UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Dedalus: 1430089

DBDCA: 26791

Terminal OK

Caracterização molecular dos genes das variantes da glicose-6-
fosfato desidrogenase Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan

Raimundo Antônio Gomes Oliveira

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Orlando Cesar de Oliveira Barretto

São Paulo
2004

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Caracterização molecular dos genes das variantes da glicose-6-
fosfato desidrogenase Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan

Raimundo Antônio Gomes Oliveira

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Orlando Cesar de Oliveira Barretto

São Paulo
2004

18058

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010397

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

O48c Oliveira, Raimundo Antônio Gomes
Caracterização molecular dos genes das variantes da glicose-6-
fosfato desidrogenase Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan / Raimundo
Antônio Gomes Oliveira. -- São Paulo, 2004.
167p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Barretto, Orlando César de Oliveira

1. Hematologia 2. Biologia molecular 3. Bioquímica
I. T. II. Barretto, Orlando César de Oliveira, orientador.

616.15 CDD

Raimundo Antônio Gomes Oliveira

Caracterização molecular dos genes das variantes da glicose-6-
fosfato desidrogenase Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Orlando Cesar de Oliveira Barretto
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 26 de novembro de 2004.

Dedico esta Tese ao meu
bravo e amado filho Antonio
Lucas e aos meus amados pais
Antonio Benedito e Maizy, por
terem me ensinado a jamais
desistir. São seus os méritos
desta conquista.

Aos patriarcas do Clã Gomes
Oliveira: Daniel e Elze,
Benedito e Ziloca. Aos meus
irmãos Tadeu, Elze, Maurício e
Júnior, à minha esposa Cláudia
e sobrinhos Felipe e Lucas.

Aquele que persiste sempre vence

anônimo

*Nada te assuste, nada te perturbe,
pois tudo passa, só Deus não muda.
Quem a Deus tem, nada lhe falta. Só
Deus basta.*

Santa Tereza de Jesus.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Antônio Benedito, maior nome da Farmácia no Maranhão, e à Professora Socorro Oliveira, que sempre me ensinaram os caminhos corretos.

Ao professor Dr. Orlando Cesar de Oliveira Barretto, pela orientação tranquila e segura desta tese.

Ao Dr Mário e Dra Rosário Hirata, por terem cedido toda a estrutura do seu Laboratório para que pudéssemos realizar os nossos experimentos, bem como por seus constantes ensinamentos de Biologia Molecular.

À Dra Maria Aparecida Nagai, por dispor o seu laboratório para as reações de sequenciamento e da PCR em Tempo Real.

À Dras. Kymio Nonoyama e Marilena Oshiro, da Seção de Hematologia da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, pela viabilização das amostras deficientes e controles, necessárias à execução deste trabalho.

À FAPESP, pelo auxílio pesquisa nº 03/00837-6 concedido ao Prof Orlando Cesar de Oliveira Barretto, como subsídio financeiro deste trabalho.

Ao Dr. Mário Hirata e ao Dr. Paulo Silveira, pelas valorosas sugestões dadas na qualificação, para o aprimoramento do nosso trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico, pelas sempre oportunas "dicas moleculares" adquiridas durante nosso convívio.

À Simone e a todos do Laboratório de Biologia Molecular da Dra Maria Aparecida Nagai, que colaboraram nas reações de sequenciamento e da PCR em Tempo Real.

À Professora Primavera Borelli, pela acolhida ao iniciarmos nosso Doutorado.

Aos Professores Ernani Garrido, José de Ribamar Gonçalves, Terezinha Rêgo, Jamile Oliveira e amigos da Faculdade de Farmácia, pelo incentivo constante.

À Chefia do Departamento de Farmácia e à Coordenação do Curso, pelo apoio recebido.

À Reitoria da Universidade Federal do Maranhão e à Direção do Hospital Universitário, pelo apoio recebido.

A todos os meus Professores neste Curso de Pós-Graduação, por terem contribuído à minha formação científica.

À Vanessa do Serviço de Sequenciamento de DNA do IB-USP por estar sempre disposta a esclarecer dúvidas sobre o sequenciamento.

À Adriana e Leila, pela revisão bibliográfica e sugestões para a normatização do texto; à Marina, pela ficha catalográfica.

À Dra Marina Maeda e a todos os amigos da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

À Dona Fabí, Ana Carla, Raquel, Silvia, Allana, Verônica e Melina pela amizade e incentivos.

A Cláudia, pela compreensão em permanecermos em São Luís para que eu pudesse escrever esta tese.

A todos os alunos e funcionários da Faculdade de Farmácia que torcem por nós.

A Rogério, Renato, Pedro, André, João Pedro, Rommel, Kléber, Omar e Chiquinho, pelos exemplos de amizade.

A todos que direta ou indiretamente nos auxiliaram na realização desta tese.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	viii
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)	2
1.2. Aspectos gerais da deficiência de G6PD	4
1.3. A deficiência de G6PD na população brasileira e mundial.....	9
1.4. As variantes fenotípicas Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan.....	12
1.5. Fisiopatologia e fenômenos hemolíticos nas variantes de G6PD.....	14
1.6. O gene da G6PD	17
1.7. A estrutura, o gene e as mutações da G6PD	18
1.8. Os haplótipos do gene da G6PD	28
1.9. Justificativa do tema	30
2. OBJETIVOS	31
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	34
3.1. Casuística.....	35
3.1.1 Obtenção das amostras.....	36
3.2. Métodos.....	36
3.2.1. Triagem de deficientes e controles normais de G6PD.....	36
3.2.2. DNA genômico.....	37
3.2.3. RNA total.....	40
3.2.4. Otimização das reações de amplificação pela PCR para SSCP, RFLP e sequenciamento do DNA genômico	41
3.2.5. Estratégia para identificação da mutação das amostras deficientes e não-deficientes e caracterização molecular das variantes Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan.....	55

3.2.6. Triagem de mutações por SSCP	56
3.2.7. Confirmação das mutações que apresentaram alterações na SSCP, pela PCR-RFLP.....	58
3.2.8. Análise dos haplótipos do gene da G6PD.....	58
3.2.9. Otimização das reações de RFLP.....	60
3.2.10. Estudo da região promotora do gene da G6PD.....	61
3.2.11. Estudo do RNAm do gene da G6PD.....	63
3.2.12. Sequenciamento das regiões codificantes do DNA genômico, da região promotora e do RNAm do gene da G6PD.....	68
3.2.13. Estudo quantitativo da expressão da G6PD nos portadores das variantes Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan pela PCR em Tempo Real.....	73
4. RESULTADOS.....	78
4.1. Extração do DNA genômico.....	79
4.2. Otimização das condições de amplificação para as reações em cadeia da polimerase (PCR).....	80
4.2.1. PCR para a técnica do polimorfismo na conformação da fita simples (SSCP) e sequenciamento do DNA genômico.	80
4.2.2. PCR para a técnica do polimorfismo no tamanho do fragmento de restrição (RFLPs).	90
4.2.3. PCR para o sequenciamento da região promotora do gene da G6PD.	103
4.3. Triagem de mutações por SSCP.....	105
4.4. Confirmação de mutações por RFLP.....	110
4.5. Sequenciamento do DNA genômico e região promotora do gene da G6PD.....	111
4.6. Caracterização dos haplótipos.....	115
4.7. Estudo do RNA das variantes Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan.....	119
4.7.1. Otimização das reações da PCR.....	119
4.7.2. Sequenciamento do RNA.....	122
4.7.3. Expressão do RNA pela PCR em Tempo Real.....	125

5. DISCUSSÃO.....	129
Otimização das amplificações pela PCR.....	130
Otimização da SSCP.....	133
Análise de mutações para as amostras de indivíduos deficientes em G6PD.	135
Análise dos haplótipos.....	138
Análise molecular das variantes Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan	141
Estrutura da G6PD versus mutações.....	147
6. CONCLUSÃO.....	152
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácido(s)
ATP	Nucleotídeo de adenosina tri-fosfatado
DNA	Ácido desoxi-ribonucleico
G6P	Glicose-6-fosfato
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
Gd	Abreviatura para glicose-6-fosfato desidrogenase
Gd+	Variantes da G6PD com atividade normal
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
IVS	Íntron (do Inglês <i>Intervening Sequence</i>)
LM	Marcador de massa molecular (do Inglês <i>Low Mass Ladder</i>)
NADP	Dinucleotídeo fosfatado de adenina nicotinamida
NADPH	Dinucleotídeo fosfatado de adenina nicotinamida reduzido
nt	Nucleotídeo(s)
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do Inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RFLP	Polimorfismo no tamanho do fragmento de restrição (do Inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SSCP	Polimorfismo na conformação da fita simples (do Inglês <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>)

LISTA DE FIGURAS

	P.
FIGURA 1.1 - A ação da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) na via das pentoses.....	03
FIGURA 1.2 - Modelo esquemático da estrutura do gene da Glicose-6-fosfato desidrogenase.....	18
FIGURA 1.3 - Representação tridimensional do dímero da G6PD em humanos..	20
FIGURA 1.4 - Representação tridimensional do dímero da enzima G6PD em humanos. Amplificação da imagem da figura 1.2, destacando a região de interface de ligação entre os dímeros.....	21
FIGURA 1.5 - Distribuição das mutações da G6PD associadas a anemia hemolítica crônica não-esferocítica (classe 1).	23
FIGURA 1.6 - Distribuição das mutações da G6PD associadas a anemia hemolítica crônica não-esferocítica (classe 1) que afetam a interface entre os dímeros.	24
FIGURA 1.7 - Localização das mutações no gene da G6PD de acordo com a classe da variante.	26
FIGURA 1.8 - Localização dos sítios polimórficos utilizados na determinação dos haplótipos	29
FIGURA 3.1 - Esquema representativo das regiões adjacentes ao éxon 8, com seus respectivos iniciadores <i>sense</i> e <i>antisense</i> , para amplificação pela PCR com a finalidade de triagem de mutações por SSCP e sequenciamento.	49
FIGURA 3.2 - Esquema representativo das regiões em que os iniciadores se localizam nas regiões adjacentes ao éxon 5, dividido em duas metades (5a e 5b), com seus respectivos iniciadores <i>sense</i> e <i>antisense</i> , para amplificação pela PCR com a finalidade de triagem de mutações por SSCP e sequenciamento.	50
FIGURA 3.3 - Diagrama de fases para a identificação molecular das amostras de deficientes e não-deficientes de nossa casuística.	55
FIGURA 3.4 - Diagrama de fases utilizados para avaliação molecular das amostras das variantes Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan.	56
FIGURA 3.5 - Localização dos sítios polimórficos utilizados na determinação dos haplótipos	60
FIGURA 3.6 - Seqüência do RNAm do gene da G6PD em toda sua extensão, com respectivos iniciadores a serem utilizados para a amplificação e o sequenciamento de toda sua extensão	67
FIGURA 3.7 - Fragmento do RNAm do gene G6PD. Seqüência de nucleotídeos dos éxons 7, 8 e 9	75

FIGURA 4.1	- Fotografia do gel de agarose a 1% de algumas amostras (1, 2, 3 e 4) de DNA extraídas pelo método de Salazar et al, 1998	79
FIGURA 4.2	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR dos éxons 2 a 7, após otimização das condições da reação.	82
FIGURA 4.3	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR dos éxons 8 a 13, após otimização das condições da reação.	82
FIGURA 4.4	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% dos fragmentos amplificados pela PCR do éxon 2 durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente	83
FIGURA 4.5	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% dos fragmentos amplificados pela PCR do éxon 3 durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente	83
FIGURA 4.6	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% dos fragmentos amplificados pela PCR do éxon 4 durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente	84
FIGURA 4.7	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% dos fragmentos amplificados pela PCR do éxon 4 durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente	84
FIGURA 4.8	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR do éxon 5a durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente	85
FIGURA 4.9	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR do éxon 10a durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente	85
FIGURA 4.10	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR do éxon 11 durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente	86
FIGURA 4.11	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR do éxon 3 (167 Pb) durante otimização do número de ciclos através de um gradiente	86
FIGURA 4.12	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR do éxon 8 (164 Pb) durante otimização do número de ciclos através de um gradiente	87
FIGURA 4.13	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR do éxon 11 (159 pb) durante otimização do número de ciclos através de um gradiente	87
FIGURA 4.14	- Fotografia do gel de agarose a 2,0% com os fragmentos de DNA (produtos de PCR) dos éxons: 1 e 2, éxon 2; 3 e 4, éxon 3; 5, éxon 5a; 6, éxon7, purificados	88
FIGURA 4.15	- Fotografia do gel de agarose a 2,0% com os fragmentos de DNA (produtos de PCR) dos éxons: 1, éxon 4; 2 e 3, éxon 6, purificados	88

FIGURA 4.16	- Fotografia do gel de agarose a 2,0% com os fragmentos de DNA (produtos de PCR) dos éxons: 1, éxon 7; 2 e 3, éxon 8; 4 e 5, éxon 9; 6 e 7 éxon 10b; 8 e 9, éxon 11; 10 e 11, éxon 12; 12 e 13, éxon 13, purificados	89
FIGURA 4.17	- Fotografia do gel de agarose a 2,0% com os fragmentos de DNA (produtos de PCR) do éxon 5b, purificados	89
FIGURA 4.18	- Esquema da RFLP para o fragmento contendo o éxon 5 com indicação do sítio de restrição para a enzima <i>FOK I</i> e fotografia do gel de agarose a 1,5% com: 1, fragmento sem; 2 e 3, fragmento com o sítio de restrição	91
FIGURA 4.19	- Esquema da RFLP para o fragmento contendo os éxons 5 e 6 com indicação do sítio de restrição para a enzima <i>Pvu II</i> e fotografia do gel de agarose a 1,5% com: 1, produto de PCR; 2 e 5, fragmentos sem; 3 e 4, fragmento com o sítio de restrição	92
FIGURA 4.20	- Esquema da RFLP para o fragmento contendo os éxons 8 e 9 com indicação do sítio de restrição para a enzima <i>BspHI</i> e fotografia do gel de agarose a 1,5% com: 1, produto de PCR; 2, fragmento com; 3 e 4, fragmentos sem o sítio de restrição	93
FIGURA 4.21	- Esquema da RFLP para o fragmento contendo parte do éxon 10 com indicação do sítio de restrição para a enzima <i>Pst I</i> e fotografia do gel de poliacrilamida a 8% com: 1 e 2, fragmentos com o sítio de restrição; 3 e 4, produtos de PCR	94
FIGURA 4.22	- Esquema da RFLP para o fragmento contendo os éxons 10 e 11 com indicação do sítio de restrição para a enzima <i>Bcl I</i> e fotografia do gel de agarose a 2,0% com: 1, produto de PCR; 2, fragmento sem; 3, fragmento com o sítio de restrição	95
FIGURA 4.23	- Esquema da RFLP para o fragmento contendo parte do íntron 11 e o éxon 12 com indicação do sítio de restrição para a enzima <i>Nla III</i> e fotografia do gel de agarose a 2,0% com: 1, produto de PCR; 2, fragmento com; 3, fragmento sem o sítio de restrição ...	96
FIGURA 4.24	- Esquema da RFLP para o fragmento contendo os éxons 3 e 4 com indicação do sítio de restrição para a enzima <i>Nla III</i> e fotografia do gel de agarose a 2,0% com: 1 e 2, fragmentos sem; 3, produto de PCR; 4 e 5, fragmentos com o sítio de restrição ...	97
FIGURA 4.25	- Esquema da RFLP para o fragmento contendo o éxon 6 com indicação dos sítios de restrição para a enzima <i>Mbo II</i> e fotografia do gel de agarose a 2,0% com: 1, produto de PCR; 2, fragmento com um sítio de restrição constitutivo mas sem o sítio de restrição específico para mutação 563 C→T	98
FIGURA 4.26	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR de todo o éxon 5 (355 pb) para a RFLP da mutação 376 A→G com a enzima <i>FoK I</i> , utilizando os iniciadores E5aS e E5bAS, durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente	99

FIGURA 4.27	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR de todo o éxon 5 (355 pb) para a RFLP da mutação 376 A→G com a enzima Fok I, utilizando os iniciadores E5aS e E5bAS, depois da otimização das condições da reação	100
FIGURA 4.28	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR de parte do éxon 5 e todo o éxon 6 (1025 pb) para a RFLP para o polimorfismo IVS5nt611 C→G com a enzima PvuII, utilizando os iniciadores E5bS e E6AS, durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente	100
FIGURA 4.29	- Fotografia do gel de agarose a 1,0% com os fragmentos amplificados pela PCR de parte do éxon 5 e todo o éxon 6 (1025 pb) para a RFLP para o polimorfismo IVS5nt611 C→G com a enzima PvuII, utilizando os iniciadores E5bS e E6AS, depois da otimização das condições da reação	101
FIGURA 4.30	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR dos éxons 3 e 4 (326 pb) para a RFLP para a mutação 202 G→A com a enzima NlaIII, utilizando os iniciadores E3S e E4AS, durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente	101
FIGURA 4.31	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR dos éxons 3 e 4 (326 pb) para a RFLP para a mutação 202 G→A com a enzima NlaIII, utilizando os iniciadores E3S e E4AS, depois da otimização das condições da reação	102
FIGURA 4.32	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR dos éxons 3 e 4 (326 pb) para a RFLP para a mutação 202 G→A com a enzima NlaIII, utilizando os iniciadores E3S e E4AS, durante otimização do número de ciclos através de um gradiente	102
FIGURA 4.33	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR dos éxons 8 e 9 (795 pb) para a RFLP do Polimorfismo IVS8 nt163C→T com a enzima BspHI, utilizando os iniciadores E8S e E9AS, durante otimização do número de ciclos através de um gradiente	103
FIGURA 4.34	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR da região promotora do gene da G6PD (507 pb) durante otimização da concentração de MgCl ₂ , através de um gradiente	104
FIGURA 4.35	- Fotografia do gel de agarose a 2,0% com os fragmentos de DNA (produtos de PCR) da região promotora do gene da G6PD	104
FIGURA 4.36	- Fotografias dos géis de SSCP (poliacrilamida) corados com nitrato prata representando os produtos obtidos pelos iniciadores que flanqueiam a região que contém o éxon 4 do gene da G6PD	106
FIGURA 4.37	Fotografias dos géis de SSCP (poliacrilamida) corados com nitrato prata representando os produtos obtidos pelos iniciadores que flanqueiam a região que contém o éxon 5a do gene da G6PD	106

FIGURA 4.38	- Fotografias dos géis de SSCP (poliacrilamida) corados com nitrato de prata representando os produtos obtidos pelos iniciadores que flanqueiam a região que contém o éxon 5b do gene da G6PD	107
FIGURA 4.39	- Fotografias dos géis de SSCP (poliacrilamida) corados com nitrato de prata representando os produtos obtidos pelos iniciadores que flanqueiam a região que contém o éxon 8 do gene da G6PD	107
FIGURA 4.40	- Fotografias dos géis de SSCP (poliacrilamida) corados com nitrato de prata representando os produtos obtidos pelos iniciadores que flanqueiam a região que contém o éxon 11 do gene da G6PD	108
FIGURA 4.41	- Fotografias dos géis de SSCP (poliacrilamida) corados com nitrato de prata representando os éxons 2, 3, 6 e 7 do gene da G6PD	108
FIGURA 4.42	- Fotografias dos géis de SSCP (poliacrilamida) corados com nitrato de prata representando os éxons 9, 10a e 10b do gene da G6PD	109
FIGURA 4.43	- Fotografias dos géis de SSCP (poliacrilamida) corados com nitrato de prata representando os éxons 5a, 8, 12 e 13 do gene da G6PD	109
FIGURA 4.44	- Eletrofluorograma do sequenciamento do início do éxon 6 do gene da G6PD do portador da variante fenotípica Gd+ Butantan..	111
FIGURA 4.45	- Eletrofluorograma do sequenciamento do início do éxon 6 do gene da G6PD do portador da variante fenotípica Gd+ Cuiabá. ...	111
FIGURA 4.46	- Fotografia do gel da SSCP com alteração no padrão de migração do gene da G6PD para mutação Seattle	112
FIGURA 4.47	- Sequenciamento do éxon 8 do gene da G6PD, demonstrando a mutação 844G→C, identificada como variante Seattle	112
FIGURA 4.48	- Fotografias dos géis de SSCP (poliacrilamida) corados com nitrato de prata representando os produtos obtidos pelos iniciadores que flanqueiam a região que contém o éxon 7 do gene da G6PD	113
FIGURA 4.49	- Sequenciamento do éxon 7 do gene da G6PD, demonstrando uma mutação inédita nt660 C→G	113
FIGURA 4.50	- Sequenciamento de parte da região promotora do gene da G6PD da amostra controle normal G6PDB+	114
FIGURA 4.51	- Sequenciamento de parte da região promotora do gene da G6PD da amostra do portador da variante fenotípica Gd+ Cuiabá	114
FIGURA 4.52	- Sequenciamento de parte da região promotora do gene da G6PD da amostra do portador da variante fenotípica Gd+ Butantan	114

FIGURA 4.53	- Fotografia do gel de agarose a 2,0% com os fragmentos amplificados pela PCR da "região 4" do RNA do gene da G6PD (454 pb) durante otimização da temperatura de hibridização, através de um gradiente	120
FIGURA 4.54	- Fotografia do gel de agarose a 2,0% com os fragmentos amplificados e purificados, encaminhados para sequenciamento do RNA do gene da G6PD: 1, 2 e 3, "região 1"; 4, 5, 6, "região 2", das amostras GdB, Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan	120
FIGURA 4.55	- Fotografia do gel de agarose a 2,0% com os fragmentos amplificados e purificados, encaminhados para sequenciamento do RNA do gene da G6PD: 1, 2 e 3, "região 3"; 4, 5, 6, "região 4", das amostras GdB, Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan	121
FIGURA 4.56	- Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos do RNA amplificados pela PCR a partir dos iniciadores RNA 3S e RNA 2AS, correspondentes aos éxons 8 e 9 do gene da G6PD (119 pb), após otimização das condições da PCR	121
FIGURA 4.57	- Fotografia do gel de agarose a 2,0% com os fragmentos amplificados pela PCR através dos iniciadores RNA1S e E13AS, correspondentes a toda a extensão do cDNA ("região 1" a "região 4") do gene da G6PD	122
FIGURA 4.58	- Eletrofluorograma do sequenciamento feito a partir do iniciador <i>sense</i> (E5bS), da "região 2" do cDNA do gene da G6PD do portador da variante Gd+ Cuiabá.	123
FIGURA 4.59	- Eletrofluorograma do sequenciamento feito a partir do iniciador <i>sense</i> (E5bS), da "região 2" do cDNA do gene da G6PD do portador da variante Gd+ Butantan.	123
FIGURA 4.60	- Eletrofluorograma do sequenciamento feito a partir do iniciador <i>sense</i> (E5bS), da "região 2" do cDNA do gene da G6PD do controle normal GdB+.	124
FIGURA 4.61	- Eletrofluorograma do sequenciamento feito a partir do iniciador <i>antisense</i> (E5bS), da "região 2" do cDNA do gene da G6PD do portador da variante Gd+ Cuiabá.	124
FIGURA 4.62	Eletrofluorograma do sequenciamento feito a partir do iniciador <i>antisense</i> (E5bS), da "região 2" do cDNA do gene da G6PD do portador da variante Gd+ Butantan.	125
FIGURA 4.63	Eletrofluorograma do sequenciamento feito a partir do iniciador <i>antisense</i> (E5bS), da "região 2" do cDNA do gene da G6PD do controle normal GdB+.	125
FIGURA 4.64	- Curva de dissociação para a reação de amplificação para o RNA do gene da G6PD	127
FIGURA 4.65	- Curva de dissociação para a reação de amplificação para o RNA do gene da GAPD	127
FIGURA 4.66	- Curvas de amplificação para a reação da PCR em Tempo Real para avaliação da expressão do RNA do gene da G6PD, utilizando o gene da GAPD como controle	128

LISTA DE TABELAS E QUADROS

	p.
TABELA 3.1 - Lista de iniciadores utilizados nas reações em cadeia da polimerase utilizadas para SSCP, nas amostras de DNA genômico	45
TABELA 3.2 - Lista de iniciadores utilizados nas PCR para as RFLPs, como confirmação das mutações africana 202 G→A e 376 A→G (A-), nos éxons 4 e 5, e mediterrânea 563 C→T no éxon 6, nas amostras de DNA genômico.	46
TABELA 3.3 - Lista de iniciadores utilizados nas reações de PCR-RFLP, para a caracterização dos polimorfismos, para a determinação dos haplótipos	46
TABELA 3.4 - Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes aos éxons 2 e 8.	48
TABELA 3.5 - Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 3	49
TABELA 3.6 - Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 4	49
TABELA 3.7 - Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 5, dividido em duas metades. Primeira metade, éxon 5a.	50
TABELA 3.8 - Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 5, dividido em duas metades. Segunda metade, éxon 5b.	50
TABELA 3.9 - Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 6	51
TABELA 3.10 - Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 7	51
TABELA 3.11 - Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 9	51
TABELA 3.12 - Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 10, dividido em duas metades. Primeira metade, éxon 10a	52
TABELA 3.13 - Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 10, dividido em duas metades. Segunda metade, éxon 10b	52
TABELA 3.14 - Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 11	52
TABELA 3.15 - Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 12	53

TABELA 3.16	- Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 13	53
TABELA 3.17	- Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes à região promotora do gene da G6PD	62
TABELA 3.18	- Programa inicial modificado do termociclador para amplificação das regiões adjacentes à região promotora do gene da G6PD	62
TABELA 3.19	- Estratégia estabelecida para realização da RT-PCR para seqüenciamento do RNAm do gene da G6PD em toda a sua extensão	65
TABELA 3.20	- Programa utilizado para amplificar a 1ª, 2ª, 3ª e 4ª regiões do RNAm do gene da G6PD pela PCR	65
TABELA 3.21	- Estratégia estabelecida para realização de PCR para seqüenciamento do RNAm do gene da G6PD em toda a sua extensão.	66
TABELA 3.22	- Programa utilizado para amplificar o mRNA do gene da G6PD em toda a sua extensão pela PCR, como uma primeira avaliação da possibilidade de erro no processamento do RNA	66
TABELA 3.23	- Concentrações dos reagentes para a reação de seqüenciamento semi-automático de produtos da PCR	71
TABELA 3.24	- Estratégia estabelecida para amplificar os fragmentos do RNA correspondentes aos éxons 8 e 9 do gene da G6PD pela PCR "a frio" como modelo para avaliação da expressão do gene da G6PD, a ser feita através da PCR em Tempo Real.	74
TABELA 3.25	- Programa utilizado para amplificar os éxons 8 e 9 do RNAm do gene da G6PD pela PCR, como modelo para avaliação da expressão do gene da G6PD, a ser feita através da PCR em Tempo Real.....	75
TABELA 3.26	- Componentes do Platinum SYBR Green qPCR SupermMix UDG (Invitrogen Life Technologies).	76
TABELA 4.1	- Resultado da extração de DNA de algumas amostras, escolhidas aleatoriamente entre alguns dos pacientes deficientes, obtidas pelo Método de Salazar et al, 1998.	79
TABELA 4.2	- Condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizadas para amplificação das amostras usadas nas reações de SSCP e sequenciamento do DNA genômico para a G6PD, que foram estabelecidas após otimização.	81
TABELA 4.3	- Condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) estabelecidas para as reações de RFLP para determinação dos haplótipos e confirmação de mutações, após otimização.	90
TABELA 4.4	- Condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) para o sequenciamento da região promotora do gene da G6PD, que foram estabelecidas após otimização.	103

TABELA 4.5	- Condições para realização da técnica de SSCP em GeneGel Excel (Amersham-Biosciences, Uppsala, Sweden), que apresentaram alterações conformacionais para as amostras avaliadas durante nossa otimização.	105
TABELA 4.6	- Fragmentos amplificados e produtos da digestão para identificação dos polimorfismos utilizados na determinação dos haplótipos da G6PD.	115
TABELA 4.7	- Frequência de haplótipos para o gene da G6PD encontrados em nossa casuística.	116
TABELA 4.8	- Frequência de polimorfismos intragênicos para o gene da G6PD no grupo controle GdB+ e no grupo de deficientes.	117
TABELA 4.9	- Distribuição dos haplótipos do gene da G6PD, em deficientes (Gd A-, Gd Seattle, Gd São Paulo) e não deficientes (Gd B+, Gd A+, Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan).	117
TABELA 4.10	- Distribuição dos haplótipos do gene da G6PD entre o grupo de deficientes, pelo Teste de Fisher.	118
TABELA 4.11	- Distribuição dos haplótipos do gene da G6PD, em portadores do genótipo GdB+ e das variantes Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan.	118
TABELA 4.12	- Distribuição do polimorfismo para o sítio de restrição 163 C→T, intron 8, para a enzima <i>BspHI</i> para o gene da G6PD, em portadores do genótipo GdB+ e no grupo de deficientes.	118
TABELA 4.13	- Condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) para o sequenciamento do RNA do gene da G6PD, estabelecidas após otimização.	119
TABELA 4.14	- Condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) "a frio" como modelo para a PCR em Tempo Real, estabelecidas após otimização.	119
QUADRO 1.1	Drogas relacionadas ao desencadeamento de hemólise em deficientes de G6PD.....	09
QUADRO 1.2	Os tipos de mutações que causam deficiência de G6PD.....	22
QUADRO 1.3	Polaridade dos grupamentos funcionais dos aminoácidos.....	27

RESUMO

OLIVEIRA, R.A.G. Caracterização molecular dos genes das variantes da glicose-6-fosfato desidrogenase Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan. São Paulo, 2004. 167p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

RESUMO

Estudos prévios demonstraram alterações bioquímicas em duas variantes da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) com atividade enzimática normal (classe 4), a Gd+ Cuiabá e Butantan. Na Gd+ Cuiabá o Km era elevado para G6P e para Gd+ Butantan o Km era elevado para G6P e NADP. Este trabalho teve por objetivo caracterizar molecularmente tais variantes. Propôs-se iniciadores que flanqueassem regiões menores, e que foram otimizados para as reações da PCR para SSCP e sequenciamento do DNA genômico e região promotora, para RFLP na determinação dos haplótipos, e para sequenciamento do RNA e sua expressão pela PCR em Tempo Real. Utilizou-se como parâmetro para os haplótipos e para otimização destas reações, 30 amostras deficientes e 32 controles normais GdB+. Os resultados demonstraram que ambas as variantes apresentaram sequência codificadora do DNA, região promotora e RNA mensageiro similares à GdB+. O haplótipo correspondente respectivamente aos seis sítios polimórficos do éxon 5 (376 A→G), do Íntron 5 (nt611C→G), do íntron 8 (nt163C→T), do éxon 10 (nt116G→A) e do éxon 11 (nt1311C→T) para BclI, e do íntron 11 (nt93T→C) para a Gd+ Cuiabá foi tipo Ia (- - + + - +) e para a Gd+ Butantan tipo I (- - + + - -), ambos associados aos haplótipos encontrados no grupo controle GdB+. Isto sugere que as eventuais causas das suas alterações bioquímicas tenham ocorrido a partir de algum evento após tradução protéica, sendo provavelmente de ordem epigenética. A expressão do RNA da Gd+ Cuiabá foi semelhante àquela do controle GdB+, enquanto que a da Gd+ Butantan foi em torno de 33% mais baixa.

ABSTRACT

OLIVEIRA, R.A.G. Molecular characterization of gene of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants Gd+ Cuiabá and Gd+ Butantan. São Paulo, 2004. 167p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

ABSTRACT

Previous studies have shown biochemical alterations in two class 4 variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), Gd+ Cuiabá and Gd+ Butantan. Km for G6P was elevated in Gd+ Cuiabá, and Gd+ Butantan showed elevated Km for G6P and NADP. Exons 2 to 13 as well as the promoter region of G6PD gene were amplified by PCR for SSCP and entire DNA of both variants were performed. PCR for RFLP to determine the haplotypes associations, for SSCP, RNA sequencing and expression by Real Time PCR were optimized, by studying thirty G6PD deficient samples and 32 GdB+ controls. Our results showed that Gd+ Cuiabá and Butantan gene, promoter and mRNA sequences were similar to GdB+. The haplotype for six intragenic restriction fragment length studied: nt376A→G (exon 5); nt611C→G (intron 5); nt163C→T (intron 8); nt116G→A (exon 10); nt1311 C→T (exon 11) and nt93T→C (intron 11) was type Ia (- - + + - +) for Gd+ Cuiabá and type I (- - + + - -) for Gd+ Butantan, both corresponding to GdB+ control group haplotype. Therefore, our results may suggest that the biochemical alteration of these variants may be ascribed to pos-translational changes. The RNA expression for Gd+ Cuiabá was normal, and for Gd+ Butantan was 33% less than control sample.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A ENZIMA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PD)

A G6PD (E.C. 1.1.1.49) é a enzima que cataliza a primeira etapa da via das pentoses oxidando a glicose-6-fosfato (G6P) a 6-fosfogluconato, e reduzindo a molécula de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato forma reduzida (NADPH) (GAETANI *et al.*, 1989).

