

BC/37233

IB/80783



UNICAMP

Mariane Bernadete Compri

**“GENÉTICA COMUNITÁRIA E DEFICIÊNCIA
DE DESIDROGENASE DE 6-FOSFATO
DE GLICOSE (G-6-PD):
ESTUDO DE UMA COMUNIDADE BRASILEIRA
(BRAGANÇA PAULISTA, SP) ABORDADA
A PARTIR DOS DOADORES DE SANGUE.”**

Mariane Bernadete Compri

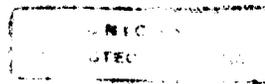
**“GENÉTICA COMUNITÁRIA E DEFICIÊNCIA DE
DESIDROGENASE DE 6 - FOSFATO DE GLICOSE (G-6-PD):
ESTUDO DE UMA COMUNIDADE BRASILEIRA (BRAGANÇA
PAULISTA, SP) ABORDADA A PARTIR DOS DOADORES DE
SANGUE.”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Mariane Bernadete Compri
Aprovada para a Comissão Julgadora.
15/12/98

Orientador : Antônio Sérgio Ramalho

Co-orientadora : Sara T. O. Saad

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Genética.



UNID.:	IB
N.º C.:	
V.:	
T.º V.º B.º:	37.233
DATA:	22/9/99
P.º:	01x
PREÇO:	R\$ 11,00
DATA:	07/04/99
N.º C.º:	400.28.83.4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

C738g Compri, Mariane Bernadete
Genética comunitária e deficiência de desidrogenase de 6- Fosfato de glicose (G-6-PD) : estudo de uma comunidade brasileira (Bragança Paulista, SP) abordada a partir dos doadores de sangue / Mariane Bernadete Compri. -- Campinas, SP : [s.n.], 1998.

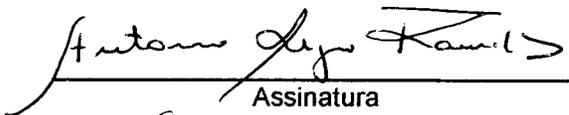
Orientadores : Antônio Sérgio Ramalho, Sara Terezinha Olalla Saad.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia.

1. Glicosefosfato desidrogenase. 2. Farmacogenética. 3. Saúde pública. 4. Aconselhamento genético. 5. Genética molecular. I. Ramalho, Antônio Sérgio. II. Saad, Sara Terezinha Olalla. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Local e Data: Campinas, 15 de dezembro de 1998.

Banca Examinadora:

Titulares :

- Prof.Dr. Antônio Sérgio Ramalho (Orientador) 
Assinatura
- Prof. Dr. Sérgio Marangoni 
Assinatura
- Prof.a. Dra. Cristine Hackel 
Assinatura
- Prof.a. Dra. Andréa Trevas Maciel - Guerra 
Assinatura
- Prof.a. Dra. Denise Pontes Cavalcanti 
Assinatura

Suplentes:

