUTLER *et al.*, 1990), sendo que a maioria apresenta mutação pontual, conduzindo a substituições

de aminoácidos (YUCEL *et al.*, 1993; MEHTA, 1994). As variantes descritas para a deficiência da G6PD são caracterizadas por exibirem mobilidade eletroforética e propriedades cinética distintas (ORZALES *et al.*, 1984), fato que permite dividi-las em cinco classes (BRITISH NATIONAL FORMULARY 47, 2004).

- CLASSE 1: Associada à anemia hemolítica crônica (não esferocítica). Ex: Variante New York, Andaloris, Campinas e Sumaré.
- CLASSE 2: Variantes com deficiência enzimática acentuada da atividade da G6PD (menos de 10% da atividade normal). Ex: Variantes Mediterrânea e Union.
- CLASSE 3: Variantes com deficiência enzimática moderada da atividade da G6PD (10 a 60% da atividade normal). Ex: Variantes Africana ou A-, Cantão e Seattle.
- CLASSE 4: Variantes com deficiência enzimática discreta da atividade da G6PD (60 a 100% da atividade normal). Ex: Variante A ou A+.
- CLASSE 5: Variantes com atividade enzimática aumentada da G6PD (>150% de atividade). Ex: Variante Verona, Hartford.

Os indivíduos deficientes da G6PD podem apresentar anemia hemolítica e outras manifestações clínicas, como icterícia, dor abdominal, cefaléia, dispnéia, sendo a icterícia neonatal e a anemia hemolítica os principais sintomas associados a esta deficiência em recém-nascidos (CECIL, 1992). Todas estas circunstâncias estão relacionadas diretamente à inabilidade de tipos celulares específicos em regenerar o fosfato reduzido do NADPH, reação normalmente catalisada pela G6PD.

A Icterícia Neonatal, primeira manifestação dos indivíduos portadores da deficiência da G6PD, aparece imediatamente após o nascimento. Apesar da icterícia neonatal possuir etiologia variada, quando presente de forma persistente pode estar associada à deficiência de G6PD, podendo causar danos neurológicos permanentes em alguns casos (BEUTLER, 1994).

Na anemia induzida por drogas, a hemólise intravascular aguda ocorre 1 a 3 horas após a administração oral, podendo levar o hematócrito para níveis entre 25%

a 35%. Ocorre hemoglobinúria, diminuição da haptoglobina sérica e alterações morfológicas nas hemácias tais como policromasia, presença de hemácias fragmentadas, esquizócitos e hemácias em forma de meia-lua (lunácitos). Os pacientes podem apresentar mal estar, febre baixa, icterícia, dores abdominais ou lombares e urina escura, com presença de hepatoesplenomegalia. A fase de recuperação se inicia 10 a 14 dias após o episódio de hemólise aguda (HERSCHEL & BEUTLER, 2001).

Além da anemia hemolítica droga-induzida, há também a anemia hemolítica feijão-induzido, conhecida como favismo. Os feijões de Fava foram os primeiros alimentos associados a indução de anemia em indivíduos portadores da deficiência da G6PD (MUDD *et al.*, 1995).

TANPHAICHITR (1999), em estudo realizado na Tailândia, avaliaram a associação entre a deficiência da G6PD e a dengue hemorrágica em pacientes do gênero masculino. O autor descreveu a prevalência de 19,1% para a deficiência da G6PD, concluindo que os portadores apresentaram a dengue hemorrágica com quadro clínico mais grave que aqueles sem a deficiência.

A infecção é provavelmente a causa mais comum de hemólise na deficiência da G6PD em áreas onde o favismo não é prevalente,. Os metabólicos oxidativos produzidos por bactérias, vírus, e fungos foram identificados como a maior causa de anemia. As infecções mais importantes descritas como precipitadoras do episódio hemolítico são as hepatites virais, pneumonia e a febre tifóide (CECIL, 1992).

A distribuição geográfica da deficiência de G6PD demonstra prevalências que variam de 5% a 25% em áreas endêmicas como a África, Oriente Médio, Ásia, Mediterrâneo e Nova Guiné (Papua), com prevalência bastante elevadas entre os judeus curdos, que alcançam 65%. Prevalências de 0.5% e 6.9% foram descritas nas Américas do Norte e Sul, respectivamente (*BRITISH NATIONAL FORMULARY* 47, 2004) (Figura 1.3).

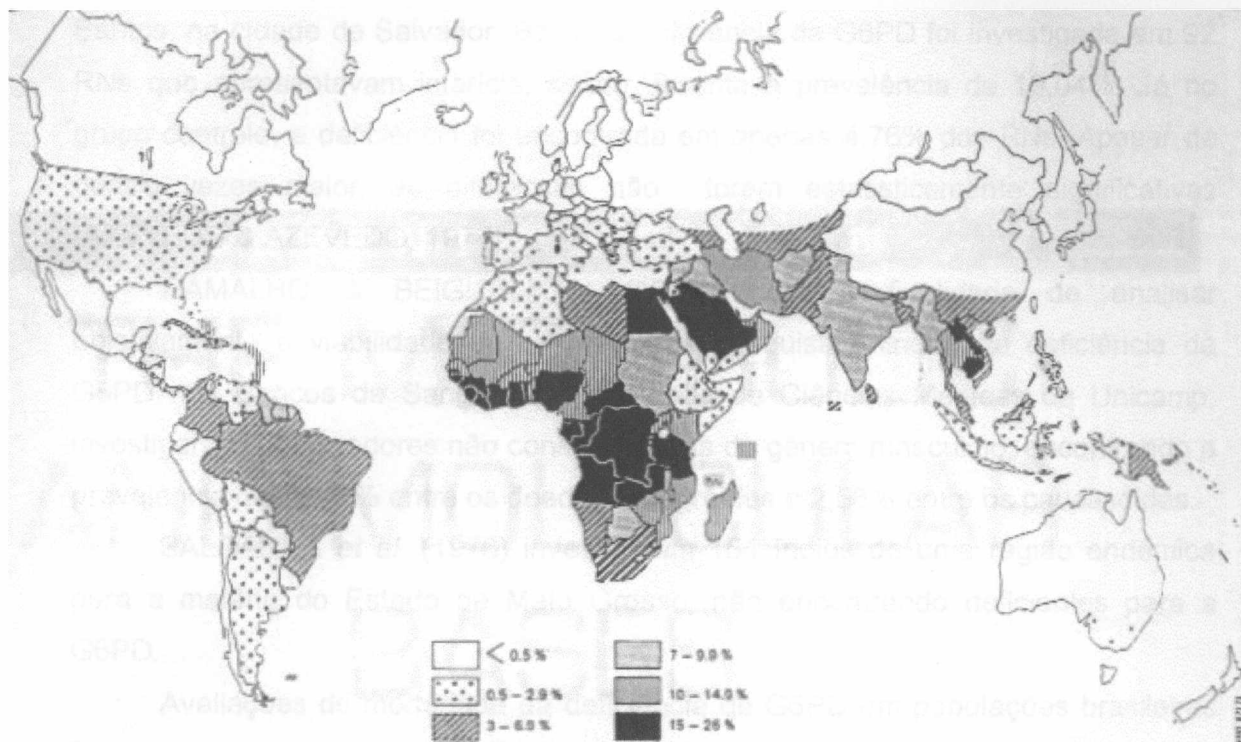


Figura 1.3. Distribuição mundial da deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato. Adaptado de MUDD *et al.*, 1995.

Estudos conduzidos em diferentes regiões do Brasil descreveram prevalências para a deficiência da G6PD em torno de 10% entre os homens afro-descendentes, enquanto que entre os euro-descendentes dos Estados de São Paulo e do Rio Grande do Sul foram encontradas prevalências em torno de 1% a 3% (LEWGOY & SALZANO, 1968; BEIGUELMAN *et al.*, 1970; SALDANHA *et al.*, 1969; RAMALHO & BEIGUELMAN, 1976). Nessa fase, anterior ao advento das técnicas de biologia molecular, as variantes de G6PD mais freqüentemente caracterizadas no Brasil, foram a Africana ou A- (classe 3) e a Mediterrânea (classe 2).

As primeiras avaliações da deficiência da G6PD em populações brasileiras foram as realizadas por SALDANHA *et al.* (1969) e AZEVEDO e YOSHIDA (1969). SALDANHA investigou a distribuição e hereditariedade de diferentes variantes no estado de São Paulo, enquanto AZEVEDO e YOSHIDA descreveram a variante Minas Gerais da G6PD (Gd MG). Em 1970, BARRETO realizou estudo em dois distritos de São Paulo (Vila Pinheiros e Madalena), descrevendo prevalência de 3,27% entre os homens e 1,59% entre as mulheres.

Em estudo caso-controle realizado no Hospital Universitário Professor Edgard Santos, na cidade de Salvador, Bahia, a deficiência da G6PD foi investigada em 92 RNs que apresentavam icterícia, sendo descrita a prevalência de 19,04%. Já no grupo controle, a deficiência foi encontrada em apenas 4,76% dos RNs. Apesar de quatro vezes maior, as diferenças não foram estatisticamente significativas (AZEVEDO & AZEVEDO, 1974).

RAMALHO & BEIGUELMAN (1976), com a finalidade de analisar objetivamente a viabilidade de se instituir a pesquisa rotineira da deficiência da G6PD nos Bancos de Sangue da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, investigaram 204 doadores não consangüíneos do gênero masculino, encontrando a prevalência de 10,42% entre os doadores negróides e 2,56% entre os caucasóides.

SALDANHA *et al.* (1976) investigaram 154 índios de uma região endêmica para a malária do Estado de Mato Grosso, não encontrando deficientes para a G6PD.

Avaliações de morbidade da deficiência de G6PD em populações brasileiras foram realizadas por AZEVEDO *et al.* (1978) entre homens afro-descendentes de Salvador, Bahia, e por SENA *et al.* (1984) entre homens descendentes de europeus e de africanos em Campinas, São Paulo. AZEVEDO *et al.* (1978) investigaram 850 pacientes do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, encontrando prevalência de 11,39% em negros, 7,85% em mulatos escuros, e 6,98% em mulatos médios, sem diferenças estatísticas. O mesmo ocorreu entre os dados hematológicos, frequência de hospitalização e o tipo de manifestações clínicas apresentadas entre os portadores da deficiência e indivíduos do grupo controle. Entretanto, o passado relacionado a presença de icterícia entre os portadores (22,22%) e os controles (12,76%) foi estatisticamente significativo ($\chi^2 = 4,43$; p value = 0,03). Neste estudo, os autores concluíram que a deficiência de G6PD não é suficientemente grave entre a população do nordeste brasileiro, não havendo registro de aumento significativo no número de hospitalizações entre seus portadores, apesar de poder causar icterícia clinicamente detectável.

Os resultados obtidos por SENA *et al.* (1984) indicaram que a deficiência de G6PD não determina o aparecimento de alterações clínicas graves na maioria dos enzimopênicos da região de Campinas. Neste estudo concluiu-se que os deficientes de G6PD mantinham contato freqüente com fatores ambientais potencialmente hemolíticos, tais como, naftalina, sulfas e outros medicamentos, cuja intensidade do

contato parece ser insuficiente para desencadear, na maioria dos casos, hemólise importante.

A morbidade diminuída observada nos estudos realizados em Salvador e Campinas deve-se, em grande parte, ao fato de a maioria dos deficientes detectados terem apresentado a variante Africana ou A⁻, considerada mais benigna. SENA *et al.* (1984) chamaram a atenção para a possibilidade de casos isolados de deficientes de G6PD no Brasil poderem manifestar anemia hemolítica aguda importante, até mesmo fatal, na presença de fatores oxidantes fortes, ressaltando a importância da detecção e da orientação preventiva dos portadores dessa deficiência, sobretudo nas populações onde a variante Mediterrânea pode ser encontrada.

Em 1992, SAAD & COSTA, estudaram um grupo de 54 falcêmicos, composto por 31 portadores da anemia falciforme (SS), 14 portadores da doença SC, e nove portadores da S Beta Talassemia (S β tal); registrando sete (12,96%) deficientes da G6PD, entre três (5,56%) SS, três (5,56%) SC e um (1,85%) S β tal.

Mais recentemente, com a introdução em nosso país das técnicas de biologia molecular, a atenção dos pesquisadores voltou-se para a caracterização das mutações causadoras da deficiência da G6PD, comprovando-se o predomínio das variantes Africana ou A⁻ e Mediterrânea, além da descrição de mutações novas, como as variantes Lages, São Borja, Farroupilha, Anaheim, Campinas e Sumaré (SAAD *et al.*, 1997a,b; WEIMER *et al.*, 1998).

A deficiência de G6PD, na maioria dos casos, não é causa de manifestações clínicas graves, a menos que o indivíduo seja exposto a medicamentos, infecções, ou alimentos indutores de hemólise. Os portadores de deficiência de G6PD podem tolerar pequenas quantidades destas exposições, dependendo da mutação presente (STEINBERG *et al.*, 1988).

O tratamento específico da anemia por deficiência da G6PD será determinado pelo médico baseando na idade, estado geral de saúde, história médica, quadro clínico apresentado e tolerância a determinados medicamentos, procedimentos ou terapias. Os pacientes devem evitar a exposição a drogas e outros agentes tóxicos que induzem a hemólise. Os princípios gerais de tratamento são semelhantes àqueles das outras anemias hemolíticas hereditárias. A esplenectomia é de benefício discutido e a ausência de seqüestro esplênico significativo deve ser conciliada com o conceito da retirada das hemácias com corpúsculos de Heinz pelo baço, como o mecanismo fisiopatológico primário da hemólise. Também pode ocorrer hemólise intravascular, seqüestro hepático e medular. Porém, o tratamento

da deficiência de G6PD é evitar a ocorrência de hemólise (HUGHES-JONES *et al.*, 2004).

Quando um episódio de anemia ocorre, os indivíduos deficientes de G6PD devem ser tratados com oxigênio nasal e colocados em repouso (CECIL, 1992). Os indivíduos anêmicos podem ser tratados com haptoglobina (OHGA *et al.* 1995) e/ou transfusões sanguíneas e nas crises hemolíticas agudas, os pacientes devem receber terapêutica pelo ácido fólico (CECIL, 1992). Quando seguidas às recomendações, o tratamento é eficiente, prevenindo as manifestações clínicas da doença, que apresentará bom prognóstico.

Atualmente, as técnicas de engenharia genética visam à produção de feijão de fava geneticamente modificado, proporcionando a eliminação dos agentes causadores da resposta hemolítica, principalmente as proteínas lecitinas, que possuem propriedade de aglutinar eritrócitos em intensidade variável (SCHVARTSMAN *et al.*, 1966). A utilização destas metodologias assume um caráter bastante significativo em regiões onde os feijões de fava são alimentos importantes na dieta, como no Oriente Médio, cuja prevalência elevada da deficiência da G6PD e a alimentação pela fava encontram-se associados.

Apesar de várias investigações relacionadas a deficiência de G6PD já terem sido conduzidas na população da Bahia, ainda não foram realizadas a caracterização molecular das mutações e sua associação a alterações hematológicas, interação com hemoglobinas variantes ou intercorrências, como prematuridade e baixo peso ao nascimento.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

- Determinar os perfis hematológico, eletroforético e molecular da deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato em um grupo de recém-nascidos de Salvador-Bahia, associando-os a presença de hemoglobinas variantes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estimar a prevalência da deficiência da G6PD em um grupo de RNs da cidade do Salvador-Bahia;
- Determinar as mutações presentes no gene da G6PD nos RNs portadores da deficiência;
- Associar a presença da deficiência da G6PD aos dados hematológicos, presença de hemoglobinas variantes e outras alterações, como a presença de prematuridade e baixo peso ao nascimento.

3 *JUSTIFICATIVA*

A deficiência da Desidrogenase da Glicose 6- Fosfato (G6PD) é uma alteração genética recessiva ligada ao cromossomo X, cujo grau de heterogeneidade clínica e hematológica estão associadas a variante presente. A distribuição da deficiência da G6PD apresenta prevalência de 5% a 25% na África, Oriente Médio, Ásia, Mediterrâneo e Nova Guiné, sendo com prevalência de 65% entre os judeus curdos (*BRITISH NATIONAL FORMULARY* 47, 2004). No Brasil, a prevalência é de 1 a 4% entre os caucasóides e de 9 a 15% entre os negróides (BARRETO, 1970; SENA *et al*, 1986).

As variantes mais freqüentes são caracterizadas por apresentarem efeitos adversos e grande homologia. Entretanto, as variantes que causam anemia hemolítica crônica, devido à seleção adversa, decorrem de mutações recentes e independentes (BEUTLER, 1991b).

Na Bahia, a deficiência de G6PD foi investigada por AZEVEDO *et al.* (1978), que demonstraram prevalência de 11,39% em pacientes internados no Hospital Universitário Professor Edgard Santos em Salvador e de 12,20% (45) entre 369 crianças do gênero masculino da cidade de Salvador, sendo que 38 apresentaram a variante A-; seis a Mediterrânea (Gd Med), e um a variante Minas Gerais (Gd MG).

A Bahia é um estado cuja história retrata a presença de uma população composta por indígenas, negros e várias outras etiologias, apresentando descendentes originários de vários países Europeus, em especial a Espanha e Portugal. Esta miscigenação étnica favoreceu o estabelecimento de características genéticas únicas, fato evidenciado pelas prevalências elevadas descritas para as hemoglobinopatias (AZEVEDO, 1973; AZEVEDO., 1980; AZEVEDO *et al.*, 1981; AZEVEDO *et al.* 1982).

De acordo com o exposto e baseados na ausência de dados relativos a caracterização molecular das mutações relacionadas a deficiência de G6PD na população da Bahia, julgamos de importância sua investigação, contribuindo para a ampliação dos conhecimentos já existentes.

4 CASUÍSTICA

Foi realizado um inquérito epidemiológico em recém-nascidos das Maternidades Tsylla Balbino e Hospital Santo Amaro, cujas gestantes foram originárias de diversos bairros da cidade do Salvador e periferia.