Para que tenha ação catalítica, é necessário que a G6PD encontre-se sob estado dimérico (WRIGLEY *et al.*, 1972) e ligada ao NADP (De FLORA *et al.*, 1974a; MORELLI *et al.*, 1976). A ligação dos monômeros inativos em dímeros cataliticamente ativos, é dependente da presença de NADP (KIRKMAN & HENDRICKSON, 1962). Deste modo sugere-se que o NADP ligado à enzima funcione como um componente estrutural, bem como substrato para as reações catalíticas (De FLORA *et al.*, 1974b; CANEPA *et al.*, 1991). Dados de Hirono *et al* (1989) sugerem que os aminoácidos 386 Lys e 387 Arg liguem-se a um dos fosfatos do NADP (HIRONO *et al.*, 1989). O sítio de ligação da G6PD com a glicose-6-fosfato (G6P), por sua vez, é localizado no aminoácido 205 Lys (CAMARDELLA *et al.*, 1988).

Como, após a perda do núcleo e da capacidade de sintetizar proteínas, possuem vida média em torno de 120 dias, os eritrócitos (também chamados de glóbulos vermelhos ou hemácias), são as células que sofrem mais pronunciadamente com a deficiência de G6PD (MASON, 1996).

Além de ser a única fonte de NADPH nos eritrócitos, a via hexose-monofosfato (das pentoses) também produz a ribose necessária para a síntese de nucleotídeos de uma via alternativa, cuja principal função é proteger o eritrócito contra a lesão oxidativa. O NADPH formado reduz a enzima glutathiona, de GSSG (forma oxidada) a GSH (forma reduzida) e os grupamentos sulfidrilas das proteínas. É a glutathiona em sua forma reduzida (GSH) que remove o peróxido dos eritrócitos (**figura 1.1**). Apesar de ser rico em catalase, que se mostra ineficiente em remover pequenas quantidades de peróxido, o eritrócito depende fundamentalmente do NADPH para exercer esta função antioxidante (MORELLI *et al.*, 1976; GAETANI *et al.*, 1989).

Figura 1.1. A ação da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) na via das pentoses. O NADPH é produzido e usado na redução de peróxidos tóxicos (R-O-OH) via glutathiona (GSH e GSSG). Outras enzimas demonstradas são: HK= hexoquinase; 6PGL = 6-fosfogliconolactonase; 6PGD = 6-fosfogliconato desidrogenase; Ru5PI = ribulose 5-fosfato isomerase.

A estrutura protéica da G6PD é constituída por 2 a 4 subunidades monoméricas por molécula de enzima ativa. Cada uma destas subunidades (monômeros inativos) possui um peso molecular aproximado de 60.000 Daltons, consistindo de 515 aminoácidos (WRIGLEY *et al.*, 1972).

1.2. ASPECTOS GERAIS DA DEFICIÊNCIA DE G6PD

A deficiência de G6PD constitui-se em um significativo marcador genético. É provavelmente a alteração genética que mais cause polimorfismos em humanos (BEUTLER, 1994). Suas manifestações clínicas variam de portadores assintomáticos a pacientes com icterícia neonatal, crises hemolíticas agudas ou até severa anemia hemolítica crônica não-esferocítica. Ela é a mais comum das enzimopatias em humanos, afetando cerca de 400 milhões de pessoas no mundo inteiro, e se expressa como uma anormalidade alélica de herança ligada ao sexo (BEUTLER, 1991).

Uma vez que a produção da G6PD é coordenada por um gene localizado no cromossomo X, mesmo tendo herdado um cromossomo com gene defeituoso, as mulheres, que são XX, geralmente não apresentam anormalidades clínicas, pois o outro cromossomo X (não afetado) é capaz de produzir quantidade de enzima suficiente para a manutenção do metabolismo eritrocitário. Os homens, entretanto, por serem XY, quando herdam um gene de G6PD defeituoso (são então chamados de hemizigotos), estão mais propensos a ter anemia hemolítica (BEUTLER, 1995).

Embora a estrutura do gene da G6PD em humanos tenha sido descrita em 1986 por MARTINI *et al.*, e sua clonagem e sequenciamento tenham sido feitos por PERSICO *et al.* e TAKIZAWA *et al.* em 1986, HIRONO & BEUTLER em 1988, CHEN *et al.*, 1991, apenas em 2000 é que sua estrutura tridimensional natural foi completamente elucidada, através de estudos de cristalografia desenvolvidos por AU *et al.* iniciados em 1999 (AU *et al.*, 1999; AU *et al.*, 2000).

Com base em suas características bioquímicas, estabelecidas a partir de ensaios padronizados pela OMS (WHO Scientific Group, 1967), mais de 400 variantes de G6PD já foram descritas (COMPRI *et al.*, 2000). Por outro lado, após a clonagem e sequenciamento completo do gene, pouco mais de 130 diferentes mutações em nível de DNA têm sido identificadas como responsáveis pela deficiência desta enzima (GRABOWSKA *et al.*, 2004). Esta desproporção deve-se provavelmente ao fato de que variantes com fenótipo aparentemente inédito, mas que em realidade possuíam a mesma alteração molecular, recebiam diferentes nomes quando encontradas em diferentes partes do mundo (MEHTA *et al.*, 2000). Existem exemplos de uma mesma alteração molecular ter surgido de modo independente em diferentes populações (VULLIAMY *et al.*, 1997).

Através dos seus perfis bioquímicos, as variantes fenotípicas então descritas, foram agrupadas em 5 classes distintas, de acordo com suas atividades enzimáticas e aspectos clínicos. (YOSHIDA *et al.*, 1971; YOSHIDA & BEUTLER, 1983). Esta divisão foi ampliada por LUZZATTO & MEHTA em 1995. Classe 1: 97 variantes, das quais apenas uma polimórfica. Estão

associadas a anemia hemolítica crônica não-esferocítica. Andaloris, Atlanta, Barcelona, New York, Campinas (BARONCIANI *et al.*, 1993) e Sumaré (SAAD, *et al.*, 1997) são alguns exemplos. As duas últimas foram descritas por pesquisadores aqui no Brasil. Classe 2: 122 variantes, sendo 37 polimórficas. Possuem grave deficiência de atividade enzimática (< 10%). A variante Mediterrânea, Union, Markham e Panay são exemplos clássicos. Classe 3: 103 variantes, das quais 22 polimórficas. Atividade enzimática moderadamente diminuída (10 a 60% de atividade). A variante Africana (A-), Betica, Canton e Seattle, são bons exemplos. Classe 4: 52 variantes, das quais 12 polimórficas. Possuem atividade enzimática quase normal ou normal (60 a 150% de atividade). A variante A⁺ é seu exemplo mais característico (COMPRI *et al.*, 2000). Nesta classe também estão incluídas as variantes Cuiabá e Butantan, descritas no Brasil (BARRETTO & NONOYAMA, 1987 e STOCCO DOS SANTOS, BARRETTO *et al.*, 1991). Classe 5: possuem atividade enzimática aumentada (acima de 150%). São descritas 2 variantes, a Gd Verona e a Gd Hektoen, nenhuma polimórfica (COMPRI *et al.*, 2000).

Dentre as inúmeras variantes da enzima destacam-se, pela alta frequência e variabilidade em sua expressão clínica ao portador, a forma normal, denominada variante B+ [Gd(+) B] (classe 4), as variantes Africanas A⁺ [Gd(+) A] (classe 4), resultante da substituição do aminoácido (aa) ácido aspártico por asparagina na posição 126 decorrente da mutação A→G no nucleotídeo 376 e A⁻ [Gd(-) A] (classe 3), que possui simultaneamente à mutação 376A→G, uma segunda mutação, que geralmente é resultante da troca na posição 68 do aa valina por metionina, devido a mutação no

nucleotídeo 202G→A. Menos frequentemente a segunda mutação que também determina a variante A⁻ pode estar na posição do aa 227 com substituição de arginina por leucina devido a mutação no nucleotídeo 680G→T, ou na posição do aa 323 com troca de leucina por prolina pela mutação 968T→C (HIRONO & BEUTLER, 1988; BEUTLER *et al.*, 1989). Além das variantes Africanas, também é bastante frequente a variante Mediterrânea ou B⁻ [Gd(-) B] (classe 2), decorrente da substituição de serina por fenilalanina no aa 188, decorrente da mutação no nucleotídeo 563C→T (VULLIAMY *et al.*, 1988).

A grande maioria de indivíduos de origem africana, e deficientes de G6PD são portadores da variante A⁻. Ela possui mobilidade eletroforética mais rápida que a variante normal B⁺ e atividade enzimática significativamente diminuída (10 a 60% do normal). Esta atividade, porém, é suficiente para manter as funções metabólicas normais do glóbulo vermelho na ausência de condições de stress oxidativo, como em infecções, pelo uso em altas doses de determinados medicamentos (**quadro 1.1**). Assim, os pacientes portadores da variante A⁻ habitualmente não apresentam manifestações clínicas, afora quadros hemolíticos agudos quando naquelas referidas condições. Também é característica da raça negra a variante A⁺. Esta variante possui mesma mobilidade eletroforética da variante A⁻, porém com atividade enzimática normal ou praticamente normal (acima de 60% do normal), daí o símbolo (+) vir acompanhado na denominação desta variante. Seus portadores não apresentam manifestações clínicas (MEHTA *et al.*, 2000).

Por outro lado, a grande maioria dos afetados por deficiências enzimáticas intraeritrocitárias oriundos da região do Mediterrâneo são

portadores da variante Mediterrânea (B^-). Ela tem mobilidade eletroforética igual à normal (B^+), porém de baixíssima atividade enzimática ($< 10\%$ do normal). Assim, muitos dos portadores desta variante apresentam crises hemolíticas graves provocadas por drogas (**quadro 1.1**), mesmo que em baixas doses, o que não é tão comum nos portadores da variante A^- . O favismo (hemólise após ingestão de fava fresca) ocorre tradicionalmente em portadores da variante B^- e nas demais variantes classe 2 (VULLIAMY *et al.*, 1988).

Além das referidas variantes A^+ , A^- e Mediterrânea, existem algumas outras, de incidência rara, porém de pior curso clínico, que podem causar anemia hemolítica crônica não-esferocítica (variantes classe 1). Sob o ponto de vista funcional estas variantes classe 1 são mais severas que as variantes A^- e Mediterrânea. Por outro lado, suas atividades enzimáticas “*in vitro*”, podem ser de fato maiores que a das variantes A^- e B^- . Isto sugere que características bioquímicas específicas como a suscetibilidade a inibição pelo NADPH possa explicar a hemólise crônica que ocorre em pacientes com as variantes classe 1 (YOSHIDA, 1973), devido a suas alterações moleculares estarem próximas ao sítio de acoplamento do NADP (BEUTLER, 1995).

Quadro 1.1. Drogas relacionadas ao desencadeamento de hemólise em deficientes de G6PD.

Tipos de medicamentos relacionados a hemólise em deficientes de G6PD	
Analgésicos/antitérmicos	Ácido acetil salicílico, acetanilida, acetofeneditina, amidopirina, antipirina, piramidona, probenecid;
Antimaláricos	Cloroquina, hidroxicloroquina, pamaquina, pentaquina, primaquina, quinacrina, quinina, quinocide;
Antibacterianos/citotóxicos	Ácido naldixico, ácido para-aminosalicílico, cloranfenicol, co-trimoxazol, frumetonol, furazolidona, neoasfenamina, nitrofurantoína, nitrofurazona,
Cardiovasculares	Procainamida, quinidina;
Sulfas/sulfonamidas	Dapsona, sulfacetamida, sulfametoxipirimidina, sulfanilamida, sulfapiridina, sulfasalazina, sulfisoxazol;
Outros	Alfa-metildopa, ácido ascórbico, ácido nalgístico, azul de toluidina, azul de metileno, dimercaprol, fenilhidrazina, hidralazina, piridium, mestranol, naftaleno, niridazol, trinitrotolueno, vitamina K hidrossolúvel;

Adaptado de OMS (1967) e de Beutler *et al.*, 1989 e Beutler, 1995.

1.3. A DEFICIÊNCIA DE G6PD NA POPULAÇÃO BRASILEIRA E MUNDIAL

A deficiência de G6PD é muito frequente em povos de origem africana, e da região do mar mediterrâneo, mas pode ser vista em virtualmente todas as populações do mundo. Sua prevalência em populações caucasóides pode variar de menos de 1 em 1000 habitantes nas populações do norte da Europa

até valores de cerca de 50% entre certas populações de Judeus. Também é frequente em populações da China e do sudeste asiático (BEUTLER, 1995).

A deficiência de G6PD do tipo A- é muito frequente no oeste africano (BEUTLER, 1995). É de aproximadamente 11% em homens negros americanos afro-descendentes (HELLER *et al.*, 1979). Cerca de 16% de negros afro-americanos possuem G6PD variante A+ (LUZZATTO & BATTISTUZZI, 1985). A variante Mediterrânea (G6PD B-) é a mais frequente entre os povos caucasóides da região do mar mediterrâneo, mas, nesta região, também podem estar presentes as variantes A- e Seattle (BEUTLER, 1995).

Recentes estudos feitos na Europa mostram perfís bastante distintos para a deficiência de G6PD naquele continente. Dados de DI MONTEMUROS *et al.* (1997) revelam heterogeneidade maior que a esperada para a deficiência de G6PD entre Italianos. Seus números reportam que 70% dos casos de deficiência de G6PD devem-se à variante Mediterrânea, mas 6% à variante Union, 6% à variante Seattle, 4% à variante africana A-, 1,2% às variantes S. Antinoco e Cosenza e apenas 1 caso da variante Tokyo. Estudo de RODRIGUES *et al.* (2002) em caucasianos portugueses mostra heterogeneidade ainda maior para a deficiência de G6PD. Seus resultados demonstraram que 48,6% dos portugueses deficientes em G6PD são portadores da variante africana A-, 18% da variante Santa Maria, 12,3% da variante Seattle, 9% da variante Betica, 6,1% da variante Mediterrânea, 3% da variante Gahoe e 1 indivíduo com uma "nova" mutação denominada então variante Flores. Na Espanha os resultados são igualmente heterogêneos. Dados de VIVES CORRONS *et al.* (1997), inferem às variantes africana A-,

Mediterrânea, Union e Seattle como as mais frequentes daquela população. Além destas também foram encontradas 9 outras mutações, 5 delas já vistas em outras populações: a variante A- associada à mutação 968T→C, Santa Maria, Aures e a variante Chatam, além de 4 inéditas, as variantes Malaga, Murci, Valladolid e Madrid, confirmando assim uma marcante heterogeneidade genética naquele país. Segundo MENOUNOS *et al.* (2000) seis diferentes tipos de variantes de G6PD foram encontradas entre 299 gregos deficientes de G6PD. As variantes encontradas foram a G6PD Mediterrânea, Seattle, Cassano, Lerapetra, Hermoupolis e Acrokorinthos (as duas últimas inéditas).

Entre os povos orientais é bastante comum a variante Canton e menos frequentemente a variante Viangchan (BEUTLER *et al.*, 1991c). As variantes Mediterrânea, Chatham e Consenza são comumente encontradas entre os povos árabes (MESBAH NAMIN *et al.*, 2002).

No Brasil, os estudos populacionais através de técnicas moleculares sobre a deficiência de G6PD são, em sua maioria, da região Sudeste, principalmente do interior do estado de São Paulo através dos trabalhos de SAAD (1995), SAAD *et al.* (1997), na região de Campinas, COMPRI *et al.* (2000), na região de Bragança Paulista e FERREIRA & LEITE (2004) na região de Araraquara. Ressalvas devem ser feitas à região Sul através dos estudos de WEIMER *et al.*, (1998) e recentemente, à região da amazônia, mais especificamente no Pará, através do trabalho de HAMEL, SAAD *et al.* (HAMEL & SAAD, 2002; HAMEL *et al.*, 2002).

Os dados obtidos para a deficiência de G6PD nas regiões do interior paulista demonstram em geral menor heterogeneidade para a deficiência de

G6PD que aqueles da Região Sul e da Região da Amazônia (estado do Pará). No sudeste, a mutação A- 202G→A é a grande causadora da deficiência da G6PD no Brasil (SAAD, 1995; SAAD *et al.*, 1997; COMPRI *et al.*, 2000). As variantes encontradas em Campinas foram: A- 202G→A (97,3%); Mediterrânea (2%), Chatam (1 caso $\cong$ 0,7%) (SAAD *et al.*, 1997); em Bragança Paulista foram: A- 202G→A (98,6%) e provável variante Chatam (1 caso) (COMPRI *et al.*, 2000); em Araraquara foram: A- 202G→A (95,5%), Mediterrânea (2,25%), não conclusivo (2,25%) (FERREIRA & LEITE, 2004). No interior e capital dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina foram encontradas as variantes A-, Mediterrânea, Seattle, e 2 novas mutações denominadas Gd Lages e Gd Farroupilha (WEIMER *et al.*, 1998). Curiosamente, todos os indígenas estudados por WEIMER *et al.*, em diferentes regiões do Brasil apresentaram variante normal Gd B+ (WEIMER *et al.*, 1993). No Pará foram encontradas as variantes: A- 202G→A (82,1%), A- 968T→C (7,1%), Seattle (4,6%), Santa Maria (2,5%) e as “novas” variantes Belém, Crispim, Ananindeua e Amazônia (HAMEL & SAAD, 2002; HAMEL *et al.*, 2002).

1.4. AS VARIANTES FENOTÍPICAS GD+ CUIABÁ E GD+ BUTANTAN

A Gd+ Cuiabá foi descrita em 1987 pelos pesquisadores Barretto e Nonoyama (BARRETTO & NONOYAMA, 1987) e revelava o portador como um homem (33 anos na época) caucasóide de ascendência portuguesa, residente em Cuiabá, Mato Grosso. Sua história clínica destaca que após o uso de ácido acetil salicílico (AAS) e acetaminofeno, por alguns dias, apresentou dor de

cabeça, calafrios, moleza, palidez, febre, discreta icterícia e urina escura. Após 4 dias, o hemograma apresentava 9,2g/dL de hemoglobina, sua contagem de reticulócitos era de 8,1%, bilirubina total de 8mg/dL (indireta = 7,1 mg/dL) e teste de Coombs indireto negativo. Catorze dias após a suspensão do AAS, seu estado havia normalizado. Cinco semanas depois, voltou a tomar AAS e voltou a ter dor de cabeça, icterícia e calafrios. Após 2 meses do ocorrido, foi feita dosagem de G6PD dando atividade normal (cerca de 80% da atividade do padrão). Como a história clínica era sugestiva de alterações na G6PD, mesmo com atividade normal, procedeu-se à purificação e caracterização bioquímica da enzima. Os resultados revelaram: mobilidade eletroforética normal, atividade normal, elevação do Km para G6P (aproximadamente o dobro do normal), Km normal para NADP, afinidade normal para os substratos 2-deoxi-glicose-6-fosfato e diamino-NADP, menor estabilidade térmica, aumento do Ki para NADPH e curva de pH normal. Tais resultados levaram os pesquisadores a indagar como variantes classe 4 (atividade normal) poderiam levar a hemólise *in vivo* após ingestão de AAS, imputando à diminuição da afinidade (aumento do Km) pelo seu substrato fisiológico (G6P) como um fator determinante e que justificaria seu episódio hemolítico.

A descrição original da Gd+ Butantan foi feita em 1991 por Stocco dos Santos, Barretto *et al.* (STOCCO DOS SANTOS, BARRETTO, *et al.*, 1991). Os portadores eram 3 primos de primeiro grau, todos do sexo masculino e de origem caucasóide. Destaca-se no texto que tais pacientes eram portadores de uma síndrome genética, ligada ao cromossomo X, até então nunca descrita, cujas principais alterações eram um grave retardo mental e alterações ósseas.

Sua variante de G6PD apresentava como principais características: atividade normal (100% do padrão normal), eletroforese normal (padrão B+), aumento do K_m para os substratos G6P (cerca de 2x o do controle normal) e para NADP (cerca de 2 a 3x o do controle normal), leve diminuição da estabilidade térmica e curva de pH arredondada, distintamente do aspecto truncado da curva de pH para o controle normal. O tempo de vida média dos eritrócitos de um dos portadores (determinação feita em apenas um dos três portadores) foi de aproximadamente 57 dias contra os 80 a 120 dias de vida média de eritrócitos normais. As irmãs dos portadores eram fisicamente normais. A caracterização bioquímica das G6PD das mães e irmãs não revelou qualquer perfil da variante Butantan dos portadores homens. Entretanto, como o gene da G6PD faz parte da região do cromossomo X submetida a inativação, poderia ter dificultado a identificação e caracterização bioquímica nas mulheres heterozigotas. O gene relacionado à esta síndrome genética é localizado na região Xq2.7, muito próximo do gene da G6PD e do sítio frágil do cromossomo X, sujeito ao fenômeno da inativação de um dos cromossomos X (descrito por Lyon).

1.5. FISIOPATOLOGIA E FENÔMENOS HEMOLÍTICOS NAS VARIANTES DE G6PD:

A deficiência de G6PD foi inicialmente descrita como resultado da investigação dos efeitos hemolíticos da primaquina (CARSON *et al.*, 1956).

O maior efeito da ineficiência de gerar NADPH através do ciclo das pentoses em deficientes de G6PD é a perda do único meio que os eritrócitos

possuem de se defenderem contra agressões oxidativas, uma vez que a manutenção das concentrações de glutathione reduzida (GSH), responsável pelo efeito antioxidante, é dependente de NADPH. Assim, os agentes oxidantes podem desnaturar a hemoglobina dos eritrócitos, levar à formação de precipitados intracelulares (os corpos de Heinz) que se aglomeram em sua superfície, para por fim serem fagocitados pelas células do sistema monocítico-macrofágico no baço. A peroxidação de lipídeos da membrana do eritrócito diminui sua flexibilidade e também facilita o seu sequestro esplênico (LUX, 1993).

A heterogeneidade clínica da deficiência de G6PD está associada a sua grande heterogeneidade genética (MEHTA *et al.*, 2000). Diferentes tipos de mutações levam a diferentes níveis de deficiência. Esta heterogeneidade está relacionada a quadros de hemólise associados a icterícia neonatal, anemia hemolítica aguda após uso de determinadas drogas oxidantes, durante infecções ou após ingestão de fava (favismo) e a anemia hemolítica crônica não-esferocítica (LUZZATTO & MEHTA, 1995).

O risco e a severidade de hemólise secundária ao uso de determinadas drogas em deficientes de G6PD estão relacionados a dose e à duração da terapia, bem como a situações adicionais de estresse oxidativo, como em determinadas infecções associadas. O uso de acetaminofeno, por exemplo, pode levar a severa hemólise. A hemólise e a icterícia, se iniciam em geral de 2 a 3 dias após o início da terapia. A hemólise é usualmente intravascular e pode levar a hemoglobinúria. Entre 8 a 10 dias após o início da hemólise ocorre

grande reticulocitose e o valor da hemoglobina circulante que havia diminuído, tende a elevar-se (MEHTA *et al.*, 2000).

Estima-se que cerca de 1/3 dos casos de icterícia neonatal em recém-nascidos masculinos de populações do oeste africano e mediterrâneo sejam uma consequência da deficiência de G6PD. Em casos mais graves podem levar a kernicterus (MILBAUER *et al.*, 1973; BIENZLE, 1981).

Como os eritrócitos jovens de portadores da variante Africana tipo A⁻ possuem atividade enzimática próxima do normal, estes pacientes dificilmente apresentam crises hemolíticas agudas. Por outro lado, portadores da variante Mediterrânea, apresentam mais facilmente tais fenômenos hemolíticos, uma vez que a atividade funcional desta variante é ausente tanto nos eritrócitos maduros quanto nos eritrócitos mais jovens (BEUTLER, 1990).

Além das variantes comuns, algumas mutações raras podem gerar tipos de G6PD que causem anemia hemolítica crônica não esferocítica. Estes portadores apresentam grande diminuição na sobrevivência média dos eritrócitos, tanto na ausência de stress oxidativo, quanto após o uso de certos medicamentos ou após infecções. Segundo Beutler, tais “novas mutações”, provavelmente por surgirem de modo esporádico, não se propagariam na população (BEUTLER, 1992). Para Fiorelli *et al* (FIORELLI *et al.*, 2000) as principais características bioquímicas destas variantes descritas como classe I seriam, uma pequena diminuição da sua constante de inibição (K_i) para NADPH, elevação dos seus K_m para os substratos G6P e NADP, bem como redução em suas estabilidades térmicas. Nestas variantes a atividade

enzimática pode chegar a abranger desde valores de até 35% do normal, a níveis severamente reduzidos ou mesmo indetectáveis (BEUTLER, 1994).

1.6. O GENE DA G6PD

O gene da G6PD (E.C. 1.1.1.49) é considerado como um típico gene constitutivo (*house keeping gene*), e está localizado no braço longo do cromossomo X, em sua região telomérica Xq2.8. É composto por 13 éxons e 12 íntrons, correspondendo a um tamanho de aproximadamente 18,5 quilobases (Kb) (MARTINI *et al.*, 1986) (**figura 1.2**). Seus éxons variam de tamanho de 38 pb (éxon 3) a até 695 pb (éxon 13). Todos os seus íntrons são menores que 300 pb, exceto o íntron 2 que, de modo pouco comum, possui aproximadamente 9857 pb. Sua região codificadora corresponde aos éxons 2 a 13, onde o éxon 1, os 8 primeiros pares de bases do éxon 2 e todos menos os 88 primeiros pb do éxon 13 não sofrem tradução no seu RNA mensageiro (POGGI *et al.*, 1990). Sua região codificadora é constituída por 1548 pares de bases (pb), gerando um polipeptídeo de 515 aminoácidos (MARTINI *et al.*, 1986). Sua região promotora é tipicamente rica em GC, uma característica marcante dos genes constitutivos (MEHTA *et al.*, 2000), que é conservada em humanos e camundongos, está localizada em um segmento de 436 bp da região 5' (URSINI *et al.*, 1990), e possui uma sequência típica TATA Box, TTAAAT, mas não elementos CAAT. Seu éxon 13 tem cerca de 607 pb em sua sequência 3'UTR não traduzida, que contém um típico sítio de poliadenilação (cauda *poly A*) (MARTINI *et al.*, 1986).

A G6PD em humanos é um tetrâmero (dímeros de dímeros), em que cada monômero possui dois domínios: um N-terminal, o domínio de ligação à coenzima NADP, correspondente aos resíduos de aminoácidos (31 a 200) (AU *et al.*, 2000), e o outro C-terminal, um grande domínio estrutural $\beta + \alpha$, correspondente aos resíduos de aminoácidos (201 a 515) (NAYLOR *et al.*, 1996; AU *et al.*, 1999; AU *et al.*, 2000; GRABOWSKY *et al.*, 2004), **fig 1.3**. Ela possui 2 regiões conservadas em relação a outras espécies: são os 7 resíduos GASGDLA de aminoácidos (38 a 44) que corresponde exatamente ao sítio de ligação à coenzima (NADP), e os 8 resíduos RIDHYLGK de aminoácidos (198 a 205) correspondentes ao sítio de ligação ao substrato G6P (BHADBHADE *et al.*, 1987; CAMARDELLA *et al.*, 1988; BAUTISTA *et al.*, 1995; NAYLOR *et al.*, 1996; AU *et al.*, 1999; AU *et al.*, 2000).

A estrutura dimérica é a menor forma molecular da G6PD que tem atividade catalítica (CANCEDDA *et al.*, 1973). A G6PD é funcional nos eritrócitos sob as formas tetramérica ou dimérica, cuja proporção intracelular é dependente do pH (FIORELLI *et al.*, 2000; AU *et al.*, 2000).

Caracteristicamente, o domínio N-terminal possui um sítio β - α - β (ligação NADP). O grande domínio $\beta + \alpha$ (C-terminal), possui nove folhas beta pregueadas antiparalelas. A interface entre os dímeros situa-se no início desta segunda parte (domínio $\beta + \alpha$) da molécula. Estes dois domínios são interligados por uma alfa hélice, que contém os oito resíduos de peptídeos conservados (198 a 205), que atuam como sítio de ligação ao substrato G6P (BAUTISTA *et al.*, 1995; NAYLOR *et al.*, 1996; MASON, 1996; COSGROVE *et al.*, 1998). Os primeiros 30 resíduos do segmento N-terminal são desordenados

al., 1998). Os primeiros 30 resíduos do segmento N-terminal são desordenados e parecem não ter muita importância na formação do tetrâmero da G6PD. Pouquíssimas regiões de contato para a formação do tetrâmero estão próximas das diferentes partes de interface entre os dímeros (AU *et al.*, 2000). A estabilidade da estrutura quaternária ativa da G6PD é crucial para a atividade normal da enzima (FIORELLI *et al.*, 2000).

Figura 1.3: Representação tridimensional do dímero da G6PD em humanos: dois monômeros (subunidades P e Q). O monômero P está colorido em vermelho, verde e amarelo; o monômero Q está colorido em azul claro, róseo e branco. Cada monômero consiste de dois domínios: o pequeno domínio da coenzima (aminoácidos 1-200) e o grande domínio $\beta + \alpha$ (aminoácidos 201-515). A sequência de aminoácidos 38-44 corresponde ao sítio de ligação à coenzima (NADP) (seta). A sequência de aminoácidos 198-205 corresponde ao sítio de ligação ao substrato (G6P). Adaptado de Naylor *et al.*, 1996.

De acordo com a estrutura cristalográfica determinada por Au *et al.* (2000), os aminoácidos correspondentes às mutações no éxon 10 (e suas proximidades) do gene da G6PD (variantes classe 1) estão localizados principalmente, na zona de interface entre os dímeros (resíduos 380-425), indicando que a integridade desta região é importante para a estabilidade e atividade *in vivo* da enzima (WIJK *et al.*, 2004). Os aminoácidos codificados no éxon 10 são envolvidos na formação dos dímeros ativos da G6PD, que adicionalmente requer a molécula estrutural de NADP para sua estabilidade (MEHTA *et al.*, 2000) **figuras 1.4, 1.5 e 1.6.**

Figura 1.4: Representação tridimensional do dímero da enzima G6PD em humanos. Amplificação da imagem da figura 1.2, destacando a região de interface de ligação entre os dímeros. O monômero P está colorido em vermelho, verde e amarelo; o monômero Q está colorido em azul claro, róseo e branco. As esferas pretas representam algumas mutações severas da classe 1 na unidade P, as esferas cinzas representam algumas mutações severas da classe 1 na unidade Q. As folhas beta pregueadas adjacentes (em verde e azul), pertencentes ao grande domínio $\beta+\alpha$ (resíduos de aminoácidos 380-425) correspondem à área específica de interface entre os dímeros. Adaptado de Naylor *et al.*, 1996.

Como esperado do fato de a maioria das variantes da G6PD que causam deficiência enzimática possuírem propriedades bioquímicas alteradas, tem sido demonstrado que quase todas as mutações da G6PD afetam a sequência codificadora do gene (VULLIAMY *et al.*, 1997). A grande maioria das mutações leva a substituição de uma única base (pontuais) (**quadro 1.2**), gerando a substituição simples de aminoácidos. A ausência de grandes deleções e mutações que gerem mudança do quadro de leitura da sequência de nucleotídeos a ser traduzida (frameshift), indicam que a falta total de G6PD seja incompatível com a vida. Experimentos utilizando embriões de camundongos com gene da G6PD submetido a *Knock-out*, demonstraram que embora fêmeas heterozigotas para este alelo nulo (alelo com gene Knock-out) fossem viáveis, os embriões alelo nulo hemizigotos (que dariam origem a camundongos machos) produziam morte intrauterina (MEHTA *et al.*, 2000).

Quadro 1.2. Os tipos de mutações que causam deficiência de G6PD

Tipo	Número
Substituição simples	111
Substituição de 2 ou 3 bases	8
Pequenas deleções	8
Sítios de processamento (<i>splicing</i>)	1
Substituições sem sentido (portadora heterozigota)	1
Região promotora	0
Total	129

Adaptado de Mehta *et al.*, 2000

Embora as mutações se estendam através de toda a região codificadora do gene, um número muito exíguo (4 em 56) das mutações que causam a mais severa forma de deficiência de G6PD, associada a anemia hemolítica crônica não-esferocítica (variantes classe 1), está entre os 160 aminoácidos N-terminais, e nenhuma das mutações que causam as formas moderadas de deficiência (classe 2 ou 3) está entre os 48 aminoácidos C-terminais. Além disso há um grupo de mutações causadoras de variantes classe I no éxon 10, principalmente entre os resíduos de aminoácidos 380 e 425, (FIORELLI *et al.*, 2000) figuras 1.5, 1.6 e 1.7.