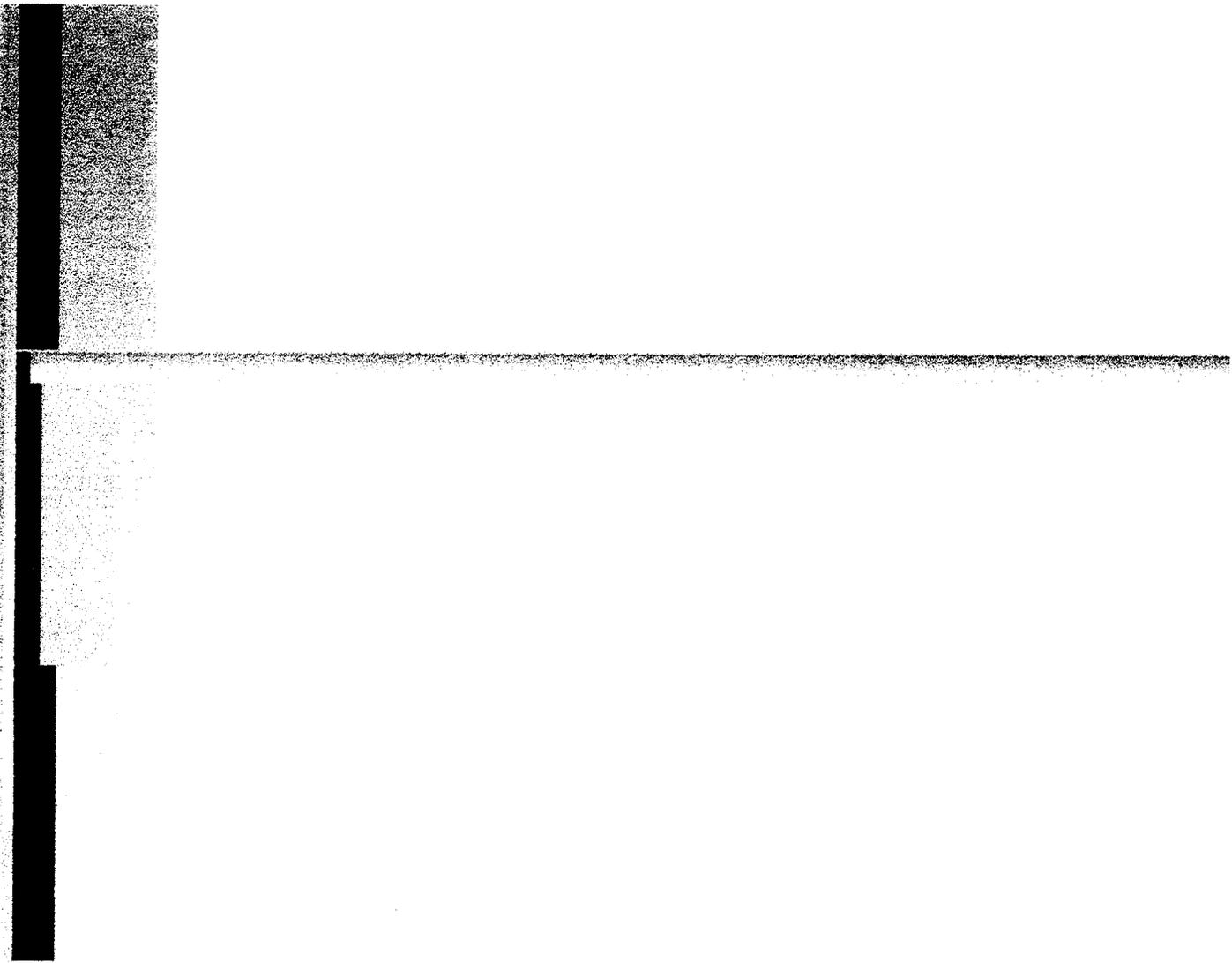
- Prof.a. Dra. Antônia Paula Marques de Faria _____
Assinatura
- Prof. Dr. Luís Alberto Magna _____
Assinatura



*Criança do semblante puro e dos olhos sonhadores de
maravilhas!*

*Teu sorriso adorável certamente evocará
O dom do amor de um conto de fadas.*

*Ao meu filho
GABRIEL....*



*Ao Prof. Dr. Antônio Sérgio Ramalho, meu
agradecimento especial...*

*“Trabalhar pelo que se ama, amar aquilo em que se
trabalha”
(Leon Tolstói)*

Agradecimentos

À Universidade São Francisco, pelo estímulo , confiança e interesse no desenvolvimento deste trabalho.

Ao HEMOCENTRO da UNICAMP, na pessoa de sua Coordenadora, Profa. Sara Terezinha O. Saad, co-orientadora deste trabalho, pelo apoio clínico e laboratorial na implantação do Programa de Deficiência de G-6-PD em Bragança Paulista.

Ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Martin Nardy, Diretor da Faculdade de Ciências Médicas da USF, pelo apoio e estímulo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Newton Carlos Polimeno, por sua colaboração, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho.

À Tereza S. I. Salles, por seu apoio técnico e amizade.

À Profa. Maria Julia Acedo Vieira pela valiosa colaboração técnica prestada.

Aos Professores Dr.Sérgio Marangoni , Profa. Dra. Cristine Hackel, Dra. Andréia Trevas Maciel-Guerra, Dra. Denise Cavalcanti pela análise prévia deste trabalho e sugestões apresentadas.

Aos funcionários e colegas do HEMOCENTRO da UNICAMP e do Núcleo dos Laboratórios Multiunidade CBC da USF, pelo apoio e colaboração prestados.

Ao Sr. Carlos Alberto Moysés, por sua contribuição neste trabalho.