Neste inquérito foram estudados 952 recém-nascidos (RNs), sendo 675 da maternidade Tsylla Balbino e 277 da maternidade do Hospital Santo Amaro. As informações relativas às características raciais, gênero, peso, prematuridade e intercorrências ao nascimento, foram obtidas durante entrevista, observação do RN e consulta ao prontuário.

Estas maternidades apresentam características bem distintas quanto ao perfil de seus clientes, principalmente no que diz respeito ao nível social e econômico. A maternidade Tsylla Balbino é a maior maternidade pública de Salvador, atendendo em média 10.500 gestantes por ano, sendo estas, em sua grande maioria, com poder aquisitivo baixo. A maternidade do Hospital Santo Amaro é uma maternidade privada que atende em média 3.500 gestantes por ano, predominantemente da classe social média e alta.

Devido às perdas decorrentes a manipulação e armazenamento das amostras, algumas análises em determinados grupos de RNs apresentam diferenças quanto ao número total coletados.

Desta forma, durante o período de coleta na maternidade pública, fevereiro a junho de 2000, foram registrados 2958 nascimentos por parto normal e as amostras de sangue foram coletadas em 22,82% (675) do total. A classificação do gênero dos recém-nascidos foi registrada em nosso banco de dados em 543 casos, com 48,6% (264) do gênero masculino e 51,4% (279) do feminino. A triagem para a deficiência da G6PD foi realizada em 70,45% (522) dos RNs; as análises moleculares no gene da G6PD foram realizadas em 51 RNs positivos na triagem, e a determinação do perfil de hemoglobinas em 66,18% (546).

Na maternidade privada as coletas foram realizadas entre agosto e dezembro de 2000. Foram registrados 1043 nascimentos neste período, com 947 cesárias, 89 partos normais e 5 fórceps. As amostras coletadas na maternidade do Hospital Santo Amaro corresponderam a 29,92% (312) dos nascimentos do período. Os gêneros foram cadastrados em nosso banco de dados em 292 casos, com 44,9% (131) do gênero masculino e 55,10% (161) do feminino. A triagem para a deficiência da G6PD foi realizada em 219 (29,55%) RNs; a caracterização molecular da

deficiência da G6PD foi realizada em 15 RNs, e a determinação do perfil de hemoglobinas em 33,82% (279).

Como critério de inclusão no estudo utilizou-se o fato dos RNs serem nativos, possuírem amostras de sangue do cordão umbilical coletadas pelos profissionais dos respectivos hospitais, e história obstétrica e pregressa (Anexo I) obtidas através da entrevista e consulta aos prontuários médico/hospitalar das mães. Foi considerada também, a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelos pais maiores de 18 anos ou responsáveis (Anexo II), após informação dos objetivos e finalidades da pesquisa. Como critérios de exclusão foram adotadas as recusas em assinar o termo de consentimento pelos responsáveis; a recusa em responder o questionário; a ausência dos prontuários médico/hospitalar e a presença de doenças congênitas ao nascimento. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-FIOCRUZ-BA.

As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM - FIOCRUZ) para realização das análises hematológicas e moleculares e ao Laboratório de Pesquisas em Anemias da Faculdade de Farmácia – Universidade Federal da Bahia - UFBA para investigação do perfil de hemoglobinas.

5 MÉTODOS

5.1 COLETAS DAS AMOSTRAS

Foram coletados 10 ml de sangue de cordão umbilical, sendo cinco mililitros (ml) em EDTA (ácido etileno diaminotetracético sódico) na concentração de 1,5 mg/mL (DACIE & LEWIS, 1995) e cinco ml sem aditivo para obtenção de soro. As coletas foram realizadas pela equipe de auxiliares de enfermagem das Maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro e imediatamente encaminhadas para a triagem da deficiência da G6PD, execução do hemograma, eletroforese da G6PD, determinação do perfil de hemoglobinas, extração do DNA (ácido desoxirribonucléico) genômico e obtenção do soro.

5.2 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

A análise hematológica e dos índices hematimétricos foram realizadas em contador eletrônico de células (*Coulter Count T - 890*). A análise morfológica das hemácias foi realizada pela observação microscópica dos esfregaços sangüíneos corados pelo corante Wright (DACIE & LEWIS, 1995).

5.3 PERFIL DE HEMOGLOBINAS

O perfil de hemoglobinas foi determinado por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance) pelo princípio de troca iônica, no aparelho VARIANT I (BIO-RAD - 1000 Alfred Nobel Drive Hercules- CA- USA), utilizando o kit comercial *Sickle Cell Short Program*. Todas as análises foram realizadas após a utilização de calibradores padrões que funcionam como marcadores do tempo de retenção, constituídos por hemolisados liofilizados contendo os tipos de hemoglobinas humanas F, A, E, S e F, A, D e C, preservados em gentamicina, tobramicina e EDTA. A calibração foi realizada através de um cartão de leitura ótica, constituído por um "chip" de memória de leitura programável.

Para análise do perfil de hemoglobinas foram utilizados cinco µl do sangue do cordão umbilical em 500 µl de água destilada em cubetas de 1ml de capacidade. Os calibradores foram avaliados antes de cada dosagem e de acordo com as recomendações do fabricante.

5.4 TRIAGEM DA G6PD (TESTE DE BREWER)

O teste de BREWER utiliza solução de nitrito de sódio (NaNO_2)/Glicose (6g de glicose, 1,25g de nitrito de sódio em 100mL de H_2O destilada) e de cloreto de azul de metileno (150mg de cloreto de azul de metileno trihidratado em 1L H_2O destilada). A técnica baseia-se no fato do NaNO_2 converter a hemoglobina em metahemoglobina (Hb contendo Fe^{+3}). Caso o indivíduo possua a G6PD funcional, após a incubação com azul de metileno que é um agente redutor, a via das pentoses é estimulada, convertendo a metahemoglobina em hemoglobina, após três horas de incubação a 37°C .

Os resultados positivos no teste de BREWER foram posteriormente confirmados pela eletroforese de G6PD e análise molecular.

5.5 ANÁLISE ELETROFORÉTICA

A eletroforese para pesquisa da G6PD foi realizada com a finalidade de se obter informações relativas à mobilidade eletroforética das variantes identificadas.

Como descrito anteriormente, as variantes da G6PD apresentam padrões eletroforéticos distintos, o que permite a análise preliminar do tipo presente. A eletroforese descreve se a variante presente possui mobilidade eletroforética maior, menor ou igual a variante normal (Figura 5.1).

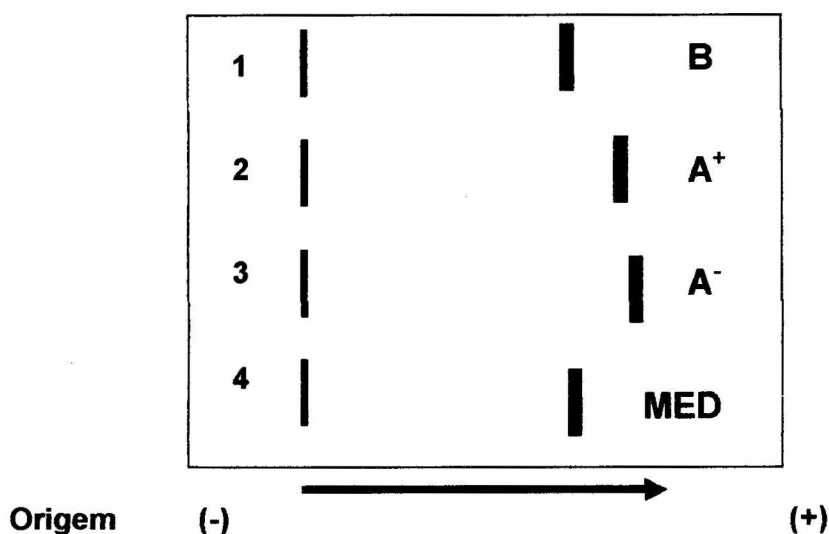


Figura 5.1. Representação esquemática da eletroforese em acetato de celulose pH 9,1 para a pesquisa da deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato.

1= G6PD B (Normal);

2= Variante com mobilidade pouco maior que a normal, porém deficiente (A^+);

3= Variante com mobilidade bem maior que a normal (Africana ou A^-);

4= Variante com mobilidade maior / igual a normal (Mediterrânea).

A eletroforese de G6PD foi realizada em acetato de celulose, utilizando-se tampão tris-borato EDTA pH 9.1 (**TBE**) (0,1M Tris-HCl, 0,1M ácido bórico e 0,02mM EDTA) durante 50 minutos a 200 Volts e coradas por 25 minutos em solução de NADP e G6PD (0,008g de **NADP**, 0,02g de **G6PD** e 0,004 de **MTT** (3-[4-5 Dimetil-tiazol -2]-2-5 difenil-tetrazólio brometo) dissolvidos em 18,8 mL de Tris-HCl -1.0 M - pH 8.0). Controles positivos e negativos para a deficiência da G6PD foram incluídos em todos os experimentos de eletroforese (Figura 5.2).

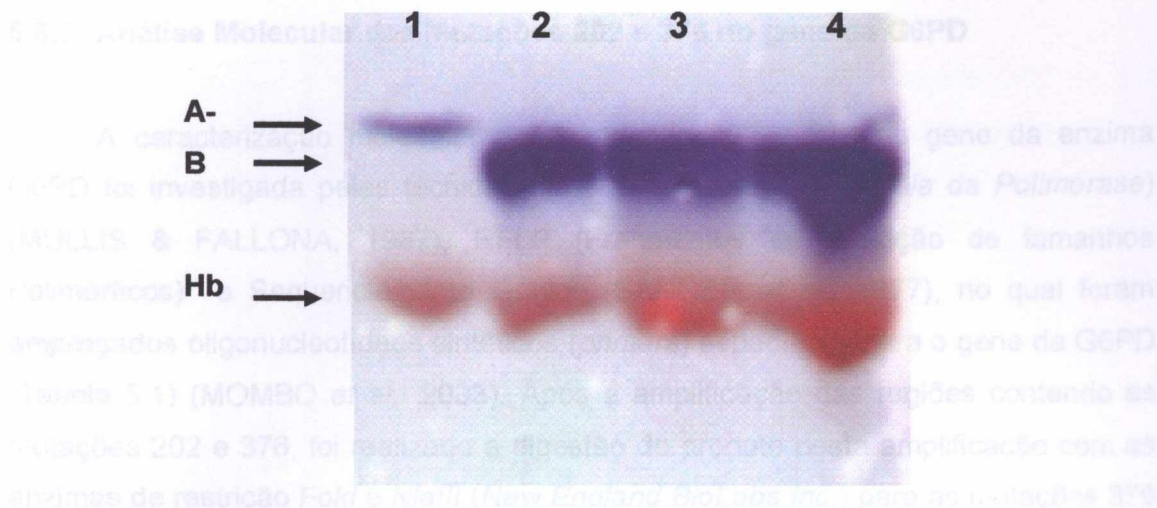


Figura 5.2. Eletroforese em acetato de celulose pH 9,1 para a pesquisa da deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato. 1 = Amostra de RN portador da variante A - 2 e 3 = Amostras de RNs - 4 – Controle Normal.

ANÁLISE MOLECULAR

5.6.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de leucócitos em 100 µl de sangue de cordão umbilical utilizando-se o Kit *GFX™ Genomic Blood DNA Purification KIT* (Amersham Pharmacia Biotec- NJ - USA). Quinhentos µL da solução de extração (solução tampão contendo substância caotrópica e detergente) foram adicionados em eppendorf contendo 100 µl de sangue total, seguido de agitação em vortex e incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. A mistura foi transferida para a coluna GFX e centrifugada a 5000 x g por 1 minuto, desprezando-se o conteúdo no tubo coletor. Adicionou-se 500 µl da solução de extração à coluna GFX e centrifugou-se a 5000 x g por 1 minuto. Quinhentos µl da solução de lavagem (tampão Tris-EDTA/Etanol Absoluto) foram adicionados à coluna GFX e centrifugados a 8000 g por 3 minutos. Foram adicionados à coluna GFX 100 µl de água Milli-Q estéril a temperatura de 70⁰ C e realizada incubação da mistura por 1 minuto à temperatura ambiente. Posteriormente, o tubo foi centrifugado a 5000 x g para obtenção do DNA genômico.

5.6.2 Análise Molecular das Mutações 202 e 376 no gene da G6PD

A caracterização molecular das mutações 202 e 376 no gene da enzima G6PD foi investigada pelas técnicas de PCR (*Reação em Cadeia da Polimerase*) (MULLIS & FALLONA, 1987), RFLP (Fragmentos de restrição de tamanhos Polimórficos) e Sequenciamento Gênico (SANGER *et al.*, 1977), no qual foram empregados oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) específicos para o gene da G6PD (Tabela 5.1) (MOMBO *et al.*, 2003). Após a amplificação das regiões contendo as mutações 202 e 376, foi realizado a digestão do produto desta amplificação com as enzimas de restrição *FokI* e *NlaIII* (*New England BioLabs Inc.*) para as mutações 376 e 202, respectivamente. A reação de PCR foi realizada em termociclador, o produto da amplificação foi corado pelo azul-de-bromofenol/xilenocianol/sacarose (0,25%/0,25%/40%) e analisado por eletroforese em gel de agarose (SIGMA) a 1,5% em tampão TAE 1X pH 8.3 ((tris-base 40mM, NaOAC, 20mM, EDTA 1mM)). A análise do produto digerido foi realizada em gel de agarose (SIGMA) a 2,5%, corado pelo brometo de etídio a 0,002% e visualizado sob luz ultravioleta.

Tabela 5.1. Seqüências dos oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) para investigação das mutações 202 e 376 no gene da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato (HIRONO & BEUTLER, 1988).

Mutação	Seqüência dos Oligonucleotídeos Sintéticos 5'- 3'	Pares de Bases (pb)	Localização no gene
202	TTA-CAG-CTG-TGC-CCT-GCC-CT (D)	919	Exon IV
202/376	AGG-GCA-ACG-GCA-AGC-CTT-AC (R)		
376	CTG-CGT-TTT-CTC-CGC-CAA-TC (D)	585	Exon V
D-Direto	R-Reverso		

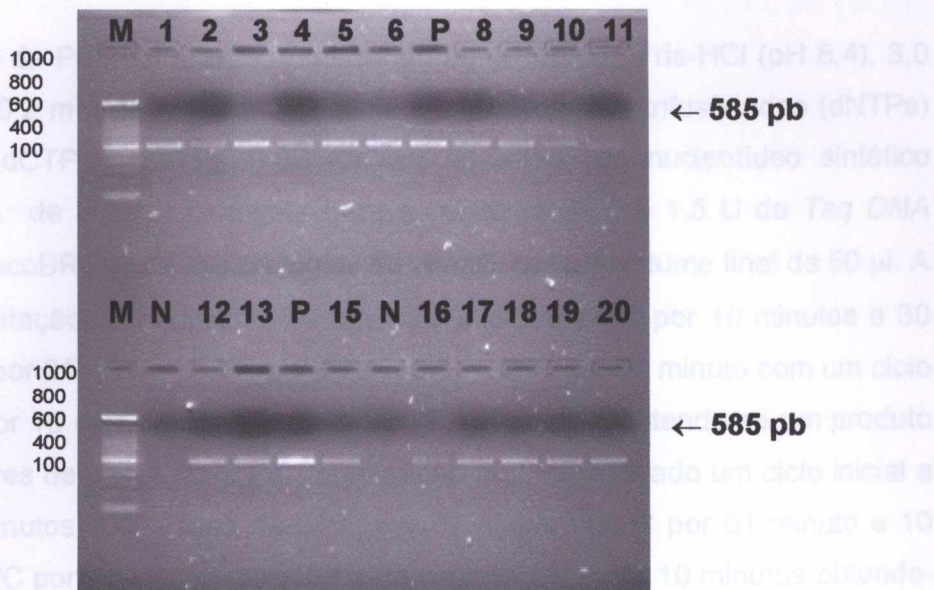


Figura 5.4. Gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X pH 8.3 demonstrando amplificação, por PCR, da mutação 376 no gene da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato. Posição M = marcador de pares de bases *Ladder* de 100; Posições de 1-20 - amostras amplificadas. As posições P e N correspondem aos controles positivo e negativo, respectivamente.

5.6.4 Análise de Fragmentos de Restrição de Tamanhos Polimórficos (RFLP)

A digestão dos produtos da reação de PCR foi realizada utilizando-se as endonucleases de restrição *FokI* e *NlaIII*, para as mutações 376 e 202, respectivamente. As reações foram incubadas a 37°C, sendo composta por 25 µl do produto da PCR (\cong 200 a 500 ng de DNA amplificado); 6,0 U da enzima de restrição (*New England BioLabs Inc.*); 5,0 µl do tampão 10X concentrado pH 7.9 (50 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl, 10 mM de MgCl₂ e 1 mM de DTT) e 19,6 µl de água destilada estéril, em um total de 50 µl. No protocolo com a enzima *NlaIII*, adicionou-se 0,20 µl de BSA (Soro Albumina Bovina).

A digestão dos produtos da PCR pela endonuclease de restrição *NLAIII* gerou fragmentos de 919 pb para o padrão normal; com dois sítios de corte gerando fragmentos aproximadamente de 749, 590, 329 e 170 pb para os hemizigotos. Na

5.6.3 Protocolo da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação da PCR foi realizada utilizando-se 40 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 3,0 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM da mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) (dATP, dTTP, dCTP e dGTP); 0,02 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (primer); 0,02% de glicerol (somente para a mutação 202) e 1,5 U de *Taq DNA Polimerase* (GibcoBRL - *Life Technologies do Brasil*), em um volume final de 50 μ l. A pesquisa da mutação 376 consistiu de um ciclo inicial a 94°C por 10 minutos e 30 ciclos de 94°C por 01 minuto, 65°C por 01 minuto e 72°C por 01 minuto com um ciclo final de 72°C por 10 minutos (HIRONO & BEUTLER, 1988), obtendo-se um produto final de 585 pares de bases (pb). Para a mutação 202 foi realizado um ciclo inicial a 94°C por 10 minutos e 30 ciclos de 94°C por 01 minuto, 68°C por 01 minuto e 10 segundos e 72°C por 01 minuto com um ciclo final de 72°C por 10 minutos obtendo-se um produto final de 919 pares de bases (pb) (Figuras 5.3 e 5.4). Controles negativos e positivos foram incluídos, com a finalidade de testar a presença de contaminantes e confirmar a fidelidade da reação (SAMBROOK *et al.*, 1989).