Figura 1.5: Distribuição das mutações da G6PD associadas a anemia hemolítica crônica não-esferocítica (classe 1). A linha mais acima mostra a escala de aminoácidos. Os círculos cheios representam mutações esporádicas, os círculos vazios representam mutações recorrentes, os círculos com linha representam mutações duplas ou triplas: a) Gd Honiara 33 Ile→Met + 454 Arg→Cys; b) Gd Vancouver 106 Ser→Cys + 182 Arg→Trp, 198 Arg→Cys; c) Gd Mount Sinai 126 Asn→Asp + 387 Arg→Cys; d) Gd Bangkok Noi 459 Arg→Leu + 501 Phe→Cys. Triângulos ilustram as posições das pequenas deleções. As setas indicam os sítios de ligação ao substrato (G6P) e à coenzima (NADP+). e = éxons; α = alfa hélices; β = folhas beta pregueadas. Adaptado de Fiorelli *et al.*, 2000.

Figura 1.6: Distribuição das mutações da G6PD associadas a anemia hemolítica crônica não-esferocítica (classe 1) que afetam a interface entre os dímeros. Modificado de Fiorelli *et al.*, 2000.

As proteínas, sintetizadas como sequência de aminoácidos unidos em uma estrutura poliamida linear (polipeptídeo) assumem configurações tridimensionais complexas ao exercerem suas funções. Sua conformação pode modificar-se pela simples troca de um aminoácido, podendo ou não comprometer sua atividade biológica (BAYNES & DOMINICZAK, 2000). Assim, as mutações, que são alterações de cópia durante a replicação do DNA e, conseqüentemente, alteração da transcrição do RNA mensageiro, dependendo do tipo de troca de base e, por conseguinte, de aminoácido (**quadro 1.3**), poderão comprometer ou não o desempenho da proteína. Desta feita, o local onde houve a troca de aminoácidos, qual aminoácido foi trocado por qual, e o

que esta troca específica em local específico trará para a conformação da proteína, são pontos chave para, em maior ou menor monta, alterar o desempenho de sua atividade, estabilidade e/ou modificar o seu perfil bioquímico.

As mutações conservadoras são aquelas em que o códon que codifica um determinado aminoácido é substituído por um códon que dá origem a um aminoácido do mesmo grupo (ex. AAA = lisina é mudado para AGA = arginina, sendo arginina e lisina aminoácidos básicos). Elas geralmente não levam a grandes alterações protéicas. As mutações de falso sentido são as que um códon é substituído por outro códon que dá um aminoácido quimicamente muito diferente, por exemplo: um AAG = lisina é mudado para GAG (ácido glutâmico), sendo a lisina um aminoácido básico enquanto que o ácido glutâmico é um aminoácido ácido. Disso resulta geralmente uma proteína bastante anormal (ETIENNE, 2002). As mutações do gene da G6PD são geralmente pontuais e, em cerca de 75% dos casos, envolve as bases G e C. Este desequilíbrio pode ser explicado pela alta frequência de dinucleotídeos CpG, resultando geralmente em transições CpG para TpG (COOPER & YOUSSEF, 1988). Nas variantes classe 1, este tipo de transição é observado e explica a redução da atividade enzimática em apenas cerca de 18% dos casos. Uma vez que quase todas as mutações, incluindo as substituições CpG→TpG, envolve aminoácidos próximos a interface entre os dímeros (éxons 10 e 11 do gene da G6PD), isto sugere que a posição da estrutura terciária da enzima seja mais importante que propriamente, e por si só, o tipo de mutação. Isto pode ser confirmado pela presença de um outro

grupo de mutações nos éxons 6 e 7, e que causam anemia hemolítica crônica não-esferocítica (variantes classe 1) que estão muito próximas da região de interface entre os dímeros da G6PD (FIORELLI *et al.*, 2000).

Figura 1.7: Localização das mutações no gene da G6PD de acordo com a classe da variante. Bolas vazias = mutações simples; bolas cheias = mutações duplas ou triplas; quadrados cheios = deleções. Total mutações descritas = 140. Total de mutações plotadas na figura = 131. E = éxon. Nove mutações não tinham definição da respectiva classe e não foram plotadas na figura. Classe 1 = 65 mutações; classe 2 = 33 mutações; classe 3 = 30 mutações; classe 4 = 3 mutações. Baseado nos dados de Beutler & Vulliamy, 2002.

Quadro 1.3. Polaridade dos grupamentos funcionais dos aminoácidos

Resumo dos grupamentos funcionais dos aminoácidos e sua polaridade			
Aminoácidos	Grupo funcional	Hidrofílicos (polar) ou hidrofóbicos (apolares)	Exemplos
Ácidos	Carboxila	polar	Asp, Glu
Básicos	amina,	polar	Lys
	imidazol,	polar	His
	guanidina	polar	Arg
Neutros	amida	polar	Asn, Gln
	hidroxila	polar	Ser, Thr
	sulfidrina	polar	Cis
	hidrogênio	polar	Gly
Alifáticos	hidrocarboneto	apolar	Ala, Val, Leu, Ile,
	sulfidrina		Met,
	hidrocarb. cíclico		Pro
Aromáticos	anéis de C	apolar	Phe, Trp, Tyr

(adaptado de Baynes e Dominiczak, 2000)

1.8. OS HAPLÓTIPOS DO GENE DA G6PD

A partir da observação de que determinadas enzimas (as endonucleases de restrição), eram capazes de reconhecer e clivar determinadas seqüências específicas de nucleotídeos e gerar diferentes fragmentos de DNA, caso houvesse ou não a presença daquela seqüência de nucleotídeos, pôde-se então criar uma técnica que através da identificação de diferença de fragmentos do DNA gerado pela restrição enzimática após amplificação pela PCR, era capaz de informar se haveria ou não o sítio específico de restrição.

Assim, através da utilização destas endonucleases específicas, pode-se determinar a existência ou não de variação do tamanho dos fragmentos amplificados pela PCR. Para estas variações detectadas nos sítios de restrição foi dado o nome de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLPs) (THOMPSON *et al.*, 1993).

As mutações no DNA, através da introdução ou substituição de bases, podem alterar (criar ou omitir) sítios específicos de clivagem para tais enzimas e gerar fragmentos de diferentes tamanhos.

O haplótipo é o termo que traduz a combinação de sítios polimórficos que ocorrem simultaneamente em um mesmo cromossomo (ANTONARAKIS *et al.*, 1985).

Com base na presença de determinados sítios polimórficos organizados em ordem crescente conforme sua localização no DNA para o gene da G6PD, do éxon 4 (202 G→A) para **NlaIII**, do éxon 5 (376 A→G) para **FOKI**, Intron 5 (nt611C→G) para **PvuII**, Intron 7 (nt175C→T) para **ScaI**, Intron 8 (nt163C→T)

para **BspHI**, éxon 10 (nt116G→A) para **PstI**, e éxon 11 (nt1311C→T) para **BclI**, em 1991, VULLIAMY *et al.*, ordenaram numericamente os haplótipos para G6PD, como: I (- - - - + + -); II (- - - - + - -); III (- + - - + + -); IV (- + - - - + -); V (- + + - + -); VI (+ + + + - + -) e VII (- - - - + + +). Este modelo de numeração passou então a ser utilizado como base para comparação entre vários outros trabalhos publicados na literatura, como o de RODRIGUES *et al.*, 2002, que além dos sítios polimórficos do éxon 5 (376 A→G) para **FokI**, do íntron 5 (nt611C→G) para **PvuII**, do íntron 8 (nt163C→T) para **BspHI**, do éxon 10 (nt116G→A) para **PstI** e do éxon 11 (nt1311C→T) para **BclI**, acresceu o estudo do sítio polimórfico do íntron 11 (nt93T→C) para **NlaIII** permitindo a avaliação de novas combinações de polimorfismos e adaptou tal numeração.

Alguns sítios polimórficos fornecem informações sobre seus haplótipos, tornando possível analisar relação de desequilíbrio entre diferentes mutações e polimorfismos, e especularem suas idades e respectiva origem.

Figura 1.8: Localização dos sítios polimórficos utilizados na determinação dos haplótipos, adaptado de Vulliamy *et al.*, 1991. Esquema do gene da G6PD, adaptado de Martini *et al.*, 1986.

1.9. JUSTIFICATIVA DO TEMA

Dentre as várias classes de variantes bioquímicas da G6PD, certamente as classe 4 e classe 5, que não promovem diminuição da atividade da G6PD (sendo assim chamadas variantes Gd+) e não levam a alterações clínicas em seus portadores, são as mais difíceis de serem encontradas. Isso, por si só, as torna de grande importância no estudo científico.

Além desta desvantagem numérica em relação às variantes de outras classes, são as variantes classe 4 que podem servir de contraponto com as mutações das variantes classe 1 no estudo proteína versus gene. Isto se justifica uma vez que estas últimas, por levarem seus portadores a desenvolverem anemia hemolítica crônica não-esferocítica, têm suas alterações moleculares (mutações) sempre relacionadas a pontos críticos da molécula protéica. Deste modo a elucidação das alterações moleculares em variantes fenotípicas que não levam a maiores alterações na atividade enzimática, como as Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan, pode servir de contrabalanço no estudo da correlação entre a estrutura (seqüência de aminoácidos) e conformação espacial da proteína G6PD *versus* a sua atividade e funcionabilidade.

2. OBJETIVOS

GERAL

Caracterização molecular dos genes das variantes fenotípicas da glicose-6-fosfato desidrogenase descritas na literatura através de seu perfil bioquímico, a Gd+ Cuiabá (BARRETTO & NONOYAMA, 1987) e a Gd+ Butantan (STOCCO DOS SANTOS, BARRETTO *et al.*, 1991).

ESPECÍFICOS

- Otimizar as reações da PCR para amplificação de fragmentos do DNA genômico e do RNA mensageiro, para o estudo molecular das variantes fenotípicas da glicose-6-fosfato desidrogenase Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan, através da construção de novos iniciadores;
- Para validar as otimizações propostas das reações da PCR e posterior SSCP para triagem de mutações relacionadas ao gene da glicose-6-fosfato desidrogenase, utilizar uma casuística local de amostras controles de indivíduos normais e deficientes de G6PD;
- Avaliar de que forma a alteração molecular específica de cada uma das variantes possa ter contribuído para as respectivas alterações em seus perfis bioquímicos;
- Sequenciar o RNA mensageiro obtido pela reação da RT-PCR para avaliar a sequência do transcrito;

- Caracterizar o haplótipo das variantes Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan, utilizando como referência amostras deficientes e controles normais de nossa população através da análise de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP);
- Avaliar a expressão da glicose-6-fosfato desidrogenase nos portadores das variantes Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan, através da técnica da PCR em Tempo Real.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

Nossa casuística constou dos portadores das variantes fenotípicas para glicose-6-fosfato desidrogenase descritas na literatura através de seu perfil bioquímico, a Gd+ Cuiabá (BARRETTO & NONOYAMA, 1987) e a Gd+ Butantan (STOCCO DOS SANTOS, BARRETTO *et al.*, 1991), além da mesma amostra controle normal utilizada na caracterização bioquímica destas referidas variantes publicadas na literatura.

Inicialmente foram utilizadas apenas uma amostra de sangue do portador da Gd+ Cuiabá e uma amostra de sangue de um dos portadores da Gd+ Butantan. Somente após a identificação da alteração molecular é que seriam investigados os demais familiares dos respectivos probandos.

Com a finalidade de otimização da técnica da Análise do Polimorfismo na Conformação da Fita Simples (SSCP- *Single Strand Conformation Polymorphism*) em amostras de DNA amplificadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR- *Polymerase Chain Reaction*) e para a determinação dos haplótipos através da técnica do Polimorfismo no Tamanho do Fragmento de Restrição (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*) em produtos da reação em cadeia pela polimerase, a serem utilizados como referência para os probandos, também foram utilizadas 30 amostras de indivíduos deficientes de G6PD e 33 de não-deficientes encaminhadas à Seção de Hematologia da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, para dosagem de G6PD.

Assim, nossa casuística abrangeu no total, uma amostra da Gd+ Cuiabá, uma amostra da Gd+ Butantan, 30 amostras deficientes para atividade da G6PD e 34 amostras não-deficientes.

3.1.1. Obtenção das amostras:

Após aprovação em Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, e consentimento livre e esclarecido dado pelos probandos ou responsáveis, as amostras utilizadas foram obtidas como segue.

Para extração de DNA genômico de leucócitos, foram colhidos 5mL de sangue por punção de veia periférica, colocados em tubo de Kahn (tubo de hemólise) contendo 1 gota de solução de sal dissódico de EDTA a 10% (DACIE & LEWIS, 1995) e homogeneizados. Para extração de RNA de células mononucleares, foram colhidos 10mL de sangue e colocados em 2 tubos de Kahn, cada um contendo 1 gota de solução de sal dissódico de EDTA a 10%.

Para as amostras encaminhadas à seção de Hematologia da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, para dosagem quantitativa da atividade intraeritrocitária da G6PD e que também foram utilizadas para análise molecular da G6PD em DNA genômico leucocitário, foram colhidos 5mL de sangue por punção de veia periférica e colocados em tubo de Kahn (tubo de hemólise) contendo 1 gota de solução de sal dissódico de EDTA a 10% e misturados a uma solução de ACD (ácido cítrico - citrato de sódio -dextrose) (DACIE & LEWIS, 1995), na proporção de 1mL de ACD para cada 3mL de sangue em EDTA.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Triagem de deficientes e controles normais de G6PD

Através da determinação quantitativa da atividade intraeritrocitária da G6PD, obedecendo aos critérios de coleta e processamento do sangue, preparo

do hemolisado e determinação da atividade a 37°C, de acordo com Beutler (1984 e 1990b), foi feita a triagem entre pacientes com deficiência de G6PD e indivíduos não-deficientes.

Para a otimização da SSCP como triagem de mutações, utilizamos as 30 amostras que apresentaram baixa atividade de G6PD, além das variantes Cuiabá e Butantan, num total de 32 amostras. Estas amostras deficientes também foram utilizadas para a caracterização dos haplótipos em deficientes.

Outras 33 amostras escolhidas ao acaso dentre aquelas que apresentaram atividade normal para G6PD, foram incluídas no grupo de não-deficientes. A amostra utilizada como controle normal nos experimentos originais feitos para a caracterização bioquímica das variantes Gd Cuiabá e Gd Butantan, referida anteriormente também fez parte do grupo de não deficientes. Assim, um total de 34 amostras serviu de base para determinação de haplótipos em não deficientes. As amostras negativas para o polimorfismo 376 A→G, no éxon 5 foram designadas como grupo controle G6PD B+, as positivas para tal polimorfismo foram designadas como G6PD A+ (figura 3.3).

3.2.2. DNA genômico

3.2.2.1. Extração do DNA genômico

Os DNAs genômicos das amostras foram extraídos utilizando-se a técnica descrita por SALAZAR *et al.* (1998). Neste procedimento, resumidamente, o sangue coletado foi centrifugado a 5.000 rpm/ 5 min à TA e o plasma sobrenadante desprezado. Para hemolisar os eritrócitos adicionou-se ao

sedimento leuco-eritrocitário tampão tris TM1 1x (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; KCl 100 mM; MgCl₂ 100 mM; EDTA 20 mM) contendo triton X-100 a 2,5%. Após agitação vigorosa centrifugou-se a 5.000 rpm/ 5 min, e descartou-se o sobrenadante hemolisado. Para lavar o sedimento de leucócitos e deixá-lo livre de hemoglobina, foram feitas 3 lavagens sucessivas com tampão tris TM1 1x sem triton, seguida de centrifugação. Após a última lavagem ressuspendeu-se o sedimento leucocitário com tampão tris TM2 1x (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl₂ 10 mM; EDTA 2 mM; NaCl 0,4 M). Para lisar a membrana celular dos leucócitos adicionou-se 20 µL de SDS 10% e incubou-se a 56°C por 15 min. Para precipitação das proteínas adicionou-se 100 µL de NaCl 5M seguida de centrifugação a 12.000 rpm / 5 min à TA. Transferiu-se o sobrenadante contendo o DNA para um tubo estéril. Para extrair o DNA adicionou-se quantidade equivalente a 2 volumes de etanol absoluto e deixou-se incubando em freezer a -20°C por 30 min. Para precipitar o DNA centrifugou-se a 12.000 rpm / 5 min, lavou-se o sedimento por 3x com etanol a 70%. Removeu-se cuidadosamente o etanol, e após toda sua evaporação ressuspendeu-se o sedimento de DNA com tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0).

3.2.2.2. Quantificação e análise de pureza do DNA genômico

A quantificação e a análise de pureza obtida através da relação das absorbâncias a 260nm e 280nm das amostras de DNAs extraídas foram determinadas no espectrofotômetro Beckman DU 640, Fullerton, CA, USA, em UV, após diluição (1:20) das amostras em tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0), 5µl DNA + 95µL de tampão TE (SAMBROOK *et al.*, 1989). Foi

utilizado o próprio tampão TE como branco das leituras para zerar o espectrofotômetro.

As amostras de DNA extraídas e quantificadas foram diluídas em TE para uma concentração padrão de 50 ng/μL. Os DNAs, assim obtidos, foram então armazenados em refrigerador à uma temperatura de - 20°C.

3.2.2.3. Avaliação da integridade do DNA genômico

Após a determinação da concentração e pureza, foi também determinada a integridade dos DNAs através de eletroforese em gel de agarose (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA) a 1,0% em tampão TBE (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM) em cuba eletroforética Horizon 58 (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Rockville, MD USA). O gel foi imerso em tampão TBE (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM) e as amostras contendo 5 μL do DNA e 2 μL do tampão de amostra (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol FF a 0,25% e glicerol a 30%) foram aplicadas no gel de agarose. Aplicou-se também 5 μL de marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb. A separação eletroforética foi realizada a 100 V, por 30 min a 60 mA, utilizando fonte modelo EPS 200 (Pharmacia Biosciences, Uppsala, Sweeden).

Após a corrida da eletroforese, o gel de agarose foi corado com brometo de etídeo, visualizados sob luz UV e fotografados com sistema de fotodocumentação Alphamager 2000 Documentation & Analysis System (AlphaInnotech Corporation).

3.2.2.4. Otimização da quantidade de DNA para 50 ng/μL

Com a finalidade de tornar equivalente as quantidades de DNA a serem utilizadas durante a otimização de cada uma das reações da PCR, de posse da concentração de DNA determinada espectrofotometricamente para cada amostra, foi pipetada uma quantidade de DNA suficiente para aliquotarmos 100 μL de uma solução de DNA a 50 ng/μL.

Por exemplo: Concentração DNA extraído = 919,61 ng/μL. Utilizando a fórmula $C1 V1 = C2 V2$, onde $C1$ = concentração inicial, $V1$ = volume inicial, $C2$ = concentração final, $V2$ = volume final, determinou-se: $919,61 \text{ ng/μL} \times V1 = 50 \text{ ng/μL} \times 100 \text{ μL}$, então $V1 = 5,5 \text{ μL}$. Desta forma diluiu-se 5,5 μL da solução do DNA extraído em 94,5 μL de tampão TE, para obtermos os 100 μL da solução de DNA a 50 ng/μL.

3.2.3. RNA total

3.2.3.1. Extração de RNA total

A extração do RNA foi feita com TRIZOL (Gibco-BRL), utilizando linfócitos obtidos por gradiente Ficoll-Paque. Resumidamente: Para uma quantidade de linfócitos equivalente a 5 a 10×10^6 células obtidos por gradiente ficoll-paque, adicionou-se 1 mL de reagente Trizol para um tubo de microcentrífuga estéril; homogeneizou-se vigorosamente por 15 seg e incubou-se a -20°C por 15 min; centrifugou-se por 15 min a 12.000 g a 4°C ; transferiu-se a fase superior, contendo o RNA para um outro tubo de microcentrífuga onde adicionou-se 500 μL de isopropanol; incubou-se por 1 hora a -20°C ; centrifugou-se por 15 min a

12.000g a 4°C, removeu-se o sobrenadante e o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol a 75%; misturou-se por inversão; centrifugou-se por 7 min a 7.500g a 4°C; desprezou-se o sobrenadante, deixou-se secar por 10 min e resuspendeu-se o sedimento em 100 µL de água miliQ estéril tratada com DEPC; incubou-se a 56°C por 10 minutos para completa solubilização do RNA e acondicionou-se a – 70°C.

3.2.3.2. Quantificação do RNA total extraído

A quantificação e a análise de pureza do RNA total extraído foi feita de modo semelhante ao DNA genômico.

3.2.4. Otimização das reações de amplificação pela PCR para SSCP, RFLP e sequenciamento do DNA genômico.

As regiões codificadoras do DNA genômico, para análise de SSCP e sequenciamento com as demais regiões específicas, para a caracterização de polimorfismos por RFLP para determinação dos haplótipos do gene da G6PD, foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (SAIKI *et al.*, 1985).

Com o objetivo de estabelecer as concentrações ideais dos reagentes e as condições ideais dos ciclos de amplificação para as amostras e as temperaturas de desnaturação, hibridização e extensão, foram realizados testes baseados inicialmente nos trabalhos de POGGI *et al.*, 1990 e RODRIGUES *et al.*, 2002 no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da USP.

Quantidades de (50 ng, 100 ng e 200 ng) de DNA genômico foram inicialmente amplificadas em uma mistura contendo Tris-HCl (pH 9,0) 75 mM; MgCl₂ 2 mM; KCl 50 mM; (NH₄)₂SO₄ 20 mM; quantidades de 100 nM, 150 nM e 200 nM de cada iniciador, 200 µM de dNTPs e 2 e 1U de Taq DNA polimerase para um volume final de reação de 50 µL, utilizando termociclador PTC-200 da MJ Ressearch.

Os produtos de amplificação foram avaliados quanto a especificidade da reação em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo, visualizados sob luz UV e fotografados com sistema de fotodocumentação Alphamager 2000 Documentation & Analysis System (AlphaInnotech Corporation).

3.2.4.1. Iniciadores

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizadas para amplificar regiões específicas do gene da G6PD estavam de acordo com informações disponíveis no GenBank, número de acesso X55448, através do site:ncbi.nlm.nih.gov

O critério inicial utilizado para a escolha dos iniciadores a serem utilizados para a amplificação do DNA genômico para a técnica do polimorfismo na conformação da fita simples, foi de aumentar ao máximo a sensibilidade desta técnica. Assim procuramos trabalhar com iniciadores que nos dessem fragmentos únicos de DNA e que tais fragmentos não ultrapassassem ao tamanho de aproximadamente 250bp. O gene da G6PD foi então dividido em 14 regiões: éxon 2, éxon 3, éxon 4, éxon 5a, éxon 5b, éxon 6, éxon 7, éxon 8, éxon 9, éxon 10a, éxon 10b, éxon 11, éxon 12 e éxon 13. Como o éxon 1, apesar de ser transcrito

para o RNAm não sofre tradução, ele não foi incluído nesta fase de estudo. Assim, para esta etapa foram utilizados 28 iniciadores, 9 deles de acordo com POGGI et al, 1990 e outros 19 “novos” iniciadores propostos neste estudo, utilizando o programa *Primer Premier 5* (PREMIER Biosoft International, California, USA) (tabela 3.1).

Como após a SSCP tínhamos o interesse em fazer o sequenciamento do DNA, a localização dos iniciadores foi feita nos íntrons adjacentes aos éxons a serem amplificados, de modo a poder avaliar as seqüências dos éxons por inteiro, incluindo os sítios de processamento. Para aqueles éxons de maior tamanho, onde a construção dos iniciadores nos íntrons adjacentes tornava o fragmento de DNA muito acima de 250 pb inicialmente preconizados, foi utilizada a estratégia de internalizar iniciadores no próprio éxon em questão, de modo que o iniciador *antisense* correspondente à primeira metade do éxon ficasse pelo menos 30 nucleotídeos após o iniciador *sense* correspondente à segunda metade daquele éxon. Havendo assim uma sobreposição nas terminações 5' e 3' do fragmento de DNA com o objetivo de analisar o gene em toda a sua extensão.

3.2.4.2. Construção de “novos” iniciadores

Para a construção dos “novos” iniciadores foi utilizado o programa *Primer Premier 5* (PREMIER Biosoft International, California - U.S.A), o qual, a partir da seqüência do gene específico em estudo nos calculava a temperatura de desnaturação (*melting*), a possibilidade de formação de alças (hairpin) entre os iniciadores, de dímeros, de hibridização em locais inespecíficos (sítios de falsos iniciadores) e do tamanho do fragmento a ser formado entre os iniciadores *sense*

e *antisense* em análise. Os pares de iniciadores escolhidos foram aqueles que, pelo programa, apresentavam as temperaturas de desnaturação o mais próximo possível entre si e as menores possibilidades de formar alças, dímeros ou fragmentos inespecíficos.

Os desenhos dos iniciadores foram feitos e previamente testados junto ao GenBank, através do programa BLAT, no site: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgblat>, para excluir a possibilidade de a sequência desenhada para cada par de iniciadores alinhar em outras regiões do genoma humano.

Um outro ponto importante levado em consideração na construção dos “novos” iniciadores foi o escolher seqüências de oligonucleotídeos *sense* que combinados com outros oligonucleotídeos *antisense* (que não aqueles do par original) também pudessem nos dar resultados satisfatórios e assim, serem úteis nas nossas amplificações para as reações de RFLP. Por exemplo: os pares de iniciadores A *sense* / B *antisense* e C *sense* / D *antisense*, pudessem ser usados na combinação A *sense* / D *antisense*.

Assim, para a otimização das técnicas do tamanho do fragmento de restrição (RFLP) em produto da reação em cadeia da polimerase (PCR), a serem utilizadas para a confirmação das amostras deficientes que apresentassem perfil na SSCP alterados simultaneamente e apenas nos éxons 4 e 5 como provável variante africana 202 G→A e 376 A→G (A-), ou apenas no éxon 6 como variante mediterrânea 563 C→T, também foram utilizados alguns dos mesmos iniciadores usados para SSCP (tabela 3.2).

As reações de amplificação para as análises do polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição (PCR-RFLPs) e caracterização dos haplótipos, com

exceção do par de iniciadores usado para a pesquisa do polimorfismo C→T no nucleotídeo 1311 do éxon 11, todos os demais também foram os mesmos utilizados para as reações de SSCP (tabela 3.3).

Tabela 3.1. Lista de iniciadores utilizados nas reações em cadeia da polimerase utilizadas para SSCP, nas amostras de DNA genômico.

Iniciador (sentido)	Comprimento (pb)	Localização no DNA genômico	Tamanho frag. amplif. (pb)	Temperatura melting (°C) calculada
E2 (S)* /E2 (AS)*	25 / 25	nt3272-3296/nt3512-3487	241	62,9 / 66,7
E3 (S)/E3 (AS)	20 / 20	nt13279-13298/nt13445-13423	167	62,5 / 63,8
E4 (S)/E4 (AS)	20 / 20	nt13403-13422/nt13604-13585	202	65,8 / 66,2
E5a(S)/E5a(AS)	20 / 20	nt14046-14065/nt14255-14236	211	63,1 / 64,0
E5b(S)/E5b(AS)	20 / 20	nt14186-14205/nt14399-14380	214	60,3 / 63,0
E6 (S)/E6 (AS)	22 / 21	nt14956-14977/nt15210-15190	255	65,5 / 64,4
E7 (S)/E7 (AS)	21 / 20	nt15311-15341/nt15502-15484	192	63,1 / 65,1
E8 (S)* /E8(AS)*	17 / 19	nt15798-15814/nt15961-15943	164	52,7 / 63,2
E9 (S)* /E9(AS)*	17 / 17	nt16340-16356/nt14255-14236	253	49,3 / 63,4
E10a(S)/E10a(AS)	21 / 20	nt16658-16678/nt16858-16839	202	62,6 / 62,7
E10b(S)/E10b(AS)*	21 / 21	nt16790-16810/nt16977-16957	188	68,9 / 71,5
E11 (S)* /E11(AS)	21 / 23	nt17002-17022/nt17160-17138	159	66,2 / 67,1
E12 (S) / E12 (AS)	20 / 20	nt17167-17186/nt17380-17361	214	63,9 / 63,9
E13 (S) / E13 (AS)*	19 / 19	nt17338-17357/nt17549-17531	211	66,0 / 66,8

* segundo POGGI *et al.*, 1990; S = sentido *sense*; AS = sentido *antisense*. Os sentidos e a localização dos iniciadores estão de acordo com a sequência do gene da G6PD presente no GenBank. pb = pares de bases.

Tabela 3.2. Lista de iniciadores utilizados nas PCR para as RFLPs, como confirmação das mutações Africana 202 G→A e 376 A→G (A-), nos éxons 4 e 5, e Mediterrânea 563 C→T no éxon 6, nas amostras de DNA genômico.

Iniciador (sentido)	Comprimento (pb)	Mutação	Tamanho frag. amplif. (pb)	Temperatura melting (°C) calculada
E3 (S)/ E4 (AS)	20 / 20	<i>Nla</i> III éxon 4(nt202 G→A)	326	62,5 / 66,2
E5a(S)/ E5b(AS)	20 / 20	<i>Fok</i> I éxon 5(nt376 A→G)	355	63,1 / 64,0
E6 (S)/E6 (AS)	22 / 21	<i>Mbo</i> II éxon 6(nt563 C→T)	255	65,5 / 64,4

S = sentido *sense*; AS = sentido *antisense*. Os sentidos dos iniciadores estão em relação à sequência do gene da G6PD presente no GenBank. pb = pares de bases.

Tabela 3.3. Lista de iniciadores utilizados nas reações de PCR-RFLP, para a caracterização dos polimorfismos, para a determinação dos haplótipos.

Iniciador (sentido)	Enzima e Polimorfismo	Comp. (pb)	Tamanho frag. amplif. (pb)	Temperatura de melting (°C) calculada
E5a(S)/E5b(AS)	<i>FOK</i> I éxon5 (376 A→G)	20 / 20	355	63,1 / 63,0
E5b(S)/ E6 (AS)	<i>Pvu</i> II Intron5 (nt611C→G)	20 / 21	1025	60,3 / 64,4
E8(S)*/E9 (AS)*	<i>Bsp</i> HI Intron8 (nt163C→T)	17 / 17	795	52,7 / 63,4
E10a(S)/E10a(AS)	<i>Pst</i> I éxon10 (nt1116G→A)	21 / 21	202	62,6 / 62,7
Bcl(S)*#/Bcl(AS)*#	<i>Bcl</i> I éxon11 (nt1311C→T)	21 / 23	207	66,2 / 67,1
E12 (S) / E12 (AS)	<i>Nla</i> III intron11 (nt-13T→C)	20 / 20	214	63,9 / 63,9

* segundo POGGI *et al.*, 1990;# segundo SAAD, 1995 modificado de BEUTLER *et al.*, 1989 e POGGI *et al.*, 1990. S = sentido *sense*; AS = sentido *antisense*. Os sentidos dos iniciadores estão em relação à sequência do gene da G6PD presente no GenBank.

3.2.4.3. Determinação da temperatura ótima de hibridização para cada par de iniciadores, utilizados na PCR

A temperatura de hibridização ideal para cada PCR foi determinada através de um gradiente de diferentes temperaturas, utilizando-se inicialmente valores de aproximadamente 3 graus acima e de 3 graus abaixo da temperatura de

hibridização que foi calculada teoricamente subtraindo 5 graus da temperatura média de desnaturação entre os iniciadores *sense* e *antisense* utilizados. A temperatura de desnaturação entre cada par de iniciadores foi calculada pelo programa *primer premier 5* (PREMIER Biosoft International, California - U.S.A), tanto para os iniciadores originalmente construídos durante o desenvolvimento deste trabalho quanto para aqueles já publicados na literatura (**tabela 3.1**). As temperaturas de desnaturação e de extensão inicialmente utilizadas foram de 94°C e de 72°C, respectivamente, com duração de 1 minuto para cada temperatura de acordo com as recomendações de SAMBROOK *et al.*, 1989.

Quando os resultados demonstravam fragmento único e específico para aquela reação de amplificação e de forte intensidade mesmo até a temperatura mais alta utilizada no gradiente inicial de temperatura, acrescentávamos temperaturas de hibridização mais elevadas em um novo gradiente, até o limite de 68°C. A temperatura de escolha para hibridização das nossas reações de amplificação pela PCR foi a mais elevada dentre aquelas em que o produto de PCR era único, sem fragmentos inespecíficos, e de forte intensidade.