A todos os que, embora não nomeados, colaboraram para a realização deste trabalho, a certeza da minha gratidão.

ÍNDICE

	Pág.
I – Introdução	
I.1 - O conceito de Genética Comunitária.....	01
I.2 - A comunidade de Bragança Paulista.....	03
I.3 - A desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6-PD).....	06
I.4 - A deficiência de G-6-PD.....	11
I.5 - A manutenção do polimorfismo da deficiência de G-6-PD.....	16
I.6 - A deficiência de G-6-PD no Brasil.....	19
II - Objetivos.....	25
III - Casuística e Métodos.....	26
III.1 - Fase I : Triagem populacional, comprovação diagnóstica, orientação, avaliação genética e estudo da fertilidade das heterozigotas.....	27
III.2 - Fase II : Caracterização molecular da mutações.....	31
III.3 - Indicadores utilizados para avaliar o programa comunitário.....	38
IV - Resultados	
Fase I - Triagem populacional, comprovação diagnóstica, orientação, avaliação genética e estudo da fertilidade das heterozigotas.....	40
Fase II - Caracterização molecular das mutações.....	47
V - Discussão.....	49
VI - Conclusões.....	72
VII - Summary.....	74
VII - Referências bibliográficas.....	75
VIII - Anexos.....	83

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Composição étnica de Bragança Paulista em 1836 (Adaptado de Martins e Laurito, 1944).....	04
Tabela 2 - Fármacos associados á hemólise significativa em deficientes de G-6-PD (Luzzato e Metha, 1995).....	15
Tabela 3 - Opinião dos doadores sobre a utilidade da orientação genética fornecida.....	44
Tabela 4 - Número médio de filhos calculado a partir de mães de doadores deficientes e de mães de doadores normais.....	45
Tabela 5 - Tamanho da prole das heterozigotas e controles.....	45
Tabela 6 - Frequência relativa de diversos grupos estrangeiros registrados em Capivari, SP, no Estado de São Paulo e no Brasil durante o censo de 1950 (Saldanha, 1968).....	63
Tabela 7 - Número de nascimentos, nacionalidade e/ou naturalidade dos pais registrados em Bragança Paulista, SP, em 1901.....	67
Tabela 8 - Número e nacionalidade de estrangeiros registrados em Bragança Paulista, SP, durante o censo de 1903 (Junior <i>et al.</i> , 1904).....	67

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Localização do gene da G-6-PD : Xq28.....	07
Figura 2 - Glutatião na sua forma reduzida.....	11
Figura 3 - Esquema da eletroforese de G-6-PD. Representação de um indivíduo normal Gd ⁺ B, de um deficiente de G-6-PD A ⁻ , de um indivíduo com a variante A ⁺ e de uma heterozigota AB	30
Figura 4 - As regiões amplificadas, exons 3 e 4 com os iniciadores utilizados n + P4, exons 6 e 7 com os iniciadores B+J e o exon 9 com os iniciadores D+R (adaptado de Poggi <i>et al.</i> , 1990).....	34
Figura 5 - Produtos de PCR amplificados com iniciadores n e P4 (exons 3 e 4) com fragmento de 320 pb.....	35
Figura 6 - Produto de PCR amplificado com iniciadores B e J (exons 6 e 7) com fragmento de 542 pb.....	35
Figura 7 - Produtos de PCR amplificados com iniciadores D e R (exon 9) com fragmento de 253 pb.....	36
Figura 8 - Produtos digeridos com a enzima Nla III apresentando fragmentos de 213 e 97 pb.	48
Figura 9 - SSCP do exon 9.....	48

RESUMO

A Genética Comunitária é uma nova disciplina, situada na interface entre a medicina, a genética e a comunidade. A presente tese teve por objetivo estudar a deficiência de Desidrogenase de 6-Fosfato de glicose (G-6-PD) em uma comunidade do interior do Estado de São Paulo (Bragança Paulista), de acordo com os critérios científicos e pragmáticos da Genética Comunitária, compreendendo os aspectos genético-epidemiológicos, moleculares, demográficos, sociais, éticos e culturais.

Em um período de 36 meses foram triados 4.621 doadores de sangue do sexo masculino no Núcleo de Hematologia e Hemoterapia de Bragança Paulista, detectando-se 80 deficientes da G-6-PD, cujo diagnóstico foi confirmado pela quantificação enzimática e pela eletroforese da enzima. O índice de positividade na amostra foi de 1,7%, a taxa de aceitação à orientação genética atingiu 61% e o nível de assimilação dos deficientes quanto às informações fornecidas foi de 81%.