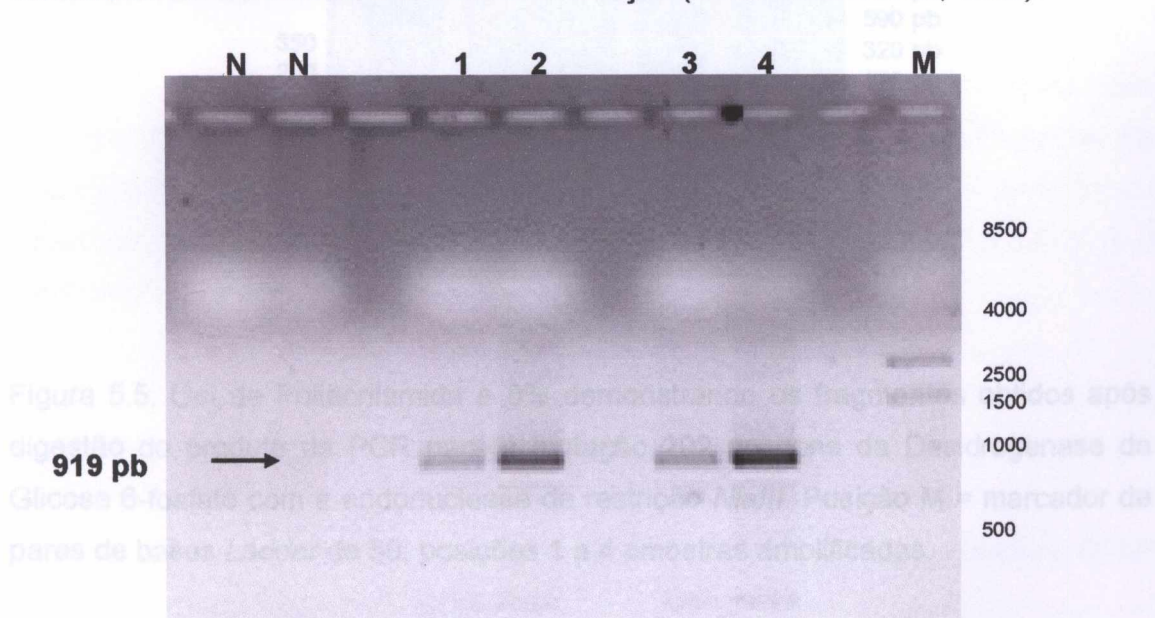


Figura 5.3. Gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X pH 8.3 demonstrando amplificação por PCR da mutação 202 no gene da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato. Posição M = marcador de pares de bases *Ladder* de 500; 1 a 4 - amostras amplificadas. As posições N correspondem a controles Negativos da reação.

pesquisa da mutação 376 utilizou-se a endonuclease de restrição *FokI*; que gerou fragmentos de 585 pb para o padrão normal; sítios de cortes com fragmentos de aproximadamente 330, 210 e 125 (130), mantendo o fragmento de 585 pb normal para os heterozigotos. Cumpre ressaltar que 06 RNs demonstraram também um fragmento de aproximadamente 45 pb, que talvez demonstre uma nova mutação.

Os fragmentos gerados foram analisados através de corrida eletroforética em gel de poliacrilamida a 8% durante 90 minutos a 60 volts, corados durante cinco minutos com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Todas as amostras foram posteriormente seqüenciadas utilizando-se oligonucleotídeos sintéticos descritos no quadro 2 (Figuras 5.5 e 5.6).

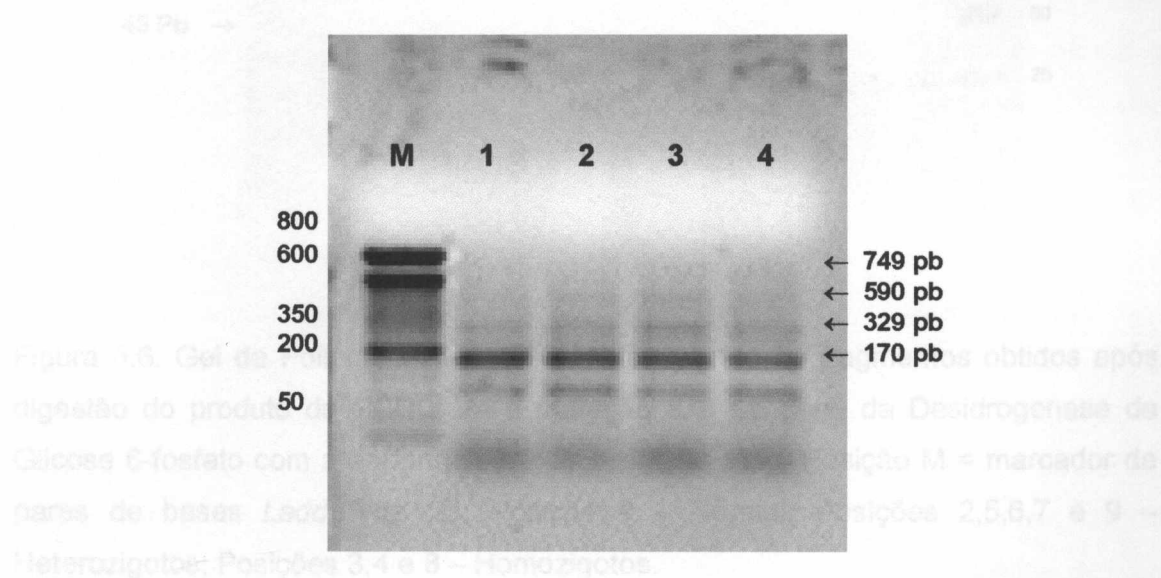


Figura 5.5. Gel de Poliacrilamida a 8% demonstrando os fragmentos obtidos após digestão do produto da PCR para a mutação 202 no gene da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato com a endonuclease de restrição *NlaIII*. Posição M = marcador de pares de bases *Ladder* de 50; posições 1 a 4 amostras amplificadas.

Os produtos obtidos na PCR foram purificados em 1/4 do volume em Acetato de Amônio 1M e 01 volume de isopropanol PA. O DNA então foi incubado durante 15 minutos a temperatura ambiente e centrifugado a 2300 x g por 30 minutos. Após a centrifugação, o precipitado resultante foi lavado por 03 vezes em 200 µl etanol a 80%. Após a última lavagem, o precipitado foi incubado durante uma hora a

ambiente, favorecendo a precipitação do etanol. O precipitado foi ressuspenso em 30 a 40 µl de H₂O e armazenado em 15°C por 2 hs antes do uso.

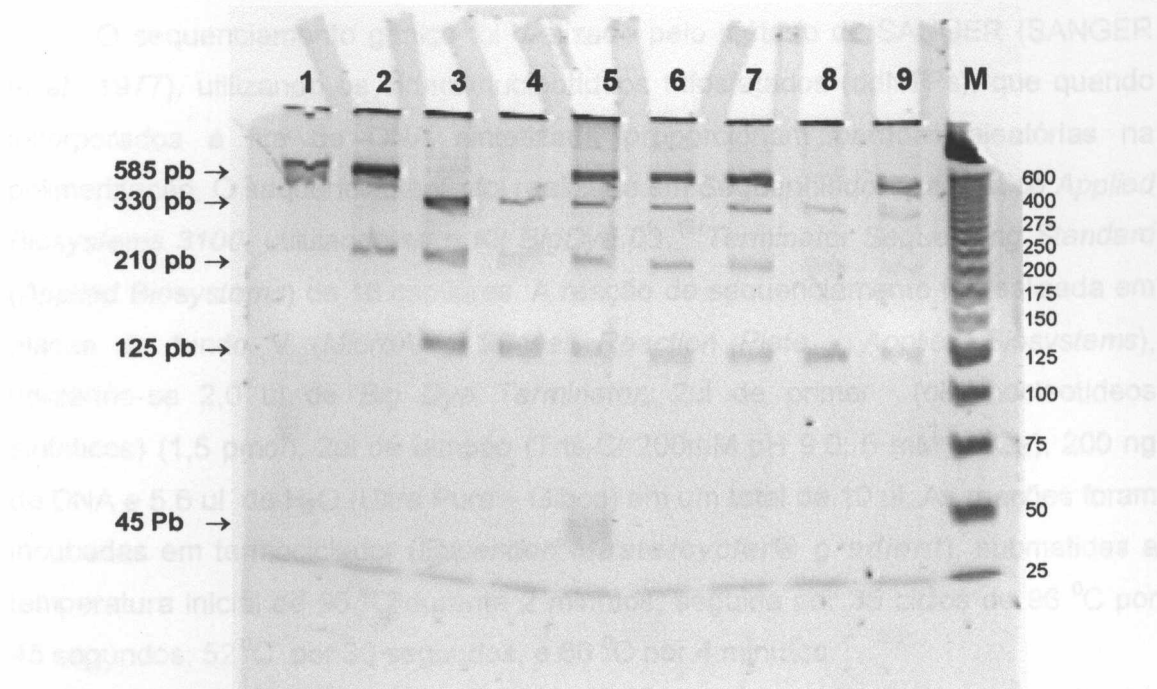


Figura 5.6. Gel de Poliacrilamida a 8% demonstrando os fragmentos obtidos após digestão do produto da PCR para a mutação 376 no gene da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato com a endonuclease de restrição *FokI*. Posição M = marcador de pares de bases *Ladder* de 25; Posição 1 – Normal; Posições 2,5,6,7 e 9 – Heterozigotos; Posições 3,4 e 8 – Homozigotos.

5.6.5 Sequenciamento Gênico

O sequenciamento foi realizado visando confirmar o resultado obtido no RFLP e pesquisar mutações novas.

Os produtos obtidos na PCR foram purificados em 1/4 do volume em Acetato de Amônio 1M e 01 volume de Isopropanol PA. O DNA então foi incubado durante 15 minutos a temperatura ambiente e centrifugado a 2300 x g por 30 minutos. Após a centrifugação, o precipitado resultante foi lavado por 03 vezes em 200 µl etanol a 80%. Após a última lavagem, o precipitado foi incubado durante uma hora a

temperatura ambiente, favorecendo a evaporação do etanol. O precipitado foi ressuspenso em 30 a 40 μ l de H₂O e incubado a 4 °C por 12 hs antes do uso.

O sequenciamento gênico foi realizado pelo método de SANGER (SANGER *et al.*, 1977), utilizando os dideoxinucleotídeos trifosfatados (ddNTPs), que quando incorporados a fita de DNA sintetizada proporcionam paradas aleatórias na polimerização. O sequenciamento foi realizado em Seqüenciador Automático *Applied Biosystems 3100*, utilizando-se o *Kit BigDye 03™ Terminator Sequencing Standard (Applied Biosystems)* de 16 capilares. A reação de sequenciamento foi realizada em placas de fundo V (*MicroAmp 96-well Reaction Plate - Applied Biosystems*), utilizando-se 2,0 μ l de *Big Dye Terminator*, 2 μ l de primer (oligonucleotídeos sintéticos) (1,5 pmol), 2 μ l de tampão (Tris-Cl 200mM pH 9,0: 5 mM MgCl₂), 200 ng de DNA e 5,6 μ l de H₂O (Ultra Pura – Gibco) em um total de 10 μ l. As reações foram incubadas em termociclador (*Eppendorf Mastercycler® gradient*), submetidas a temperatura inicial de 96 °C durante 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 96 °C por 45 segundos; 52 °C por 30 segundos, e 60 °C por 4 minutos.

Para cada poço contendo 10 μ l de reação foram adicionados 8 μ l de H₂O milli-Q autoclavada e 32 μ l de etanol a 100%, que foram homogeneizados 40 vezes por inversão. Após homogeneização, a reação foi incubada por 20 minutos no escuro a temperatura ambiente. Após incubação, centrifuga-se por 45 minutos a 2500 x g a temperatura ambiente, descartando-se o sobrenadante em papel absorvente e realizando-se spin invertido a 120 x g. Após a centrifugação, adicionou-se 150 μ l de etanol a 70%, em seguida a amostra foi homogeneizada por 40 vezes e centrifugada por 15 minutos a 2500 x g à temperatura ambiente, sendo esta repetida por 03 vezes. Após esta fase, as amostras foram incubadas em ambiente escuro por um período mínimo de 2 horas, acrescentando-se 10 μ l da mistura de parada da reação (*Hi-Di™ Formamide - Applied Biosystems*) antes de serem colocadas no seqüenciador.

Os produtos do sequenciamento automático são exibidos nas figuras 5.7 a 5.10. As letras especificam as bases e os números indicam a posição das bases no segmento seqüenciado. As curvas indicam a intensidade de fluorescência de um corante particular para cada base.

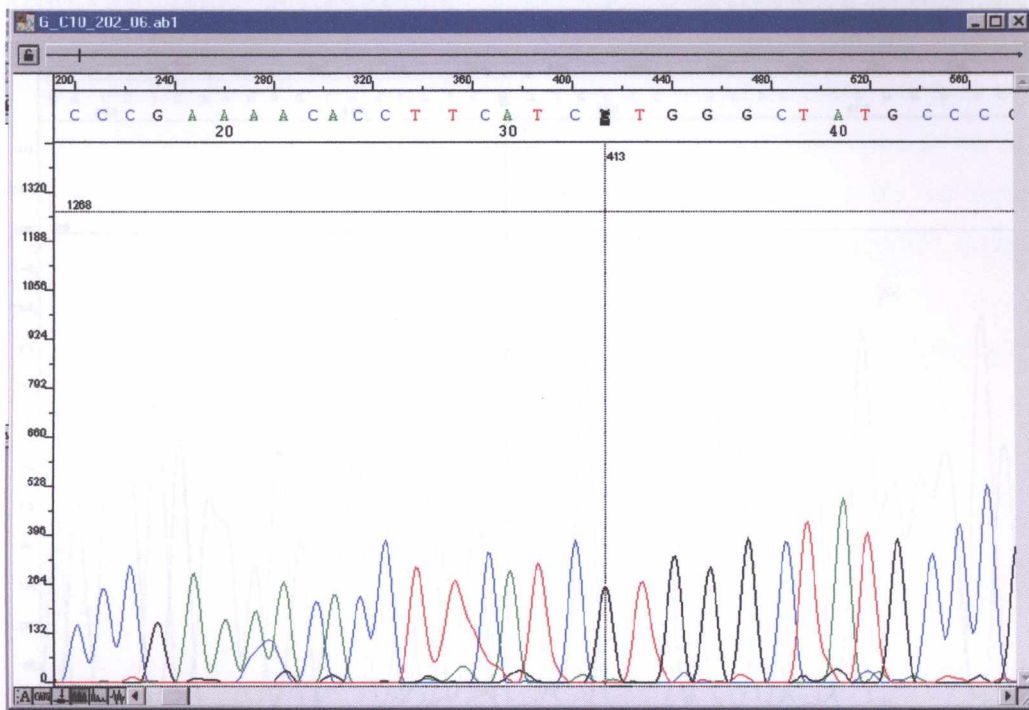
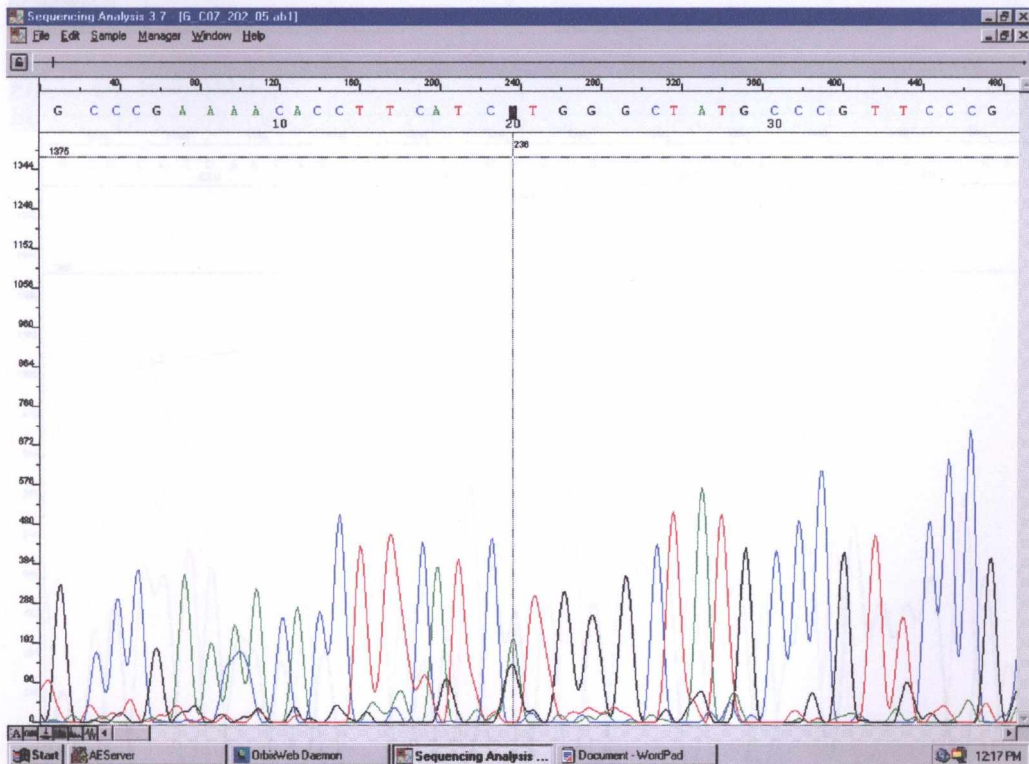
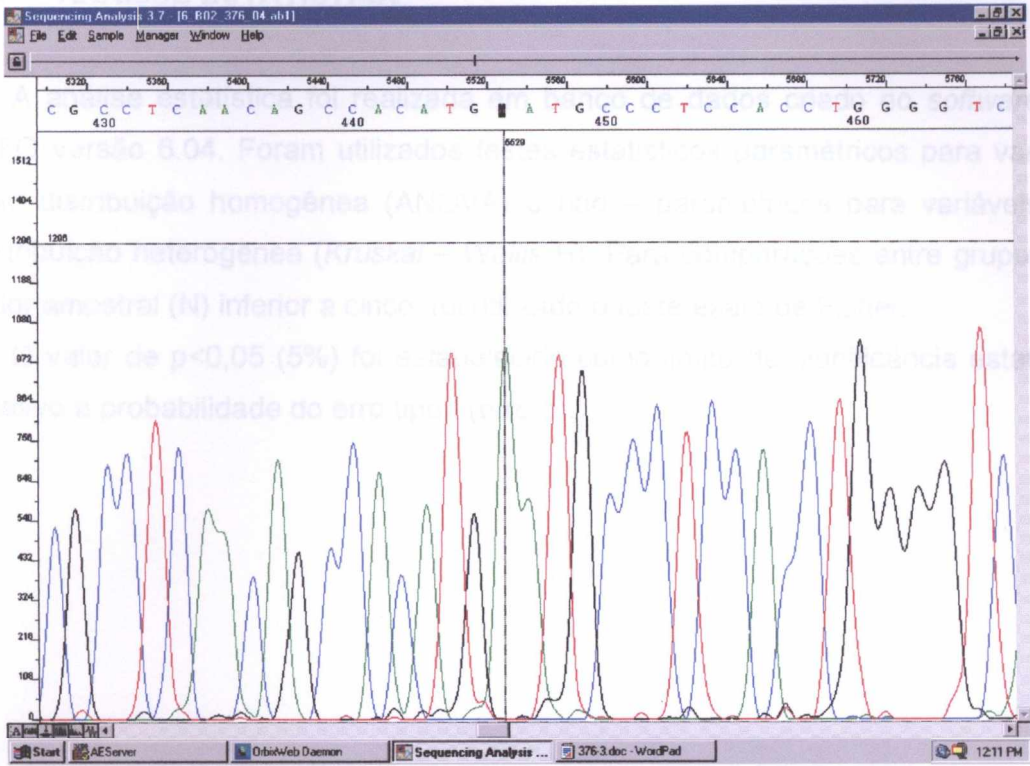
A**B**

Figura 5.7. Eletroferograma demonstrando o sequenciamento do gene da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato apresentando a seqüência Normal (A) e a mutação 202 (B).