3.2.4.4. Determinação do número de ciclos ideal para cada PCR

Após terem sido estabelecidas as concentrações dos reagentes e amostras e as temperaturas de hibridização, foram realizados testes para a otimização do número de ciclos ideal para cada reação de amplificação. Para isso foram realizadas reações com 28 a 35 ciclos. A definição do número ideal de ciclos foi determinada pelo ciclo anterior àquele a partir do qual a PCR entrou em platô. Por exemplo: se para um determinado fragmento de DNA a PCR entrou em

platô no ciclo 33, o número de ciclos ideal para aquela reação foi 32, e assim por diante.

3.2.4.5. Protocolo utilizado na PCR

A amplificação das regiões adjacentes aos éxons 2 a 13, foi realizada usando o seguinte protocolo: Em tubos tipo eppendorff de 0,2 mL pipetou-se 1 μ L de DNA genômico (50 ng/ μ L), (exceção feita aos éxons 2 e 8, os quais tivemos que aumentar a quantidade para 100 ng de DNA), tampão de PCR 1X (Tris-HCl a 75 mM. pH 9,0; KCl a 50 mM; $MgCl_2$ a 2,0 mM), 0,2 mM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, e dTTP) (Pharmacia Biosciences do Brasil Ltda), 100 nM de cada iniciador, (exceção feita aos éxons 2 e 8, no qual tivemos de utilizar 400 nM e 200 nM, respectivamente), e 1 U de enzima DNA polimerase (Biotools) e água deionizada esterilizada para volume final de 50 μ L.

As regiões gênicas de interesse nesse estudo foram amplificadas em termociclador PTC-200 da MJ Research utilizando-se programas desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular da FCF da USP, para cada um dos pares de iniciadores, e que estão descritos nas Tabelas 3.4 a 3.16.

Tabela 3.4. Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes aos éxons 2 e 8 empregando respectivamente os iniciadores δ (sense), ϕ (antisense) e L (sense) e I (antisense) construídos por POGGI et al , 1990.

Desnaturação inicial	98°C	3 min.
28 a 35 Ciclos	D, 94°C	1 min.
	H, 54 a 59°C	1 min.
	E, 72°C	1 min.
Extensão final	72°C	10 min.

D: desnaturação; H hibridização; E extensão.

Figura 3.1. Esquema representativo das regiões adjacentes ao éxon 8, com seus respectivos iniciadores Sense e Antisense, para amplificação pela PCR com a finalidade de triagem de mutações por SSCP e sequenciamento.

Tabela 3.5. Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 3, com os iniciadores E3S (sense), E3AS (antisense).

Desnaturação inicial	98°C	3 min.
	D, 94°C	1 min.
28 a 35 Ciclos	H, 53 a 62°C	1 min.
	E, 72°C	1 min.
Extensão final	72°C	10 min.

D: desnaturação; H hibridização; E extensão.

Tabela 3.6. Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 4, com os iniciadores E4S (sense), E4AS (antisense).

Desnaturação inicial	98°C	3 min.
	D, 94°C	1 min.
28 a 35 Ciclos	H, 54 a 67°C	1 min.
	E, 72°C	1 min.
Extensão final	72°C	10 min.

D: desnaturação; H hibridização; E extensão.

Tabela 3.7. Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 5, dividido em duas metades. Primeira metade, éxon 5a, empregando os iniciadores E5aS (sense), E5aAS (antisense).

Desnaturação inicial	98°C	3 min.
	D, 94°C	1 min.
28 a 35 Ciclos	H, 54 a 65°C	1 min.
	E, 72°C	1 min.
Extensão final	72°C	10 min.

D: desnaturação; H hibridização; E extensão.

Tabela 3.8. Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 5, dividido em duas metades. Segunda metade, éxon 5b, empregando os iniciadores E5bS (sense), E5bAS (antisense).

Desnaturação inicial	98°C	3 min.
	D, 94°C	1 min.
28 a 35 Ciclos	H, 52 a 59°C	1 min.
	E, 72°C	1 min.
Extensão final	72°C	10 min.

D: desnaturação; H hibridização; E extensão.

Figura 3.2. Esquema representativo das regiões em que os iniciadores se localizam nas regiões adjacentes ao éxon 5, dividido em duas metades (5a e 5b), com seus respectivos iniciadores *sense* e *antisense*, para amplificação pela PCR com a finalidade de triagem de mutações por SSCP e sequenciamento.

Tabela 3.9. Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 6, empregando os iniciadores E6S (sense), E6AS (antisense).

Desnaturação inicial	98°C	3 min.
	D, 94°C	1 min.
28 a 35 Ciclos	H, 55 a 61 ⁰ C	1 min.
	E, 72°C	1 min.
Extensão final	72°C	10 min.

D: desnaturação; H hibridização; E extensão.

Tabela 3.10. Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 7, empregando os iniciadores E7S (sense), E7AS (antisense).

Desnaturação inicial	98°C	3 min.
	D, 94°C	1 min.
28 a 35 Ciclos	H, 55 a 61 ⁰ C	1 min.
	E, 72°C	1 min.
Extensão final	72°C	10 min.

D: desnaturação; H hibridização; E extensão.

Tabela 3.11. Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 9, empregando os iniciadores D (sense), R (antisense) construídos por POGGI et al, 1990.

Desnaturação inicial	98°C	3 min.
	D, 94°C	1 min.
28 a 35 Ciclos	H, 50 a 60 ⁰ C	1 min.
	E, 72°C	1 min.
Extensão final	72°C	10 min.

D: desnaturação; H hibridização; E extensão.

Tabela 3.12. Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 10, dividido em duas metades. Primeira metade, éxon 10a, empregando os iniciadores E10aS (sense), E10aAS (antisense).

Desnaturação inicial	98°C	3 min.
	D, 94°C	1 min.
28 a 35 Ciclos	H, 54 a 64°C	1 min.
	E, 72°C	1 min.
Extensão final	72°C	10 min.

D: desnaturação; H hibridização; E extensão.

Tabela 3.13. Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 10, dividido em duas metades. Segunda metade, éxon 10b, empregando os iniciadores E10bS (sense), construído originalmente e S (antisense), de acordo com SAAD, 1995 modificado de BEUTLER et al, 1989 e POGGI et al, 1990.

Desnaturação inicial	98°C	3 min.
	D, 94°C	1 min.
28 a 35 Ciclos	H, 61 a 68°C	1 min.
	E, 72°C	1 min.
Extensão final	72°C	10 min.

D: desnaturação; H hibridização; E extensão.

Tabela 3.14. Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 11, empregando os iniciadores T (sense) de acordo com SAAD, 1995 modificado de BEUTLER et al., 1989 e POGGI et al., 1990, e E11AS (antisense).

Desnaturação inicial	98°C	3 min.
	D, 94°C	1 min.
28 a 35 Ciclos	H, 55 a 61°C	1 min.
	E, 72°C	1 min.
Extensão final	72°C	10 min.

D: desnaturação; H hibridização; E extensão.

Tabela 3.15. Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 12, empregando os iniciadores E12S (sense), E12AS (antisense).

Desnaturação inicial	98°C	3 min.
28 a 35 Ciclos	D, 94°C	1 min.
	H, 55 a 62°C	1 min.
	E, 72°C	1 min.
Extensão final	72°C	10 min.

D: desnaturação; H hibridização; E extensão.

Tabela 3.16. Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes ao éxon 13, empregando os iniciadores E13S (sense), construído originalmente e "G" (E13AS) (antisense) construído por POGGI *et al.*, 1990.

Desnaturação inicial	98°C	3 min.
28 a 35 Ciclos	D, 94°C	1 min.
	H, 57 a 62°C	1 min.
	E, 72°C	1 min.
Extensão final	72°C	10 min.

D: desnaturação; H hibridização; E extensão.

3.2.4.6. Avaliação dos produtos de amplificação para realização da técnica de SSCP.

Todos os produtos das reações de amplificação foram avaliados em gel de agarose 1,5%. O gel foi preparado com agarose (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) em tampão TBE (Tris-HCl 0,45 mM, ácido bórico 0,45 mM e EDTA 2,5 mM pH 8,0), aquecido em forno microondas durante trinta segundos. Cinco µL de cada produto de amplificação misturados a 1 µL de tampão de aplicação (azul de

bromofenol 0,25%, xilenicianol FF 0,25% e glicerol 30%) foram submetidos à separação eletroforética por 30 min a 100 Volts em sistema eletroforético Horizon 58 (Gibco- BRL Life Technologies) e fonte EPS 200 (Pharmacia Biosciences, Uppsala, Sweeden). Foram utilizados 5 μ L do marcador de 100 pares de bases (pb) de DNA (Amersham Biosciences do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) diluído em tampão de amostra, na proporção 1:6 como padrão do tamanho do produto amplificado.

Os géis foram corados em solução de brometo de etídio 0,5 μ g/mL durante 15 minutos, lavados em H₂O destilada e os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz UV e fotografados com sistema de fotodocumentação Alphamager 2000 Documentation & Analysis System (Alphalnnotech Corporation).

Os produtos da PCR das diferentes regiões gênicas estudadas foram armazenadas a – 20°C até a análise por SSCP.

3.2.4.7. Controle de qualidade das PCRs

Todas as amplificações realizadas pela PCR, usaram como controle interno um branco de reação. Esse controle negativo consistiu de um tubo onde foram adicionados todos reagentes para a reação de amplificação, com exceção da amostra de DNA.

3.2.5. Estratégia para identificação da mutação das amostras deficientes e não-deficientes e caracterização molecular das variantes Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan

A estratégia utilizada neste trabalho para a identificação da mutação das amostras deficientes e não-deficientes em G6PD e caracterização molecular das amostras das variantes Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan, estão resumidas, respectivamente, nos diagramas de fases abaixo descritos (figuras 3.3 e 3.4).

Fig 3.3. Diagrama de fases para a identificação molecular das amostras de deficientes e não-deficientes de nossa casuística. Seq. = sequenciamento. Alter. = alterado.

Fig 3.4. Diagrama de fases utilizados para avaliação molecular das amostras das variantes Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan.

3.2.6. Triagem de mutações por análise do polimorfismo na conformação de fita simples (SSCP):

Após otimização das PCR, 30 amostras deficientes da atividade enzimática da G6PD, além das variantes fenotípicas Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan, foram submetidas à triagem de mutações pela técnica do Polimorfismo na Conformação da Fita Simples (SSCP).

Brevemente: uma vez determinada a presença de um único fragmento de DNA, por eletroforese em gel de agarose 1,5%, 1 μ L dos produtos da PCR foram desnaturados em 25 μ L de tampão de desnaturação (formamida 95%, EDTA 20mM, xilenocianol 0,005% e azul de bromofenol 0,005%) a uma temperatura de 95°C por 8 minutos e imersos imediatamente em gelo. A seguir, 5 μ L dos

produtos desnaturados foram submetidos à separação eletroforética no Sistema GenePhor™ (Pharmacia Biosciences, Uppsala, Sweeden), utilizando GeneGel Excel 12.5/24 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweeden).

3.2.6.1. Otimização das condições da eletroforese da SSCP

Para adequação das condições de eletroforese foram realizados vários testes utilizando as potências de 400 e 600 Volts e 25 mA, às temperaturas constantes de 5, 8, 12 e 15 graus, respectivamente, utilizando o Sistema GenePhor™ (Pharmacia Biosciences, Uppsala, Sweeden).

Após separação eletroforética, os géis foram corados manualmente com nitrato de prata para visualização dos perfis de SSCP, comparados sempre com um controle normal.

O tempo de realização de eletroforese variou inicialmente de 1h e 30 min a 2h e 30 min dependendo da potência utilizada, sendo inversamente proporcional.

3.2.6.2. Colorações dos géis de poliacrilamida

Inicialmente os géis foram fixados com solução contendo ácido acético 0,5% e etanol 10% durante 30 min, sob agitação, em seguida foram impregnados com solução de prata 0,17% durante 15 min, sob agitação. Os géis foram lavados com água destilada para retirar o excesso da prata e as bandas de DNAs foram então precipitadas com formaldeído 37% em solução de NaOH durante 15 min sob agitação, para visibilização dos perfis eletroforéticos de SSCP.

Os géis foram fotografados em sistema de fotodocumentação Alpha Imager 2000 – Documentation & Analysis System (AlphaInnotech-Corporation) e imortalizados, após lavagem com água destilada e 10% de glicerina (Merck, Rio de Janeiro), entre folhas de papel celofane e deixados secar em temperatura ambiente por 48 horas.

3.2.7. Confirmação das mutações que apresentaram alterações na SSCP, pela PCR-RFLP:

Para a otimização das técnicas do polimorfismo no tamanho do fragmento de restrição (RFLP) em produto da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizadas para a confirmação das amostras deficientes que apresentassem perfil de bandas alterado na SSCP alterados apenas nos éxons 4 e 5 como variante africana 202G→A e 376A→G (A-), ou apenas no éxon 6 como variante mediterrânea 563C→T, foram utilizados os mesmos iniciadores (tabela 3.3) e a mesma estratégia utilizada para as otimizações das PCR para SSCP .

3.2.8. Análise dos haplótipos do gene da G6PD

Uma vez que um dos objetivos deste trabalho foi a determinação dos haplótipos das variantes de G6PD Cuiabá e Butantan, optou-se por determinar o perfil de alguns polimorfismos em uma amostragem, composta por 30 indivíduos com baixa atividade de G6PD e que tiveram suas mutações posteriormente caracterizadas, além de um grupo de 34 indivíduos com atividade normal utilizado como controle, todos não aparentados e do sexo masculino.

Para isso otimizamos a PCR-RFLP para 6 polimorfismos: 1) do éxon 5 (376A→G) para **FOKI**, 2) Íntron 5 (nt611C→G) pela **PvuII**, 3) íntron 8 (nt163C→T) pela **BspHI**, 4) éxon 10 (nt116G→A) pela **PstI**; 5) éxon 11 (nt1311C→T) pela **BclI** e 6) íntron 11 (nt93T→C) para **NlaIII**. Os resultados obtidos nos serviu de dados para comparação com outras casuísticas no Brasil e em determinadas regiões no mundo, para estudo de associação e desequilíbrio de ligação e para tentar correlacionar os haplótipos das variantes Cuiabá e Butantan nesse contexto.

Em nosso estudo, em consonância com o trabalho de RODRIGUES *et al.*, 2002, além dos sítios polimórficos do éxon 5 (376 A→G) para **FOKI**, do Íntron 5 (nt611C→G) para **PvuII**, do íntron 8 (nt163C→T) para **BspHI**, do éxon 10 (nt116G→A) para **PstI** e do éxon 11 (nt1311C→T) para **BclI**, foi acrescido o estudo do sítio polimórfico do íntron 11 (nt93T→C) para **NlaIII** (figura 3.3). Isto nos permitiu a avaliação de novas combinações de polimorfismos. Deste modo a numeração dos haplótipos utilizada neste trabalho ficou de acordo com VULLIAMY, 1991, modificado por RODRIGUES *et al.* 2002. Usou-se, portanto, o sinal de (+) para a presença do sítio de restrição e o sinal de (–) para a ausência do sítio, independentemente de a mutação criar ou omitir aquele sítio de restrição.

Figura 3.5: Localização dos sítios polimórficos utilizados na determinação dos haplótipos, adaptado de Vulliamy *et al.*, 1991. Esquema do gene adaptado de Martini *et al.*, 1986.

Para a avaliação de frequência de haplótipos em nossa casuística foi utilizado o Teste do χ^2 e para frequências pequenas, o Teste de Fischer, utilizando o programa SigmaStat versão 2.0 (Science Products SYSTAT Software, Chicago, U.S.A)

3.2.9. Otimização das reações de polimorfismo no tamanho do fragmento de restrição (RFLP).

As concentrações de reagentes e condições de realização das RFLPs foram aquelas estabelecidas pelo fabricante, com algumas adaptações de tempo para digestão enzimática e quantidade de enzima. Tudo isso em função da quantidade de produto de PCR que era colocado para cada reação.

3.2.10. Estudo da região promotora do gene da G6PD:

Além da triagem de mutações por SSCP e sequenciamento das regiões codificantes das nossas variantes fenotípicas Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan, também foi realizado o estudo da região promotora, através da escolha de iniciadores específicos, otimização da PCR e sequenciamento. Nesta fase foi utilizado como controle normal uma amostra G6PD B+.

3.2.10.1. Construção dos iniciadores e otimização da PCR para a região promotora do gene da G6PD:

A estratégia para construção dos “novos iniciadores” que flanqueassem as regiões adjacentes à região promotora foi similar àquela utilizada para SSCP. Assim, para esta etapa foi utilizado 1 par de “novos iniciadores”, construídos a partir dos dados fornecidos pelo programa *Primer Premier 5* (PREMIER Biosoft International, California - U.S.A), e denominados GdPromS (sense) e GdPromAS (antisense), localizados respectivamente entre os nucleotídeos nt2184-2203 e nt2690-2671, de modo que até o local de início da transcrição pudesse ser sequenciado. As regiões gênicas de interesse nesse estudo foram então amplificadas em termociclador PTC-200 da MJ Research utilizando-se inicialmente programas desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular da FCF da USP, tendo como base informações iniciais de acordo com SAMBROOK *et al.*, 1989 e que estão descritos nas **tabelas 3.17 e 3.18**.

Tabela 3.17. Programa inicial utilizado no termociclador para amplificação das regiões adjacentes à região promotora do gene da G6PD, respectivamente os iniciadores GdPromS (sense) e GdPromAS (antisense) desenhados originalmente através do programa *Primer Premier 5*.

Desnaturação inicial	98°C	3 min.
28 a 35 Ciclos	D, 94°C	1 min.
	H, 55 a 68°C	1 min.
	E, 72°C	1 min.
Extensão final	72°C	10 min.

D: desnaturação; H hibridização; E extensão.

Tabela 3.18. Programa inicial modificado do termociclador para amplificação das regiões adjacentes à região promotora do gene da G6PD, utilizando os iniciadores GdPromS (sense) e GdPromAS (antisense) desenhados originalmente através do programa *Primer Premier 5*.

Desnaturação inicial	98°C	4 min.
28 a 35 Ciclos	D, 96°C	1,5 min.
	H, 55 a 68°C	1 min.
	E, 72°C	1 min.
Extensão final	72°C	10 min.

D: desnaturação; H hibridização; E extensão.

3.2.10.2. Otimização das PCR para a região promotora do gene da G6PD.

Utilizando os programas descritos nas tabelas 3.17 e 3.18, e com o objetivo de estabelecer as concentrações ideais para os reagentes e amostras, foram realizados vários testes baseados inicialmente nos protocolos utilizados nas

PCRs usadas para a amplificação das regiões exônicas na triagem de mutações por SSCP.

Quantidades de (50ng, 100 ng e 200ng) de DNA genômico foram inicialmente amplificadas em uma mistura contendo Tris-HCl (pH 9,0) 75mM; MgCl₂ 2mM; KCl 50mM; (NH₄)₂SO₄ 20mM; quantidades de 100nM, 150nM e 200nM de cada iniciador, 200uM de dNTPs e 2 e 1U de Taq DNA polimerase para um volume final de reação de 50uL. Também foram testados protocolos que utilizassem diferentes concentrações de MgCl₂ (2mM, 2,5mM, 3,0mM e 4,0mM) e de dimetilsulfóxido (DMSO) (5,0%, 8,0% e 10,0%). O gradiente de cloreto de magnésio e de DMSO foram testados isoladamente, mas depois simultaneamente.

3.2.11. Estudo do RNAm do gene da G6PD

O projeto de construção dos iniciadores estabelecido para a amplificação (utilizando a técnica da RT-PCR) e o sequenciamento do RNAm do gene da G6PD em toda sua extensão está esquematizado na **figura 3.6** e nas **tabelas 3.19, 3.20 e 3.21**.

Previamente à reação de amplificação do RNA pela PCR, foi obtido o cDNA por reação de transcrição reversa (ver condições no item 3.11.1) a ser utilizado como amostra a partir do RNA extraído dos portadores das variantes Cuiabá e Butantan e de um controle G6PD B como descrito no item 3.11.1.

3.2.11.1 Protocolo para síntese de cDNA a ser usado como amostra para a reação de amplificação pela reação em cadeia da polimerase através de prévia transcrição reversa, a RT-PCR

Para a síntese de cDNA foram misturados em um tubo tipo eppendorff com capacidade para um volume de 0,2mL (tubo 1), 2 μ L de iniciadores aleatórios (radom primers), volume equivalente a 1 μ g de RNA, e quantidade suficiente para 12 μ L de água milliQ livre de RNase, previamente esterilizada. Homogeneizou-se, centrifugou-se brevemente e incubou-se a 70°C por 10 min transferindo o tubo imediatamente para banho em gelo. Em um outro tubo tipo eppendorff (tubo 2) foi misturado à parte 4 μ L de tampão 5x contendo Tris-HCl (pH 9,0) 75mM; MgCl₂ 2mM; KCl 50mM; (NH₄)₂SO₄ 20mM; 2 μ L de DTT 100mM; 10mM de cada um dos dNTPs e 1 μ L da enzima Superscript RT H 200U/ μ L (Invitrogen Life Technologies, California, U.S.A).

Após prévia homogeneização de cada um dos tubos, os 12 μ L do tubo 1, foram misturados aos 8 μ L do tubo 2. Após esta mistura, o tubo 2 com a mistura total foi submetido a uma seqüência de ciclos térmicos de 25°C por 10 min (para hibridização), de 42°C por 50 min (para ação da enzima transcriptase reversa), e de 70°C por 15 min (para inativação da enzima). Utilizamos para isso o termociclador PTC-200 (MJ Research, Waltham, MA – U.S.A).

Tabela 3.19. Estratégia estabelecida para realização da RT-PCR para seqüenciamento do RNAm do gene da G6PD em toda a sua extensão.

PCR	Iniciadores	Tamanho do produto da PCR
PCR # 1 (região 1)	RNA1S E5aAS	477 pb
PCR # 2 (região 2)	E5bS RNA2AS	555 pb
PCR # 3 (região 3)	RNA3S BclIAS*	551 pb
PCR # 4 (região 4)	E10bS (E13AS)G**	454 pb

Os iniciadores * e ** foram descritos respectivamente segundo Saad, 1995 modificado de Beutler *et al.*, 1989 e Poggi *et al.*, 1990. Os demais foram construídos originalmente.

Para otimização das PCR #1, PCR #2, PCR #3 e PCR #4 a serem utilizadas respectivamente para a amplificação das “regiões 1, 2, 3 e 4” do RNA, foi utilizado o programa de amplificação descrito na **tabela 3.20**.

Tabela 3.20. Programa utilizado para amplificar a 1ª, 2ª, 3ª e 4ª regiões do RNAm do gene da G6PD pela PCR.

Desnaturação inicial	98°C	3 min.
28 a 35 Ciclos	D, 94°C	1 min.
	H, 61 a 68°C	1 min.
	E, 72°C	1 min.
Extensão final	72°C	10 min.

D: desnaturação; H hibridização; E extensão.

Tabela 3.21. Estratégia estabelecida para realização de PCR para seqüenciamento do RNAm do gene da G6PD em toda a sua extensão.

PCR	Iniciadores	Tamanho do produto da PCR
PCR # 1 + 4 (região 1 a 4)	RNA1S G*	1666 pb

O iniciador * foi construído segundo Poggi *et al.*, 1990. O iniciador RNA1S foi construído originalmente.

Para a otimização da PCR # 1 + 4 foi utilizado o programa descrito na tabela 3.22.

Tabela 3.22. Programa utilizado para amplificar o RNAm do gene da G6PD em toda a sua extensão pela PCR, como uma primeira avaliação da possibilidade de erro no processamento do RNA.

Desnaturação inicial	98°C	3 min.
	D, 94°C	1 min.
28 a 35 Ciclos	H, 61 a 68°C	1,5 min.
	E, 72°C	1,5 min.
Extensão final	72°C	10 min.

D: desnaturação; H hibridização; E extensão.

5' ..Agggacagcccagaggaggcgtggccacgctgccggcgggaagtggagccctccgcgagcgcg
 cgagggccgcccgggagggcgggaaaccggacagtggggcggggccgggcccggatggggatgc
 gggagcactacgcggagctgcacccgtgcccgccggaattggggatgcagagcagcggcagcgggt
 atggcaggcagccggcggggccggcctccagcgcaggtgcccgagaggcaggggctggcctgggatg
 cgcgcgcacctgccctcgccccgccccgccccgcacgaggggtggtggccgaggccccgccccgcac
 gcctcgctgaggcgggtccgctcagcccaggcgccccgccccgccccgcgattaaatgggccc
 gcggggctcagccccggaaacgggtcgtacacttcggggctgcgagcgcggaggggcgacgacgacg
 aagcgcagacagcgtcatgacagagcaggtggcctgagccggaccaggtgtggggatgctggg
 ggaagagctttccagggggatgcctccatcagtcggatcacacatattccatcatcatgggtgc
 atcgggtgacctggccaagaagaagatctacccaccatctggtggtgttcggggatggcctctc
 gcccgaaaacacttccatcatgggtatgccggttcgggctccaggtgggtgacatccgcaaca
 gagtgageccttcttcaaggccacccagaggagaagctcaagctggaggacttctttgcccgcaa
 ctctatgtggctggccagtacgatgatgcagcctcctaccagcgcctcaacagccacatgaatgc
 cctccagcgggtccagggccacgcgctcttctacctggccttgccccgaccgtctacgaggc
 cgtcaccaagaacattcacgagtcctgcatgagccagatagggtggaacggcatcatcgtggagaa
 gcccttcgggagggagctgcagagctctgacgggtgtccaaacacatctcctccctgttcggtga
 ggaccagatctaccgcatcgaccactacctgggcaaggagatggtgcagaaactcatggtgctgag
 atttgccaacaggatcttcggccccatctggaaccgggacaacatcgctgcgttatcctcacctt
 caaggagccctttggcactgagggtgcgggggctatttcgatgaatttgggatcatccgggaagt
 gatgcagaaccacctaactgcagatgctgtgtctggtggccatggagaagccggctccaaaccta
 agatgacgtccgtgatgagaaggtcaaggtgttgaaatgcattccagagctccaaacacacat
 caatgtggtcctgggccaagtacgtggggaaccccgatggagagggcgaggccaccaaagggtacctggacga
 cccacgggtgcccgccgggtccaccacccgcaacttttgagccgtcgtcctctatgtggagaatga
 gaggtgggatgggggtgccttccatcctgcgtggggcaaggccctgaacgagcgcgaaggccgagggt
 gaggtgcagttccatgatgtggccggcgacatctccaccagcagtgcaagcgcaacgagctggt
 gatccgctgcagcccaacgaggccgtgtacacaagatgatgaccaagaagccgggcatgttctt
 caaccccgaggagtccgagctggacctgacctacggcaacagatacaagaacgtgaagctccctga
 cgctacgagcgcctcatcctggagctcttctcggggagccagatgcacttcgtgcgcagcgagga
 gctccgtgaggcctggcgtattttcaccacactgctgcaccagattgagctggagaagcccaagcc
 catccctatatttatggcagccgagggccccacggaggcagacgagctgatgaagagagtgggttt
 ccagtatgagggcacctacaagtgggtgaacccccacaagctctgagccctgggcacccacctcca
 cccccgcaaggccacctccttcccgccgcccgaacccgagtcgggaggactccgggaccattga
 cctcagctgcacattcctggccccgggtctggccacctggccgcccctcgtgctgctactac
 ccgagcccagctacattcctcagctgccaaagcactcgagaccatcctggccctccagacctgcc
 tgagcccaggagctgagtcacctcctccactcactccagcccaacagaaggaggaggggcgcc
 cattcgtctgtcccagagcttattggccactgggtctcactcctgagtggggcccagggtgggaggg
 agggacaagggggaggaaagggggcgagcaccacgtgagagaatctgcctgtggccttgcccgcc
 gcctcagtgccacttgacattccttgtcaccagcaacatctcgagccccctggatgtcccctgtcc
 caccaactctgcactccatggccaccccgtagccacccgtaggcagcctctctgtataagaaaagc
 agacgcagcagctgggacccctcccaacctcaatgcctgccattaaatccgcaaacagcc..3'

Figura 3.6: Seqüência do RNAm do gene da G6PD em toda sua extensão, com respectivos iniciadores a serem utilizados para a amplificação e o sequenciamento de toda sua extensão (tabelas 3.20 e 3.21). Em fundo branco os fragmentos correspondentes aos éxons 1,3,5,7,9,11 e 13; em fundo azul os fragmentos correspondentes aos éxons 2, 4, 6, 8 e 10. Em fundo amarelo os iniciadores sense, em fundo verde os iniciadores antisense. Em fundo cinza os códons de iniciação, de parada e os sítios TATA box.

Assim, para esta etapa foram utilizados 8 iniciadores, dentre os quais, dois, o BclIAS* e o (E13AS)G** de acordo com Saad, 1995 modificado de Beutler *et al.*, 1989 e Poggi *et al.*, 1990, três construídos originalmente mas já utilizados nas amplificações para a SSCP (E5aAS), (E5bS) e (E10bS) (tabela 3.1) e outros três desenhados especificamente para esta etapa de sequenciamento do RNA, os iniciadores GdRNA1S, GdRNA2AS e GdRNA3S, localizados respectivamente entre os nucleotídeos 404 e 423; 1376 e 1357 e 1615 e 1635, com base na numeração do cDNA descrita no GenBank para o gene da G6PD, na qual o ATG inicial, geralmente numerado como +1 encontra-se a 475 nucleotídeos do início da transcrição.

3.2.12. Sequenciamento das regiões codificantes do DNA genômico, da região promotora e do RNAm do gene da G6PD.

3.2.12.1. Avaliação dos produtos de amplificação para realização de seqüenciamento

Todos os produtos de amplificação foram avaliados quanto à especificidade da reação em gel de agarose 1,5%. O gel foi preparado com agarose (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) em tampão TBE (Tris-HCl 0,45 mM, ácido bórico 0,45 mM e EDTA 2,5 mM pH 8,0), aquecido em forno microondas durante trinta segundos. Cinco µL de cada produto de amplificação misturados a 1 µL de tampão de aplicação (azul de bromofenol 0,25%, xilenicianol FF 0,25% e glicerol 30%) foram submetidos à separação eletroforética por 30 min a 100 Volts e 60 mA, em sistema eletroforético Horizon 58 (Gibco- BRL Rockville, MD, USA) e

fonte EPS 200 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Foram utilizados 5 μ L de marcador de tamanho molecular de DNA, de 100 pares de base (pb) (Amersham-Biosciences, Uppsala, Sweeden) diluído em tampão de amostra, na proporção 1:6 como padrão de tamanho molecular.

Os géis foram corados em solução de brometo de etídio 0,5 μ g/mL durante 15 minutos, lavados em H₂O destilada e os fragmentos de DNA foram visibilizados sob luz UV e fotografados com sistema de fotodocumentação Alphamager 2000 Documentation & Analysis System (AlphaInnotech Corporation).

3.2.12.2. Purificação dos produtos da PCR para o sequenciamento

Todos os produtos de amplificação a serem encaminhados para o sequenciamento foram previamente purificados utilizando o Kit QIAquick 28.106 da QIAGEN (Uniscience do Brasil, São Paulo, Brazil), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.2.12.3. Reação de seqüenciamento de produtos da PCR

As reações de sequenciamento dos produtos das PCRs obtidos para as amostras de DNA genômico do éxon 8 dos pacientes deficientes que haviam apresentado alteração na SSCP, bem como do RNA das variantes Gd⁺ Cuiabá, Gd⁺ Butantan e do controle GdB⁺, foram realizadas no Laboratório de Sequenciamento do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo, utilizando o MegaBACE 1000 (Amershan Bioscience) e o DYEnamic ET Dye Terminator

Cycle Sequencing Kit (com Thermo Sequenase II DNA Polimerase). Estas reações de sequenciamento foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimaron 3.12.

Todas as demais reações de sequenciamento dos produtos das PCRs obtidos para as amostras de DNA genômico dos éxons 2 a 13 , bem como da região promotora do gene da G6PD das variantes Gd+ Cuiabá, Gd+ Butantan e controle GdB+, foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Profª Maria Aparecida Nagai da FMUSP, utilizando kit comercial DNA sequenciag Kit (Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing) com AmpliTaq^R DNA Polimerase (ABI PRISM Applied Biosystems) em termociclador AB Applied (Applied Biosystems Corp. Foster City, CA, USA) de acordo com as instruções do fornecedor. As concentrações dos reagentes utilizadas para estas reações estão resumidas na **tabela 3.23**. Os procedimentos técnicos utilizados para estes sequenciamentos estão descritos a seguir.