Tendo em vista a existência na literatura de evidências indiretas de aumento de fertilidade das heterozigotas do gene da deficiência de G-6-PD em áreas malarígenas, este aspecto foi investigado de forma direta no presente trabalho, em uma região não malarígena. Não foi observada, no entanto, diferença significativa entre a média de filhos das heterozigotas, quando comparada à de um grupo controle da mesma faixa etária e nível sócio-econômico e cultural ($p=0,176$).

A análise molecular foi realizada em 70 deficientes de G-6-PD não consangüíneos, através da amplificação de DNA por PCR seguida de digestão por enzimas de restrição e análise de polimorfismo de conformação em hélice simples (SSCP). Em 98,6% dos deficientes foi identificada a mutação G-6-PD A⁻ (202 G → A), por digestão do exon 4 com Nla III. Verificou-se a presença de uma mutação mais rara no exon 9, por SSCP. Não foi constatado nenhum caso de variante Mediterrânea de G-6-PD. Tais resultados permitiram algumas informações a respeito da deficiência de G-6-PD na comunidade, ou seja, a variante A⁻, quase que exclusiva, foi introduzida na comunidade não apenas pelos negróides, mas também por imigrantes europeus, sobretudo espanhóis, portugueses e italianos; a contribuição italiana em termos da variante Mediterrânea de G-6-PD foi menor que a contribuição em termos de talassemia beta.

O custo de implantação do programa comunitário no Núcleo de Hematologia e Hemoterapia demonstrou ser possível, com um baixo custo anual de apenas US\$ 272,30, diagnosticar e orientar de forma ética um número significativo de famílias com deficiência de G-6-PD, além de iniciar a educação da comunidade a respeito do problema e implantar na USF um núcleo de estudo dessa enzimopenia.

INTRODUÇÃO

1 – Introdução

1.1- O conceito de Genética Comunitária

O termo **Genética Comunitária** ou **Genética de Comunidade** foi usado pela primeira vez em 1990, em uma discussão a respeito das implicações em saúde pública da identificação do gene da fibrose cística (Modell, 1990). Já o seu conceito foi sendo delineado nos anos seguintes, em reuniões da Organização Mundial da Saúde, estabelecendo-se assim, uma nova disciplina da Genética, concretizada em 1998, com a criação na Suíça de um periódico especializado, o “Journal of Community Genetics” (Modell e Kuliev, 1998).

De acordo com Ten Kate (1998), a Genética Comunitária situa-se na interface entre a medicina, a genética e a comunidade e pode ser conceituada pelo seu lado aplicado ou pelo seu lado científico. Do ponto de vista pragmático, ela pode ser definida pelos efeitos preventivos e educacionais dos serviços de genética sobre a comunidade, englobando aqui as atividades de triagem populacional e orientação genética, divulgação das alterações genéticas prevalentes na comunidade e assessoria reprodutiva, variando esta última da orientação sobre métodos anticoncepcionais até o oferecimento do diagnóstico pré-natal e/ou neonatal. Já do ponto de vista científico, ela inclui todas as pesquisas necessárias à implantação e à avaliação de um programa de genética que atue sobre a comunidade, compreendendo aqui aspectos genético-epidemiológicos, moleculares, demográficos, sociais, psicológicos, éticos e culturais. Pelo seu caráter extremamente amplo, a Genética Comunitária é melhor caracterizada como uma metagenética, do que pela sua contribuição à genética em si (Ten Kate, 1998).

Do exposto, parece claro que a Genética Comunitária difere conceitualmente da Genética de Populações, a qual se interessa, basicamente, pelas freqüências alélicas e pela dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. Embora mais próxima da Genética Epidemiológica, pelos seus objetivos de prevenção, ela também difere desta última, primariamente voltada para os mecanismos relacionados à ocorrência e à recorrência de doenças genéticas nas populações. Dentro do espírito holístico que caracteriza este final de século, a Genética Comunitária pretende dar uma maior abrangência aos programas de intervenção social da genética, enfatizando que os caminhos da mente humana são imponderáveis e que as suas respostas podem fugir do que seria esperado e até “óbvio “ de acordo com alguma teoria. De fato, um programa de genética a ser implantado em uma comunidade deve levar em consideração não apenas os seus aspectos genético-epidemiológicos e populacionais, mas também os seus aspectos sócio-econômicos, psicológicos e culturais. Como comenta Bowman (1991), os programas populacionais geralmente são concebidos em um mundo teórico e idealizado. Na prática, no entanto, eles são desenvolvidos em um mundo real, muito diferente.