A



B

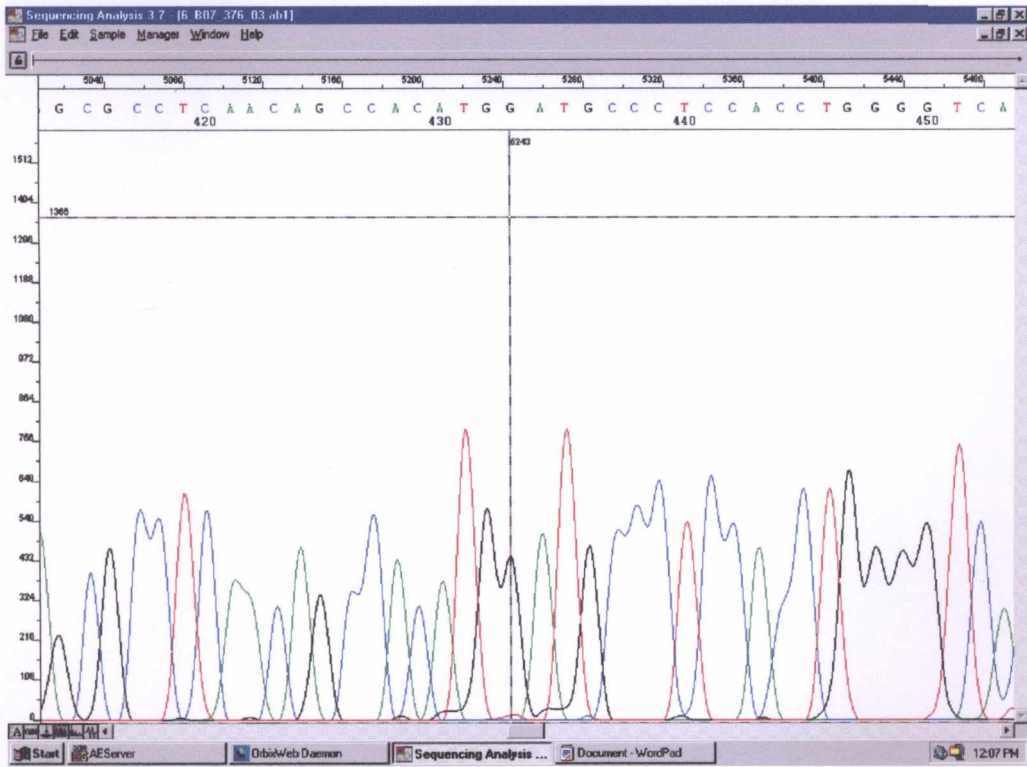


Figura 5.8. Eletroferograma demonstrando o sequenciamento do gene da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato apresentando a seqüência Normal (A) e a mutação 202 (B).

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada em banco de dados criado no *software* EPI-INFO versão 6.04. Foram utilizados testes estatísticos paramétricos para variáveis com distribuição homogênea (ANOVA) e não – paramétricos para variáveis com distribuição heterogênea (*Kruskal – Wallis H*). Para comparações entre grupos com valor amostral (N) inferior a cinco, foi utilizado o teste exato de Fisher.

O valor de $p < 0,05$ (5%) foi estabelecido como limite de significância estatística, relativo à probabilidade do erro tipo I (erro α).

6 *RESULTADOS*

O inquérito epidemiológico foi constituído por 952 Recém-Nascidos (RNs), sendo 675 da Maternidade Pública Tsylla Balbino, seleccionados durante o período de fevereiro a junho de 2000, e 277 da Maternidade Santo Amaro, seleccionados durante o período de agosto a dezembro de 2000.

Dentre as 952 amostras, somente 825 tiveram o perfil de hemoglobinas variantes determinado, com a seguinte distribuição: 724 (87,8%) apresentaram perfil cromatográfico FA; 57 (6,9%) apresentaram perfil FAS; 38 (4,6%) apresentaram perfil FAC; cinco (0,6%) apresentaram perfil FSC e um (0,1%) apresentou perfil FS. No presente estudo não foi detectado o perfil eletroforético FC (Figura 6.1). A tabela 6.1 demonstra a distribuição de hemoglobinas por maternidade.

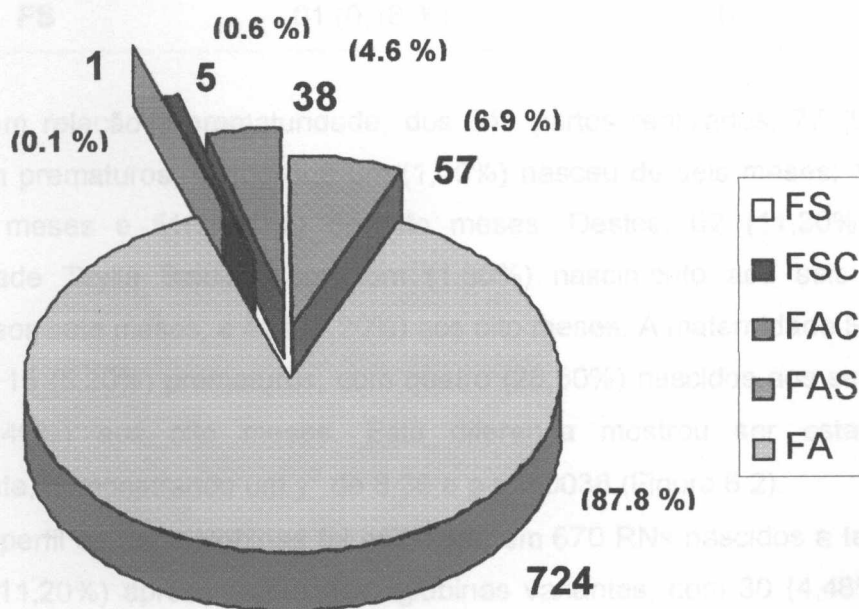


Figura 6.1. Representação gráfica da distribuição dos perfis de hemoglobinas entre RNs das maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro-Salvador-Bahia.

- FA = RN com perfil normal
- FAS = RN portador de heterozigose para Hb S
- FAC = RN portador de heterozigose para Hb C
- FSC = RN portador da doença SC
- FS = RN portador da homozigose para a HB S

Tabela 6.1. Distribuição dos perfis de hemoglobinas entre RNs das maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro -Salvador-Bahia.

Perfil de Hemoglobinas	Maternidade Tsylla Balbino (548)	Maternidade Santo Amaro (278)	Total
FA	454 (83,00 %)	270 (97,13 %)	724
FAS	51 (9,32 %)	06 (2,16 %)	57
FAC	36 (6,58%)	02 (0,72 %)	38
FSC	05 (0,92%)	0	05
FS	01 (0,18 %)	0	01

Com relação à prematuridade, dos 841 partos realizados, 77 (9,10%) RNs nasceram prematuros, sendo que um (1,40%) nasceu de seis meses; 18 (25,70%) de sete meses e 51(72,90%) de oito meses. Destes, 62 (11,30%) foram da maternidade Tsylla Balbino, com um (1,80%) nascimento aos seis meses; 14 (25,0%) aos sete meses, e 41 (73,20%) aos oito meses. A maternidade Santo Amaro registrou 15 (5,20%) prematuros, com quatro (28,50%) nascidos aos sete meses, e dez (71,40%) aos oito meses. Esta diferença mostrou ser estatisticamente significativa, demonstrando um χ^2 de 8,36 e $p = 0,0038$ (Figura 6.2).

O perfil de hemoglobinas foi analisado em 670 RNs nascidos a termo, sendo que 75 (11,20%) apresentaram hemoglobinas variantes, com 30 (4,48%) FAC; 41 (6,12%) FAS e quatro (0,60%) FSC. Do total de 69 RNs prematuros 13 (18,84%) apresentaram hemoglobinas variantes, com cinco (7,25%) FAC; sete (10,14%) FAS; um FS (1,45%) e 46 (80,16%) com perfil normal. A análise entre os grupos de RNs a termo e prematuros foi estatisticamente significativa, com χ^2 de 13,11 e $p = 0,017$.

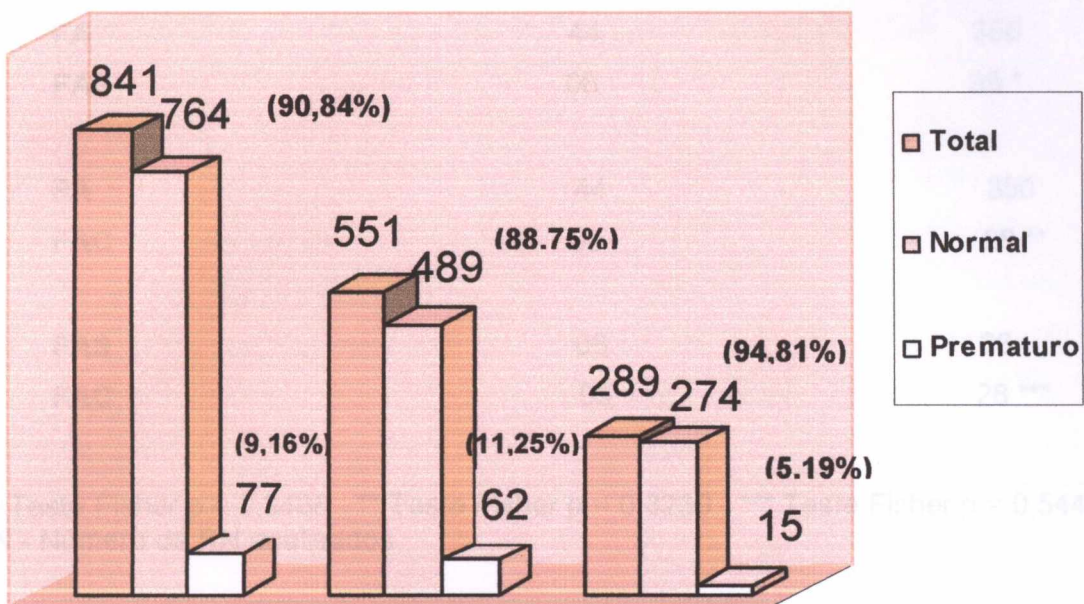


Figura 6.2. Distribuição de nascimentos normais e prematuros entre RNs das maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro -Salvador-Bahia.

O perfil de hemoglobinas entre RNs normais (FA) e portadores de hemoglobinas variantes (FAS e FAC) foram comparados entre aqueles com e sem prematuridade em cada maternidade. Apesar da frequência elevada de hemoglobinas variantes entre os prematuros, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Tabelas 6.2 e 6.3).

Tabela 6.2. Comparação do perfil de hemoglobinas apresentado pelos RNs nascidos a termo e prematuros - maternidade Tsylla Balbino/SESAB - Salvador - Bahia.

Perfil de Hb	RN prematuro		RN a termo	
	N	N	N	N
FA	44		350	
FAS	06		36 *	
FA	44		350	
FAC	05		28 **	
FAS	06		36	
FAC	05		28 ***	

* Teste Fisher p = 0,3466 - ** Teste Fisher p = 0,3239 - *** Teste Fisher p = 0,5444
N - Número de RN analisados

Tabela 6.3. Comparação do perfil de hemoglobinas apresentado pelos RNs nascidos a termo e prematuros - maternidade Santo Amaro - Salvador - Bahia.

Perfil de Hb	RN prematuro		RN a termo	
	N	N	N	N
FA	12		245	
FAS	01		05 *	
FA	12		245	
FAC	0		02 **	
FAS	01		05	
FAC	0		02 ***	

* Teste Fisher p = 0,2644 - ** Teste Fisher p = 0,9093 - *** Teste Fisher p = 0,7500
N - Número de RN analisados

A média de peso dos RN foi de 3,192 Kg (\pm 0,488), com 440 (52,60%) do gênero feminino e 396 (47,40%) do masculino. Os RNs a termo apresentaram média

de peso ao nascimento de 3,254 Kg ($\pm 0,423$) e os prematuros de 2,51 Kg (± 603), com os últimos apresentando peso dentro dos limites de normalidade (2,50 Kg) (NOBREGA *et al.*, 1995) (Tabela 6.4).

Tabela 6.4. Média de peso por perfil de hemoglobinas apresentados pelos RNs das maternidades Tsylla Balbino (A) e Santo Amaro (B) - Salvador - Bahia.

A			B		
Perfil de Hb	N	Média peso (\pm DP)	Perfil de Hb	N	Média peso (\pm DP)
FA	386	3,129 ($\pm 0,502$)	FA	258	3,310 ($\pm 0,443$)
FAS	40	3,116 ($\pm 0,526$)	FAS	06	3,123 ($\pm 0,382$)
**p = 0,8785			*p = 0,3062		
FA	386	3,129 ($\pm 0,502$)	FA	258	3,310 ($\pm 0,443$)
FAC	30	3,175 ($\pm 0,413$)	FAC	02	3,542 ($\pm 0,534$)
*p = 0,4819			*p = 0,4618		
FA	386	3,129 ($\pm 0,502$)	FAS	06	3,123 ($\pm 0,382$)
FAC	30	3,175 ($\pm 0,413$)	FAC	02	3,542 ($\pm 0,534$)
*p = 0,2687			*p = 0,2586		

DP - Desvio padrão

*ANOVA

** Kruskal - Wallis H

A classificação racial foi realizada apenas no grupo de 576 RNs provenientes da maternidade pública Tsylla Balbino, adotando critérios de AZEVEDO *et al.* (1980), classificando 98 brancos (17,02%); 308 mulatos (53,47%) e 170 (29,51%) negros.

Os perfis de hemoglobinas e sua associação com a classificação racial foram analisados em 500 RNs. No grupo de recém-nascidos classificados como brancos, 76 (88,31%) apresentaram o perfil de hemoglobinas FA; dois (2,33%) FAC; e oito (9,30%) FAS no total de 87 RNs; de mulatos, 226 (82,78%) apresentaram o perfil de hemoglobinas FA; 19 (6,95%) FAC; 24 (8,79%) FAS; três (1,10%) FSC e um (0,37%) FS, no total de 273 RNs. Entre os negros, 113 (80,14%) apresentaram o perfil FA; 12 (8,51%) FAC; 15 (10,34%) FAS; e um (0,71%) FSC, no total de 141 RNs. As análises estatísticas realizadas entre os grupos não foram significativas (Tabela 6.5).

Tabela 6.5. Distribuição dos perfis de hemoglobinas e classificação racial dos RNs da maternidade Tsylla Balbino - Salvador - Bahia.

Maternidade Tsylla Balbino				
Perfis de Hemoglobinas	Classificação Racial			Total
	Branco (n)	Mulato (n)	Negro (n)	
FA	76 (88,37%)	226 (82,78%)	113 (80,14%)	415
FAC	02 (2,33%)	19 (6,95%)	12 (8,514%)	33
FAS	08 (9,30%)	24 (8,79%)	15 (10,34 %)	47
FSC	-----	03 (1,10%)	01 (0,71 %)	04
FS	-----	01 (0,37%)	-----	01
Total	86	273	141	500
$\chi^2 = 5,93$	$p = 0,654$			

Os dados hematológicos de hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb), contagem de hemácias (Hm) e os índices hematimétricos de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram obtidos de 817 RNs, sendo 590 provenientes da Maternidade Tsylla Balbino e 227 da Maternidade Santo Amaro. As médias dos dados hematológicos e índices hematimétricos e respectivos desvios padrões estão descritos na tabela 6.6.

Tabela 6.6. Médias dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm) e dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) em RNs das maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro - Salvador - Bahia.