Os tubos tipo eppendorff contendo os reagentes para a reação de seqüenciamento foram submetidos às seguintes condições de reação: 1 ciclo de desnaturação a 96°C durante 5 minutos, 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, totalizando aproximadamente 2h e 26 min.

Cada produto da PCR foi seqüenciado em ambas direções, em dois ciclos de seqüenciamento separados. O seqüenciamento foi realizado com o iniciador *sense* para seqüenciar a fita *sense* e com o iniciador *antisense* para seqüenciar a fita *antisense*.

Para os ciclos de seqüenciamento dos demais fragmentos estudados estudados foram utilizados os mesmos iniciadores que os utilizados para a PCR.

Tabela 3.23. Concentrações dos reagentes para a reação de seqüenciamento semi-automático de produtos da PCR.

Reagentes	Volume por reação (μL)
Iniciador (1 μM)	3,2
Big Dye Terminator MIX (ABI Prism P E Applied Biosystem)	4,0
Tampão de seqüenciamento (5X) (ABI Prism P E Applied Biosystems)	2,0
Água deionizada estéril	9,8
Produto da PCR	1,0
Volume Total da reação	19,0

3.2.12.4. Purificação do produto da reação de seqüenciamento

Os produtos da reação de seqüenciamento foram purificados para remoção de iniciadores e ddNTPs não incorporados durante a reação, através de reação de precipitação para os nucleotídeos incorporados. Inicialmente todo o volume contido nos microtubos de 0,2 mL com os produtos da reação de seqüenciamento foram transferidos para microtubos de 1,6 mL. Para cada um deles foram pipetados, 8 μL de água destilada milliQ estéril, 32 μL de etanol absoluto (agente precipitante), homogeneizados em vortex e colocados para precipitação em ambiente escuro por 15 min à temperatura ambiente; foram submetidos a centrifugação por 10.000 rpm por 20 min, lavados com etanol a 70% por 2 vezes, ao final, foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min e levados para dessecador por 10 min. Os produtos assim preparados, foram estocados em refrigerador até o momento da realização da eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.2.12.5. Eletroforese dos produtos do ciclo de seqüenciamento

A eletroforese dos produtos dos ciclos de seqüenciamento foi realizada em gel de poliacrilamida (Uréia 8,5 M, 50%; Acrilamida (19:1), 6%; em TBE (Tris 0,89 mM; ácido bórico 0,89 mM; EDTA 0,02 M).

A mistura do gel foi preparada em um erlemeyer de 150 mL contendo agitador magnético onde dispensou-se 40 g de uréia (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanha), 12 mL de acrilamida-bisacrilamida 40% (19:1) (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA), 27 mL de água destilada e 1 g de mistura de pérolas de resina de troca iônica AG^R 501-X8 resin (Bio-Rad laboratories, Inc. Hercules, CA, USA). A dissolução foi realizada em agitador magnético com leve aquecimento, a seguir, a solução foi filtrada em membrana Millipore 0,2 µm. Ao filtrado, foi adicionado 8 mL de TBE (Gibco BRL Life Technologies Inc, Rockville, MD USA) e ajustado a um volume final de 80 mL com água deionizada estéril. Adicionou-se 400 µL de uma solução a 10% de persulfato de amônio e 45 µL de TEMED (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA). Imediatamente após a homogeneização procedeu-se a preparação do gel entre duas placas de vidros com espaçadores de 0,4 mm para polimerização do mesmo.

A parte externa da placa contendo o gel foi então lavada cuidadosamente em água corrente e em água deionizada e colocada para secar. A placa contendo o gel, assim preparada, foi adaptada ao seqüenciador e colocado o pente "dente de tubarão" para aplicação das amostras.

3.2.12.6. Preparação e realização de eletroforese das amostras obtidas na reação de seqüenciamento

As amostras purificadas foram desnaturadas a temperatura de 90°C durante 2 minutos em 0,8 µl de tampão de aplicação Blue Dextram/EDTA (ABI PRISM - Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) e imersas imediatamente em gelo. Um volume de 1,5 µL de cada amostra, assim preparado, foi aplicado no gel de poliacrilamida, e a eletroforese estabelecida a 600 V durante 12 horas em seqüenciador ABI PRISMA 373XL (P E Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.2.12.7. Análise do eletrofluorograma para detecção de mutações

A análise do eletrofluorograma para detecção de mutação nas amostras estudadas, foi realizada usando-se os programas ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software version 3.0 (P E Applied Biosystems, Foster City, USA) e BioEdit. Os resultados obtidos foram comparados com seqüências publicadas no GenBank para o gene da G6PD.

3.2.13. Estudo quantitativo da expressão da G6PD nos portadores das variantes Gd+ Cuiabá e Butantan pela PCR em Tempo Real (*Real Time PCR*)

Além dos sequenciamentos de todos os éxons codificantes, região promotora e RNA, também foi feito o estudo da quantificação dos transcritos do gene da G6PD em um controle normal GdB+ e as amostras da Gd+ Butantan e Gd+ Cuiabá através da determinação da expressão da G6PD pela técnica da

PCR em tempo real usando o gene constitutivo da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPD) como controle normal de expressão para cada amostra.

O projeto de escolha dos iniciadores estabelecido para a amplificação a ser utilizada nesta quantificação a partir do cDNA de cada amostra, foi o de utilizar iniciadores em éxons distintos, onde o iniciador *sense* estivesse, do começo ao fim, em um determinado éxon e o iniciador *antisense* estivesse, do começo ao fim, no éxon subsequente (por exemplo, éxon 8 e éxon 9) e que o fragmento amplificado não ultrapassasse ao tamanho de 150 pares de bases. Além disso, a temperatura de hibridização otimizada para a reação de amplificação do gene da G6PD fosse compatível com aquela que seria usada para a amplificação simultânea do gene da GAPD que seria usado como controle na reação da PCR em tempo real. Foi por este motivo que escolhemos os iniciadores GdRNA3S e GdRNA2AS, anteriormente descritos e que haviam sido construídos inicialmente com a finalidade de fazer o sequenciamento completo do RNAm. Este projeto está esquematizado nas tabelas 3.24 e 3.25 e na figura 3.7..

Tabela 3.24. Estratégia estabelecida para amplificar os fragmentos do RNA correspondentes aos éxons 8 e 9 do gene da G6PD pela PCR "a frio" como modelo para avaliação da expressão do gene da G6PD, a ser feita através da PCR em Tempo Real.

PCR	Iniciadores	Tamanho do produto da PCR
PCR # E8 + E9	RNA3S	119 pb
	RNA2AS	
Os iniciadores utilizados foram construídos originalmente neste trabalho.		

Para a realização da PCR # E8 + E9 foi utilizado o programa descrito na **tabela 3.25**.

Tabela 3.25. Programa utilizado para amplificar os éxons 8 e 9 do mRNA do gene da G6PD pela PCR, como modelo para avaliação da expressão do gene da G6PD, a ser feita através da PCR em Tempo Real.

Desnaturação inicial	98°C	3 min.
	D, 94°C	1 min.
28 a 35 Ciclos	H, 51 a 60°C	1min
	E, 72°C	1 min
Extensão final	72°C	10 min.

D: desnaturação; H hibridização; E extensão.

5'...atttgccaacaggatcttcggcccccattctggaaccgggacaacatcgccctgcgtta
tcctcaccttcaaggagccctttggcactgagggctcgcgggggctatttcgatgaatttgg
gatcatccgggaacgtgatgcagaaccacctaactgcagatgctgtgtctggtaggcacatgga
aagcccgccctccaccaactcagatgaacgtccgtgatgagaaggtcaaggtgttgaaatgc
cagaggtgcaggcccaacaatgtgggtcctgggccagtagctggggaaccccgatggaga
ggcgaggccaccaaagggtacctggacgacccacgggtgccccgcgggtccaccaccgcc
acttttgcagccgctcgtcctctatgtggagaatgagaggtgggatg...3'

Figura 3.7. Fragmento do RNAm do gene G6PD. Sequência de nucleotídeos dos éxons 7 (fundo branco), 8 (fundo azul) e 9 (fundo branco). Em fundo amarelo o iniciador *sense* (GdRNA3S) localizado no éxon 8, em fundo verde o iniciador *antisense* (GdRNA2AS) localizado no éxon 9.

Após otimização das condições da PCR "a frio", utilizada como modelo para testar os iniciadores RNA3S e RNA2AS, e verificar se gerariam produtos de amplificação únicos e em temperatura similar à daqueles iniciadores que seriam utilizados para as amplificações do gene constitutivo GAPD, a ser usado como controle, durante as reações de PCR em Tempo Real, foi procedida a montagem

das placas para as reações de PCR “marcadas” (PCR em “tempo real”), como descrito a seguir.

Para um volume final de 25 μL foram misturados, para cada reação do gene da GAPD: 0,375 μL de uma solução de 20 μM do iniciador *sense*, 0,375 μL de uma solução de 20 μM do iniciador *antisense*, 10,75 μL de água milliQ estéril, 12,5 μL do SuperMix UDG (Platinum SYBR Green qPCR, 11733-038 da Invitrogen, **tabela 3.26**) e 1 μL de cDNA. Para cada reação do gene da G6PD foram misturados 1,0 μL de uma solução 10 μM do iniciador *sense*, 1,0 μL de uma solução 10 μM do iniciador *antisense*, 9,5 μL de água milliQ estéril, 12,5 μL do SuperMix UDG (Platinum SYBR Green qPCR, 11733-038 da Invitrogen) e 1 μL de cDNA.

Tabela 3.26. Componentes do Platinum SYBR Green qPCR SupermMix UDG (Invitrogen Life Technologies).

Reagentes	Concentração
SYBR Green I Platinum Taq DNA Polimerase	60 U/ μL
Tris-HCl pH 8,4	40mM
KCl	100mM
MgCl ₂	6mM
DGTP	400 μM
DATP	400 μM
DCTP	400 μM
DUTP	400 μM
UDP	40 U/mL

As misturas contendo respectivamente amostras de cDNA do controle GdB+, da Gd+ Cuiabá e da Gd+ Butantan utilizadas nas reações de amplificação para o gene da GAPD e para o gene da G6PD foram então pipetadas para uma placa de plástico com 96 poços (96 Well Optical Reaction Plate) de fabricação do Applied biosystems e cobertas com tiras específicas Microamp Optical Caps (8caps/strip) de fabricação da Applied Biosystems.

Depois de montada, a placa foi então colocada no GeneAmp 5700 Sequence Detection System da Applied Biosystems e submetida à PCR por 1 ciclo de 50°C por 2 min, 1 ciclo de 95°C por 10 min e 40 ciclos sob as temperaturas de 95°C por 15 segundos e 57°C por 1 min, totalizando aproximadamente 2 h e 10 min de reação.

4. RESULTADOS

4.1. Extração do DNA genômico pelo método de Salazar *et al.*, 1998.

O método de extração utilizado apresentou bom rendimento e pureza. Todas as amostras extraídas demonstraram relação das absorbâncias 260nm/280nm entre 1,8 e 2,0 (**tabela 4.1**), bem como boa integridade, não apresentando fragmentação e/ou degradação (**figura 4.1**).

Tabela 4.1. Resultado da extração de DNA de algumas amostras, escolhidas aleatoriamente entre alguns dos pacientes deficientes, obtidas pelo Método de Salazar *et al.*, 1998, determinadas no espectrofotômetro Beckman DU 640, Fullerton, CA, USA, em UV, após diluição (1:20) das amostras em tampão TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 8,0), 5µl DNA + 95µL de tampão TE. Os DNAs 1, 2, 3 e 4 demonstram R 260/280 entre 1,8 e 2,0 em diferentes concentrações (ng/µL).

amostra	260 nm	280 nm	R 260/280	ng/µL
1	0,875	0,478	1,83	875,2
2	0,558	0,309	1,80	557,8
3	0,325	0,165	1,97	325,5
4	0,183	0,099	1,83	182,96

Figura 4.1. Fotografia do gel de agarose a 1% de algumas amostras (1, 2, 3 e 4) de DNA extraídas pelo método de Salazar *et al.*, 1998, (as mesmas da tabela 4.1) escolhidas aleatoriamente entre o grupo de pacientes deficientes, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil ImageTM Alpha Innotech Corporation. Para cada amostra foram aplicados 1µL de DNA + 1 µL de *loading buffer*. M = marcador de tamanho molecular de 1 Kb (quilobases). A eletroforese do gel de eletroforese mostra que as bandas são coesas e únicas.

4.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA AS REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).

4.2.1. PCR para a técnica do polimorfismo na conformação da fita simples (SSCP) e sequenciamento do DNA genômico.

As concentrações dos reagentes e amostra, o número de ciclos, a temperatura e o tempo ótimos para desnaturação, hibridização e extensão, para cada uma das reações em cadeia da polimerase para os vários éxons do DNA genômico para o gene da glicose-6-fosfato desidrogenase, a serem utilizadas para a técnica do polimorfismo na conformação da fita simples (SSCP) e sequenciamento, estabelecidos após otimização das reações da PCR estão dispostos na **tabela 4.2** e ilustrados nas **figuras 4.2 e 4.3**.

Os iniciadores descritos por POGGI *et al.*, 1990 foram estudados através do programa *Primer Premier 5* (PREMIER Biosoft International, California - U.S.A) e observou-se que algumas das condições descritas não eram as mais adequadas, o que nos levou a construir “novos” iniciadores que poderiam, termodinamicamente serem mais eficientes.

Os resultados obtidos durante a otimização das temperaturas de hibridização e número de ciclos, através de seus respectivos gradientes, para as amplificações pela PCR para alguns dos vários éxons do DNA genômico da G6PD, utilizadas para SSCP e sequenciamento estão ilustrados nas **figuras 4.4 a 4.13**.

Tabela 4.2. Condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizadas para amplificação das amostras usadas nas reações de SSCP e sequenciamento do DNA genômico para a G6PD, que foram estabelecidas após otimização.

Éxon	Temperat. (°C) e tempo (min/seg) de desnaturação (D), hibridização (H) e extensão (E)	Quant. DNA (ng/μL)	Concentração iniciadores (nMolar)	Núm. Ciclos
E2	94°C/1min; 54°C/1min; 72°C/1 min	150	400nM	34
E3	94°C/1min; 61°C/1min; 72°C/1 min	50	100nM	33
E4	94°C/1min; 67°C/1min; 72°C/1 min	100	200nM	34
E5a	94°C/1min; 65°C/1min; 72°C/30 seg	50	100nM	33
E5b	94°C/1min; 64°C/1min; 72°C/1 min	50	100nM	32
E6	94°C/1min; 62°C/1min; 72°C/1 min	50	100nM	33
E7	94°C/1min; 61°C/1min; 72°C/1 min	50	100nM	33
E8	94°C/1min; 58°C/1min; 72°C/1 min	150	200nM	34
E9	94°C/1min; 57°C/1min; 72°C/1 min	100	200nM	33
E10a	94°C/1min; 64°C/1min; 72°C/1 min	50	100nM	33
E10b	94°C/1min; 67°C/1min; 72°C/1 min	50	100nM	33
E11	94°C/1min; 61°C/1min; 72°C/1 min	50	100nM	32
E12	94°C/1min; 62°C/1min; 72°C/30 seg	100	100nM	33
E13	94°C/1min; 66°C/1min; 72°C/1 min	50	100nM	32

A quantidade de dNTPs, de tampão, de MgCl₂ e de taq DNA polimerase estabelecidas para todos os éxons foram de respectivamente, 200 μM, 1x, 2mM e 1U. A temperatura e o tempo utilizados para a desnaturação inicial e a extensão final estabelecidos para todas as reações foram de 98°C/3min e de 72°C por 10 min.

Figura 4.2. Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR dos éxons 2 a 7, após otimização das condições da reação. 1, éxon 2 (241 pb); 2, éxon 3 (167 pb); 3, éxon 4 (202 pb); 4, éxon 5a (211 pb); 5, éxon 5b (214 pb); 6, éxon 6 (255 pb); 7, éxon 7 (192 pb), após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases (pb).

Figura 4.3. Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR dos éxons 8 a 13, após otimização das condições da reação. 1, éxon 8 (164 pb); 2, éxon 9 (253 pb); 3, éxon 10a (202 pb); 4, éxon 10b (188 pb); 5, éxon 11 (159 pb); 6, éxon 12 (214 pb); 7, éxon 13 (211 pb), após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases (pb).

Figura 4.4. Fotografia do gel de agarose a 1,5% dos fragmentos amplificados pela PCR do éxon 2 durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente: 1, controle negativo (54°C); 2, 54°C ; 3, 56°C ; 4, 59°C ; após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil ImageTM Alpha Innotech Corporation, com inversão das cores. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases. Apenas com a utilização de maiores quantidades de reagentes e amostra é que houve o aparecimento das bandas no gel de agarose, ainda assim, somente às temperaturas de 54 e 56 graus.

Figura 4.5. Fotografia do gel de agarose a 1,5% dos fragmentos amplificados pela PCR do éxon 3 durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente: 1, controle negativo (57°C); 2, 53°C ; 3, 55°C ; 4, 58°C ; 5, 60°C ; 6, 62°C ; após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil ImageTM Alpha Innotech Corporation, com inversão das cores. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases. Nota-se a presença de fragmentos específicos (167 pb), sem a presença de bandas inespecíficas, em todas as temperaturas testadas. As bandas às temperaturas de 60 e 62 graus foram as que demonstraram maior intensidade (maior expressão no gel).

Figura 4.6. Fotografia do gel de agarose a 1,5% dos fragmentos amplificados pela PCR do éxon 4 durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente: 1, controle negativo (57°C); 2, 55°C; 3, 57°C; 4, 59°C; 5, 61°C; 6, 63°C; após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation, com inversão das cores. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases. Nota-se a presença de fragmentos específicos (202 pb) e inespecíficos (de ~ 410 pb), em todas as temperaturas aqui testadas, o que demonstrava a necessidade de se fazer um gradiente a maiores temperaturas (figura 4.7).

Figura 4.7. Fotografia do gel de agarose a 1,5% dos fragmentos amplificados pela PCR do éxon 4 durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente: 1, controle negativo (57°C); 2, 64°C; 3, 65,5°C; 4, 67°C; após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation, com inversão das cores. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases. Nota-se o desaparecimento do fragmento inespecífico (amostra 2) às temperaturas de 65,5 e 67 graus (amostras 3 e 4).

Figura 4.8. Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR do éxon 5a durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente: 1, controle negativo (63°C); 2, 54°C; 3, 56°C; 4, 58°C; 5, 60°C; 6, 63°C; 7, 65°C; após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation, com inversão das cores. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases. Nota-se a presença de fragmento inespecífico (acima de 1500 pb) até a temperatura de 60 graus (amostra 5), que desapareceu às temperaturas de 63 e 65 graus (amostras 6 e 7).

Figura 4.9. Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR do éxon 10a durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente: 1, controle negativo (60°C); 2, 54°C; 3, 56°C; 4, 58°C; 5, 60°C; 6, 62°C; 7, 64°C; após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation, com inversão das cores. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases. Nota-se a presença de fragmento específico (202 pb) e de forte intensidade em todas as temperaturas testadas.

Figura 4.10. Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR do éxon 11 durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente: 1, controle negativo (60°C); 2, 55°C; 3, 57°C; 4, 59°C; 5, 60°C; 6, 61°C; após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation, com inversão das cores. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases. Nota-se a presença de fragmento específico (159 pb) e de forte intensidade em todas as temperaturas testadas.

Figura 4.11. Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR do éxon 3 (167 Pb) durante otimização do número de ciclos através de um gradiente: 1, 28 ciclos; 2, 29 ciclos; 3, 30 ciclos; 4, 31 ciclos; 5, 32 ciclos; 6, 33 ciclos; 7, 34 ciclos, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases. Nota-se que a partir do ciclo 33 a expressão da banda não mais se modifica.

Figura 4.12. Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR do éxon 8 (164 Pb) durante otimização do número de ciclos através de um gradiente: 1, 29 ciclos; 2, 30 ciclos; 3, 31 ciclos; 4, 32 ciclos; 5, 33 ciclos; 6, 34 ciclos; 7, 35 ciclos, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases. Nota-se que a partir do ciclo 34 a expressão da banda não mais se modifica.

Figura 4.13. Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR do éxon 11 (159 pb) durante otimização do número de ciclos através de um gradiente: 1, 28 ciclos; 2, 29 ciclos; 3, 30 ciclos; 4, 31 ciclos; 5, 32 ciclos; 6, 33 ciclos, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation. M = marcador de tamanho molecular de 50 pares bases. Nota-se que a partir do ciclo 32 a expressão da banda não mais se modifica.

As imagens de alguns dos fragmentos de DNA (produtos de PCR) já purificados e que foram encaminhados para o sequenciamento, estão dispostas nas figuras 4.14 a 4.17.

Figura 4.14. Fotografia do gel de agarose a 2,0% com os fragmentos de DNA (produtos de PCR) dos éxons: 1 e 2, éxon 2; 3 e 4, éxon 3; 5, éxon 5a; 6, éxon 7, purificados e encaminhados para sequenciamento, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation. Foram aplicados 4 μ L do produto de PCR + 1 μ L de *loading buffer*, 4 μ L do marcador de massa molecular (LM) e 5 μ L do marcador de tamanho molecular (M) de 100 pares bases. Todos os produtos de PCR purificados apresentam-se com massas moleculares cujas intensidades estão acima do equivalente a 20ng/ μ L.

Figura 4.15. Fotografia do gel de agarose a 2,0% com os fragmentos de DNA (produtos de PCR) dos éxons: 1, éxon 4; 2 e 3, éxon 6, purificados e encaminhados para sequenciamento, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation. Foram aplicados 4 μ L do produto de PCR + 1 μ L de *loading buffer*, 4 μ L do marcador de massa molecular (LM) e 5 μ L do marcador de tamanho molecular (M) de 100 pares bases. Todos os produtos de PCR purificados apresentam-se com massas moleculares cujas intensidades estão acima do equivalente a 20ng/ μ L.

Figura 4.16. Fotografia do gel de agarose a 2,0% com os fragmentos de DNA (produtos de PCR) dos éxons: 1, éxon 7; 2 e 3, éxon 8; 4 e 5, éxon 9; 6 e 7 éxon 10b; 8 e 9, éxon 11; 10 e 11, éxon 12; 12 e 13, éxon 13, purificados e encaminhados para sequenciamento, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multi Image™ Alpha Innotech Corporation. Foram aplicados 4µL do produto de PCR + 1 µL de *loading buffer*, 4µL do marcador de massa molecular (LM) e 5µL do marcador de tamanho molecular (M) de 100 pares bases. Todos os produtos de PCR purificados apresentam-se com massas moleculares cujas intensidades estão acima do equivalente a 20ng/µL.

Figura 4.17. Fotografia do gel de agarose a 2,0% com os fragmentos de DNA (produtos de PCR) do éxon 5b, purificados e encaminhados para sequenciamento, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multi Image™ Alpha Innotech Corporation. Foram aplicados 4µL do produto de PCR + 1 µL de *loading buffer*, 4µL do marcador de massa molecular (LM) e 5µL do marcador de tamanho molecular (M) de 100 pares bases. Os produtos de PCR purificados apresentam-se com massas moleculares cujas intensidades estão acima do equivalente a 20ng/µL.

4.2.2. PCR para a técnica do polimorfismo no tamanho do fragmento de restrição (RFLPs).

As concentrações dos reagentes e amostra, o número de ciclos, a temperatura e o tempo ótimos para desnaturação, hibridização e extensão, para cada uma das reações em cadeia da polimerase para as várias regiões de interesse (éxons e íntrons) do DNA genômico para o gene da G6PD, que foram estabelecidas para a técnica de RFLP, utilizados para determinação dos haplótipos e confirmação de mutações, após otimização das reações da PCR estão dispostos à **tabela 4.3**. O esquema utilizado para a detecção dos polimorfismos e mutações por RFLP e as fotografias dos géis para cada uma destas determinações estão dispostos às **figuras 4.18 a 4.25**.

Tabela 4.3. Condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) estabelecidas para as reações de RFLP para determinação dos haplótipos e confirmação de mutações, após otimização.

Reação de RFLP (enzima e sítio restrição)	Temperat. (°C) e tempo (min/seg) de desnaturação (D), hibridização (H) e extensão (E)	Quant. DNA (ng/μL)	Concentração iniciadores (nMolar)	Núm. Ciclos
Haplótipos				
<i>FoKl</i> 376 A→G	94°C/1min; 65°C/1min; 72°C/1 min	50	100nM	31
<i>PvuII</i> 611C→G	94°C/1min; 66°C/1min; 72°C/1 min	50	100nM	32
<i>BspHI</i> 163C→T	94°C/1min; 61°C/1min; 72°C/1 min	50	100nM	30
<i>PstI</i> 1116G→A	94°C/1min; 64°C/1min; 72°C/1 min	50	100nM	32
<i>Bcl I</i> 1311C→T	94°C/1min; 55°C/1min; 72°C/1 min	50	100nM	33
<i>NlaIII</i> nt-13T→C	94°C/1min; 62°C/1min; 72°C/30seg	50	100nM	32
Mutações				
<i>NlaIII</i> 202G→A	94°C/1min; 67°C/1min; 72°C/1 min	50	100nM	31
<i>MboII</i> 563C→T	94°C/1min; 62°C/1min; 72°C/1 min	50	100nM	32

A quantidade de dNTPs, de tampão, de MgCl₂ e de taq DNA polimerase estabelecidas para todos os éxons foram de respectivamente, 200 μM, 1x, 2mM e 1U. A temperatura e o tempo utilizados para a desnaturação inicial e a extensão final estabelecidos para todas as reações foram de 98°C/3min e de 72°C/10 min.

Mutação 376 A→G no gene da G6PD

Figura 4.18. Esquema da RFLP para o fragmento contendo o éxon 5 com indicação do sítio de restrição para a enzima *FOK I* e fotografia do gel de agarose a 1,5% com: 1, fragmento sem; 2 e 3, fragmento com o sítio de restrição, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation, com imagem invertida para negativo. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases.

Polimorfismo IVS5 nt 611 C→G no gene da G6PD

Figura 4.19. Esquema da RFLP para o fragmento contendo os éxons 5 e 6 com indicação do sítio de restrição para a enzima *Pvu II* e fotografia do gel de agarose a 1,5% com: 1, produto de PCR; 2 e 5, fragmentos sem; 3 e 4, fragmento com o sítio de restrição, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation, com imagem invertida para negativo. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases.

Polimorfismo IVS8 nt163C→T no gene da G6PD

Figura 4.20. Esquema da RFLP para o fragmento contendo os éxons 8 e 9 com indicação do sítio de restrição para a enzima *Bsp*HI e fotografia do gel de agarose a 1,5% com: 1, produto de PCR; 2, fragmento com; 3 e 4, fragmentos sem o sítio de restrição, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation, com imagem invertida para negativo. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases.

Polimorfismo 1116 G→A no gene da G6PD

Figura 4.21. Esquema da RFLP para o fragmento contendo parte do éxon 10 com indicação do sítio de restrição para a enzima *Pst* I e fotografia do gel de poliacrilamida a 8% com: 1 e 2, fragmentos com o sítio de restrição; 3 e 4, produtos de PCR, após coloração com prata, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation, com imagem invertida para negativo. M = marcador de tamanho molecular.

Polimorfismo 1311 C→T no gene da G6PD

Figura 4.22. Esquema da RFLP para o fragmento contendo os éxons 10 e 11 com indicação do sítio de restrição para a enzima *Bcl* I e fotografia do gel de agarose a 2,0% com: 1, produto de PCR; 2, fragmento sem; 3, fragmento com o sítio de restrição, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation, com imagem invertida para negativo. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases.

Polimorfismo IVS11 nt -13 T→C no gene da G6PD

Figura 4.23. Esquema da RFLP para o fragmento contendo parte do íntron 11 e o éxon 12 com indicação do sítio de restrição para a enzima *Nla* III e fotografia do gel de agarose a 2,0% com: 1, produto de PCR; 2, fragmento com; 3, fragmento sem o sítio de restrição, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation, com imagem invertida para negativo. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases.

Mutação 202 G→A no gene da G6PD

Figura 4.24. Esquema da RFLP para o fragmento contendo os éxons 3 e 4 com indicação do sítio de restrição para a enzima *Nla* III e fotografia do gel de agarose a 2,0% com: 1 e 2, fragmentos sem; 3, produto de PCR; 4 e 5, fragmentos com o sítio de restrição, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation, com imagem invertida para negativo. M = marcador de tamanho molecular de 50 pares bases.

Mutação 563 C→T no gene da G6PD

Figura 4.25. Esquema da RFLP para o fragmento contendo o éxon 6 com indicação dos sítios de restrição para a enzima *Mbo* II e fotografia do gel de agarose a 2,0% com: 1, produto de PCR; 2, fragmento com um sítio de restrição constitutivo mas sem o sítio de restrição específico para mutação 563 C→T, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation, com imagem invertida para negativo. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases.

A otimização das temperaturas de hibridização e número de ciclos, através de seus respectivos gradientes, para as amplificações pela PCR para alguns dos vários fragmentos do DNA genômico da G6PD, utilizadas para as RFLPs estão ilustrados nas **figuras 4.26 a 4.33**.

Figura 4.26. Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR de todo o éxon 5 (355 pb) para a RFLP da mutação 376 A→G com a enzima Fok I, utilizando os iniciadores E5aS e E5bAS, durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente: 1, 53°C; 2, 55°C; 3, 58°C; 4, 61°C; 5, 64°C; 6, 66°C; após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation, com inversão das cores para o negativo. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases. * fragmento de uma outra reação de PCR. Nota-se o desaparecimento dos fragmentos inespecíficos (amostras 1 e 2) às temperaturas de 61, 64 e 66 graus (amostras 4, 5 e 6). Na amostra 3 (temperatura de 58 graus) ainda há um discreto fragmento inespecífico de ~ 1200pb.

Figura 4.27. Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR de todo o éxon 5 (355 pb) para a RFLP da mutação 376 A→G com a enzima *FoK* I, utilizando os iniciadores E5aS e E5bAS, depois da otimização das condições da reação com, 1, controle negativo, 2 a 5 algumas das amostras de nossa casuística, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases (pb).

Figura 4.28. Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR de parte do éxon 5 e todo o éxon 6 (1025 pb) para a RFLP para o polimorfismo IVS5nt611 C→G com a enzima *Pvu*II, utilizando os iniciadores E5bS e E6AS, durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente: 1, 58°C; 2, 61°C; 3, 63°C; 4, 64°C; 5, 66°C; 6, 68°C; após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation, com inversão das cores para o negativo. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases. * fragmento de uma outra reação de PCR.

Figura 4.29. Fotografia do gel de agarose a 1,0% com os fragmentos amplificados pela PCR de parte do éxon 5 e todo o éxon 6 (1025 pb) para a RFLP para o polimorfismo IVS5nt611 C→G com a enzima PvuII, utilizando os iniciadores E5bS e E6AS, depois da otimização das condições da reação com, 1, controle negativo, 2 a 6 algumas das amostras de nossa casuística, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases (pb).

Figura 4.30. Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR dos éxons 3 e 4 (326 pb) para a RFLP para a mutação 202 G→A com a enzima NlaIII, utilizando os iniciadores E3S e E4AS, durante otimização da temperatura de hibridização através de um gradiente: 1, controle negativo; 2, 59°C; 3, 62°C; 4, 64°C; 5, 66°C; 6, 67°C; após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation, com inversão das cores para o negativo. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases.

Figura 4.31. Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR dos éxons 3 e 4 (326 pb) para a RFLP para a mutação 202 G→A com a enzima *NlaIII*, utilizando os iniciadores E3S e E4AS, depois da otimização das condições da reação com, 1, controle negativo, 2 a 5 algumas das amostras de nossa casuística, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases (pb).

Figura 4.32. Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR dos éxons 3 e 4 (326 pb) para a RFLP para a mutação 202 G→A com a enzima *NlaIII*, utilizando os iniciadores E3S e E4AS, durante otimização do número de ciclos através de um gradiente: 1, controle negativo, 2, 28 ciclos; 3, 29 ciclos; 4, 30 ciclos; 5, 31 ciclos; 6, 32 ciclos; 7, 33 ciclos, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases. Nota-se que a partir do ciclo 31 (amostra 5) a expressão da banda não mais se modifica.

Figura 4.33. Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR dos éxons 8 e 9 (795 pb) para a RFLP do Polimorfismo IVS8 nt163C→T com a enzima BspHI, utilizando os iniciadores E8S e E9AS, durante otimização do número de ciclos através de um gradiente: 1, controle negativo; 2, 28 ciclos; 3, 29 ciclos; 4, 30 ciclos; 5, 31 ciclos, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases. Nota-se que a partir do ciclo 30 (amostra 4) a expressão da banda não mais se modifica.