Como seria de se esperar, as alterações genéticas de maior prevalência nas populações, sobretudo aquelas que contam com métodos de triagem de heterozigotos, como é o caso das hemoglobinopatias hereditárias, a deficiência de G-6-PD, a fibrose cística, etc., constituem o alvo preferido da Genética Comunitária. No entanto, as alterações relacionadas à deficiência mental (ex.: síndrome de Down, fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, etc.) e às malformações também se enquadram em seus objetivos. Um programa de informação sobre agentes teratogênicos, por exemplo, enquadra-se perfeitamente nos objetivos da Genética Comunitária, desde que ele inclua, evidentemente, alguma modalidade de avaliação do seu impacto sobre a população.

No Brasil, os primeiros programas de Genética Comunitária, nos moldes acima definidos, diziam respeito às hemoglobinopatias hereditárias, tendo como alvo comunidades de aproximadamente 100.000 habitantes, como é o caso das cidades paulistas de Araras (Teixeira e Ramalho, 1993 ;1994) e Bragança Paulista (Compri *et al.*, 1996). Tais programas despertaram o interesse da comunidade científica nacional sendo reconhecidos como de relevância científica e premiados pela Academia de Medicina de São Paulo (Ramalho *et al.*, 1996 b). Com a recente valorização da Genética Comunitária nos meios de comunicação internacionais, acredita-se que novos programas sejam implantados no Brasil, enfocando várias outras alterações genéticas.

1.2- A comunidade de Bragança Paulista

Bragança Paulista é uma cidade localizada no interior do Estado de São Paulo, distante apenas 90 Km da capital, e que reúne algumas condições propícias à implantação de programas comunitários. Dentre elas, merecem destaque o seu porte médio (109.863 habitantes - IBGE, 1995), a heterogeneidade racial da sua população, as boas condições de saneamento básico e uma Faculdade de Ciências Médicas (Universidade São Francisco), com um Setor de Hematologia Clínica e Laboratorial, vinculado à Hemo-Rede (Rede Estadual de Hematologia e Hemoterapia do Estado de São Paulo). Outro fator favorável é a distância de apenas 60 km da Universidade Estadual de Campinas, equipada para fornecer assessoria em técnicas laboratoriais mais complexas e especializadas, como, por exemplo, as de Biologia Molecular, imprescindíveis na caracterização das mutações presentes na comunidade.

Bragança Paulista, como tantas outras cidades brasileiras, teve a sua origem nas proximidades de uma capela, no ano de 1763. Cresceu neste local o Povoado de Conceição do Jaguari, que em 1797 passou à condição de Vila Bragança (Bueno, 1993). A sociedade, como toda sociedade brasileira da época, apresentava no seu topo os grandes proprietários rurais: homens brancos e livres. A população negra era dividida em escravos e libertos. Em 1836, a composição étnica da população de Bragança Paulista era a expressa como mostra a Tabela 1 :

Tabela 1 – Composição étnica de Bragança Paulista em 1836 (Adaptado de Martins e Laurito, 1944).

	Homens	Mulheres	Total
Branco	3582	3580	7162
Mulatos	1028	978	2006
Pretos	690	546	1236
Total	5300	5104	10.404

Na primeira metade do século XIX, Bragança constituía, juntamente com outras cidades da região, o celeiro da capital, pois produzia feijão, milho, arroz e até trigo, além do gado (Laurito e Martins, 1944) . De acordo com a Professora Beatriz W.C. Leite *, em seu estudo sobre a região bragantina, o açúcar não teve na região importância econômica de destaque; “A lavoura de mantimentos e a pecuária foram as duas principais motivações da economia Bragantina”.

A localização de Bragança, próxima ao Sul de Minas, colocou-a na rota do lucrativo e intenso comércio de tropeiros.

* Trabalho pertencente ao acervo do CDAPH-IFAN (Centro de Documentação e Apoio à Pesquisa Histórica - Instituto Franciscano de Antropologia), sem registro da data de publicação, sendo provavelmente da década de 70.