Variáveis	Médias e desvios padrões dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm) e dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) em RNs das maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro - Salvador - Bahia		Valores de referência (WALLAC, 2000)	p-value
	Tsylla Balbino (N = 590)	Santo Amaro (N = 227)		
Dados				
Hematológicos				
Ht (%)	46,141 (± 5,750)	44,281 (± 5,942)	57,0 (± 13,0)	* 0,0007
Hb (g/dL)	14,728 (± 1,848)	14,281 (± 1,882)	19,5 (± 4,5)	* 0,0021
Hm (x10 ⁶ /L)	4,275 (± 0,545)	4,107 (± 0,600)	5,4 (± 1,3)	* 0,0001
Índices hematimétricos				
VCM (fL)	108,352 (± 6,00)	108,420 (± 4,935)	108,0 (± 6,5)	** 0,6516
HCM (pg)	34,639 (± 3,796)	34,886 (± 3,763)	36,0 (± 3,0)	** 0,4047
CHCM (%)	31,965 (± 2,854)	32,179 (± 3,292)	34,0 (± 2)	** 0,3788
N - número de RNs	*ANOVA		** Kruskal - Wallis H	

Considerando que estes valores poderiam estar sendo influenciados pela inclusão de RN prematuros foram verificados os valores hematológicos e os índices hematimétricos entre os RN prematuros e nascidos a termo, não havendo diferenças estatísticas nas análises. Dentre os RN nascidos a termo a média de Hb foi de 14,688 g/dL (DP± 1,803); Ht de 45,880 % (DP± 5,872); Hm de 4,244 x10⁶/L (DP± 0,566); VCM de 108,337fL (DP± 5,662); HCM de 34,787 pg (DP± 3,877) e CHCM de 32,112 % (DP± 3,110). Entre os RN prematuros, a média de Hb foi de 14,106 g/dL (DP± 2,201); de Ht 45,015 % (DP± 5,676) e de Hm 4,126 x10⁶/L (DP± 0,570); de VCM 109,410fL (DP± 5,782); de HCM 34,260 pg (DP± 3,530) e de CHCM 31,299 % (DP± 2,647). No entanto, quando esta mesma análise foi realizada entre os RNs da

Tsylla Balbino, foram encontradas diferenças estatísticas para Hb e Hm, com $p = 0.0058$ e 0.0212 , respectivamente; diferenças estatísticas foram encontradas para os valores de VCM e CHCM dos RNs da maternidade Santo Amaro com $p = 0.0147$ e 0.0397 , respectivamente (Tabelas 6.7 e 6.8).

Tabela 6.7. Médias e desvios padrões dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm) e dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) dos RNs nascidos a termos e prematuros - maternidade Tsylla Balbino - Salvador - Bahia.

	RN prematuro (N = 57)	RN a Termo (N = 461)	valor - P
Dados			
Hematológicos			
Hb (g/dL)	14,160 (\pm 1,931)	14,858 (\pm 1,780)	* 0,0058
Ht (%)	44,942 (\pm 5,369)	46,457 (\pm 5,742)	* 0,0589
Hm $\times 10^6/L$	4,130 (\pm 0,539)	4,304 (\pm 0,537)	* 0,0212
Índices			
Hematimétricos			
VCM (fL)	109,077 (\pm 5,0303)	108,389 (\pm 6,021)	** 0,3616
HCM (pg)	34,393 (\pm 2,957)	34,723 (\pm 3,956)	** 0,8350
CHCM (%)	31,519 (\pm 2,109)	32,037 (\pm 3,034)	** 0,9498

N - número de RNs

*ANOVA

** Kruskal - Wallis H

Tabela 6.8. Médias e desvios padrões dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm) e dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) dos RNs nascidos a termos e prematuros - maternidade Santo Amaro - Salvador - Bahia.

	RN prematuro (N = 10)	RN a Termo (N = 205)	valor - P
Dados Hematológicos			
Hb (g/dL)	13,800, ($\pm 3,493$)	14,304 ($\pm 1,798$)	** 0,7115
Ht (%)	45,430 ($\pm 7,528$)	44,580 ($\pm 5,969$)	* 0,6646
Hm x10⁶/L	4,107 ($\pm 0,368$)	4,110 ($\pm 0,570$)	** 0,9869
Índices Hematimétricos			
VCM (fL)	111,310 ($\pm 8,094$)	108,220 ($\pm 4,766$)	** 0,0147
HCM (pg)	33,500 ($\pm 6,017$)	34,931 ($\pm 3,696$)	** 0,680
CHCM (%)	30,040 ($\pm 4,655$)	32,282 (± 276)	* 0,0397

N - número de RNs

*ANOVA

** Kruskal - Wallis H

As médias dos dados hematológicos e índices hematimétricos com seus respectivos desvios padrões e p-value, por tipo de hemoglobinas nas maternidades Tsylla Balbino (Tabelas 6.9) e Santo Amaro (Tabelas 6.10) são apresentados abaixo.

Tabela 6.9. Médias dos valores e índices hematológicos por perfil de hemoglobinas nos RNs da maternidade Tsylla Balbino - Salvador – Bahia.

Perfil de Hb	Hb (g/dL)	Ht (%)	Hm ($\times 10^6/L$)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)
	Média	Média	Média	Média	Média	Média
	(\pm DP)	(\pm DP)	(\pm DP)	(\pm DP)	(\pm DP)	(\pm DP)
FA (N = 429)	14,759 (\pm 1,829)	46,291 (\pm 5,881)	4,292 (\pm 0,549)	108,392 (\pm 6,287)	34,586 (\pm 3,659)	31,883 (\pm 6,728)
FAC (N = 36)	14,586 (\pm 1642)	44,200 (\pm 6,903)	4,091 (\pm 0,642)	108,106 (\pm 3,914)	36,319 (\pm 6,356)	33,608 (\pm 5,883)
FAS (N = 48)	14,617 (\pm 2,010)	45,629 (\pm 5,908)	4,224 (\pm 0,511)	108,063 (\pm 5,958)	34,629 (\pm 2,357)	32,029 (\pm 0,843)
FSC (N = 04)	14,725 (\pm 2,483)	48,750 (\pm 5,560)	4,450 (\pm 0,470)	109,550 (\pm 5,454)	33,450 (\pm 4,978)	30,550 (\pm 4,204)
FS (N = 01)	12,900	40,900	3,710	110,300	34,900	31,600
p- value	**p = 0,43	**p = 0,2891	*p = 0,1822	**p = 0,8576	*p = 0,1223	*p = 0,0109

N - Número de RNs analisados DP - Desvio Padrão *ANOVA **Kruskal – Wallis H

Teste de redução da metahemoglobina (Teste de Brewer) foi realizado em 741 RNs, sendo encontrada prevalência da deficiência de HbPD no 0,60% (71). Quando distinguímos por maternidade, a Santo Amaro apresentou prevalência de 7,8% (17) e a Tsylla Balbino de 10,30% (54), com χ^2 de 6,0 e *p*-valor de 0,0142 com Odds Ratio de 2,146 (2,6-17,1).

Tabela 6.10. Médias dos valores e índices hematológicos por perfil de hemoglobinas nos RNs da maternidade Santo Amaro - Salvador – Bahia.

Perfil de Hb	Hb (g/dL)	Ht (%)	Hm ($\times 10^6/L$)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)
	Média	Média	Média	Média	Média	Média
N = 205	(\pm DP)	(\pm DP)	(\pm DP)	(\pm DP)	(\pm DP)	(\pm DP)
FA (N = 197)	14,395 (\pm 1,911)	45,201 (\pm 5,459)	4.180 (\pm 0,527)	108,288 (\pm 4,773)	34,545 (\pm 3,263)	31,885 (\pm 2,503)
FAC (N = 02)	11,850 (\pm 0,636)	28,500 (\pm 8,627)	2,690 (\pm 0,608)	105,150 (\pm 8,415)	45,050 (\pm 13,223)	43,450 (\pm 16,051)
FAS (N = 06)	14,217 (\pm 0,861)	43,383 (\pm 6,657)	3,923 (\pm 0,692)	111,133 (\pm 9,644)	36,967 (\pm 4,987)	33,300 (\pm 4,209)

*p = 0,4648 *p = 0,0135 *p = 0,0030 *p = 0,6087 *p = 0,0004 *p < 0,0001

N - Número de RNs analisados DP - Desvio Padrão *ANOVA **Kruskal - Wallis H

A eletroforese da G6PD foi realizada nas 71 amostras positivas para a deficiência pelo método de Brewer; todas as amostras apresentaram um padrão de mobilidade semelhante ao da variante A.

O teste de redução da metahemoglobina (Teste de Brewer) foi realizado em 741 RNs, demonstrando prevalência da deficiência de G6PD de 9,60% (71). Quando distinguimos por maternidade, a Santo Amaro apresentou prevalência de 7,8% (17) e a Tsylla Balbino de 10,30% (54), com χ^2 de 6.0 e p-value de 0,0142 com Odds ratio de 2 (Tabela 6.11).

Tabela 6.11. Distribuição da Deficiência da Desidrogenase de Glicose 6 fosfato pelo Teste de redução da metahemoglobina (Teste de Brewer) em recém-nascidos das maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro - Salvador - Bahia.

BREWER	MATERNIDADE TSYLLA BALBINO	MATERNIDADE SANTO AMARO	TOTAL
POSITIVO	54 (10,30%)	17 (7,80%)	9.60 % (71)
NEGATIVO	468 (89,70%)	295 (92,20%)	90.40 % (670)
TOTAL	522	312	741

$\chi^2 = 6.0$ p-value = 0,0142 Odds ratio = 2

Quando foi analisada a associação da deficiência da G6PD e gênero dos RNs, a maternidade Tsylla Balbino apresentou prevalência de 6,53% (29) para o gênero feminino e 4,28% (19) para o masculino e a maternidade Santo Amaro apresentou 4,78% (10) para o gênero feminino e 2,87% (06) para o masculino, sem diferenças estatísticas (Tabela 6.12).

Com relação a prematuridade, cinco RNs foram deficientes da G6PD, sendo todos os cinco nascidos aos oito meses. Estes resultados não foram significativos.

Tabela 6.12. Distribuição da Deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato pelo teste de redução da metahemoglobina (Teste de Brewer) entre os gêneros dos recém-nascidos das maternidades Tsylla Balbino e do Hospital Santo Amaro - Salvador - Bahia.

Teste de Brewer	Maternidade Tsylla Balbino (444)		Maternidade Santo Amaro (209)		Total	
	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino
Positivo	29 (6,53%)	19 (4,28%)	10 (4,78%)	06 (2,87%)	39 (5,98%)	25 (3,82%)
Negativo	201 (45,27%)	195 (43,92%)	112 (53,59%)	81 (38,76%)	313 (47,93%)	276 (42,27%)
Total	230	214	122	87	352	301

A análise entre a deficiência da G6PD e os RNs portadores de hemoglobinas variantes demonstrou uma prevalência de 14,29% no grupo de RNs FAS e 6,67 no grupo de RNs FAC. Cumpre ressaltar que o único RN FS foi positivo para a deficiência da G6PD. Estes dados foram significativos, com χ^2 de 9.09 e $p = 0.0281$, sendo também significativo quando realizada somente entre os RNs da maternidade Tsylla Balbino, encontrando diferenças significantes, com χ^2 de 11.48 e $p = 0.0303$.

Entretanto, quando analisamos a deficiência da G6PD com o total das hemoglobinas variantes (AS, AC, SC e SS) e o padrão normal (FA), não houve diferenças significativas (Tabela 6.13).

Tabela 6.13. Associação da deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato e perfil de hemoglobinas apresentados pelos RNs das Maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro - Salvador / Bahia.

Perfis de Hemoglobina	Maternidade Tsylla Balbino (463)		Maternidade Santo Amaro (199)		Total
	Brewer (+)	Brewer (-)	Brewer (+)	Brewer (-)	
FA	37 (7,99%)	352 (76,03%)	16 (8,04%)	180(90,45%)	585
FAC	02 (0,43%)	28 (6,05%)	0	0	30
FAS	05 (1,08%)	34 (7,34%)	01 (0,50%)	02 (1,01%)	42
FSC	0	04 (0,87%)	0	0	04
FS	01 (0,22%)	0	0	0	01
Total	45	418	17	182	662

Análise de todos os RNS

= χ^2 de 9.09 e p = 0.0281

Análise dos RNs da maternidade Tsylla Balbino

= χ^2 de 11.48 e p = 0.0303

(+) Positivo

(-) Negativo

A tabela 6.14 apresenta a análise dos dados hematológicos e índices hematimétricos entre os RNs portadores da deficiência da G6PD e provenientes da maternidade Tsylla Balbino.

Tabela 6.14. Associação da deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato, dados hematológicos (Ht, Hb, Hm) e índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) dos RNs da maternidade Tsylla Balbino - Salvador - Bahia.

Variáveis	Número de RNs		Valores de referência (WALLAC, 2000) Média (± DP)	p-value
	Brewer – (451)	Brewer + (54)		
Dados Hematológicos				
Ht (%)	45,723 (± 5,904)	46,607 (±4,665)	57,0 (± 13,0)	** 0,5763
Hb (g/dL)	14,655 (±1,934)	14,820 (±1,367)	19,5 (± 4,5)	** 0,6398
Hm (x10⁶/L)	4,244 (±0,554)	4,220 (±0,447)	5,4 (± 1,3)	* 0,5680
Índices hematimétricos				
VCM (fL)	108,217 (±6,053)	110,628 (±5,518)	108,0 (± 6,5)	* 0,0054
HCM (pg)	34,711 (±3,959)	35,276 (±3,004)	36,0 (± 3,0)	** 0,1758
CHCM (%)	32,076 (±3,024)	31,872 (±2,016)	34,0 (± 2)	** 0,0489

() número de RNs *ANOVA ** Kruskal - Wallis H

(+) Positivo (-) Negativo

A tabela 6.15 apresenta a análise dos dados hematológicos e índices hematimétricos entre os RNs portadores da deficiência da G6PD e da maternidade Santo Amaro.

Tabela 6.15. Associação da deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato, dados hematológicos (Ht, Hb, Hm) e índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) dos RNs da maternidade Santo Amaro - Salvador - Bahia.

Variáveis	Valores de referência			p-value
	Brewer – (156)	Brewer + (13)	(WALLAC, 2000) Média (± DP)	
Dados Hematológicos				
Ht (%)	44,629 (± 5,756)	48,031 (±5,814)	57,0 (± 13,0)	* 0,0423
Hb (g/dL)	14,338 (±1,787)	15,215 (±1,749)	19,5 (± 4,5)	* 0,0904
Hm (x10 ⁶ /L)	4,106 (±0,605)	4,250 (±0,495)	5,4 (± 1,3)	* 0,4048
Índices hematimétricos				
VCM (fL)	108,383 (±4,999)	113,008 (±4,824)	108,0 (± 6,5)	* 0,0015
HCM (pg)	35,008 (±3,683)	35,831 (±1,534)	36,0 (± 3,0)	** 0,1507
CHCM (%)	32,296 (±3,093)	31,715 (±2,501)	34,0 (± 2)	** 0,1064

() número de RNs *ANOVA ** Kruskal - Wallis H

(+) Positivo (-) Negativo

A caracterização molecular das mutações 202 e 376 no gene da G6PD foi investigada pela técnica de PCR e RFLP. Após esta etapa foi realizado o sequenciamento gênico, visando confirmar o resultado obtido no RFLP e ao mesmo tempo realizar a pesquisa de mutações novas.

Dos 71 RNs positivos pela técnica de Brewer, 66 foram caracterizados molecularmente, correspondendo a 51 da maternidade Tsylla Balbino e 15 da

maternidade Santo Amaro. Os resultados demonstraram 57 (86,36%) portadores de ambas mutações (202 / 376); quatro (6,06%) portadores somente da mutação 202; dois (3,03%) portadores somente da mutação 376 e três (4,54%) negativos para ambas as mutações (202 / 376) (Tabela 6.16). Entre os 57 RNs portadores da mutação 202 / 376, dois (3,51%) foram homocigotos para a mutação 376.

De acordo com a análise de equilíbrio de HARDY-WEINBERG (ROBINSON & OSORIO, 2001) levando-se em consideração genes ligados ao sexo, a frequência alélica para o gene deficiente foi de 0,096 e para o gene normal foi de 0,904. Quando o cálculo foi realizado para os homens, a frequência genotípica para os afetados foi de 0,0633 e para os normais de 0,9367. No caso das mulheres afetadas, foi de 0,1226 e para as normais de 0,8774, sendo que a frequência genotípica das mulheres afetadas foi o dobro do encontrado nos homens.

Tabela 6.16. Distribuição das mutações 202 e 376 presentes no gene da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato em RNs das maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro - Salvador -Bahia.

Mutações	Maternidade	Maternidade	Total
	Tsylla Balbino	Santo Amaro	
202	02	02	04
376	02	0	02
202/376	46	11	57
Negativo	01	02	03
Total	51	15	66

A tabela 6.17 apresenta a associação entre os dados hematológicos e índices hematimétricos entre as mutações encontradas nos RNs portadores da deficiência da G6PD.

Da análise estatística realizada, apesar dos 86,36% (57) portadores das mutações 202/376 terem apresentado hemoglobina e hematócrito não foram encontradas diferenças significativas. Da mesma maneira, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os portadores das mutações 202/376 no momento do nascimento e prematuridade.

Tabela 6.17. Associação da deficiência da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato, dados hematológicos (Ht, Hb, Hm) e índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) nas diferentes mutações encontradas entre os RNs das maternidades Tsylla Balbino e Santo Amaro- Salvador - Bahia.