4.2.3. PCR para o sequenciamento da região promotora do gene da G6PD.

As condições da PCR otimizadas para amplificação da região promotora do gene da G6PD estão dispostas à **tabela 4.4**.

Tabela 4.4. Condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) para o sequenciamento da região promotora do gene da G6PD, que foram estabelecidas após otimização.

Região	Temperatura (°C) / tempo (min): desnaturação (D); hibridização (H) e extensão (E)	Quant. DNA (ng/μL)	Concentração iniciadores (nMolar)	Núm. ciclos
Promo tor	96°C/1,5min; 60,5°C/1,5min; 72°C/1,5 min	100	400nM	35

A quantidade de dNTPs, de tampão, de MgCl₂, DMSO (dimetilsulfóxido) e de taq DNA polimerase estabelecidas foram de respectivamente, 200 μM, 1x, 3mM, 10% e 1,5U. A temperatura e o tempo utilizados para a desnaturação inicial e a extensão final estabelecidos foram de 98°C/4min e de 72°C por 10 min, respectivamente.

Figura 4.34. Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos amplificados pela PCR da região promotora do gene da G6PD (507 pb) durante otimização da concentração de $MgCl_2$, através de um gradiente: 1, controle negativo; 2, 2mM; 3, 2,5mM; 4, 3mM; 5, 4mM, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil ImageTM Alpha Innotech Corporation. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases..

Figura 4.35. Fotografia do gel de agarose a 2,0% com os fragmentos de DNA (produtos de PCR) da região promotora do gene da G6PD: 1, amostra controle normal G6PDB; 2, amostra Gd Cuiabá; 3, amostra Gd Butantan, purificados e encaminhados para sequenciamento, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil ImageTM Alpha Innotech Corporation. Foram aplicados 4 μ L do produto de PCR + 1 μ L de *loading buffer*, 4 μ L do marcador de massa molecular (LM) e 5 μ L do marcador de tamanho molecular (M) de 100 pares bases.

4.3. TRIAGEM DE MUTAÇÕES POR SSCP

As condições estabelecidas para a SSCP em gel de poliacrilamida 12,5% foram de: 600 volts, 25 mA, 15W, às temperaturas de 50°C, 80°C, 120°C e 150°C por 1 hora e 30 min. Os perfis de bandamento nas mesmas temperaturas (50°C, 80°C, 120°C e 150°C) obtidos a 400 volts por 2:00 horas foram semelhantes àqueles obtidos a 600 volts.

Nenhuma das amostras que não havia apresentado alteração conformacional em nenhuma das temperaturas utilizadas apresentou alteração no sequenciamento do DNA genômico. Os fragmentos que apresentaram alterações conformacionais na SSCP durante a otimização, e suas respectivas condições de reação estão dispostos à **tabela 4.5** e ilustrados às **figuras 4.36 a 4.40**.

Tabela 4.5. Condições para realização da técnica de SSCP em GeneGel Excel (Amersham-Biosciences, Uppsala, Sweden), que apresentaram alterações conformacionais para as amostras avaliadas durante nossa otimização.

Região analisada	Voltagem (V)	Temperaturas (°C)	Tempo (min)
Éxon 4	600	5, 8, 12, 15	90
Éxon 5a	600	5, 8, 12, 15	90
Éxon 5b	600	5, 8, 12, 15	90
Éxon 7	600	5, *, *, 15	90
Éxon 8	600	5, 8, 12, 15	90
Éxon 11	600	5, 8, 12, 15	90

* não realizado

As variantes Cuiabá e Butantan não apresentaram qualquer alteração conformacional em nenhum dos éxons, em nenhuma das 4 temperaturas testadas na SSCP como ilustrado nas **figuras 4.36, 4.38 e 4.40 a 4.43**.

Figura 4.36. Fotografias do géis de SSCP (poliacrilamida) corados com nitrato de prata representando os produtos obtidos pelos iniciadores que flanqueiam a região que contém o éxon 4 do gene da G6PD, a 600 volts, 25mA e 15W, em diferentes temperaturas. Na posição 1 foi colocado o controle normal, na posição 3 foi colocada uma amostra positiva para mutação 202 G→A, nas posições 2 e 4, foram colocadas respectivamente as amostras das variantes Cuiabá e Butantan, obtidas no sistema digital Multil ImageTM Alpha Innotech Corporation, com inversão das cores para o negativo. A seta (↑ ou ↓) indica perfil de SSCP sugestivo de presença de mutação.

Das trinta amostras deficientes analisadas, vinte e seis apresentaram alterações conformacionais simultaneamente nos éxons 4 e 5 (**figuras 4.36 a 4.38**), três apresentaram alterações apenas no éxon 8 (**figura 4.39**) e uma apenas no éxon 7 (**figura 4.48**). Nenhuma apresentou alteração no éxon 6.

Figura 4.37. Fotografias dos géis de SSCP (poliacrilamida) corados com nitrato de prata representando os produtos obtidos pelos iniciadores que flanqueiam a região que contém o éxon 5a do gene da G6PD, a 400 volts, 25mA e 15W, em diferentes temperaturas. Na posição 1 foi colocado o controle normal, na posição 4 foi colocada uma amostra positiva para mutação 376 A→G, nas posições 2 e 3, foram colocadas duas amostras negativas, obtidas no sistema digital Multil ImageTM Alpha Innotech Corporation, com inversão das cores para o negativo. A seta (↑ ou ↓) indica perfil de SSCP sugestivo de presença de mutação.

Figura 4.38. Fotografias dos géis de SSCP (poliacrilamida) corados com nitrato de prata representando os produtos obtidos pelos iniciadores que flanqueiam a região que contém o éxon 5b do gene da G6PD, a 600 volts, 25mA e 15W, em diferentes temperatura. Na posição 1 foi colocado o controle normal, na posição 4 foi colocada uma amostra positiva para mutação 376 A→G, foram colocadas respectivamente as amostras das variantes Cuiabá e Butantan, obtidas no sistema digital Multil ImageTM Alpha Innotech Corporation, com inversão das cores para o negativo. A seta (↑) indica perfil de SSCP sugestivo de presença de mutação.

Figura 4.39. Fotografias dos géis de SSCP (poliacrilamida) corados com nitrato de prata representando os produtos obtidos pelos iniciadores que flanqueiam a região que contém o éxon 8 do gene da G6PD, a 600 volts, 25mA e 15W, em diferentes temperaturas. Na posição 1 foi colocado o controle normal, nas posições 2, 3 e 4 foram colocadas amostras positivas para mutação 844 G→C (Seattle), obtidas no sistema digital Multil ImageTM Alpha Innotech Corporation, com inversão das cores para o negativo. A seta (↓) indica perfil de SSCP sugestivo de presença de mutação.

As amostras com os éxons 4 e 5 alterados na SSCP foram avaliadas para as mutações 202G→A e 376A→G por RFLP. As 3 amostras com éxon 8 e a amostra com éxon 7 alterados na SSCP, bem como todos os éxons das variantes fenotípicas Cuiabá e Butantan tiveram seus respectivos fragmentos amplificados, purificados e encaminhados para o sequenciamento.

Figura 4.40. Fotografias dos géis de SSCP (poliacrilamida) corados com nitrato de prata representando os produtos obtidos pelos iniciadores que flanqueiam a região que contém o éxon 11 do gene da G6PD, a 600 volts, 25mA e 15W, em diferentes temperaturas. Na posição 1 foi colocado o controle normal, na posição 4 foi colocada uma amostra positiva para o polimorfismo 1311 C→T, nas posições 2 e 3, foram colocadas respectivamente as amostras das variantes Cuiabá e Butantan, obtidas no sistema digital Multil ImageTM Alpha Innotech Corporation, com inversão das cores para o negativo. A seta (↓) indica perfil de SSCP sugestivo de presença de mutação.

Figura 4.41. Fotografias dos géis de SSCP (poliacrilamida) corados com nitrato de prata representando os éxons 2, 3, 6 e 7 do gene da G6PD, a 600 volts, 25mA e 15W, em diferentes temperaturas. Nas posições 1 foram colocados os controles normais, nas posições 2 e 3, foram colocadas respectivamente as amostras das variantes Cuiabá e Butantan, obtidas no sistema digital Multil ImageTM Alpha Innotech Corporation, com inversão das cores para o negativo.

Figura 4.42. Fotografias dos géis de SSCP (poliacrilamida) corados com nitrato de prata representando os éxons 9, 10a e 10b do gene da G6PD, a 600 volts, 25mA e 15W, em diferentes temperaturas. Nas posições 1 foram colocados os controles normais, nas posições 2 e 3, foram colocadas respectivamente as amostras das variantes Cuiabá e Butantan, obtidas no sistema digital Multil ImageTM Alpha Innotech Corporation, com inversão das cores para o negativo.

Figura 4.43. Fotografias dos géis de SSCP (poliacrilamida) corados com nitrato de prata representando os éxons 5a, 8, 12 e 13 do gene da G6PD, a 600 volts, 25mA e 15W, em diferentes temperaturas. Nas posições 1 foram colocados os controles normais, nas posições 2 e 3, foram colocadas respectivamente as amostras das variantes Cuiabá e Butantan, obtidas no sistema digital Multil ImageTM Alpha Innotech Corporation, com inversão das cores para o negativo.

4.4. CONFIRMAÇÃO DE MUTAÇÕES POR RFLP

As amostras deficientes com os éxons 4 e 5 alterados na SSCP, avaliadas para as mutações 202G→A e 376A→G por RFLP, confirmaram serem de portadores da variante Africana A⁻.

Como nenhuma das amostras deficientes havia apresentado alteração conformacional no éxon 6, em nenhuma das 4 temperaturas testadas na SSCP, não foi necessário a utilização da RFLP para a confirmação da mutação Mediterrânea 563C→T (GdB⁻).

Das trinta e quatro (34) amostras do grupo de não-deficientes (amostras com atividade normal da G6PD), apenas duas (2), apresentaram sítio de restrição para a mutação polimórfica 376A→G, nos permitindo afirmar serem de portadores da variante Africana A⁺. Assim, do grupo de não-deficientes cerca de 94% (32/34) são portadores do alelo G6PDB⁺ e cerca de 6% (2/34) do alelo G6PD A⁺.

Deste modo, para a análise de haplótipos, o grupo de não deficientes ficou subdividido em 32 amostras de indivíduos com G6PD tipo B⁺, que passaram a integrar o grupo controle GdB⁺ e 2 amostras de indivíduos com G6PD tipo A⁺ (GdA⁺).

4.5. SEQUENCIAMENTO DO DNA GENÔMICO E REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA G6PD

Os resultados do sequenciamento de todos os éxons para as variantes fenotípicas Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan não demonstraram qualquer alteração estrutural na sequência de nucleotídeos. Uma parte do sequenciamento de um dos fragmentos do DNA genômico (final do íntron 5 e início do éxon 6) destas amostras está ilustrado através dos seus eletrofluorogramas nas **figuras 4.44 e 4.45**.

Figura 4.44. Eletrofluorograma do sequenciamento do início do éxon 6 do gene da G6PD do portador da variante fenotípica Gd+ Butantan. A sequência de nucleotídeos GGCTCCAGCAG corresponde ao final do íntron 5, a sequência de nucleotídeos AGGCTGG corresponde ao início do éxons 6.

Figura 4.45. Eletrofluorograma do sequenciamento do início do éxon 6 do gene da G6PD do portador da variante fenotípica Gd+ Cuiabá. A sequência de nucleotídeos GGCTCCAGCAG corresponde ao final do íntron 5, a sequência de nucleotídeos AGGCTGG corresponde ao início do éxons 6.

As três amostras que haviam apresentado alterações conformacionais no éxon 8 pela SSCP (ilustradas na **figura 4.39 e 4.46**) apresentaram no sequenciamento do DNA genômico substituição no nucleotídeo 844G→C em relação à sequência de referência G6PD B+, correspondente à mutação Seattle (**figura 4.47**).

Figura 4.46. Fotografia do gel da SSCP com alteração no padrão de migração do gene da G6PD para mutação Seattle. N = padrão normal.

Figura 4.47. Sequenciamento do éxon 8 do gene da G6PD, demonstrando a mutação 844G→C, identificada como variante Seattle. Em A) o sequenciamento através do iniciador *sense*, em B) o sequenciamento através do iniciador *antisense*.

A amostra de um indivíduo originário da cidade de Barretos - São Paulo, que havia demonstrado atividade residual da G6PD de 64,3% em relação ao padrão normal GdB+, e que teve alteração conformacional no éxon 7 pela SSCP (ilustrada na **figura 4.48**) apresentou no sequenciamento do DNA genômico uma substituição no nucleotídeo 660C→G (**figura 4.49**) nunca antes descrita na literatura, levando a alteração do triplete ATC para ATG, correspondendo à troca dos aminoácidos apolares não-aromáticos isoleucina para metionina na posição 220 da sua molécula protéica.

Figura 4.48. Fotografias dos géis de SSCP (poliacrilamida) corados com nitrato de prata representando os produtos obtidos pelos iniciadores que flanqueiam a região que contém o éxon 7 do gene da G6PD, a 600 volts, 25mA e 15W, em diferentes temperaturas. Na posição 1 foi colocado o controle normal, na posição 2 foi colocada a amostra positiva para a inédita mutação 660 C→G, obtidas no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation. A seta (↑) indica perfil de SSCP sugestivo de presença de mutação.

Figura 4.49. Sequenciamento do éxon 7 do gene da G6PD, demonstrando uma mutação inédita nt660 C→G. Em A) o sequenciamento através do iniciador *sense*, em B) o sequenciamento através do iniciador *antisense*.

O sequenciamento da região promotora dos portadores das variantes fenotípicas Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan não demonstrou qualquer alteração estrutural em relação ao controle normal (GdB+) que foi seqüenciado em paralelo. Uma parte deste sequenciamento está ilustrado nas **figuras 4.50, 4.51 e 4.52**.

Figura 4.50. Sequenciamento de parte da região promotora do gene da G6PD da amostra controle normal G6PDB+. Em destaque o sítio TATA BOX, TTAAAT.

Figura 4.51. Sequenciamento de parte da região promotora do gene da G6PD da amostra do portador da variante fenotípica Gd+ Cuiabá. Em destaque o sítio TATA BOX, TTAAAT.

Figura 4.52. Sequenciamento de parte da região promotora do gene da G6PD da amostra do portador da variante fenotípica Gd+ Butantan. Em destaque o sítio TATA BOX, TTAAAT.

4.6. CARACTERIZAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS

Após otimização das condições da PCR (tabela 4.3) e RFLP (figuras 4.18 a 4.25), e de posse da definição do genótipo para as amostras deficientes: variantes Africana A⁻ (através de RFLP para os fragmentos alterados na SSCP), variantes Seattle e variante inédita (mutação nt660 C→G) (através de sequenciamento do fragmento alterado na SSCP), e não deficientes: controles normais GdB⁺ e variantes Africana A⁺, foi feita a caracterização dos haplótipos para as variantes Gd⁺ Cuiabá e Gd⁺ Butantan e demais amostras deficientes e não deficientes. O tamanho dos fragmentos amplificados e produtos da digestão utilizados para avaliar as RFLPs na determinação dos haplótipos da G6PD estão dispostos na tabela 4.6.

Tabela 4.6. Fragmentos amplificados e produtos da digestão para identificação dos polimorfismos utilizados na determinação dos haplótipos da G6PD.

Polimorfismo	Endonuclease de restrição	Fragmento amplificado (pb)	Tamanho fragmentos (pb) após digestão enzimática	
			Alelo normal	alelo variante
376 A→G, exon 5	<i>Fok</i> I	355	355	193 e 161
IVS5nt611 C→G	<i>Pvu</i> II	1025	1025	759 e 266
IVS8 nt163C→T	<i>Bsp</i> HI	795	292 e 503	795
1116 G→A, exon10	<i>Pst</i> I	202	108 e 94	202
1311 C→T, exon11	<i>Bcl</i> I	207	207	184 e 23*
IVS11nt93 T→C	<i>Nla</i> III	214	214	47 e 167

* o fragmento de 23 pb não é visualizado no gel de agarose.

Foram avaliadas seis RFLPs intragênicas através dos polimorfismos: éxon 5, nt 376 A→G, *Fok*I; íntron 5, nt 611 C→G, *Pvu*II; íntron 8, nt 163 C→T, *Bsp*HI; éxon 10, nt 116 G→A, *Pst*I; éxon 11, nt 1311 C→T, *Bcl*I e íntron 11, nt 93 T →C, *Nla*III, e feito o estudo de desequilíbrio de ligação e de associação para alguns haplótipos específicos.

Dos 64 possíveis haplótipos, apenas 5 foram evidenciados em nossa casuística composta das variantes fenotípicas Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan, por um grupo de 34 amostras não deficientes (32 do grupo controle GdB+ e 2 variantes africana GdA+) e de 30 amostras deficientes (26 variantes africana GdA-, 3 variantes Seattle e uma variante nunca descrita, nt660C→G. Foram eles: I (- - + + - -), Ia (- - + + - +), IVa (+ - - + - +), VIa (+ + - + - +) e VIIa (- - + + + +), de acordo com a presença (+) ou não (-) do sítio de restrição para aqueles polimorfismos, **tabela 4.7**. Os demais resultados estão dispostos às **tabelas 4.8 a 4.12**.

Tabela 4.7: Frequência de haplótipos para o gene da G6PD encontrados em nossa casuística.

Haplótipos	Sítio de restrição						Frequência	
	<i>FokI</i>	<i>PvuII</i>	<i>BspHI</i>	<i>PstI</i>	<i>BclI</i>	<i>NlaIII</i>	n	%
Controles GdB+							32	100
I	-	-	+	+	-	-	26	81,3
Ia	-	-	+	+	-	+	2	6,2
VIIa	-	-	+	+	+	+	4	12,5
Amostras GdA+							2	100
IVa	+	-	-	+	-	+	2	100
Deficientes GdA-							26	100
VIa	+	+	-	+	-	+	26	100
Defic. Gd Seattle							3	100
I	-	-	+	+	-	-	3	100
Gd nt660C→G*								
I	-	-	+	+	-	-	1	100
Gd+ Cuiabá								
Ia	-	-	+	+	-	+	1	100
Gd+ Butantan								
I	-	-	+	+	-	-	1	100

* mutação inédita nt660C→G.

Tabela 4.8: Frequência de polimorfismos intragênicos para o gene da G6PD no grupo controle GdB+ e no grupo de deficientes.

Polimorfismo	Enzima restrição	Freq. Alelos, grupo controle GdB (n=32)				Freq. alelos, grupo deficientes (n=30)			
		(+)		(-)		(+)		(-)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
376 A→G, éxon 5	<i>FokI</i>	0	0	32	100	26	86,7	4	13,3
611 C→G, íntron 5	<i>PvuII</i>	0	0	32	100	26	86,7	4	13,3
163 C→T, íntron 8	<i>BspHI</i>	32	100	0	0	4	13,3	26	86,7
1116 G→A, éxon 10	<i>PstI</i>	32	100	0	0	30	100	0	0
1311 C→T, éxon 11	<i>BclI</i>	4	12,5	28	75,5	0	0	30	100
93 T→C, íntron 11	<i>NlaIII</i>	6	18,7	26	81,3	26	87,6	4	13,3

Tabela 4.9: Distribuição dos haplótipos do gene da G6PD, em deficientes (Gd A-, Gd Seattle, Gd nt660C>G) e não deficientes (Gd B+, Gd A+, Gd+ Culabá e Gd+ Butantan).

Haplótipos	deficientes	não deficientes	
I	4	27	
Ia	0	3	$\chi^2 = 50,9$ $p < 0,001$
IVa	0	2	
Vla	26	0	
VIIa	0	4	

Tabela 4.10: Distribuição dos haplótipos do gene da G6PD entre o grupo de deficientes, pelo Teste de Fisher.

Haplótipos	GdA-	Gd Seattle/ Gd nt660C→G	
I	0	4	
Vla	26	0	$p < 0,001$

Tabela 4.11: Distribuição dos haplótipos do gene da G6PD, em portadores do genótipo GdB+ e das variantes Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan.

Haplótipos	GdB+	GdCuiabá/Gd Butantan	
I	26	1	
Ia	2	1	$\chi^2 = 4,56$
VIIa	4	0	$p = 0,102$

Tabela 4.12: Distribuição do polimorfismo para o sítio de restrição 163 C→T, íntron 8, para a enzima *BspHI* para o gene da G6PD, em portadores do genótipo GdB+ e no grupo de deficientes.

genótipo GdB+ e no grupo de controle					
Amostras	Polimorfismo 163 C→T, íntron 8 para <i>BspHI</i>				
	(+)		(-)		
	n	%	n	%	
Controles GdB+	32	100	0	0	$\chi^2 = 44,27$
Deficientes	4	18,7	26	81,3	$p < 0,001$

4.7. ESTUDO DO RNA DAS VARIANTES Gd+ CUIABÁ E Gd+ BUTANTAN

4.7.1. Otimização das reações da PCR

As condições da PCR otimizadas para amplificação do RNA transcrito do gene da G6PD estão dispostas às **tabelas 4.13 e 4.14** e ilustradas nas **figuras 4.51 a 4.54**.

Tabela 4.13. Condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) para o sequenciamento do RNA do gene da G6PD, estabelecidas após otimização.

Região amplificada	Temperat. (°C) e tempo (min) de desnaturação (D), hibridização (H) e extensão (E)	Concentração iniciadores (nMolar)	Núm. Ciclos
RNA dividido			
"região 1"	94°C/1min; 65°C/1min; 72°C/1 min	100nM	33
"região 2"	94°C/1min; 61°C/1min; 72°C/1 min	100nM	33
"região 3"	94°C/1min; 60°C/1min; 72°C/1 min	100nM	33
"região 4"	94°C/1min; 68°C/1min; 72°C/1 min	100nM	33
RNA completo			
"região 1 a 4"	94°C/1min; 65°C/1,5min; 72°C/1,5 min	100nM	33

A quantidade de dNTPs, de tampão, de MgCl₂ e de taq DNA polimerase estabelecidas foram de respectivamente, 200 µM, 1x, 2mM e 1U. A temperatura e o tempo utilizados para a desnaturação inicial e a extensão final estabelecidos para todas as reações foram de 98°C/3min e de 72°C/10 min. Foi utilizado como amostra 2µL de cDNA para um volume final de reação de 50 µL. Para a reação da região 1 a 4 foi utilizada 2U de taq DNA polimerase.

Tabela 4.14. Condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) "a frio" como modelo para a PCR em Tempo Real, estabelecidas após otimização.

Região do RNA amplificada*	Temperat. (°C) e tempo (min/seg) de desnaturação (D), hibridização (H) e extensão (E)	Concentração iniciadores (nMolar)	Núm. Ciclos
*E8 e E9	94°C/1min; 57°C/1min; 72°C/1 min	200nM	32

A quantidade de dNTPs, de tampão, de MgCl₂ e de taq DNA polimerase estabelecidas foram de respectivamente, 200 µM, 1x, 2mM e 1U. A temperatura e o tempo utilizados para a desnaturação inicial e a extensão final estabelecidos foram de 98°C/3min e de 72°C/10 min. * a região amplificada foi o fragmento do RNA correspondente aos éxons 8 e 9 do gene da G6PD

Figura 4.53. Fotografia do gel de agarose a 2,0% com os fragmentos amplificados pela PCR da "região 4" do RNA do gene da G6PD (454 pb) durante otimização da temperatura de hibridização, através de um gradiente: 1, 61°C; 2, 63°C; 3, 65°C; 4, 67°C; 5, 68°C, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases.

Figura 4.54. Fotografia do gel de agarose a 2,0% com os fragmentos amplificados e purificados, encaminhados para o sequenciamento do RNA do gene da G6PD: 1, 2 e 3, "região 1"; 4, 5, 6, "região 2", das amostras GdB, Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases. LM = marcador de massa molecular.

Figura 4.55. Fotografia do gel de agarose a 2,0% com os fragmentos amplificados e purificados, encaminhados para o sequenciamento do RNA do gene da G6PD: 1, 2 e 3, "região 3"; 4, 5, 6, "região 4", das amostras GdB, Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil ImageTM Alpha Innotech Corporation. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases. LM = marcador de massa molecular.

Figura 4.56. Fotografia do gel de agarose a 1,5% com os fragmentos do RNA amplificados pela PCR a partir dos iniciadores RNA 3S e RNA 2AS, correspondentes aos éxons 8 e 9 do gene da G6PD (119 pb), após otimização das condições da PCR: 1, controle negativo; 2, amostra GdB; 3, amostra Gd Cuiabá; 4, amostra Gd Butantan, obtidos após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, através do sistema digital Multil ImageTM Alpha Innotech Corporation. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases.

4.7.2. Sequenciamento do RNA

Após otimização das condições das reações de amplificação da sequência completa do RNAm da G6PD, dividida em "4 regiões", foi feita a purificação dos produtos de PCR obtidos e o sequenciamento do RNA de um controle normal G6PD B+, e das variantes Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan.

Os produtos da PCR obtidos a partir dos iniciadores que flanqueavam toda a extensão do RNAm (região 1 a 4) entre as amostras da Gd+ Cuiabá, Gd+ Butantan e controle GdB+ (**figura 4.57**), foram do mesmo tamanho, o que não sugeria erro de encadeamento do RNAm. Isto de fato foi comprovado com os resultados dos sequenciamentos dos cDNAs de cada uma das 4 regiões (região 1, 2, 3 e 4) dos portadores da Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan, que não demonstraram qualquer alteração estrutural em toda sua extensão. Parte destes sequenciamentos estão ilustrados nas **figuras 4.58 a 4.63**.

Figura 4.57. Fotografia do gel de agarose a 2,0% com os fragmentos amplificados pela PCR através dos iniciadores RNA1S e E13AS, correspondentes a toda a extensão do RNA ("região 1" a "região 4") do gene da G6PD: 1, controle negativo; 2, amostra GdB+; 3, amostra Gd+ Cuiabá; 4, amostra Gd+ Butantan, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil ImageTM Alpha Innotech Corporation. M = marcador de tamanho molecular de 100 pares bases.

Figura 4.58. Eletrofluorograma do sequenciamento feito a partir do iniciador *sense* (E5bS), da "região 2" do cDNA do gene da G6PD do portador da variante Gd+ Cuiabá, equivalente ao final do éxon 5 (AGCCAGAT) e início do éxon 6 (AGGCTGGAACC).

Figura 4.59. Eletrofluorograma do sequenciamento feito a partir do iniciador *sense* (E5bS), da "região 2" do cDNA do gene da G6PD do portador da variante Gd+ Butantan, equivalente ao final do éxon 5 (AGCCAGAT) e início do éxon 6 (AGGCTGGAACC).

Figura 4.61. Eletrofluorograma do sequenciamento feito a partir do iniciador *antisense* (E5bS), da "região 2" do cDNA do gene da G6PD do portador da variante Gd+ Cuiabá, equivalente ao final do éxon 5 (AGCCAGAT) e início do éxon 6 (AGGCTGGAACC).

Figura 4.62. Eletrofluorograma do sequenciamento feito a partir do iniciador *antisense* (RNA2AS), da "região 2" do cDNA do gene da G6PD do portador da variante Gd+ Butantan, equivalente ao final do éxon 5 (AGCCAGAT) e início do éxon 6 (AGGCTGGAACC).

Figura 4.63. Eletrofluorograma do sequenciamento feito a partir do iniciador *antisense* (E5bS), da "região 2" do cDNA do gene da G6PD do controle normal GdB+, equivalente ao final do éxon 5 (AGCCAGAT) e início do éxon 6 (AGGCTGGAACC).

4.7.2. Expressão do RNA pela PCR em Tempo Real

A avaliação da expressão do RNA do gene da G6PD nas amostras dos portadores da Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan teve como controle normal a mesma amostra GdB+ utilizada em suas respectivas caracterizações bioquímicas, cujo DNA genômico e RNA haviam sido previamente seqüenciados neste trabalho.

Foi usado o gene constitutivo da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPD) como controle da expressão "normal" da reação. Os resultados

descritos abaixo demonstraram uma diminuição em cerca de 33,0% da expressão do RNA do gene da G6PD no portador da Gd+ Butantan em relação ao controle GdB+. Não houve diferença significativa entre a expressão do RNA do portador da Gd+ Cuiabá e o controle normal GdB+.

Cálculos:

No local onde a amplificação das reações de PCR marcadas estavam em exponencial (CT ou Threshold Cycle) os valores médios encontrados para as amostras GdB+, Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan, para o gene da GAPD foram de respectivamente 20,18; 21,105 e 21,445. Para o gene da G6PD foram de respectivamente 22,71; 23,675 e 24,545. Assim, os valores para ΔCT (diferença entre as médias de CT da G6PD e da GAPD) para cada amostra foram de respectivamente: 2,53; 2,57 e de 3,1.

O cálculo da expressão do gene em estudo equivale à diferença entre os ΔCT de cada amostra em estudo e o ΔCT da amostra controle, o chamado $\Delta\Delta CT$. Assim, o $\Delta\Delta CT$ para a Gd+ Cuiabá foi de $2,57 - 2,53 = 0,04$; o $\Delta\Delta CT$ para a Gd+ Butantan foi de $3,1 - 2,53 = 0,57$. Como o valor da expressão do gene em estudo equivale matematicamente a 2 elevado à potência de $-\Delta\Delta CT$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$), os valores da expressão da G6PD para a Gd+ Cuiabá foi $2^{-0,04} = 0,972$ e da Gd+ Butantan foi de $2^{-0,57} = 0,673$. Como o valor da expressão do controle é sempre 1 (onde $2^0 = 1$) podemos inferir que a expressão do RNA da G6PD para o portador da Gd+ Cuiabá equivale a aproximadamente 97% da expressão do controle normal e que a expressão do RNA da G6PD para o portador da Gd+ Butantan equivale a aproximadamente a 67% da expressão do controle normal, portanto, cerca de 33% mais baixa.

Fig 4.64. Curva de dissociação para a reação de amplificação para o RNA do gene da G6PD, demonstrando que apenas um único pico, portanto, um único e específico fragmento de RNA foi amplificado durante a reação da PCR em Tempo Real.

Fig 4.65. Curva de dissociação para a reação de amplificação para o RNA do gene da GAPD, demonstrando que apenas um único pico, portanto, um único e específico fragmento de RNA foi amplificado durante a reação da PCR em Tempo Real.

Figura 4.66. Curvas de amplificação para a reação da PCR em Tempo Real para avaliação da expressão do RNA do gene da G6PD, utilizando o gene da GAPD como controle. Observa-se que no limiar de 0,1 para o gene da GAPD a amostra GdB+ (azul) está amplificando exponencialmente em torno do ciclo 20, a Gd+ Cuiabá (vermelho) do ciclo 21, a Gd+ Butantan (verde claro) do ciclo 21,5. Para o gene da G6PD a amostra GdB+ (abacate) está amplificando exponencialmente em torno do ciclo 23, a Gd+ Cuiabá (roxo) do ciclo 23,5 e a Gd+ Butantan (azul-esverdeado) do ciclo 24,5.

5. DISCUSSÃO

Extração do DNA genômico.

Apesar do tempo necessário para sua execução ser um pouco prolongado, o método descrito por SALAZAR *et al.* (1998) nos pareceu bastante satisfatório demonstrando bom rendimento e pureza (relação Abs 260 nm / Abs 280 nm entre 1,8 e 2,0), boa integridade das amostras extraídas, não apresentando fragmentação e/ou degradação. Além de tudo, demonstrou grande economia de custos em relação aos kits comerciais.

Otimização das amplificações pela PCR:

Na construção dos iniciadores houve o cuidado em deixar as extremidades 3' livres para as prováveis hibridizações inespecíficas (demonstradas pelo programa *primer premier*), portanto, com menor possibilidade de que a DNA polimerase pudesse incorporar nucleotídeos em regiões inapropriadas e assim gerar produtos inadequados da PCR. Assim, permitiu-se que durante as otimizações das reações tenha sido possível obter produtos de amplificação específicos que pudessem ser visualizados no gel de agarose, inclusive a várias temperaturas de hibridação, como se pode observar nas figuras 4.5, 4.9 e 4.10.

Para maior segurança, foi escolhida como ideal a mais alta temperatura dentre aquelas que apresentaram o fragmento da PCR forte e com boa resolução. Esta opção decorreu do fato de que em alguns casos, as temperaturas mais baixas, dentre aquelas que haviam apresentado resultados iniciais satisfatórios, passavam a apresentar fragmentos inespecíficos nas

reações experimentais em que era utilizado o próprio produto da PCR como amostra de amplificação para a mesma reação, ou seja, PCR da PCR.