Da segunda metade do século XIX em diante, além de a cidade desenvolver o comércio, ela passou a conviver com a cafeicultura e com os imigrantes europeus. Essa época foi marcada pela chegada de indivíduos de diversas cidades da região e de outros Estados, como Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo e Paraná (Paranaguá). Em 1833 já se registrava em Bragança a presença de dez estrangeiros : 5 portugueses, 2 italianos, 1 alemão, 1 persa e 1 espanhol. Nos fins do século XIX e início deste, ocorreu uma intensificação das imigrações, principalmente italiana e espanhola, tendo sido nesta época criadas em Bragança a “Sociedade D. Italiana de Socorros Mútuos” (1891), a “Sociedade Espanhola de Socorros Mútuos 2 de Mayo” (1900) , a “Sociedade Italiana Fatellanga” (1898) e a “Sociedade Recreativa Italiana” (1908) (Bueno, 1993).

Dados do final da década de 30 mostram que a produção de milho e feijão continuou. A pecuária e a suinocultura também representam parte da economia da cidade há décadas, viabilizadas pela topografia e pela influência dos imigrantes europeus. Com a queda do café, intensificou-se o plantio da batata, um ciclo produtivo de aproximadamente duas décadas e que foi responsável pela fixação da colônia japonesa em Bragança. Com a pavimentação de estradas regionais e a construção da Rodovia Fernão Dias, Bragança Paulista foi perdendo importância econômica a partir da década de 50. As cidades próximas mudaram a sua referência econômica para a capital do Estado ou Campinas (Moreira *et al.*, 1997).

Em 1993 foi implantado em Bragança Paulista um programa comunitário de hemoglobinopatias hereditárias, no qual a comunidade foi abordada a partir dos estudantes de primeiro e segundo graus. Esse programa, que forneceu o substrato para a tese de mestrado da autora do presente trabalho (Compri *et al.*, 1996), revelou uma receptividade satisfatória da população aos exames laboratoriais e à orientação genética oferecidos em

caráter opcional, sem qualquer coercividade. No entanto, os seus indicadores de viabilidade e eficiência foram significativamente menores que os observados no programa de hemoglobinopatias desenvolvido em Araras, SP, a partir de gestantes (Teixeira e Ramalho, 1994). De qualquer forma, o programa despertou o interesse da comunidade, levando à implantação de um serviço especializado de diagnóstico, orientação e tratamento das hemoglobinopatias hereditárias, que continua em funcionamento.

Tendo em vista a composição racial da comunidade, outra alteração genética que se julgou merecer um programa educacional e preventivo foi a deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6-PD), que é outro polimorfismo genético humano que tem merecido a atenção da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1995; Modell e Kuliev, 1998).

1.3- A desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6-PD)

A desidrogenase de 6-fosfato de glicose, também conhecida pela sigla G-6-PD (do inglês glucose-6-phosphate dehydrogenase) ou pela notação NADP oxido-redutase de 6 -fosfato de D-glicose (EC 1.1.1.49), é uma enzima citoplasmática amplamente distribuída entre quase todos organismos e tecidos. Nos seres humanos, apesar de sua ampla distribuição, no metabolismo das hemácias é que a G-6-PD exerce sua função mais importante, ao atuar em uma das vias metabólicas utilizadas por estas células para a obtenção de energia.

Na sua forma ativa, a G-6-PD é constituída por duas ou quatro subunidades idênticas, cada uma com uma massa molecular de 59 KDa. A seqüência primária de 515 aminoácidos da G-6-PD foi determinada a partir da seqüência de cDNA. O gene que

codifica a G-6-PD possui 18 Kb, consiste em 13 exons e localiza-se na região telomérica do braço longo do cromossomo X, mais precisamente na banda Xq28 (Fig.1). Ele faz parte de um grupamento denominado G-6-PD/ daltonismo, que de acordo com os estudos de Keats (1983), inclui os seguintes genes: - daltonismo deuteronóide - G-6-PD – leucodistrofia e hemofilia A .