	M 202	M 376	M 202/376	N	p-value (Anova)
Variáveis					
Dados					
Hematológicos					
Ht (%)	55,800 (± 8,054)	42,30 (± 3,960)	46,507 (± 4,357)	48,400 (± 5,902)	* 0,0053
Hb (g/dL)	17,233 (± 2,702)	13,750 (± 1,061)	14,736 (± 1,280)	15,200 (± 1,808)	* 0,02065
Hm (x10⁶/L)	4,730 (± 0,736)	3,925 (± 0,346)	4,183 (± 0,423)	4,600 (± 0,673)	* 0,0741
Índices hematimétricos					
VCM (fL)	118,003 (± 1,343)	107,750 (± 0,778)	111,344 (± 5,301)	105,700 (± 8,180)	** 0,0225
HCM (pg)	36,400 (± 0,173)	35,050 (± 0,354)	35,050 (± 2,975)	33,233 (± 2,804)	** 0,2498
CHCM (%)	30,833 (± 0,451)	32,500 (± 0,566)	31,891 (± 1,997)	31,467 (± 0,252)	** 0,0358

M - Mutação N – Negativo para as duas mutações (202/376) *ANOVA ** Kruskal - Wallis H

De acordo com as análises estatísticas realizadas, apesar dos 86,36% (57) portadores simultaneamente das mutações 202/376 terem apresentando hemoglobinas variantes, não foram encontradas diferenças significativas. Da mesma maneira, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os portadores das mutações, baixo peso ao nascimento e prematuridade.

Entre os portadores da mutação 202 e 376 sozinhas, não foram encontrados hemoglobinas variantes, prematuridade e baixo peso; entre os portadores da mutação 376.

Entre os RNs que apresentaram as mutações 202/376, seis (10,53%) possuíam a inserção de uma adenina na posição 643 do gene da G6PD (Figura 6.3).

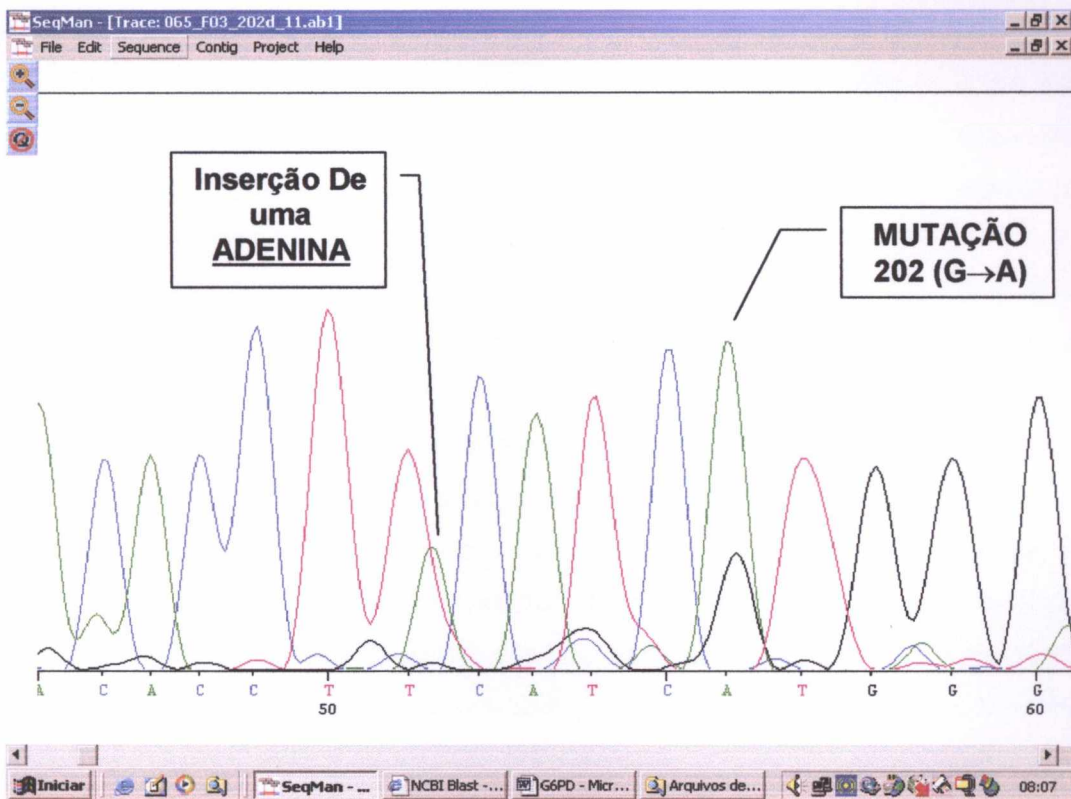


Figura 6.3. Eletroferograma demonstrando a inserção de uma ADENINA na posição 643 do gene da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato.

7 DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

A população brasileira apresenta diversidade étnica importante, sendo que quatro tipos foram fundamentais para a sua formação: os portugueses, representando os caucasóides, que descobriram o país e o colonizaram desde o século XVI até a independência; os negros, originários da África presentes a partir do século XVI até 1850 e trazidos ao Brasil durante os ciclos da cana, mineração e do café; os ameríndios, primeiros senhores da terra e atualmente reduzidos a algumas dezenas de milhares, concentrados no Norte, especialmente na Amazônia, região Centro Oeste e Nordeste; os mestiços, surgidos do cruzamento entre estes três grupos e representados pelos caboclos (descendentes de brancos e ameríndios), mulatos (cruzamento entre brancos e negros) e cafusos (descendentes de brancos e ameríndios) (AZEVEDO, 1973; FREYRE, 2000).

Salvador, capital do estado da Bahia, localiza-se na região nordeste do país, apresenta uma população com miscigenação racial elevada. De acordo com KRIEGER *et al* (1965), a população do nordeste brasileiro apresenta um grau de panmixia de raças de aproximadamente 97%. Estas observações foram posteriormente confirmadas por AZEVEDO (1981) ao realizar um estudo genético e antropológico na Ilha de Itaparica, onde relatou um avanço dinâmico da miscigenação racial na Bahia, com base no aumento contínuo de mulatos, e redução do número de brancos. No presente estudo foi encontrado o predomínio de RNs mulatos e negros, compreendendo um total de 83%, confirmando os dados obtidos por KRIEGER *et al* (1965) e AZEVEDO (1981).

O estudo do perfil de hemoglobinas revelou freqüências elevadas para as hemoglobinas variantes, sendo maior na maternidade Tsylla Balbino (16,97%) que na Santo Amaro (2,88%), com predominância da descendência africana, onde a miscigenação racial foi elevada entre os RNs. Os RNs da maternidade Santo Amaro, apesar de não terem sido classificados por raça, provavelmente apresentam miscigenação racial menor, justificada principalmente pelo nível sócio-econômico das parturientes.

Os nossos resultados mais uma vez confirmam as freqüências elevadas de hemoglobinas variantes na população de Salvador.

As prevalências elevadas para a doença SC (0,91%) e para a anemia falciforme (0,18%) descrito na maternidade Tsylla Balbino chamam a atenção a magnitude do problema de saúde pública presente na população de Salvador, quando comparada a outras populações brasileiras. Ressaltamos que entre as

freqüências descritas em vários envolvendo RNs de várias localidades brasileiras, o nosso estudo demonstrou a freqüência mais elevada para estas hemoglobinopatias já registrada no país, reforçando a necessidade da triagem neonatal universal, bem como a efetivação de medidas públicas relacionadas ao tratamento e acompanhamento destes pacientes (tabela 7.1).

Tabela 7.1. Distribuição de hemoglobinas variantes em diversos estudos realizados no estado da Bahia e no Brasil.

Autor(s)	AZEVEDO <i>et al</i> (1980)	OLIVEIRA <i>et al</i> (1999)	BANDEIRA <i>et al</i> (1999)	SERJEANT <i>et al</i> (2000)	Presente Estudo (2004)	Presente Estudo (2004)
Casuística	1200	1995	1988	605.419	675	279
	Crianças	Gestantes	RNs	RNs	RNs	RNs
Local	Bahia	Bahia	Rio de Janeiro	Minas Gerais	Bahia	Bahia
Hb	10,80 %	10,13 %	5,30%	4,58 %	17,0 %	2,90 %
Variantes						
AS	-	6,75 %	5,10 %	3,20 %	9,30 %	2,20 %
AC	-	3,28 %	0,20 %	1,30 %	6,60 %	0,20 %
SC	-	0,05 %	-	-	0,90 %	-
CC	-	0,05 %	-	0,08 %	0,20 %	-

Apesar da presença de hemoglobinopatias variantes não ter influenciado no peso dos RNs ao nascimento, os dados referentes a prematuridade demonstraram que quando comparados os grupos de RNs nascidos a termo e prematuros, o grupo de RNs prematuros apresentou uma freqüência maior destas hemoglobinas alcançando 13,26% ($p = 0,0107$).

Na análise dos dados de prematuridade por maternidade, a Tsylla Balbino apresentou freqüências mais elevadas para a as hemoglobinas variantes (11,25% $p = 0,0036$ (Mantel-Haenszel) demonstrando mais uma vez as diferenças existentes entre as parturientes das maternidades, especialmente as diferenças relacionadas ao poder aquisitivo, escolaridade e acompanhamento pré-natal adequado).

A prematuridade também foi associada ao tipo de hemoglobina presente e a deficiência de G6PD, não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas. A análise estatística da média de peso dos RN com diferentes perfis

de hemoglobina em associação com a deficiência de G6PD também não demonstrou diferenças, confirmando a ausência de alteração no peso em portadores de hemoglobinas variantes, estando em consenso com os resultados de BAILL & WITTER (1986) em estudo caso-controle realizado em RNs de Baltimore - EUA, e os de BANDEIRA *et al.* (1999) que analisaram RNs em Pernambuco, onde também não foram encontradas diferenças.

De acordo com a análise dos dados hematológicos e a sua comparação com os valores de referências de registrados por WALLACH (2000), observou-se que os RNs analisados apresentaram valores hematológicos médios situados no limite inferior da normalidade, apesar dos padrões serem americanos, devido a ausência de valores de referência da população estudada. A análise das características hematológicas entre os grupos de RN prematuros e nascidos a termo, demonstrou diferenças estatísticas quando a análise foi realizada entre as maternidades, sendo que a Tsylla Balbino apresentou para Hb e Hm, com $p = 0.0058$ e 0.0212 , respectivamente. Na maternidade Santo Amaro foram descritas diferenças para os valores de VCM e CHCM com $p = 0.0147$ e 0.0397 , respectivamente.

Estudos relacionados ao encontro de manifestações clínicas em indivíduos portadores de heterozigose para as hemoglobinas S e C têm demonstrado que estes possuem complicações equivalentes as descritas para a população no geral, sendo considerados portadores saudáveis. Acreditamos que a associação encontrada entre a presença de hemoglobinas e prematuridade esteja basicamente relacionada ao número elevado de partos prematuros ocorridos na maternidade pública, uma vez que a maioria das gestantes não realizou exames pré-natais ou foram acompanhadas por cuidados médicos e nutricionais adequados. De acordo com estudos realizados por MORRISON *et al.* (1980); MILNER *et al.* (1980) e CHARACHA *et al.* (1980), os cuidados atualmente voltados a gestantes são as causas mais importantes para a diminuição da estatística referente a prematuridade e mortalidade de RNs em portadoras de hemoglobinopatias, em especial da anemia falciforme. De acordo com SERGEANT (1983), a possível causa de morte neonatal em RNs de mães falcêmicas é a vaso oclusão ocorrida na placenta. Os encontros registrados após a morte estão decorrentes da hipóxia intra-parto (ANDERSON, 1971).

A análise dos dados hematológicos entre os RNs com perfil normal de hemoglobinas (FA) e portadores de hemoglobinas variantes demonstrou diferenças significativas somente para os valores de Hm ($p = 0,0335$). Quando comparados os

dados hematológicos dos RNS com hemoglobina normal (FA) e os portadores da hemoglobina S em heterozigose (FAS), não foram encontradas diferenças significativas. Todavia, quando os dados hematológicos dos RNs com hemoglobina normal (FA) foram associados com a variante heterozigótica C (FAC), o CHCM foi significativo, ($P < 0,0001$). Estes valores hematológicos mais elevados para o grupo AC tem sido relacionada ao aumento da viscosidade interna e do conteúdo total de cálcio presente nas hemácias contendo a HbC, como descrito por LUKENS (1999).

A deficiência da G6PD foi de 7,8% nos RNs da maternidade Santo Amaro e 10,35% na Maternidade Tsylla Balbino. A deficiência da G6PD possui diferenças marcantes entre as populações e grupos étnicos brasileiros, sendo descritas prevalências de 10% em homens afro-descendentes e de 1 a 3% em euro-descendentes (LEWGOY & SALZANO, 1968; BEIGUELMAN *et al.*, 1970; SALDANHA *et al.*, 1969; RAMALHO *et al.*, 1985). Prevalências de 10 a 12% tem sido descritas entre negros americanos (CALVERT & TRIMBLE, 1980), podendo chegar a 65% entre os judeus Curdos (OPPENHEIM, 1993). No presente estudo encontramos freqüências da deficiência da G6PD no grupo caucasóide de 10,26%, enquanto no grupo de afro-descendentes foi de 11,59%. Apesar da deficiência da G6PD estar associada a raça negra, este resultado reforça a prevalência maior desta enzimopatia descendentes africanos (CALVERT & TRIMBLE, 1980).

Nosso estudo não encontrou diferenças significativas entre os grupos de RNs portadores da deficiência da G6PD com e sem hemoglobinas variantes (FAS, FAC, FSC e FS). Entretanto, quando investigamos a deficiência da G6PD entre os portadores do perfil de hemoglobina FAS, encontramos a prevalência de 14,29% para os deficientes; a deficiência da G6PD foi também encontrada no único RN falcêmico (FS) diagnosticado.

Apesar de diversos estudos terem descritos prevalências elevadas para a deficiência da G6PD entre grupos portadores da anemia falciforme (LEWIS & HATHORN, 1965; PIOMELLI, *et al.*; SAMUEL, *et al.*, 1972), vários outros também levantaram controvérsias sobre esta afirmação, concluindo não haver diferenças entre os portadores da deficiência e da população geral (BIENZLE *et al.*, 1975; STEINBERG *et al.*, 1988; BEUTLER *et al.*, 1974).

De acordo com nossos resultados, a deficiência da G6PD foi mais prevalente no grupo dos RNs portadores do perfil FAS, indicando uma concordância com o primeiro grupo de estudos.

Com relação aos valores hematológicos, não encontramos diferenças nos vários grupos investigados, confirmando os resultados descritos por BOUANGA *et al.* (1998), onde demonstrou não haver diferenças significativas entre a deficiência da G6PD e valores hematológicos. Estudo de NAYLOR *et al.* (1960) e SMITS *et al.* (1969) também não encontraram associação entre estes dois grupos, sendo também confirmado por SAAD & COSTA em 1992 em estudo realizado em brasileiros. Entretanto, estudos mostraram efeito protetor das crises hemolíticas em portadores da anemia falciforme quando estes apresentavam também a deficiência da G6PD (LEWIS & HATHORN, 1965; EL-HAZMI & WARSY, 1989).

Baseados nestes dados, visualizamos a necessidade de se realizar o estudo da G6PD em portadores da doença falciforme (SS) e (SC) de Salvador-Bahia, visto que nossa população apresenta miscigenação elevada e grande contingente de indivíduos afro-descendentes, visando estudar a hipótese da vantagem biológica aos portadores da anemia falciforme.

A caracterização molecular das mutações 202 e 376 foi realizado em 66 RNs dos 71 deficientes da G6PD, sendo que 57 (86,36%) apresentaram ambas mutações (A-^{202/376}); quatro (6,06%) somente a mutação 202 (G6PD²⁰²); dois (3,03%) somente a mutação 376, sendo que três (4,55%) não apresentaram as mutações investigadas.

As mutações 202/376 quando encontradas simultaneamente têm sido associadas a presença da variante G6PD A- e classificada como classe 3.

Portanto, a descrição de 86,36% para o encontro simultâneo das mutações 202/376 no grupo estudado, confirma as prevalências de aproximadamente 89,39% para a variante G6PD A- descritas por SALDANHA *et al.* (1969) e AZEVEDO & YOSHIDA (1969) que investigaram a deficiência da G6PD em São Paulo, principalmente aqueles de AZEVEDO (1973) em RNs do Hospital Universitário Edgard Santos na cidade de Salvador, Bahia. Prevalências semelhantes foram também encontradas por RAMALHO & BEIGUELMAN (1976) em doadores de bancos de Sangue da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Além da mutação 202, a mutação 376 pode estar associada as mutações 680T ou 968C (BEUTLER *et al.*, 1989a,b). As mutações 542T e 1159T podem conduzir a uma anemia hemolítica quando encontrada juntas ou separadas da mutação 376 (BEUTLER, 1994; VLACHOS *et al.*, 1998). Uma explicação aceitável para a associação da mutação 376 com outras mutações africanas é fornecida pelos

achados de TOWN *et al.* (1992), que atribuíram a deficiência a mutação 202A sozinha não associada a deficiência da enzima, sendo necessária em conjunto com a mutação 376. Assim, é possível que as mutações 202, 680, e 968 não tenham nenhuma vantagem seletiva com relação à malária quando ocorrerem em um gene de G6PD que não tenha a mutação 376.

Cumprе ressaltar que a variante G6PD A- também já foi encontrada associada a mutação 542T, conhecida como Santamaría^{376/542T}, sendo descrita apenas na população da Costa Rica (BEUTLER, 1991b) e a mutação 968C (A-^{376/968C}), também encontrada na população Africana, porém, com menor frequência.

Uma mutação que não está associada com a G6PD A- é conhecida como Mt. Sinai envolve a associação das mutações 376 e 1159T. A outra mutação que também não está associada com a mutação 376 e conhecida como G6PD A ou A⁺.

De acordo com nossas análises dois RNs apresentaram a mutação 376 sozinha, podendo nestes casos, tratar-se da variante G6PD A⁺ ou possuir uma das outras mutações acima citadas e que não foram investigadas no presente estudo, além da mutação Mediterrânea já descrita por outros estudos no Brasil.

A mutação 202 isolada só foi descrita uma única vez por HIRONO *et al.* (2002), que a localizou em uma criança de três anos de idade e portadora de hemólise aguda, com anemia importante. Cumprе ressaltar que estas manifestações clínicas não foram encontradas entre os RNs portadores da mutação 202, que apresentaram dados hematológicos normais. Além do mais, o encontro de quatro Rns apresentando a mutação 202 sozinha trata-se de um fato novo e ainda não descrito no Brasil.