Provavelmente o fator que mais tenha contribuído para que, após a otimização das reações da PCR, tenhamos conseguido diminuir, pelo menos à metade, as quantidades de reagentes e amostra anteriormente utilizadas na literatura (POGGI *et al.*, 1990), tenha sido a escolha de iniciadores com temperaturas de desnaturação (*melting*) muito próximas. Isto certamente contribuiu também para que fosse possível combinar um mesmo iniciador *sense* com mais de um iniciador *antisense*, e vice-versa, o que também foi outro aspecto positivo em termos de economia.

De um modo geral, foi possível utilizar os mesmos iniciadores das reações de SSCP e sequenciamento do DNA genômico, para as reações de RFLP. Foi usado inclusive iniciadores situados em regiões exônicas, descritos inicialmente para amplificar o éxon 5 em fragmentos compatíveis com a boa sensibilidade da SSCP, como no caso dos iniciadores E5aAS e E5bS, para as reações de sequenciamento do cDNA. Da mesma forma, os iniciadores destinados a princípio para o sequenciamento do cDNA (RNA3S e RNA2AS), também foram úteis nas determinações quantitativas da expressão feitas pela PCR em Tempo Real.

Os resultados sugerem que a grande diferença entre as temperaturas de desnaturação dos iniciadores *sense* e *antisense* (mais de 10 graus de diferença) descritos por POGGI *et al.* (1990) para os éxons 8 e 9 (**tabela 3.1**) tenha sido um fator crucial para que estas reações funcionassem satisfatoriamente durante a otimização, apenas com a utilização de pelo menos

o dobro de amostras e reagentes que as demais reações otimizadas neste trabalho. Na descrição original destes pesquisadores, foi utilizado para um volume final de 100 μL por reação (as reações utilizadas no presente trabalho foram para 50 μL), uma quantidade de 1,0 μg de DNA genômico (amostra) e 0,5 μg de cada iniciador, o que corresponde portanto, a, respectivamente, cerca de 10 e 7,5 vezes mais que aquelas otimizadas em boa parte das reações com os iniciadores ora descritos.

Se por um lado, as otimizações realizadas para as regiões codificadoras do DNA genômico do gene da G6PD tenham sido obtidas com uma relativa economia de tempo e reagentes, por outro, a otimização da reação de amplificação para o sequenciamento da região promotora deste gene foi bastante laboriosa e demorada e requereu, dentre outras coisas, estudos com as mais diferentes temperaturas e tempos de desnaturação e extensão, concentrações de cloreto de magnésio e de dimetilsulfóxido. Esta complexidade já era de certo modo esperada, uma vez tratar-se de região muito rica em nucleotídeos C e G.

Apenas utilizando tempos e temperaturas mais elevados para a desnaturação inicial, que de 98°C por 3 min passou a 98°C por 4 min e da desnaturação para os vários ciclos que de 94°C por 1 min passou a 96°C por 1,5 min, de hibridização e extensão que de 1,0 min passaram para 1,5 min é que começaram a ser obtidos os primeiros produtos da PCR. A riqueza em CG provavelmente não permitia que o DNA desnaturasse de forma adequada e por tempo suficiente para que houvesse a hibridização dos iniciadores no local exato para posterior polimerização.

Como as amplificações iniciais ainda davam um fragmento inespecífico de maior tamanho, também foi necessário otimizar as condições de exstringência da reação através de diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (desnaturante químico) e cloreto de magnésio, até que se conseguisse fragmento único obtido com a inclusão simultânea de dimetilsulfóxido a 10% e cloreto de magnésio a partir de 2,5 mM. Sob estas condições houve a necessidade do aumento da quantidade de Taq DNA polimerase para 1,5 U por reação e de iniciadores para 400 nM. Apesar de tudo, os resultados finais demonstraram para cada amostra fragmentos bem condensados no gel de agarose e um sequenciamento sem interferentes, mesmo em tão difícil região.

Das otimizações para as amplificações do cDNA, apenas para a obtenção do fragmento completo do cDNA (região 1 até a região 4) é que houve a necessidade de utilizar-se 2 U de Taq DNA polimerase por reação, e de aumentar-se o tempo de extensão de 1 min para 1,5 min. Estas condições se justificaram muito provavelmente pelo fato de o fragmento em questão ter acima de 1500 pb. As amplificações específicas para cada uma das 4 regiões do cDNA (região 1, região 2, região 3 e região 4) utilizadas como estratégia para o seu sequenciamento não necessitaram do aumento da quantidade de enzima ou do tempo de extensão, uma vez que todos os respectivos fragmentos eram inferiores a 600 pb.

Otimização da SSCP:

Os resultados obtidos para SSCP (dispostos à **tabela 4.5 e figuras 4.34 a 4.38**) revelaram que as condições testadas para esta reação foram capazes

de detectar mudanças no perfil conformacional em todas as amostras com DNA alterado. Além disso, que as variantes fenotípicas Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan que haviam apresentado SSCP normal em todos os fragmentos em todas as temperaturas testadas (**figuras 4.34, 4.36 e 4.38 a 4.41**), realmente não apresentavam quaisquer alterações na sequência em seus DNAs genômicos, como pôde ser comprovado através do sequenciamento completo de todos os éxons codificadores (incluindo regiões de consenso do processamento do RNA mensageiro - início e fim dos íntrons) e região promotora dos seus genes.

Os resultados também demonstraram que a inclusão de quatro temperaturas, ao invés de duas, não aumentou a especificidade ou a sensibilidade da SSCP. Não houve diferenças significativas nos perfis de conformação da SSCP entre as temperaturas de 5, 8, 12 e 15 graus para os fragmentos alterados contidos nos éxons 8 e 11. Para os éxons 4 e 5a, os perfis de conformação na SSCP demonstraram similaridade de conformação entre as temperaturas de 5 e 8 graus e entre as temperaturas de 12 e 15 graus, mas não entre estes dois grupos de temperaturas. Para os fragmentos alterados contidos no éxon 5b, houve similaridade nos perfis de bandamento entre as temperaturas de 5, 8 e 12, mas não de qualquer delas e a temperatura de 15 graus.

Mesmo não sendo detectadas alterações no perfil de conformação das SSCPs entre o controle normal, as amostras deficientes e variantes fenotípicas Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan, para os fragmentos contidos nos éxons 2, 3, 6, 9, 10a e 10b, 12 e 13, a utilização de 4 temperaturas distintas nos assegurou dos

resultados e nos permitiu comparar o perfil de conformação para cada um destes fragmentos entre as temperaturas de 5, 8, 12 e 15 graus, e verificar que, de um modo geral, não há diferenças significativas de conformação entre as temperaturas de 5 e 8 graus nem entre as temperaturas de 12 e 15 graus.

Assim, a princípio, a utilização de 2 temperaturas, em condições bem distintas como as de 5 e 15 graus nos parece um critério seguro e econômico para triagem de mutações no gene da G6PD. Todavia, a utilização de controles positivos em um maior número de fragmentos para o gene da G6PD, utilizando as mesmas condições de SSCP ora testadas poderia assegurar categoricamente esta afirmativa.

Análise de mutações para as amostras de indivíduos deficientes em G6PD

Com o propósito de testar os iniciadores desenvolvidos, utilizamos algumas amostras de portadores de deficiência de G6PD.

As amostras deficientes só apresentaram alterações da SSCP simultaneamente nos éxons 4 e 5 ou isoladamente nos éxons 7 e 8. Não foram encontradas nenhuma alteração nos éxons 7 ou 9 simultaneamente ao éxon 5 que justificassem a necessidade da investigação para as mutações Africana A-680G→T e 968T→C através da RFLP para as enzimas de restrição *Bst*nl e *Nci*l. Todas as amostras com alterações nos éxons 4 e 5 foram investigadas por RFLP através das enzimas *Nla*III e *Fok*I, respectivamente, e confirmaram serem de portadores da mutação Africana G6PD A- 202G→A, 376A→G. Estes dados confirmam os resultados de outros estudos realizados no Brasil

(WEIMER *et al.*, 1993; SAAD *et al.*, 1995; SAAD *et al.*, 1997; COMPRI *et al.*, 2000) onde as mutações Africanas decorrentes das alterações 680G→T e 968T→C associadas a mutação 376A→G, nunca haviam sido reportadas. Apenas em 2002, através da pesquisa de Hamel e Saad e Hamel *et al.* em uma população da amazônia (estado do Pará), é que pela primeira vez foi descrito casos de G6PD A- não decorrentes da mutação 202G→A, 376A→G. Seus dados reportam que 8% dos deficientes com G6PD A- daquela população possuíam a mutação 968T→C, 376A→G (HAMEL & SAAD, 2002; HAMEL *et al.*, 2002).

De modo inesperado, nenhuma das amostras deficientes apresentou qualquer alteração do éxon 6 na SSCP, desfazendo a possibilidade de que alguma delas fosse de algum portador da mutação Mediterrânea 563C→T. Assim, não houve a necessidade de utilizarmos a RFLP com a enzima de restrição *Mbol* para confirmarmos tal mutação. Estes dados estão de acordo com os achados de COMPRI *et al.* (2000). Por não terem encontrado nenhuma variante Mediterrânea na cidade de Bragança Paulista, estes pesquisadores especulavam que do ponto de vista genético-epidemiológico, estes resultados contrariariam a suposição de que estudos moleculares realizados em comunidades pequenas e médias do interior do estado (como o caso de Bragança Paulista) encontrar-se-iam proporções da variante Mediterrânea superiores às encontradas nos grandes centros (como Campinas, por exemplo). Na verdade foi em Campinas, através do estudo de SAAD *et al.*, que foi demonstrado que 2% dos deficientes em G6PD portavam a variante Mediterrânea (SAAD, 1995; SAAD *et al.*, 1997).

Nenhuma das amostras deficientes que havia apresentado alteração para SSCP no éxon 4 deixou de apresentar alteração simultânea no éxon 5 ou apresentou qualquer outra alteração em algum dos demais éxons, nos permitindo afirmar que a mutação 202G→A do éxon 4 esteve completamente associada a mutação 376A→G do éxon 5. De acordo com Beutler *et al.* (1989) a G6PD A- corresponde a um grupo heterogêneo de mutações (202G→A, 680G→T ou 968T→C) que surgiu em alelos que já apresentavam a mutação 376A→G. Apesar de Town *et al.* (1992) afirmarem que a mutação 202G→A isoladamente não ser capaz de promover deficiência da atividade da G6PD, em 2002, Hirono *et al.* descreveram o caso de um paciente com deficiência enzimática e hemólise aguda apenas com a mutação 202G→A, sem a mutação 376A→G (HIRONO *et al.*, 2002).

A variante Africana A- 202G→A, 376A→G, foi, de longe (26/30) a de maior frequência (86,67%) dentre os deficientes estudados e deve, por direito, ser a primeira opção a ser investigada em amostras com deficiência da atividade da G6PD. Por outro lado, a variante Seattle 844G→C, ao invés da variante Mediterrânea 563C→T, foi a responsável pela deficiência de 3 dos 30 pacientes deficientes estudados (10,0%). Apesar de tal variante ter distribuição e frequência bem menos ampla que as variantes Africana A- e Mediterrânea pelo mundo, há relatos em países do sul da Europa (DE VITA *et al.*, 1989; XU *et al.*, 1995; CABRERA *et al.*, 1996; DI MONTEMUROS *et al.*, 1997; MENOUNOS *et al.*, 2000), em Portugal (RODRIGUES *et al.*; 2002), na Espanha (VIVES CORRONS *et al.* 1997), na região africana da Argélia e do

Marocos (NAFA *et al.*, 1994) e no México (MEDINA *et al.*, 1995; VACA *et al.*, 2002). No Brasil, apesar de nunca antes identificada entre deficientes de G6PD no estado de São Paulo, a variante Seattle já pôde ser descrita no região Sul (WEIMER *et al.*, 1993; WEIMER *et al.*, 1998) e na região da amazônia (HAMEL & SAAD, 2002; HAMEL *et al.*, 2002). Assim, nos parece razoável que, para amostras com baixa atividade de G6PD e que não tenham sido caracterizadas inicialmente como mutação Africana A-, seja feita, além da investigação da mutação Mediterrânea, a pesquisa de mutação para a variante Seattle na triagem para deficientes.

Como a amostra de um indivíduo natural da cidade de Barretos - São Paulo apresentara alteração no éxon 7 na SSCP que confirmou-se no sequenciamento como uma mutação nunca antes descrita, a substituição nt660C→G, sugerimos que receba uma denominação própria. Como sua atividade enzimática foi de 64,3%, tal variante se enquadra no exíguo grupo de mutações classe 4, aquelas que apresentam atividade acima de 60%.

Análise dos haplótipos

Os resultados revelaram que dos 64 haplótipos possíveis entre as diferentes possibilidades de combinações dos 6 polimorfismos analisados através das RFLPs intragênicas para: éxon 5, nt 376 A→G, *FokI*; íntron 5, nt 611 C→G, *PvuII*; íntron 8, nt 163 C→T, *BspHI*; éxon 10, nt 116 G→A, *PstI*; éxon 11, nt 1311 C→T, *BclI* e íntron 11, nt 93 T→C, *NlaIII*, apenas 5 foram

encontrados. Isto demonstra um marcante desequilíbrio de ligação entre algumas RFLPs e também algumas mutações e seus haplótipos específicos.

A população controle composta por 32 indivíduos do sexo masculino e de genótipo Gd B+ foi associada aos haplótipos I (- - + + - -), Ia (- - + + - +) e VIIa (- - + + + +) em 81,3%, 6,2% e 12,5%, respectivamente. Estes dados são similares àqueles obtidos por Rodrigues *et al.* (2202) em uma população de Portugal no qual encontrou valores de respectivamente 91,8%, 2,3% e 5,9% para as mesmas combinações de polimorfismos.

As amostras das variantes Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan, ambas de indivíduos caucasianos e de ascendência portuguesa, apresentaram os haplótipos Ia e I, respectivamente. Somado a isso, nossos resultados expostos à **tabela 4.56** demonstram não haver diferenças significativas ($p = 0,102$) na frequência de distribuição dos haplótipos entre as amostras do grupo controle Gd B+ e as amostras das variantes Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan. A avaliação da distribuição do polimorfismo para o sítio de restrição 163 C→T, íntron 8, para a enzima *BspHI* (**tabela 4.57**) demonstrou ser bem distinta entre o grupo de amostras Gd B+ e no grupo de deficientes. Todos estes dados reforçam os resultados obtidos no sequenciamento do DNA genômico que nos revelou serem as variantes Cuiabá e Butantan de genótipo similar ao das amostras GdB+.

A caracterização molecular dos haplótipos para a população de deficientes revelou para todas as variantes africana Gd A- 202G→A, 376A→G o haplótipo VIa (+ + - + - +) demonstrando assim uma completa associação entre os polimorfismos do éxon 5, nt 376 A→G para *FokI*, íntron 5, nt 611 C→G

para *PvuII* e do íntron 11, nt93T→C para *NlaIII* e esta variante. Da mesma forma SAAD *et al.* 1995, também encontrou para variante africana A- uma associação completa entre o haplótipo VIa e estes deficientes. Todas as 3 amostras caracterizadas como variante Seattle apresentaram o haplótipo I. Estes dados estão de acordo com todas as demais publicações da literatura para esta mutação (DE VITA *et al.*, 1989; WEIMER *et al.*, 1993; NAFA *et al.*, 1994; MEDINA *et al.*, 1995; XU *et al.*, 1995; CABRERA *et al.*, 1996; DI MONTEMUROS *et al.*, 1997; VIVES CORRONS *et al.* 1997; WEIMER *et al.*, 1998; MENOUNOS *et al.*, 2000; HAMEL & SAAD, 2002; HAMEL *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2002; VACA *et al.*, 2002).

As duas amostras não deficientes (GdA+) apresentaram o haplótipo IVa. Os dados de SAAD, 1995 e HAMEL & SAAD, 2002 reportam para suas populações de amostras GdA+, além do haplótipo que corresponderia ao IVa de nosso estudo, positividade também para os polimorfismos do íntron 5, nt 611 C→G para *PvuII* e do nt93T→C para *NlaIII*. Tal fato certamente se justifica pela diferença de amostragens entre o nosso e os estudos daqueles pesquisadores, uma vez que encontramos entre os não deficientes escolhidos ao acaso, apenas 2 amostras GdA+, em comparação com as 9 amostras estudadas por HAMEL e as 18 amostras estudadas por SAAD.

A mutação inédita nt660C→G apresentou o haplótipo I, que também esteve associado às variantes Seattle e aos controles normais GdB+.

Análise molecular das variantes Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan

Como a triagem de mutações por SSCP, mesmo em 4 temperaturas distintas não havia detectado qualquer alteração, em nenhum dos segmentos do DNA genômico, diga-se éxons 2 a 13, incluindo o início e o fim da sequência de nucleotídeos de seus respectivos íntrons adjacentes (sítios de processamento), para as variantes Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan, procedeu-se ao sequenciamento completo dos éxons do gene. De modo inesperado, pôde-se então confirmar que a sequência de nucleotídeos exônicos para as duas variantes era realmente normal. Falo isso em função da caracterização bioquímica de tais variantes, que apesar de terem demonstrado atividades enzimáticas normais, apresentaram inequívocos aumentos em seus Km (BARRETTO & NONOYAMA, 1987 e STOCCO DOS SANTOS, BARRETTO *et al.*, 1991), o que sugeriria fatalmente alteração protéica e, por raciocínio lógico, mudança na estrutura do DNA.

É, no mínimo, curioso que, de 52 outras variantes fenotípicas classe 4 (com atividade enzimática normal, acima de 60%), descritas até 1989 (BEUTLER, 1990a), das quais pelo menos 17 com importante elevação em seus Km para G6P ou NADP, apenas uma, a variante A+ (dentre aquelas com Km normal tanto para G6P quanto para NADP), tenha tido confirmada sua alteração bioquímica em nível de DNA. Isto sugere duas possibilidades: 1) que não tenham ainda sido feitas pesquisas moleculares para tais variantes (o que parece pouco provável) ou 2) que muitas das alterações fenotípicas das variantes classe 4 da G6PD, mesmo com elevação em seus Km, podem

realmente não refletir alterações moleculares em nível de regiões codificantes do DNA, como as Gd⁺ Cuiabá e Butantan. Das 131 mutações dentre as classes 1, 2, 3 e 4 listadas por Beutler & Vulliamy até meados de 2002, (BEUTLER & VULLIAMY, 2002), somente 3 são da classe 4: são elas a própria variante Gd A⁺ (376A→G), a variante Gd⁺ São Borja (337G→A) e a variante Gd⁺ Mira d'Aire (1048 G→C), sendo que nenhuma destas duas últimas estavam incluídas dentre as 52 variantes fenotípicas descritas até 1989. Além disso, das demais “novas” variantes moleculares listadas de 2002 até a presente data, Gd Ananindeua, Gd Belém, Gd Crispim, Gd Amazônia (HAMEL *et al.*, 2002), Gd Flores (RODRIGUES *et al.*, 2002), Gd San Luis Potosi (376 A→T), Gd Zacatecas, Gd Veracruz, Gd Yucatan (VACA *et al.*, 2003), Gd Insuli (989 G→A) (SUKUMAR *et al.*, 2003), Gd Suwalki (GRABOWSKA *et al.*, 2004), Gd Utrecht (WIJK *et al.*, 2004), Gd Kambos (DROUSIOTOU *et al.*, 2004), todas a exceção das Gd San Luis Potosi e Insuli possuem baixa atividade da G6PD, portanto, não pertencentes à classe 4. Incluindo a “nova” mutação descrita neste trabalho (nt660C→G), são apenas 6 as variantes que se enquadram molecularmente dentre as G6PD classe 4.

Com os resultados preliminares em nível de DNA codificante, partimos então para o estudo da região promotora das variantes Cuiabá e Butantan, uma vez que mutações em tal segmento do DNA poderiam causar super-expressão protéica da G6PD como uma espécie de forma compensatória para moléculas de menor afinidade pelo seu substrato (K_m elevado). Mais uma vez os resultados para ambas as variantes foi normal. Isto, de certa forma era esperado, uma vez que, mesmo sendo uma região rica em nucleotídeos C e G,

até o momento, nenhuma alteração neste segmento do gene da G6PD havia sido descrita na literatura (MENOUNOS, 2003). As mutações pontuais não são regularmente distribuídas no genoma humano. Os dinucleotídeos "CG" são considerados pontos quentes (hot spots) de mutação uma vez que são mais facilmente metilados. Entretanto, quando se trata de genes que se expressam (metilação = bloqueio da expressão), ou seja, genes constitutivos (que codificam proteínas indispensáveis à vida celular, como o gene da G6PD) as sequências CG das regiões promotoras não são metiladas (ETIENNE, 2002). Talvez por este motivo, nenhuma mutação tenha sido descrita até hoje para esta região do gene da G6PD.

Assim, nos restou avaliar a remota possibilidade de estar havendo alterações durante o processamento do RNA mensageiro, digo, erro de encadeamento (*splicing*) ou rearranjo entre éxons e confirmar definitivamente se a alteração protéica das Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan eram decorrentes de alterações no seu genótipo ou se poderia estar havendo alguma espécie de alteração epigenética, onde a estrutura do gene da G6PD, tanto para o DNA quanto para o RNA fosse normal, mas algum evento pós-tradução pudesse alterar *in vivo* a conformação da proteína (proteoma) e assim justificar a elevação em seus Km.

Para averiguar esta possibilidade de erro no processamento do RNAm (processo de excisão dos íntrons e junção éxons) nas variantes Cuiabá e Butantan, foram utilizados a princípio iniciadores que flanqueavam toda a extensão da região codificadora do RNA. Como os resultados preliminares nos demonstraram que os fragmentos do controle normal e das variantes Cuiabá e

Butantan apresentaram tamanhos aparentemente iguais na amplificação de todo o RNA pela PCR, isto não sugeria a possibilidade de erro de encadeamento, a não ser que a diferença de bases entre os fragmentos do cDNA sintetizado fosse muito pequena e não pudesse ser detectada no gel de agarose a 2%. De qualquer modo, para descartarmos realmente tais possibilidades, foram então utilizados 4 pares de iniciadores, todos em éxons distintos, que pudessem dividir o cDNA em fragmentos da ordem de 500bp, para que o sequenciamento pudesse ser efetuado com resultados confiáveis.

Os resultados do sequenciamento do cDNA para a Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan confirmaram ausência de alteração estrutural, erro no processamento do RNAm ou rearranjo de éxons.

Como as variantes Butantan e Cuiabá têm região promotora e sequência codificante do DNA semelhantes à GdB+, e não apresentam diminuição em suas atividades enzimáticas, mas elevação em seus Km para, respectivamente, substrato e coenzima, e apenas substrato, é provável que a causa de tais elevações seja pós-tradução protéica, talvez de ordem epigenética, e de modo a não alterar significativamente a conformação das suas estruturas espaciais e as suas estabilidades (sítios de acoplamento entre os dímeros). De acordo com sua estrutura terciária, é a integridade dos dímeros e, por conseguinte, da sua interface de contato, a condição essencial para que a molécula de G6PD mantenha sua atividade enzimática (AU *et al.*, 2000). Será interessante que se estude a conformação protéica da G6PD dos portadores das variantes Cuiabá e Butantan, através da sua purificação até o estado homogêneo do sangue periférico dos próprios pacientes, e não de uma

proteína recombinante produzida "in vitro", uma vez que as alterações fenotípicas não parecem estar ligadas à estrutura do gene. Assim, a análise cristalográfica da proteína parece ser o instrumento para avaliar que tipo de alteração estrutural, ou que local, da molécula protéica foi afetado ao ponto de modificar apenas as afinidades para substrato e coenzima, mas não a sua atividade.

Quanto a possível causa de tais alterações estruturais, sabe-se que nos eritrócitos existem proteases às quais se pode imputar um papel na alteração de substratos protéicos da própria célula. Entre as proteases descritas no glóbulo vermelho circulante há as proteases ácidas, ativas entre os pHs 2,8 e 3,9, presentes no citosol e na membrana celular, denominadas proteases I, II e III (PONTREMOLI *et al.*, 1979). Uma protease alcalina multicatalítica de alto peso molecular, denominada macropaína, foi isolada e caracterizada por McGuire e De Martino (1986) e tem sua atividade ótima entre os pHs 7,5 e 11,0. Outra protease que tem sido bem estudada é a calpaína I, existente no citosol e na membrana na forma inativa pro-calpaína, que pode ser ativada por concentrações micromolares de cálcio em pH fisiológico. Além da sua dependência de cálcio, a calpaína I tem um inibidor fisiológico, a calpastatina, com a qual convive em um fino equilíbrio (CROAL & DE MARTINO, 1991). *In vitro* sua ação pode ser observada sobre as proteínas solúveis como a hemoglobina, globina, caseína (PONTREMOLI, 1985; CROAL & DE MARTINO, 1991; MELLONI, 1992; SAIDO *et al.*, 1994). A diminuição da atividade das enzimas eritrocitárias ao longo dos 120 dias de vida média, tem sido ligada à

desnaturação gradual, e pode ser devida teoricamente à ação de proteases que possam reconhecê-las como substrato.

Os resultados referentes a expressão da G6PD através da técnica da PCR em Tempo Real, demonstraram que o portador da Gd+ Butantan expressa, em média 33% a menos de proteína em relação ao controle normal. A expressão da Gd+ Cuiabá foi semelhante àquela obtida na amostra controle. Como a atividade da variante Butantan é de 100% (pela descrição fenotípica de STOCCO DOS SANTOS, BARRETTO *et al.*, 1991), com região promotora normal, há de se pensar que 67% de G6PD seja suficiente para que o eritrócito mantenha sua atividade normal em condições *in vitro*. No entanto, esta diminuição da expressão da enzima talvez possa explicar o encurtamento da vida média dos eritrócitos para 57 dias, observada pelos autores (STOCCO DOS SANTOS, BARRETTO *et al.*, 1991). Este encurtamento é facilmente compensado por discreto aumento da eritropoiese, o que explica a ausência de anemia. Nas condições do sistema reagente utilizado no laboratório para caracterização bioquímica das variantes de G6PD a concentração de glicose-6-fosfato (G6P) é de 600mM. Este excesso de substrato pode pesar favoravelmente ao bom funcionamento da enzima *in vitro*. De acordo com Salvador e Savageau (2003), algumas enzimas excedem em muito a capacidade de fluxo de suas vias metabólicas. A atividade normal da G6PD é bem maior que a quantidade de NADPH que o eritrócito necessita e é regulada pela região à montante da parte estrutural do gene. Segundo estes autores, a regulação da expressão da G6PD sofreu um processo de seleção natural, de modo que valores fisiológicos da enzima nos eritrócitos são mais que suficiente

para manter concentrações de NADPH necessárias para desafios oxidativos (SALVADOR & SAVAGEAU, 2003). Deste modo, independentemente da causa, uma vez que o portador da Gd+ Butantan jamais apresentou qualquer quadro hemolítico, sugere que a produção de 67% de G6PD é satisfatória para impedir maiores danos oxidativos ao eritrócito "in vivo", embora, como já tenha sido dito, tenha possivelmente induzido a um encurtamento da vida média eritrocitária.

Quanto à Gd+ Cuiabá, a indefectível hemólise após infecção e ingestão de ácido acetil salicílico e acetaminofeno ligam-na fortemente ao quadro clínico típico da hemólise nos deficientes de G6PD.

Estrutura da G6PD *versus* mutações:

As mutações da G6PD acarretam variáveis efeitos na atividade da enzima e na ligação ao substrato e à coenzima. A grande maioria delas causa diminuição da estabilidade da proteína e por conseguinte de sua atividade. Isto revela que há muito mais regiões críticas que não-críticas na sua estrutura terciária, o que também justifica o pequeno número das variantes classe 4 (com atividade normal, acima de 60%) em relação às outras classes de mutações.

A avaliação da estrutura espacial de uma proteína acarretada pela mutação, é fundamental, posto que sua conformação terciária depende tanto da localização espacial do aminoácido alterado (não apenas da sua localização linear no gene) quanto do tipo de aminoácido que o substituiu. Assim, para

esclarecer o papel dos diferentes domínios na estabilidade da proteína é sempre importante relacionar estrutura primária versus estrutura terciária.

Algumas vezes, aminoácidos linearmente distantes podem estar conformacionalmente próximos. De acordo com Naylor (1996), apesar de distantes na estrutura primária da G6PD, as mutações 202G→A (resíduo 68) e 376A→G (resíduo 126), responsáveis pela variante GdA-, apresentam-se praticamente juntas na sua estrutura terciária. A descrição espacial da G6PD revela que resíduos distantes na estrutura primária e de diferentes subunidades (sítios) protéicas podem realmente estar envolvidas na mesma região de sensibilidade da interface entre os dímeros (AU *et al.*, 2000).

Por outro lado, algumas outras vezes, quando a localização terciária de um sítio protéico não é tão crítica para a funcionabilidade (diga-se, estabilidade e atividade catalítica) de uma proteína, o tipo de troca de aminoácido se torna até de menor significado. Isto pode ser exemplificado se compararmos a recentemente descrita variante Gd San Luis Potosi (376 A→T e 126Asn→Tyr: resíduo polar neutro→resíduo apolar) (VACA *et al.*, 2003), com a variante polimórfica A+ (376 A→G e 126Asn→Asp: resíduo polar neutro→resíduo polar ácido), ambas com atividade enzimática e estabilidade normais (classe 4), localizadas no éxon 5, que não corresponde a nenhum dos sítios para G6P, NADP e contato entre dímeros. Das cinco variantes classe 4 descritas na literatura, 3 estão localizadas neste éxon, uma região apenas intermediária entre os sítios de ligação para coenzima e substrato.

Na estrutura terciária da G6PD há uma relação espacial importante entre o sítio de ligação à coenzima, ao substrato, com a interface entre os dímeros.

Todos estes resíduos são vitais para a ligação do NADP, e consequentemente a promoção do efeito catalítico sobre o substrato. As regiões de interface entre os dímeros são especialmente importantes para a estabilidade da enzima e sua atividade. De um modo geral, as variantes deficientes menos deletérias (classe 3) em comparação às classe 1 (que causam anemia hemolítica crônica), têm forte tendência a terem seus resíduos alterados nas partes de mais fácil acesso, como nas hélices e alças mais externas da molécula. Apenas uma dentre as variantes classe 3 descritas, a Gd Montalbano (854 G→A, éxon 8, 285 Arg→His) envolve mutação em um resíduo de difícil acesso (mais interno) e que é bem conservado entre as diferentes espécies (NAYLOR, 1996). Talvez, por envolver dois aminoácidos do mesmo grupo e de mesma carga elétrica (a arginina e a histidina são aa polares básicos, carregados positivamente) esta mutação não tenha gerado uma molécula de G6PD mais instável e de maior gravidade para o paciente, como as da classe 1 ou 2.

Em contraste, os resíduos das variantes classe 1, possuem localização e acesso bastante difíceis (são bem mais internas), suas substituições geralmente são por resíduos de aminoácidos de características físico-químicas distintas e geralmente em regiões conservadas entre as espécies. Uma deterioração na interação entre os dímeros é responsável por um grande número de variantes classe 1. Os resíduos conservados entre as diferentes espécies parecem ser vitais para a proteína. Por outro lado, vale reportar que do resíduo 72 ao 166, há apenas 5 resíduos conservados (107, 118, 139, 144 e 149), o que pode sugerir porque mutações na região correspondente ao éxon 5 não levam a deficiências mais severas. A única variante classe 1 descrita no

éxon 5 (Gd Vancouver) possui simultaneamente duas outras alterações, ambas correspondentes a região de interface entre os dímeros, onde em uma há troca de um aminoácido polar altamente negativo (a arginina) por um aminoácido não-polar (triptófano) e na outra a arginina polar negativa é substituída pela cisteína, que é polar neutra.

De acordo com a descrição de sua estrutura espacial, os tipos de alterações de aminoácidos (aa) que mais influenciam a conformação terciária da G6PD são as trocas ou incorporação de resíduos de diferentes tamanhos (p.ex, fenilalanina, com um grande anel aromático pela pequena molécula de cisteína, com um hidrogênio), as substituições entre resíduos de cargas opostas (aa polares ácidos, carregados negativamente por aa polares básicos, carregados positivamente ou vice-versa) e as substituições entre resíduos que levam a perda de carga (aa polares básicos, carregados positivamente por aa polares neutros ou por aa apolares) (AU *et al.*, 2000).