O achado de seis RNs portadores das mutações 202/376 e apresentando a inserção de uma adenina na posição 643 do gene da G6PD pode representar uma mutação de mudança de matriz de leitura (*frameshift mutation*), necessitando a realização de estudos adicionais no RNAm direcionados a atividade catalítica da enzima, visando estabelecer se esta inserção em conjunto com as mutações já previamente descritas pode acarretar mudanças estruturais e/ou diminuição ou aumento da atividade enzimática. Desta forma, estudos moleculares complementares possibilitaria evidenciar a influência desta inserção no quadro clínico dos portadores destas mutações e até mesmo de situações secundárias a crises hemolíticas cursadas por estes indivíduos.

A deficiência da G6PD pode ser pesquisada por diversas técnicas, uma delas é o teste de Brewer. Em 1968, BEUTLER & MITCHELL introduziram um teste rápido

para a detecção da deficiência da G6PD mas que apresentava muitos resultados falso-positivos. Uma tentativa de melhorar a técnica foi proposta por SCHOOS-BARBETTE *et al.* (1976) que propuseram a sua realização em sangue coletado em papel e ao mesmo tempo seco para a diferenciação dos falsos positivos. FOK *et al.*, (1985) realizaram um ensaio enzimático instantâneo e direto, conseguindo identificar mulheres homozigóticas e homens hemizigotos para a deficiência da G6PD; entretanto, o teste foi insatisfatório na detecção de mulheres heterozigóticas.

No nosso estudo foram encontrados 71 portadores da deficiência da G6PD, sendo que 66 foram caracterizados molecularmente. Destes, a deficiência da G6PD não foi confirmado em três, demonstrando que o teste de Brewer pode ter apresentado especificidade de 57% e sensibilidade de 94,5% ou estes RNs podem possuir outras mutações não investigadas neste estudo.

Baseados nos nossos resultados julgamos de grande importância a realização de estudos que abordem o metabolismo oxidativo em portadores da doença falciforme, de maneira que possamos confirmar ou não a hipótese do benefício da associação com a deficiência da G6PD .

Respaldamos esta afirmativa, tendo como base os resultados obtidos no presente estudo, onde a prevalência da deficiência da G6PD foi significativamente maior no grupo dos RNs FAS

8 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados podemos concluir que:

- A deficiência de G6PD nos RNs foi encontrada em uma prevalência de 9,60% no total dos RNs investigados, sendo de 7,80% na maternidade Santo Amaro e de 10,30% na Tsylla Balbino. Entretanto, apresentou prevalência de 11,55% quando analisada entre os afro-descendentes, confirmando o encontro de 82,98 de mulatos e negros;
- A frequência de prematuridade foi elevado entre os RNs portadores de hemoglobinas variantes (18,84%), sem no entanto apresentar associação com a deficiência da G6PD;
- A deficiência da G6PD foi encontrada em uma prevalência de 14,29% entre os portadores do perfil de hemoglobinas FAS discordando de outros estudos realizados no Brasil;
- A variante G6PD A⁻ está associada a presença das mutações 202/376 simultaneamente na maioria dos indivíduos positivos, confirmando o predomínio desta variante neste grupo populacional. O encontro da inserção de uma adenina na posição 643 do gene da G6PD associada as mutações 202/376 poder representar uma mutação de mudança de matriz de leitura, necessitando estudos adicionais comprobatórios;
- A mutação 202 foi encontrada isoladamente pela primeira vez no Brasil e pode estar associada a uma variante nova na nossa população, merecendo estudos adicionais. Cumpre ressaltar que no mundo, esta mutação só foi descrita uma única vez no Japão;
- Quanto à mutação 376 isolada, esta pode estar associada à mutações já descritas ou a variante A⁺;
- Não foram encontradas associações significativas entre os dados hematológicas e a deficiência da G6PD;

- As amostras negativas requerem estudos adicionais, uma vez que podem apresentar a variante Mediterrânea ou outras mutações que cursam com crises hemolíticas quando associadas a 376, tais como as mutações 968C , 680T, 542T e 1159T;
- Cumpre ressaltar que a presente investigação caracteriza-se no primeiro estudo molecular da deficiência da G6PD no estado da Bahia.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, M.F. The foetal risks in sickle cell anaemia. **West Indian Med. J.**, **20**:288-295, 1971.
- ANTONARAKIS, S. E.; BOEHM, C. D.; SERJEANT, G. R.; THEISEN, C.E.; DOVER, G. J.; KAZAZIAN JUNIOR, H. H. Origin of the β^S -globin gene in blacks: the contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **81**: 853-856, 1984.
- AZEVEDO, E.S.; YOSHIDA, A. Brazilian variant of glucose 6-phosphate dehydrogenase (Gd Minas Gerais). **Nature**, **222**:380-382, 1969.
- AZEVEDO, E. Historical note on inheritance of sickle cell anemia. **Am. J. Hum. Genet.**, **25**: 457-458, 1973.
- AZEVEDO, S.A.; AZEVEDO, T.F.S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and neonatal jaundice in Bahia, Brasil. **Ciêñ., Cult.**, **26**: 1974.
- AZEVEDO, W.C.; SILVA, M.L.; GRASSI, M.C.; AZEVEDO, E.S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in a general hospital of Salvador, Bahia, Brazil. **Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.**, **11**: 49-52, 1978.
- AZEVEDO, E.S. Subgroup studies of black admixture within a mixed population of Bahia, Brazil. **Ann. Hum. Genet. Londers.**, **44**: 55-60, 1980.
- AZEVEDO, E.S.; ALVES, A.F.; SILVA, M.C.; SOUZA, M.G.; LIMA, A.M.; AZEVEDO, W.C. Distribution of abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in 1200 school children of Bahia, Brazil. **Am. J. Phys. Anthropol.**, **53**: 509-512, 1980.
- AZEVEDO, E.S.; SILVA, K.M.; SILVA, M.C.; LIMA, A.M.; FORTUNA, C.M.; SANTOS, M.G. Genetic and anthropological studies in the island of Itaparica, Bahia, Brazil. **Hum. Hered.**, **31**: 353-357, 1981.

AZEVEDO, E.S.; FORTUNA, C.M.; SILVA, K.M.; SOUZA, M.G.; MACHADO, M.A.; LIMA, A.M.; AGUIAR, M.E.; ABÉ, K.; EULÁLIO, M.C.; CONCEIÇÃO, M.M.; SILVA, M.C.; SANTOS, M.G. Spread and diversity of human populations in Bahia, Brazil. **Hum. Biol.**, **54**:329-341, 1982.

AYI, K.; TURRINI, F.; PIGA, A.; ARESE, P. Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes. A common mechanism that may explain protection against falciparum-malaria in sickle-trait and beta-thalassemia-trait. **Blood**, 2004

BAILL, I.C.; WITTER, F.R. Sickle cell trait and its association with birthweight and urinary tract infections in pregnancy. **Int. J. Gynaec. Obstet.**, **33**:19-21, 1986.

BANDEIRA, F.M.G.C.; LEAL, M.C.; SOUZA, R.R.; FURTADO, V.C.; GOMES, Y.M.; MARQUES, N.M. Características de recém-nascidos portadores de hemoglobina "S" detectados através de triagem em sangue de cordão umbilical. **J. Ped.**, **75**: 167-171, 1999.

BARRETO, O. C. Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.**, **3**: 61-65, 1970.

BEIGUELMAN, B.; COLLI-INGLEZ, G.; BONDER-ITSKAN, S.; SALDANHA, P.H. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity among Caucasoid twins. **Hum. Hered.**, **20**:535-539, 1970.

BETKE, K.; BEUTLER, E.; BREWER, G.J.; KIRKMAN, H.N.; LUZZATTO, L.Ç MOTULSKY, A.G.; RAMOT, B.; SINISCALCO, M. Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Report of a WHO scientific group. **WHO Tech. Rep. Ser.**, (366): 1967.

BEUTLER, E.; DERN R. J.; FLANAGAN C.L.; ALVING A.S. The hemolytic effect of primaquine. VII. Biochemical studies of drug-sensitive erythrocytes. **J. Lab. Clin. Med.**, **45**:286-295, 1955.

BEUTLER, E.; JOHNSON, C.; POWARS, D.; WEST, C. Prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in sickle-cell disease. **N. Engl. J. Med.**, **290**:826-828, 1974.

BEUTLER E. Diagnosis of G6PD. deficiency. **Lancet**, **2**:1032-1033, 1975.

BEUTLER, E. and MITCHELL, M. Special modifications of the fluorescent screening method for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Blood**, **32**:816-818, 1968.

BEUTLER, E.; VIVES-CORRONS, J.L.; HIRONO, A.; PRCHAL, J.T.; CRADER, W. The molecular biology of variation in glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Prog. Clin. Biol. Res.**, **319**:39-54, 1989a,b.

BEUTLER, E.; KUHL, W.; VIVES-CORRONS, J.L.; PRCHAL, J.T. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase A-. **Blood**, **15**:2550-2555, 1989a,b.

BEUTLER, E. and KUHL, W. The NT 1311 polymorphism of G6PD: G6PD Mediterranean mutation may have originated independently in Europe and Asia. **Am. J. Hum. Genet.** **47**:1008, 1990.

BEUTLER, E.; LISKER, R.; KUHL, W. Molecular biology of G6PD variants. **Biomed. Biochim. Acta.**, **49**:236-241, 1990.

BEUTLER, E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **New Engl. J. Med.**, **324**,p169-174, 1991a.

BEUTLAR, E. **Red cell metabolism**: a manual of biochemical methods. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PDG). 2nd ed.: Grune and Stratton, 1991b. p.66-69.

BEUTLER, E.; KUHL, W.; GELBART, T.; FORMAN, L. DNA sequence abnormalities of human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. **J Biol. Chem.**, **266**:4145, 1991.

BEUTLER, E. ; KUHL, W. Unpublished observations, 1991.

BEUTLER, E. G6PD deficiency. **Blood**, **84**:3613-3636, 1994.

BIENZLE, U.; SODEINDE, O.; EFFIONG, C.E.; LUZZATTO, L. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and sickle cell anemia: frequency and features of the association in an African community. **Blood**, **46**:591-597, 1975.

BIRCHMEIER, W. and SINGER, S.J. On the mechanism of ATP-induced shape changes in human erythrocyte membranes. II. The role of ATP. **J. Cell Biol.**, **73**:647-659, 1977.

BOUANGA, J.C.; MOUELE, R.; PREHU, C.; WAJCMAN, H.; FEINGOLD, J.; GALACTEROS, F. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and homozygous sickle cell disease in Congo. **Hum. Hered.**, **48**:192-197, 1998.

BRIGELIUS, R. **Oxidative stress: Mixed disulphides: biological functions and increase in oxidative stress.** Sies, H. ed.; London, Academic Press Inc. 1985. p. 260-266.

BRITISH National Formulary 47. March, 2004. Disponível em <<http://bnf.org/bnf/bnf/current/noframes/index.htm>>. Acesso em: 10 agosto 2004.

BUNN, H.F.; FORGET, G.G. **Hemoglobin: molecular, genetic, and clinical aspects;** Philadelphia, PA: Saunders, 1986.

BUNN, H.F. **The Molecular Basis of Blood Diseases.** In: STAMATOYANNOPOULOS, G.; NIENHUIS, A.W., MAJERUS, P.W.; VARNUS, H. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994. cap. 6, p. 207-56.

BUNN, H.F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.**, **337**: 762-769, 1997.

CALVERT, A.F.; TRIMBLE, G.E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase in an Afro-American population. **Hum. Hered.**, **30**:271-277, 1980.

CAPPELLINI, M.D.; SAMPIETRO, M.; TONIOLO, D.; CARANDINA, G.; MARTINEZ, D.I.; MONTEMUROS, F.; TAVAZZI, D.; FIORELLI, G. G6PD Ferrara I has the same two mutations as G6PD A(-) but a distinct biochemical phenotype. **Hum. Genet.**, **93**:139, 1994.

CARSON, P.E.; FLANAGAN, C.L.; ICKES, C.E.; ALVING, A.S. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. **Science**, **14**:484-485, 1956.

CECIL, K. **Cecil Textbook of Medicine**. 19th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992.

CHARACHE, S. Fetal hemoglobin, sickling, and sickle cell disease. **Adv. Pediatr.**, **37**:1-31, 1990.

CLARK, I.A.; AL YAMAN F.M.; JACOBSON, L.S. The biological basis of malarial disease. **Int. J. Parasitol.**, **27**:1237-1249, 1997.

DACIE, J.; LEWIS, S.M. **Practical Haematology**. 8. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.

DOVER, G.J.; BOYER, S.H.; PEMBREY, M.E. F-cell production in sickle cell anemia: regulation by genes linked to β - hemoglobin locus. **Science**, **211**: 1441-1443, 1981.

EL-HAZMI, M.A.; WARSY, A.S. The effects of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on the haematological parameters and clinical manifestations in patients with sickle cell anaemia. **Trop. Geogr. Med.**, **41**:52-56, 1989.

EMBURY, S.H. Advances in the prenatal and molecular diagnosis of the hemoglobinopathies and thalassemias. **Hemoglobin**, **19**:237-261, 1995.

- FOK, T.F.; LAU, S.P.; FUNG, K.P. Cord blood G-6-PD activity by quantitative enzyme assay and fluorescent spot test in Chinese neonates. **Aust. Paediatr. J.**, **21**:23-25, 1985.
- FREYRE, G. **Casa-grande & senzala**: Introdução à história da sociedade patriarcal no Brasil. 40 ed. Rio de Janeiro: Record, 2000.
- GONÇALVES, M.S.; NECHTMAN, J.F.; FIGUEIREDO, M.S.; KERBAUY, J.; ARRUDA, V.R.; SONATI, M.F.; SAAD, S.O.T.; COSTA, F.F.; STOMING, T.A. Sickle cell disease in a brasilian population from São Paulo: a study of the β^S haplotypes. **Hum. Hered.**, **44**: 322-327, 1994.
- GIBBS, W.N.; WARDLE, J.; SERJEANT, G.R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and homozygous sickle cell disease in Jamaica. **Br. J. Haematol.**, **45**:73-80, 1980.
- GREEN, L. G6PD deficiency as protection against falciparum malaria: an epidemiologic critique of population and experimental studies. **Yearb. Phys. Anthropol.**, **36**:153-178, 1993.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen – toxicity, oxygen radicals, transition-metals and disease. **Biochem. J.**, **219**:1-4, 1984.
- HAMEL, A.R.; CABRAL, I.R.; SALES, T.S.; COSTA, F.F.; OLALLA SAAD, S.T. Molecular heterogeneity of G6PD deficiency in an Amazonian population and description of four new variants. **Blood Cells Mol Dis.**, **28**:399-406, 2002.
- HERSCHEL, M.; BEUTLER, E. Low glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme activity level at the time of hemolysis in a male neonate with the African type of deficiency. **Blood Cells Mol Dis.**, **27**:918-923, 2001.
- HIRONO, A.; BEUTLER, E. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **85**:3951–3954, 1988.

HUGHES-JONES, N.C.; WICKRAMASINGHE, S.N.; HATTON, C.; WICKRAMASINGHE. **Lecture notes on haematology**. 7th ed. Oxford: John Radcliffe Hospital, 2004.

KALMUS, H. Defective colour vision, P.t.c. tasting and drepanocytosis in samples from fifteen Brazilian populations. **Ann. Hum. Genetic.**, **21**:313-317, 1957.

KAY, A.C.; KUHL, W.; PRCHAL, J.; BEUTLER, E. The origin of glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PD) polymorphisms in African-Americans. **Am. J. Hum. Genet.**, **50**:394-398, 1992.

KODA-KIMBLE, M.A.; YOUNG, L.Y.; KRADJAN, W.A.; GUGLIELMO, B.J. **Applied Therapeutics**. 7th ed. The Clinical use of Drugs, 2004.

KRIEGER, H.; MORTON, N.E.; MI, M.P.; AZEVEDO, E.; FREIRE-MAIA, A.; YASUDA, N. Racial admixture in north-eastern Brazil. **Ann. Hum. Genet.**, **29**:113-125, 1965.

LABEQUE, R.; MARNETT, L.J. Reaction of hematin with allylic fatty acid hydroperoxides: identification of products and implications for pathways of hydroperoxide-dependent epoxidation of 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene. **Biochemistry**, **27**:7060-7070, 1988.

LANE, P.A.; O'CONNELL, J.L.; LEAR, J.L.; ROGERS, Z.R.; WOODS, G.M.; HASSELL, K.L.; WETHERS, D.L.; LUCKEY, D.W.; BUCHANAN, G.R. Fuctional asplenia in hemoggllobin SC disease. **Blood**, **85**: 2238-2244, 1995.

LEE, G. R.; FOERSTER J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.P.; RODGERS, G.M.; WINTROBE, M.M. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10th ed., 1999. cap. 43.

LEWIS, R.A.; HATHORN, M. Correlation of s hemoglobin with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and its significance. **Blood**, **26**:176-180, 1965.

LEWGOY, F.; SALZANO, F.M. G6PD deficiency gene dynamics in a Brazilian population. **Acta Genet. Med. Gemellol.**, **17**:595-606, 1968.

LUKENS, J.N. The talassemia and related disorders: quantitative disorders of hemoglobin synthesis. In: LEE, C.W.; FOSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.P.; RODGERS, G.M. **Wintrobe's clinical hematology**. 10th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999. cap. 53, p. 1405-1408.

MEHTA, B.C.; MEHTA, J. Interaction of sickle haemoglobin with malaria. **J. Assoc. Physicians India**, **39**:296-297, 1991.

MOMBO, L.E.; NTOUMI, F.; BISSEYE, C.; OSSARI, S.; LU, C.Y.; NAGEL, R.L.; KRISHNAMOORTHY, R. Human genetic polymorphisms and asymptomatic Plasmodium falciparum malaria in Gabonese schoolchildren. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **68**:186-190, 2003.

MUDD, S.H.; LEVY, H.L.; SKOVBY, F.; SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S. VALLE, D. **The Metabolic Basis of Inherited Diseases**. 7th ed. 1995.

MULLIS, K.B. and FALLONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase - catalized chain reaction. **Methods Enzimol.**, **155**:335-350, 1987.

NAYLOR, J.; ROSENTHAL, I.; GROSSMAN, A.; SCHULMAN, I.; HSIA D.Y. Activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in erythrocytes of patients with various abnormal hemoglobins. **Pediatrics.**, **26**:285-292, 1960.

NAOUM, P.C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997. 171p.

NÓBREGA, F.J.; LOPES, A.L.; BRASIL, A.D. Antropometria do recém-nascido brasileiro. In: ALVES FILHO, N.; CORRÊA, M.D. **Manual de Perinatologia**. 2ª. ed. 1995.

OHGA, S.; HIGASHI, E.; NOMURA, A.; MATSUZAKI, A.; HIRONO, A.; MIWA, S.; FUJII, H.; UEDA, K. Haptoglobin therapy for acute favism: a Japanese boy with

glucose-6-phosphate dehydrogenase Guadalajara. **Br. J. Haematol.**, **89**:421-423, 1995.

PROGRESSO DA CIÊNCIA, 1970.

OLIVEIRA, J.L.B. **Contribuição ao estudo da frequência de hemoglobinopatias estruturais e sua influência no aparecimento de manifestações clínicas em gestantes de uma maternidade de Salvador - Bahia.** 1999. 93 f Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

OPPENHEIM, A.; JURY, C.L.; RUND, D.; VULLIAMY, T.J.; LUZZATTO, L. G6PD Mediterranean accounts for the high prevalence of G6PD deficiency in Kurdish Jews. **Hum. Genet.**, **91**:293-294, 1993.

ORZALES, N.; FOSSARELLO, M.; SORCINELLI, R.; SCHLICH, U. The relationship between glucose-6-phosphate deficiency and cataracts in Sardinia - an epidemiology and biochemical study. **Documenta Ophthalmol.**, **57**:187-201, 1984.

PIOMELLI, S.; REINDORF, C.A.; ARZANIAN, M.T.; CORASH, L.M. Clinical and biochemical interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and sickle-cell anemia. **N. Engl. J. Med.**, **287**:213-217, 1972.

PEIXOTO, L.I.S.; PEDREIRA, C.M.; LOPES, K.M. Estudo genético de uma comunidade nordestina (Paulo Afonso, Bahia). 1963. **Cien. Cult.**, **15**: pag, 1991.

RAMALHO, A.S.; BEIGUELMAN, B. Deficiência da Desidrogenase de 6-Fosfato de Glicose (G6PD) em doadores de Sangue Brasileiros. **Folha Méd.**, **73**: 271-283, 1976.

RAMALHO, A.S.; SENA, L.L.; VENTURELLI, L.E. Glucosephosphate dehydrogenase deficiency and hemotherapy in Brazil. **Rev. Paul. Med.**, **103**:11-14, 1985.

RAMALHO, A.S. As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA, 14. 1986. São Paulo.

- RAMOS, K.M.L.; PEDREIRA, C.M. Estimativas da frequência da Hb-C em grupos populacionais da Bahia. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 1970, Salvador. p. 22.
- ROBINSON, W.M.; OSORIO, M.R.B. **Genética Humana**. 2ª ed. Artmed, 2001
- SAAD, S.T.; COSTA, F.F. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and sickle cell disease in Brazil. **Hum. Hered.**, **42**:125-128, 1992.
- SAAD, S.T.; SALLES, T.S.; CARVALHO, M.H.; COSTA, F.F. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Brazil. **Hum. Hered.**, **47**:17-21, 1997a.
- SAAD, S.T.; SALLES, T.S.; ARRUDA, V.R.; SONATI, M.F.; COSTA, F.F. G6PD sumare: a novel mutation in the G6PD gene (1292 T→G) associated with chronic nonspherocytic anemia. **Hum. Mutat.**, **10**:245-247, 1997b.
- SALDANHA, P.H.; NOBREGA, F.G.; MAIA, J.C. Distribution and heredity of erythrocyte G6PD activity and electrophoretic variants among different racial groups in Sao Paulo, Brazil. **J. Med. Genet.**, **6**:48-54, 1969.
- SALDANHA, P.H.; LEBENSZTAJN, B.; ITSKAN, S.B. Activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase among Indians living in a malarial region of Mato Grosso and its implication to the Indian-mixed populations in Brazil. **Hum. Hered.**, **26**:241-251, 1976.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning, a laboratory manual**. 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SAMUEL, A.P.; SAHA, N.; ACQUAYE, J.K.; OMER, A.; GANESHAGURU, K.; HASSOUNH, E. Association of red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase with haemoglobinopathies. **Hum. Hered.**, **36**:107-112, 1986.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **74**:5463, 1977.

SCHOOS-BARBETTE, S.; DODINVAL-VERSIE, J.; LAMBOTTE, C. Modification of neonatal screening test for erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Clin. Chim. Acta.**, **71**:239-244, 1976.

SCHVARTSMAN, S.; BORGES, M.A.; MELLO, P. Hematological changes in acute accidental poisoning with sulfones. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med.**, **21**:42-48, 1966.

SENA, L.L.A.; BARRETO, O.C.O.; RAMALHO, A.S. Variantes de G6PD em uma população brasileira. **Rev. Bras. Patol. Clin.**, **20**:113-115, 1984.

SENA, L.L.; RAMALHO, A.S.; BARRETO, O.C.; LIMA F.A. Glucosephosphate dehydrogenase deficiency: data on prevalence and morbidity in the region of Natal, RN. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, **2**:17-20, 1986.

SENOZAM, N.M.; THIELMAN, C.A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency - an inherited ailment that affects 100 million people. **J. Chem. Educ.**, **68**:7-10, 1991.

SERJEANT, G.R.; SERJEANT, B.; ROPER, D.; HIGGS, D. Determinants of hemoglobin level in steady-state homozygous sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, **92**:143-149, 1996.

SERJEANT, G.R. Sickle haemoglobin and pregnancy. **Br. Med. J.**, **287**:628-630, 1983.

SERJEANT, G.R. Screening for sickle-cell disease in Brazil. **Lancet**, **356**: 168-169, 2000.

SHEPOTINOVSKII, V.I. The metabolic process in the erythrocytes in stress and in extreme exposure. **Pat. I Fiziol. Eksp. Ter.**, **2**:70-74, 1984.

SMITS H.L., OSKI F.A., BRODY J.I. The hemolytic crisis of sickle cell disease: the role of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **J Pediat.**, **74**:544-551, 1969.

- SMITH II, C.M.; KUETTNER, J.F.; TUREY, D.P.; BURRIS, S.M.; WHITE, J.G. Variable deformability of irreversibly sickled erythrocytes. **Blood**, **58**: 71-77, 1981.
- STEINBERG, M.H. and NECHELES, T.F. Erythrocyte glutathione peroxidase deficiency. Biochemical studies on the mechanisms of drug-induced hemolysis. **Am. J. Med.**, **50**:542-546, 1971.
- STEINBERG, M.H.; WEST, M.S.; GALLAGHER, D.; MENTZER, W. Effects of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency upon sickle cell anemia. **Blood**, **71**:748-752, 1988.
- STRYER, L. **Biochemistry**. 4th ed. New York: W.H.Freeman and Company, 1995. p567-568.
- TANG, T.K.; HUANG, C.S.; HUANG, M.J.; TAM, K.B.; YEH, C.H.; TANG, C.J.C. Diverse point mutations result in glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) polymorphism in Taiwan. **Blood**, **79**:2135, 1992.
- TAKIZAWA, T.; YONEYAMA, Y.; MIWA, S.; YOSHIDA, A. A single nucleotide base transition is the basis of the common human glucose- 6-phosphate dehydrogenase variant A(+). **Genomics**, **1**:228, 1987.
- TANPHAICHITR, V.S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Thailand; its significance in the newborn. Southeast Asian. **J. Trop. Med. Public. Health.**, **2**:75-78, 1999.
- TOWN, M.; BAUTISTA, J.M.; MASON, P.J.; LUZZATTO, L. Both mutations in G6PD A- are necessary to produce the G6PD deficient phenotype. **Hum. Mol. Genet.**, **1**:171-174, 1992.
- VLACHOS, A.; WESTWOOD, B.; LIPTON, J.M.; BEUTLER, E. G6PD Mount Sinai: a new severe hemolytic variant characterized by dual mutations at nucleotides 376G and 1159T (N126D). **Hum. Mutat.**, **1**:154-155, 1998.

VULLIAMY, T.J.; OTHMAN, A.; TOWN, M.; NATHWANI, A.; FALUSI, A.G.; MASON, P.J.; LUZZATTO, L. Polymorphic sites in the African population detected by sequence analysis of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene outline the evolution of the variants A and A-. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **88**:8568-8571, 1991.

WALLACH, J. **Interpretation of Diagnostic Tests**. 7th ed.. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

WANGC, W. and LUKENS, J.N. Sickle cell anemia and other sickling syndromes. In: LEE, G.R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.N.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.P.; RODGERS, G.M. **Wintrobe's clinical hematology**. 10th. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999. cap. 51, p. 1346-1404.

WEATHERALL, D.J. and PROVAN, A.B. Red cells I: inherited anaemias. **Lancet**, **355**:1169-1175, 2000.

WEIMER, T.A.; SALZANO, F.M.; WESTWOOD, B.; BEUTLER, E. G6PD variants in three South American ethnic groups: population distribution and description of two new mutations. **Hum. Hered.**, **48**:92-96, 1998.

YUCEL, G.; YUCEL, I.; BAGCI, H.; AKSU, G.; LULECI, G.; GUMUSLU, S., AKSU, T.A.; DURANOGLU, Y. Linkage disequilibrium between glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and congenital color-blindness in Turkish population. **Japan. J. Ophthal.**, **36**: 33-36, 1993.

10 ANEXOS

QUESTIONÁRIO APLICADO A MÃE OU RESPONSÁVEIS PELO RECÉM-NASCIDO
Anexo I

Nome da mãe: _____

Endereço: _____ Telefone _____

Idade _____ Grupo sanguíneo do RN _____

Grupo racial do RN: _____

01. Quantas vezes engravidou? _____ 02. Já teve aborto? () sim () Não
Em caso de Sim, quantas vezes abortou? _____ () Espontâneo () Provocado

03. Teve acompanhamento pré-natal? () Sim () Não
Em caso de SIM, apresentou algum problema? () SIM () NÃO

() Pneumonia () Infecção Urinária (ardor ao urinar)

() Dores ósseas () Anemia (cansaço, fraqueza)

() Pré-eclâmpsia (pressão alta) () Outros: _____

04. Já teve algum parto prematuro? _____

05. Já teve algum óbito intra-uterino (Filho morreu dentro do útero)? () Sim () Não
Em caso de SIM, quantos óbitos fetais intra-uterinos? _____

06. Fez uso de cigarros durante a gestação? () Sim () Não

07. Fez uso de álcool durante a gestação? () Sim () Não

08. Fez uso de algum remédio ou chá? () Sim () Não

Em caso de SIM, qual o tipo? _____

09. Conhece casos de Anemia Falciforme na Família? _____

10. Sexo do Recém-Nascido: () F () M

11. Grupo Racial do Recém-Nascido: _____

12. Peso do Recém-Nascido: _____

13. Recém-Nascido é prematuro? () Sim () Não

Em caso de SIM, qual o período? _____

14. Recém-Nascido apresentou algum problema de saúde? () Sim () não

Em caso de SIM, qual? () Icterícia Quantas horas após o parto _____

() Doença respiratória

() Outros: _____

15. Hemograma:

Leucócitos: _____ Hemácias: _____ Hb: _____ Hct: _____

MCV: _____ RDW: _____ PLT: _____ LIN: _____

16. Bioquímica:

Ferritina: _____ Bil. Total: _____ Bil. Indireta: _____ Bil. Direta: _____

**TERMO DE CONSENTIMENTO PARA RECÉM-NASCIDOS
ANEXO – II**

Eu, _____, com 18 anos de idade ou mais, detentor de integral competência para dar consentimento ao menor _____ para participar do estudo intitulado: "BASES MOLECULARES DA DEFICIÊNCIA DA DESIDROGENASE DA GLICOSE DE 6-FOSFATO E SUA ASSOCIAÇÃO COM HEMOGLOBINIOPATIAS EM RECÉM-NASCIDOS DA CIDADE DE SALVADOR-BAHIA" sob a coordenação de Dra. Marilda de Souza Gonçalves.

Entendo também que será garantida a privacidade do menor, bem como o sigilo de todas as informações obtidas neste estudo referentes aos mesmos, e que tenho permissão para a qualquer momento revogar o meu consentimento e retirar o menor do estudo sem nenhuma punição ou perda de direitos. Entretanto, este poderá ser solicitado a realizar exames adicionais, caso o médico que o assiste, julgue-os necessários para sua saúde e bem estar. Minha recusa em permitir que meu filho ou tutelado participe do estudo não resultará em punições ou perdas de benefícios a que ele/ ela tenha direito.

Assinatura do responsável _____ Data ___/___/___
Nome do responsável (Letra de forma) _____
Endereço _____
Número de identidade _____

Eu presenciei a explicação acima descrita, confirmando a oportunidade concedida ao responsável de formular perguntas sobre o estudo em questão e testemunho a assinatura do pai ou responsável pelo menor neste documento.

Assinatura da testemunha _____ Data ___/___/___
Nome da testemunha (Letra de forma) _____

Assinatura da testemunha _____ Data ___/___/___
Nome da testemunha (Letra de forme) _____

Assinatura do investigador _____
Nome do investigador (Letra de forma) _____
Local _____ Data ___/___/___

EXPLICAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO

Título do estudo

“BASES MOLECULARES DA DEFICIÊNCIA DA DESIDROGENASE DA GLICOSE DE 6-FOSFATO E SUA ASSOCIAÇÃO COM HEMOGLOBINOPATIAS EM RECÉM-NASCIDOS DA CIDADE DE SALVADOR-BAHIA”.

Investigador principal

Dra. Marilda de Souza Gonçalves - Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ/BA - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal da Bahia.

INFORMAÇÕES SOBRE O ESTUDO E SUA PARTICIPAÇÃO

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é uma enzima das hemácias, com herança genética ligada ao X, importante na manutenção da hemoglobina. As inúmeras mutações genéticas já encontradas resultam em deficiência da G6PD, levando à hemólise prematura quando a enzima é submetida a situações de desequilíbrio, ou em doença hemolítica do recém-nascido. Sua deficiência afeta mais de 200 milhões de pessoas no mundo, apresentando frequência relativamente alta em negros americanos (13%) e populações do mediterrâneo (5 a 40%). No Brasil a prevalência é de 1 a 4% entre os brancos e de 9 a 15% entre negros, podendo ocorrer associações com a anemia falciforme, fato que pode associar riscos à sintomatologia clínica já existentes.

A hemólise pode ser desencadeada por infecções e por algumas drogas com propriedades oxidativas, como ácido acetil salicílico, vitamina K, cloranfenicol e antimaláricos.

O diagnóstico precoce permite o controle dos fatores de risco e a melhora da qualidade de vida do paciente.

OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo deste estudo é fornecer a população estudada um diagnóstico precoce da deficiência da G6PD, estimando sua prevalência associando suas mutações aos dados hematológicos e a presença de hemoglobinas, visando a busca da melhora da qualidade de vida dos portadores desta enfermidade.

DURAÇÃO DA SUA PARTICIPAÇÃO

A aceitação em participar deste estudo implica na concordância em responder um questionário de inquérito epidemiológico e demográfico e na permissão para a

retirada de 5 mL de sangue do cordão umbilical do RN, para que possamos proceder as análises hematológicas e moleculares.

O acompanhamento médico e laboratorial decorrentes da sua participação no projeto será oferecido por tempo indeterminado, ficando a critério dos pais o tempo de acompanhamento da criança.

RISCOS, DANOS E DESCONFORTOS

O sangue será coletado do cordão umbilical, o que não acarreta riscos para o RN, sendo utilizados materiais novos, estéreis e descartáveis, por pessoal habilitado e especializado. Nas amostras coletadas serão realizados exames hematológicos e moleculares. A realização de coletas adicionais, ficará a critério do médico e estará relacionada, simplesmente, ao acompanhamento clínico e avaliação periódica do portador.

BENEFÍCIOS

A participação neste projeto proporcionará benefícios às crianças e familiares, uma vez que possibilitará a realização de diagnóstico precoce e acompanhamento médico. Cumpre ressaltar que o presente estudo contribuirá para a obtenção de informações sobre a deficiência da G6PD em nossa população, permitindo a utilização dos conhecimentos adquiridos em orientações futuras.

COMPROMISSO COM A CONFIDENCIALIDADE DA IDENTIDADE DO VOLUNTÁRIO

Os registros da participação da criança no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento somente dos participantes do projeto.

NOVOS ACHADOS SIGNIFICATIVOS

Qualquer informação importante que surgir durante o andamento do estudo que possa contribuir para o melhor desenvolvimento clínico da doença será levada imediatamente ao seu conhecimento e do seu médico.

Pessoas e locais a serem contatadas para o esclarecimento de dúvidas e maiores informações

Por favor entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos:

Dra. Marilda de Souza Gonçalves - Coordenadora do projeto - Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ.
Fone: 356-8783 R - 226

José Pereira de Moura Neto - Farmacêutico Bioquímico que desenvolverá a dissertação de mestrado com a realização do presente projeto no Laboratório LPBM - CPqGM - FIOCRUZ.
Fone 356 – 8783 R - 265

Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte ao investigador antes de assinar.

Atesto o recebimento da cópia deste acordo, que é constituído pelos termos de explicação e de consentimento.

Nome do menor (letra de forma)

Assinatura do responsável _____ Data

_____/_____/____

Nome do responsável (letra de forma)

Assinatura da Testemunha _____ Data

_____/_____/____

Nome da Testemunha (Letra de forma)

Assinatura da testemunha _____ Data

_____/_____/____

Nome da testemunha (Letra de forma)