Como a mutação inédita nt660C→G corresponde a uma das regiões próximas a interface entre os dímeros (2ª metade do éxon 6 até 1ª metade do éxon 7), é muito provável que a troca entre dois aminoácidos apolares não-aromáticos semelhantes: isoleucina (ATC) substituída por metionina (ATG), tenha sido um fator decisivo para que ela pudesse manter sua atividade ainda um pouco acima do limite de 60%. Todas as demais mutações descritas no éxon 7 apresentam deficiências enzimáticas moderadas a severas e são decorrentes ou de deleção de aminoácidos ou troca de aminoácidos com grupamentos funcionais e/ou polaridades bem distintos, o que muito provavelmente deva ter contribuído para uma maior modificação na

conformação e estabilidade das suas moléculas. Apesar de relativamente próximo, o resíduo 220 não está incluído exatamente entre aqueles correspondes às interfaces entre os dímeros responsáveis pela grande maioria das variantes classe 1 (que ficam aproximadamente entre os resíduos 229-280 e 380-425), nem exatamente no sítio de acoplamento ao substrato G6P. O resíduo 220 fica em um local posterior às regiões de acoplamento à coenzima NADP (resíduos 38-44), e ao substrato G6P (resíduos 198-205). Ele também não é um daqueles resíduos cujas bases codificantes guarde homologia dentre as diferentes espécies. É certo que estudos bioquímicos, como a determinação dos K_m e da estabilidade *in vitro* desta “nova” variante classe 4 (nt660C→G) podem trazer dados mais elucidativos para o melhor entendimento entre estrutura *versus* mutações da G6PD.

6. CONCLUSÃO

— BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

- As variantes fenotípicas Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan não apresentaram alterações moleculares em seus éxons codificantes, região promotora ou RNA mensageiro, sugerindo que as modificações em suas características bioquímicas (aumento em seus Km) tenham ocorrido após a tradução protéica, sendo provavelmente de ordem epigenética.
- Apesar de terem demonstrado elevação em seus Kms, como suas atividades são normais, é provável que as alterações estruturais sofridas pelas moléculas da Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan não tenham modificado de modo significativo suas estabilidades. Apenas o estudo cristalográfico destas variantes poderá elucidar suas reais alterações conformacionais.
- Os haplótipos apresentados pela Gd+ Cuiabá e Gd+ Butantan foram semelhantes àqueles apresentados pelas amostras do grupo controle GdB+.
- A expressão do RNA da Gd+ Cuiabá foi semelhante àquela do controle GdB+, enquanto que a da Gd+ Butantan foi em torno de 33% mais baixa. Sendo assim, nos sugere que 67% da expressão da G6PD Butantan parece ser suficiente para evitar hemólise *in vivo* e manter a sua atividade *in vitro* em 100%.

- As condições da PCR estabelecidas após otimização diminuíram pelo menos à metade, a quantidade de reagentes e amostra anteriormente utilizadas na literatura.
- Os iniciadores, construídos para as reações de SSCP e sequenciamento do DNA genômico, também se mostraram eficientes nas amplificações para as reações de RFLP e sequenciamento do RNA mensageiro.
- Os iniciadores construídos para as reações de sequenciamento do RNA mensageiro também se mostraram eficazes na determinação da expressão da G6PD pela PCR em Tempo Real.
- Nenhuma amostra que não havia apresentado alteração na SSCP apresentou alteração no sequenciamento do DNA (nenhum falso positivo). Nenhuma das amostras que haviam demonstrado padrão normal de SSCP nas 4 temperaturas testadas apresentaram quaisquer alterações no sequenciamento do DNA genômico (nenhum falso negativo).
- Todas as amostras com SSCP alterada em uma temperatura, demonstraram esta alteração em todas as demais temperaturas. O padrão de conformação entre as temperaturas de 5 e 8 graus e 12 e 15 graus foram similares entre si, assim, a utilização de 2 temperaturas bem distintas (como 5 e 15°C) ao invés de 4 temperaturas não alteraria a especificidade ou sensibilidade do método.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONARAKIS, S.E.; KAZAZIAN Jr, H.H.; ORKIN, S. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. **Hum. Genet.** v.69, p. 1-14, 1985.
- AU, S.W.N.; GOVER, S.; LAM, V.M.S.; & ADAMS M.J. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP⁺ molecule and provides insights into enzyme deficiency. **Structure.** v.8, p.293-303, 2000.
- AU, S.W.N.; NAYLOR, C.E.; GOVER, S.; VANDEPUTTE-RUTTEN, L.; MASON, P.J.; LUZZATTO, L.; LAM, V.M.; ADAMS, M.J. Solution of the structure of tetrameric human glucose-6-phosphate dehydrogenase by molecular replacement. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.** v.55(4), p.826-834, 1999.
- BARONCIANI, L.; TRICIA, F.; BEUTLER, E. G6PD "Campinas": a deficient enzyme with a mutation at the far 3' end of the gene. **Hum.Mutat.** v.2(3), p. 77-78, 1993.
- BARRETTO, O.C.O. & NONOYAMA, K. Gd Cuiabá, a new rare glucose-6-phosphate dehydrogenase variant presents normal activity. **Human Genetics** v.77, p. 201-202, 1987
- BAUTISTA, J.M.; MASON, P.J.; LUZZATTO, L. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase lysine 205 is dispensable for substrate binding but essential for catalysis. **FEBS Letters**, v.366, p. 61-64, 1995.
- BAYNES, J. & DOMINICZAK, M.H. **Bioquímica Médica.** 2ª ed. Manole.566p, 2000.
- BEUTLER, E. Selectivity of proteases as a basis for tissue distribution of enzymes in hereditary deficiencies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.80, p. 3767-3768, 1983.
- BEUTLER, E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: new perspectives. **Blood.** v.73, p. 1397-1401, 1989.
- BEUTLER, E.; KUHL, W.; VIVES-CORRONS, J.-L.; PRCHAL J.T. Molecular heterogeneity of Glucose-6-phosphate dehydrogenase A-. **Blood.** v.74, p. 2550-2555, 1989.
- BEUTLER E. & KUHL W. Linkage between a PvuII restriction fragment length polymorphism and G6PD A-202A/376G: evidence for a single origin of the common G6PD A- mutation. **Hum. Genet.** v.85, p.9-11, 1990.

* De acordo com a norma NBR 6023/89, preconizada pela associação Brasileira de Normas e técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service source Index (CASSI), 1998.

- BEUTLER, E. The genetics of Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Seminars in Hematology**. v.27(2), p. 137-164, 1990a.
- BEUTLER E. Eritrocyte enzyme assays. In **Hematology**. 4 Ed. Eds W.J. Williams, E. Beutler, A.J. Erslev & M.A. Lichtman. New York: McGraw-Hill. pp. 1723-1726, 1990b.
- BEUTLER, E.; LISKER, R.; KUHL, W. Molecular biology of G-6-PD variants. **Biomed.Biochim.Acta**. v.49, p. 236-241, 1990c.
- BEUTLER, E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **New Engl J Med**. v.324, p.169-174, 1991a.
- BEUTLER, E.; KUHL W.; SAENZ G.F.; RODRIGUEZ, W. Mutation analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Costa Rica. **Hum.Genet**. v.87(4), p. 462-464, 1991b.
- BEUTLER, E; PRCHAL, J.T.; WESTWOOD, B; KUHL, W. Definition of the mutants of G6PD Wayne, G6PD Viangchan, G6PD Jammu and G6PD "LeJeune". **Acta Haematol**. v.86, p. 179-184, 1991c.
- BEUTLER, E. Study of glucose-6-phosphate dehydrogenase: history and molecular biology. **Am J Hematol**. v.42(1), p. 53-58, 1993.
- BEUTLER, E. G6PD deficiency. **Blood**. v. 84, p.3613-3636, 1994.
- BEUTLER E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and other enzyme abnormalities. In **Williams Hematology**. 5 Ed. Eds E. Beutler, M.A. Lichtman, B.S. Coller & T.J. Kipps. New York: McGraw-Hill. pp. 564-581, 1995.
- BEUTLER, E. & VULLIAMY, T.J. Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Blood Cells Mol diseases**. v.28(2), p. 93-103, 2002.
- BHADBHADA, M.M.; ADAMS, M.J.; FYNN, T.G.; LEVY, H.R. Sequence identity between a lysine containing peptide from *Leuconostoc mesenteroides* glucose-6-phosphate dehydrogenase and na active site peptide from human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. **FEBS Letters**. v. 211, p. 243-246, 1987.
- CABRERA, V.M.; GONZÁLES, P.; SALO, W.L. Human enzyme polymorphism in the Canary Islands VII. G6PD Seattle in Canarians and North African Berbers. **Hum Hered**. v.46, p. 197-200, 1996.

* De acordo com a norma NBR 6023/89, preconizada pela associação Brasileira de Normas e técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service source Index (CASSI), 1998.

- CAMARDELLA L., CARUSO C., RUTIGLIANO B., ROMANO M., DI PRISCO G. & DECALZI-CANCEDDA F. Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase: identification of a reactive lysyl residue labelled with pyridoxal 5'-phosphate. **Eur.J.Biochem.** v.171, p.485-490, 1988.
- CANCEDDA R.; OGUMMOLA, G.; LUZZATTO, L. Genetic variants of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Discrete conformational states stabilised by NADP⁺ and NADPH. **Eur J Biochem.** v.34, p. 199, 1973.
- CANEPA, L; FERRARIS, AM; MIGLINO, M; GAETANI, GF. Bound and unbound pyridine dinucleotides in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficiente erythrocytes. **Biochem Biophys Acta**, v.1074, p.101-104, 1991.
- CARREL, R.W. Activated oxygen and hemolysis. **Br J Haematol.** v.30, p. 259, 1975.
- CARSON, P.E.; FLANAGAN, C.L.; ICKES, C.E.; ALVING, A.S. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. **Science.** v.124, p. 484-485, 1956.
- CHEN, EY; CHENG, A; LEE, A; KUANG, W.J; & HILLIER, L. Sequence of human glucose-6-phosphate dehydrogenase cloned in plasmids and a yeast artificial chromosome. **Genomics.** v.10, p.792-800, 1991.
- COMPRI, M.B.; SAAD, S.T.O.; RAMALHO, A.S. G-6-PD deficiency in a Brazilian community: an investigation involving epidemiological, genetics and molecular techniques. **Cad.Saúde Pública**, v.16, p.335-342, 2000.
- COOPER, D.N. & YOUSOUFLAN, H. The CpG dinucleotide and human genetic disease. **Human Genetics**, v.78, p. 151-155, 1988.
- CORCORAN, C.M.; CALABRO, V.; TAMAGNINI, G.; TOWN, M.; HAIDAR, B.; VULLIAMY, T.J.; MASON, P.J.; LUZZATTO, L. Molecular heterogeneity underlying the G6PD Mediterranean phenotype. **Hum.Genet.** v.88, p. 688-690, 1992.
- COSGROVE, M.S.; NAYLOR, C.; PALUDAN, S. On the mechanism of the reaction catalyzed by glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Biochemistry.** V.37, p. 2759-2767, 1998.
- CROALL, D. & DE MARTINO, G.N. Calcium-activated neutral protease (calpain) system, structure, function and regulation. **Physiol. Rev.** v.71, n.3, p.813-403, 1991.

* De acordo com a norma NBR 6023/89, preconizada pela associação Brasileira de Normas e técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service source index (CASSI), 1998.

- DACIE J. V. & LEWIS, S. M. Basic Haematological Techniques, In: **Practical Haematology**. New York: Churchill Livingstone. 6.ed. 1984, p.453.
- DACIE J. V. & LEWIS, S. M. Basic Haematological Techniques, In: **Practical Haematology**. New York: Churchill Livingstone. 8.ed. 1995, p.609.
- DE FLORA, A; MORELLI, A; BENATTI, U; GIULIANO, F; MOLINARI, MP. Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. Interaction with oxidized and reduced coenzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.60, p.999-1004, 1974a.
- DE FLORA, A; MORELLI, A; GIULIANO, F. Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. Content of bound coenzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.59, p.406-409, 1974b.
- DE FLORA, A.; MORELLI, A.; GRASSO, M.; FORTELEONI, G.; MELONI, T. Alterations of red blood cell proteolysis in favism. **Biomed Biochim Acta**, v. 46(2-3), S.184-189, 1987.
- DE VITA, G.; ALCALAY, M.; SAMPIETRO M.; CAPPELLINI, M.D.; FIORELLI, G.; TONIOLO, D. Two point mutations are responsible for G6PD polymorphism in Sardinia. **Am J Hum Genet.** v.44, p. 233-240, 1989.
- DI MONTEMUROS, F.M; DOTTI, C; TAVAZZI, D; FIORELLI, G; CAPPANELLINI, D. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Italy. **Haematologica.** v. 82, p. 440-446, 1997.
- DI MONTEMUROS, F.M; CAPPANELLINI, M.D.; DOTTI, C.; DEBERNARDI, S.; FIORELLI, G. Molecular CHARACTERIZATION OF NA Italian G6PD variant responsible for chronic non-spherocytic haemolytic anaemia. **Clin Genet.** v.46, p. 357-359, 1994.
- DROUSIOTOU, A.; TOUMA, E.H.; ANDREOU, N.; LOISELET, J.; ANGASTINIOTIS, M.; VERRELLI, B.C.; TISHKOFF, S.A. Molecular characterization of G6PD deficiency in Cyprus. **Blood Cells Mol Diseases.** v.33(1), p. 25-30, 2004.
- ETIENNE, J. Mutações e reparo do DNA. In **Bioquímica, Genética e Biologia Molecular**. 5 Ed. São Paulo. Santos Livraria Editora. Cap 8, pp. 206-224, 2002.
- FERREIRA, R.I.P. & LEITE, A.A. Polimorfismo genético da glicose-6-fosfato desidrogenase na população da região de araraquara-SP. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho". 76p., 2004.

* De acordo com a norma NBR 6023/89, preconizada pela associação Brasileira de Normas e técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service source index (CASSI), 1998.

- FIGURELLI, G.; DI MONTEMUROS, F.M.; CAPPELLINI, M.D. Chronic non-spherocytic haemolytic disorders associated with glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. **Baillière's Clinical Haematology**. v.13(1), p.39-55, 2000.
- FORBES, J.; & VAN HEERDEN R. Agarose gel electrophoresis of Glucose-6-phosphate-dehydrogenase isoenzymes. **Clin.Chim.Acta**. v.199, p. 279-282, 1991.
- FRANCO, M.H.L.P.; WEIMER, T.A.; SALZANO, F.M. Blood polymorphism and racial admixture in two Brazilian populations. **Am.J.Phys.Anthrop**. v.58, p. 127-132, 1982.
- GAETANI G., GALIANO S., CANEPA L., FERRARIS A.M. & KIRKMAN H.N. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood**. v.73, p.334-339, 1989.
- GELPI, A.P. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Saudi Arabi: A Survey. **Blood**. v.25, p. 486-493, 1965.
- GRABOWSKA, D; JABLONSKA-SKWIECINSKA, E; PLOCHOCKA, D; CHELSTOWSKA, A; LEWANDOWSKA, I; WITOS, I; MAJEWSKA, Z; ROKICKA-MILEWSKA, R; BURZYNSKA, B. A novel mutation in the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene in a subject with cronic nonspherocytic hemolitic anemia-characterization of enzyme using yeast expression system and molecular modeling. **Blood Cells Molecules & Diseases**. v.32, p.124-130, 2004.
- HAMEL, A.R. & SAAD, S.T.O. Heterogeneidade molecular no gene da glicose-6-fosfato desidrogenase em uma população da amazônia brasileira. **Tese de Doutorado**. Instituto de Biologia, Universidade estadual de Campinas. 93p., 2002.
- HAMEL, A.R; CABRAL, I.R.; SALES, T.S. I.; COSTA, F.F.; SAAD, S.T.O. Molecular Heterogeneity of G6PD deficiency in na amazonian population and description of four new variants. **Blood Cells Mol Diseases**. v. 28(3), p. 399-406, 2002.
- HELLER, P; BEST, W.R; NELSON, R.B; BECKTEL, J. Clinical implications of sickle-cell trait and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in hospitalized black male patients. **New Engl J Med**. v.300, p.1001, 1979.
- HIRONO, A.; FUJII, H.; MIWA, S. Identification of two novel deletion mutations in glucose-6-phosphate dehydrogenase gene causing hemolytic anemia. **Blood**. v.85, p. 1118-1121, 1995.

* De acordo com a norma NBR 6023/89, preconizada pela associação Brasileira de Normas e técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service source Index (CASSI), 1998.

- HIRONO, A.; FUJII, H.; SHIMA, M.; MIWA, S. G6PD Nara: a new class 1 Glucose-6-phosphate dehydrogenase variant with an eight amino acid deletion. **Blood**. v.82, p. 3250-3252, 1993.
- HIRONO A.; KUHL W.; GELBART T.; FORMAN L.; FAIRBANKS V.F. & BEUTLER E. Identification of the binding domain for NADP⁺ of human glucose-6-phosphate dehydrogenase by sequence analysis of mutants. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, v. 86, p.10015-10017, 1989.
- HIRONO, A; & BEUTLER, E. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-). **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**. v.85, p.3951-3954, 1988.
- HIRONO, A.; KAWATE, K.; HONDA, A.; FUJII, H.; MIWA, S. A single mutation 202G→A in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene (G6PD) can cause acute hemolysis by itself. **Blood**, v.99(4), p. 1498-1499, 2002.
- 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.** v.50, p. 394-398, 1992.
- KIRKMAN H.N. & HENDRICKSON E.M. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. II. Subactive states of the enzyme from normal persons. **J.Biol.Chem.** v. 237, p.2371-2376, 1962.
- KURDI-HAIDAR, B.; MASON, P.J.; BERREBI, A.; ANKRA-BADU, G.; AL-ALI, A.; OPPENHEIM, A.; LUZZATTO, L. Origin and spread of the Glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD-Mediterranean) in the Middle East. **Am.J.Hum.Genet.** v.47, p. 1013-1019, 1990.
- LONGO, L.; ROSTI, V.; GABOLI, M.; TABARINI, D.; PANDOLFI, P.P.; LUZZATTO, L. (1997) Mice heterozygous for complete glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency are viable and show somatic cell selection. **Blood** v.90(suppl. 1), 408a.
- LUKENS, J.N. Deficiência de glicose 6 fosfato desidrogenase e deficiências relacionadas que envolvem a via da pentose fosfato e metabolismo da glutatona in **Wintrobe: Hematologia Clínica**. Ed Manole LTDA. 1ª Ed Brasileira, 1998. pág: 1101-1119.
- LUX, S.E. Defeitos hereditários da membrana ou metabolismo das hemácias. In: WINGARDEN, J.B.; SMITH, J.R; BENNET, J.C. (Eds). **Cecil- Tratado de Medicina Interna**. 19ª .ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.1, cap.134, p. 875-883, 1993.

* De acordo com a norma NBR 6023/89, preconizada pela associação Brasileira de Normas e técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service source Index (CASSI), 1998.

- LUZZATTO L. & MEHTA A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In **The metabolic basis of inherited disease**. Eds D.S. Seidman, J. Becktel, R.W. Snow & D. Valle. New York: Mc Graw-Hill. pp. 3367-3397, 1995.
- LUZZATTO, L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and the pentose phosphate pathway. In **Blood: Principles and practice of hematology**. 1 Ed. Eds R.I. Handin, S.E. Lux & T.P. Stossel. Philadelphia: J.B. Lippincott Company. pp. 1897-1923, 1995.
- LUZZATTO, L & BATISTUZZI, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, in: **Advances in Human Genetics**, Eds H. Harris & K. Hirschhorn, New York: Plenum. pp. 217-329, 1985.
- McGUIRE, M.J. & DE MARTINO, G.N. Purification and characterization of a high molecular weight proteinase (macropain) from human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.873, p. 279-289, 1986.
- MANIATIS T., FRITSH E.F. & SAMBROOK J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Spring Harbor, 1982.
- MARTINI, G; TONIOLO, D; VULLIAMY, T; LUZZATO, L; DONO, R; D'URSO, M; PERSICO, MG. Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose-6-phosphate dehydrogenase. **EMBO J.** v.5, p. 1849-1855, 1986.
- MASON, P.J. New insights into G6PD deficiency. **British J Haematol.** v.94, p. 585-591, 1996.
- MEDINA M.D., VACA G., LOPEZ-GUIDO B., WESTWOOD B. & BEUTLER E. Molecular genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Mexico. **Blood Cells Mol.Dis.** v.23, p. 88-94, 1997.
- MEDINA M.D.; VACA G.; ESPARZA, A.; WESTWOOD B.; BEUTLER, E. Molecular heterogeneity of G6PD deficiency in Mexico. **Archives of Medical Research.** v.26, p. 111-113, 1995.
- MELLONI, E.; SALAMINO, F.; SPARATORE, B. The calpain-calpastatin system in mammalian cells: properties and possible functions. **Biochimie**, v.74, p. 217-223, 1992.
- MEHTA, A; MASON, P.J; VULLIAMY, T.J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Baillière's Clinical Haematology.** v.13(1), p.21-38, 2000.

* De acordo com a norma NBR 6023/89, preconizada pela associação Brasileira de Normas e técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service source Index (CASSI), 1998.

- MENOUNOS, P.G.; ZERVAS, C.; GARINIS, G.A.; DOUKAS, C.; KOLOKITHOPOULOS, D.; TEGOS, C.; PATRINOS, G.P. Molecular Heterogeneity of the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Hellenic Population. *Hum Hered.* v.50, p. 237-241, 2000.
- MENOUNOS, P.G.; GARINIS, G.A.; PATRINOS, G.P. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency does not result from mutations in the promoter region of the G6PD gene. *Journal Clinical Lab Analysis.* v.17, p. 90-92, 2003.
- MESBAH-NAMIN, S.A.; SANATI, M.H.; MOWJOODI, A.; MASON, P.J.; VULLIAMY, T.J.; NOORI-DALOTI, R. Three major glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient polymorphic variants identified in Mazandaran state of Iran. *British J. Haematol.* v. 117, p. 763-764, 2002.
- MORELLI, A.; BENATTI, U.; GUILIANO, F.; DE FLORA, A. Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. Evidence for competitive binding of NADP and NADPH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.70, p.600-604, 1976.
- MORELLI, A.; GRASSO, M.; MELONI, T.; FORTELEONI, G.; ZOCCHI, E.; DE FLORA, A. Favism: impairment of proteolytic systems in red blood cells. *Blood*, v.69, p. 1753-1758, 1987.
- NAFA, K.; REGHIS, A.; OSMANI, N.; AIT-ABBES, H.; BENABADJI, M.; KAPLAN, J.C.; VULLIAMY, T.; LUZZATTO, L. At least five polymorphic mutants account for the prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Algeria. *Hum Genet.* v.94, p. 513-517, 1994.
- NAYLOR, C.E.; ROWLAND, P.; BASAK, A.K.; GOVER, S. MASON, P.J.; BAUTISTA, J.M.; VULLIAMY, T.J.; LUZZATTO, L.; ADAMS, M.J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations causing enzyme deficiency in a model of the tertiary structure of the human enzyme. *Blood.* v.87(7), p. 2974-2982, 1996.
- NOTARO, R.; AFOLAYAN, A.; LUZZATTO L. Human mutations in glucose 6-phosphate dehydrogenase reflect evolutionary history. *The FASEB Journal.* v.14, p. 485-494, 2000.
- ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, K.; SEKIYA, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci.* v.86, p. 2766-2770, 1989.

* De acordo com a norma NBR 6023/89, preconizada pela associação Brasileira de Normas e técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service source Index (CASSI), 1998.

- PERSICO, M; VIGLIETTO, G; MARTINI, G; TONIOLO, D; PAONESSA, G; MOSCATELLI, C; DONO, R; VULLIAMY, T; LUZZATTO, L; D'URSO M. Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA cloning: primers structure of the protein and unusual 5' non-coding region. **Nucleic Acids Res.** v.14, p.2511-2522, 1986.
- POGGI, V; TOWN, M; FOULKES, N.S.; LUZZATTO, L. Identification of a single base in a new human mutant glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by polymerase chain reaction amplification of the entire coding region genomic DNA. **Biochem J**, v.271, p. 157-160, 1990.
- PONTREMOLI, S.; SALAMINO, F.; SPARATORI, B.; MELLONI, E.; MORELLI, A.; BENATTI, U.; DE FLORA, A. Isolation and partial characterization of three acidic proteinases in erythrocyte membranes. **Biochem. Journal**, v. 181, p. 559-568, 1979.
- PONTREMOLI, S.; MELLONI, E.; SPARATORI, B.; SALAMINO, F.; MICHETTI, M.; SACCO, O.; HORECKER, B.L. Biding to erythrocyte membrane is the physiological mechanism for activation of Ca^{2+} -dependent neutral proteinase. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v.128, p.331-338, 1985.
- RODRIGUES, M-O; FREIRE, A.P; MARTINS, G; PEREIRA, J, MARTINS, M-C; MONTEIRO, C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Portugal: Biochemical and mutational profiles, heterogeneity, and haplotype association. **Blood Cells Molecules and Diseases**. v.28(2), p. 249-259, 2002.
- ROWLAND, P.; BASAK, A.K.; GOVER, S.; LEVY, H.R.; ADAMS, M.J. The three-dimensional structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2,0 Å. **Structure**. v.2, p. 1073-1087, 1994.
- SAAD, S.T.O. Haplótipos do gene da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e aspectos moleculares da deficiência de G6PD em populações brasileiras. **Tese de Livre Docência**. Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP. 85p., 1995.
- SAAD, S.T.O., SALLES, T.S.I.; ARRUDA, V.R.; SONATI M.F; COSTA F.F. G6PD Sumaré: A novel mutation in the G6PD gene (1297 T→G) associated with chronic nonspherocytic anemia. **Hum. Mutat.** v.10, p.245-247, 1997.
- SAAD, S.T.O.; SALLES, T.S.I.; CARVALHO, M.H.; COSTA, F.F. Molecular Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency in blood donors from Brazil. **Hum Hered.** v.47, p: 17-21, 1997.

* De acordo com a norma NBR 6023/89, preconizada pela associação Brasileira de Normas e técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service source Index (CASSI), 1998.

- SAIDO, T.C.; SORIMACHI, H.; SUZUKI, K. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. **FASEB J.** v.8, p.814-822, 1994.
- SALATI, L.M. & AMIR-AHMADY, B. Dietary regulation of expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Annu. Rev. Nutr.**, v.21, p. 121-140, 2001.
- SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin Chem.** v.44(8), p. 1748-50, 1998.
- SALVADOR, A. & SAVAGEAU, M.A. Quantitative evolutionary design of glucose-6-phosphate dehydrogenase expression in human erythrocytes. **PNAS.** v.100, p.14463-14468, 2003.
- SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Spring Harbor (WI), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 342p.
- STOCCO DOS SANTOS, R.C.; BARRETTO, O.C.O.; NONOYAMA, K.; CASTRO, N.H.C.; FERRAZ, O.P.; WALTER-MOURA, J. X-linked syndrome: Mental retardation, hip luxation and G6PD variant [Gd(+) Butantan]. **Am J Med Genet**, v.39, p. 133-136, 1991
- SUKUMAR, S.; MUKHERJEE, M.B.; COLAH, R.B.; MOHANTY, D. Molecular characterization of G6PD Insuli - a novel 989 CGC→CAC (330 Arg→His) mutation in the Indian population. **Blood Cells Mol Diseases.** v.30(3), p. 246-247, 2003.
- TAKIZAWA, T.; YONEYAMA, Y.; MIWA, S.; YOSHIDA, A. A single nucleotide base transitiion is the basis of the common human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (A+). **Genomics.** v.1, p. 228-231, 1987.
- TAKIZAWA, T; HUANG, I.-Y; IKUTA, T; YOSHIDA, A. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: Primary structure and cDNA cloning. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.** v.83, p.4157-4161, 1986.
- THOMPSON, M.W.; McINNESS, R.R.; WILLARD, H.F. – **Thompson & Thompson. Genética Médica.** Guanabara Koogan, 5^a ed, 339pp, 1993.
- TONIOLO, D.; PERSICO, M.; ALCALAY, M. A "housekeeping" gene on the X chromosome encodes a protein similar to ubiquitin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.85, p. 851-855, 1988.

* De acordo com a norma NBR 6023/89, preconizada pela associação Brasileira de Normas e técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service source Index (CASSI), 1998.

- 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 (3): 171-174, 1992.
- URSINI, M.V.; SCALERA, L.; MARTINI, G. High levels of transcriptions driven by a 400 bp segment of the human G6PD promoter. **Biochem Biophys Res Commun**. v.170, p. 1203-1214, 1990.
- VACA, G.; ARÁMBULA, E.; ESPARZA, A. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Mexico: Overall results of 7-year project. **Blood Cells Mol Diseases**. v.28(3), p. 436-444, 2002.
- VACA, G.; ARÁMBULA, E.; MONSALVO, A.; Medina, C.; Nunez, C.; SANDOVAL, L.; LOPEZ-GUIDO, B. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Mexico: for new G-6-PD variants. **Blood Cells Mol Diseases**. v.31(1), p. 112-120, 2003.
- VIVES CORRONS, J.L.; ZARZA, R.; AYMERICH, J.M.; BOIXADERA, J.; CARRERA, A.; COLOMER, D.; CORBELLÀ, M.; CASTRO, M.; CRESPO, J.M.; DEL ARCO, A. et al. Análises molecular del déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) en Espanha. **Sangre**. v.42, p. 391-398, 1997.
- VULLIAMY, T.J.; D'URSO, M.; BATTISTUZZI, G.; ESTRADA, M.; FOULKES N.S.; MARTINI, G.; CALABRO, V.; POGGI, V.; GIORDANO, R.; TOWN, M.; LUZZATTO, L.; PERSICO, M.G. Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**. v.85, p. 5171-5175, 1988.
- 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. USA**. v.88, p. 8568-8571, 1991.
- VULLIAMY, T.; LUZZATTO, L.; HIRONO, A.; BEUTLER, E. Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Blood Cells Mol.Dis**. v.23, p.302-313, 1997.
- WEIMER, T.A.; SALZANO, F.M.; WESTWOOD, B.; BEUTLER, E. Molecular characterization of glucose-6-phosphate-dehydrogenase variants from Brazil. **Hum.Biol**.v. 66, p. 41-47, 1993.

* De acordo com a norma NBR 6023/89, preconizada pela associação Brasileira de Normas e técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service source Index (CASSI), 1998.

- 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.** v.48(2), p. 92-96, 1998.
- WELCH, S.G.; LEE, J.; MCGREGOR, I.A.; WILLIAMS, K. Red cell glucose 6 phosphate dehydrogenase genotypes of the population of two west African villages. **Hum.Genet.** v.43, p. 315, 1978.
- WHO Scientific Group. Standardization of procedures of the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **WHO Tech Rep Ser**, v.366, p.1-53, 1967.
- WHO WORKING GROUP; BEUTLER, E.; GAETANI, G.; KALOUSTIAN, V.; LUZZATTO, L.; NIWA, S.; PANNICH, V.; SODEINDE, O.; BELSEY, M.; KULIEV, A.M.; MODELL, B.; SHAH, P.M. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Bull. WHO.** v. 67, p. 601-611, 1989.
- WIJK, R.; HUIZINGA, E.G.; PRINS, I.; KORS, A; RIJKSEN, G.; BIERINGS, M.; SOLINGE, W.W. Distinct phenotypic expression of two de novo missense mutations affeting the dimer interface of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Blood Cells Mol Diseseases.** v.32, p. 112-117, 2004.
- WRIGLEY, NG; HEATER, JV; BONSIGNORE, A; DE FLORA, A. Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase: Electron microscope studies on structure and interconversion of tetramers, dimers and monomers. **J. Mol. Biol.** v. 68, p483-489, 1972.
- XU, W.; WESTWOOD, B.; BARTSOCAS, C.S.; MALCORRA-AZPIAZU, J.J.; INDRÁK, K.; BEUTLER, E. Glucose-6 phosphate dehydrogenase mutations and haplotypes in various ethnic groups. **Blood.** v. 85, p. 257-263, 1995.
- YOSHIDA A. & BEUTLER E. G-6-PD variants: another up-date. **Ann.Hum.Genet.** v.47, p. 25-38, 1983.
- YOSHIDA, A. A single amino acid substitution (asparagine to aspartic acid) between normal (B+) and the common negro variant (A+) of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.57, p. 835-839, 1967.
- YOSHIDA, A. Hemolytic anemia and G6PD deficiency. **Science.** v.179, p. 532, 1973.
- YOSHIDA, A; BEUTLER, E; MOTULSKY, A.G. **Bulletin of the World Health Organization.** v.45, p. 243-253, 1971.

* De acordo com a norma NBR 6023/89, preconizada pela associação Brasileira de Normas e técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service source Index (CASSI), 1998.