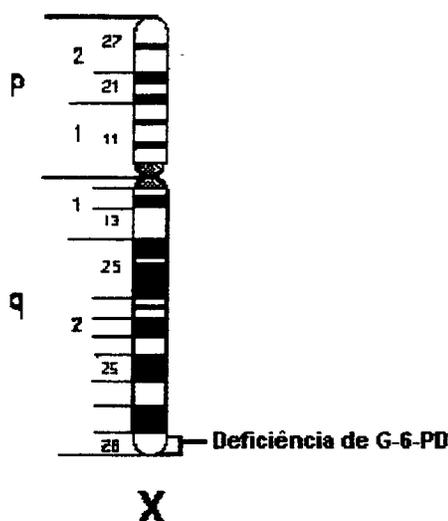


Figura 1 – Localização do gene da G-6-PD : Xq28

Como é bastante conhecido, a hemácia é muito diferente de todas as outras células, pois não possui núcleo, mitocôndrias, ribossomos e aparelho de Golgi, não tem capacidade de divisão e não sintetiza DNA nem RNA. Tais características acarretam a essa célula algumas restrições metabólicas, tornando-a incapaz, por exemplo, de sintetizar proteínas ou de obter energia a partir do ciclo de Krebs. Para tanto, ela se utiliza do metabolismo da glicose, valendo-se do ATP (trifosfato de adenosina) produzido durante a

glicólise. Contudo, apesar de suas particularidades, a hemácia é uma célula complexa e metabolicamente ativa, cuja integridade é mantida por três unidades celulares em interação: a hemoglobina, a membrana celular e os elementos solúveis intracelulares, principalmente enzimas, coenzimas e substratos do metabolismo da glicose. Essas unidades são aquelas que capacitam a hemácia a desenvolver as suas funções primárias de transporte de oxigênio e de dióxido de carbono.

A ausência de depósitos de glicogênio na hemácia normal faz com que essa célula necessite de suprimento constante de carboidrato para a obtenção da energia necessária para mantê-la funcionalmente ativa e em circulação durante um período aproximado de 120 dias. Embora o carboidrato preferido na produção de energia seja a glicose, a hemácia também pode metabolizar outros açúcares, tais como a frutose, a manose e a galactose (Oski e Naiman, 1972).

A glicose penetra facilmente nas hemácias, quase independentemente da sua concentração extracelular e, uma vez dentro da célula, é fosforilada a glicose-6-fosfato ou reduzida a seu derivado poliálcool (o sorbitol), que é então convertido a frutose. A seguir, a glicose-6-fosfato formada é metabolizada por intermédio de uma das três vias metabólicas seguintes:

- 1- Via metabólica anaeróbica de Embden - Meyerhof, que conduz à formação de piruvato e lactato e na qual é produzido o ATP, que fosforila proteínas da membrana e fornece energia para a bomba de sódio e potássio e outros passos metabólicos;
- 2- Via metabólica da pentose-fosfato ou via oxidativa direta, que produz o fosfato reduzido de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), importante para manter o potencial redutor intracelular. Essa via produz no seu final o dióxido de carbono e uma pentose fosforilada, a qual, após uma série de rearranjos moleculares, retorna à via de Embden-Meyerhof, com produção de ATP;

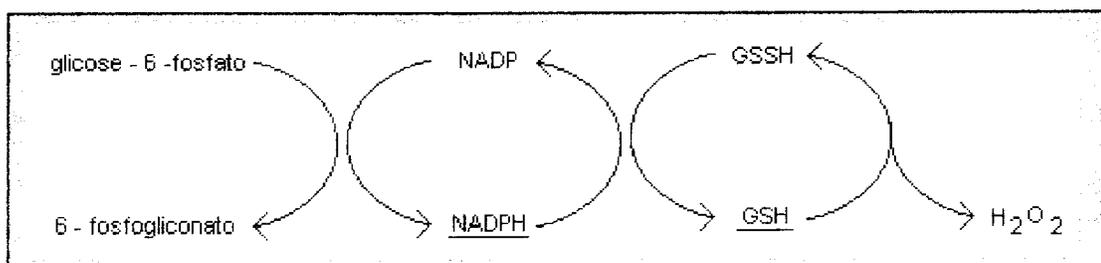
3- Conversão de glicose-6-fosfato a glicose-1-fosfato e, eventualmente, a glicogênio.

Em condições normais, 90% da glicólise é feita nas hemácias pela via de Emden–Meyerhof e 10% pela via oxidativa direta (Oski e Naiman, 1972).

A G-6-PD catalisa o primeiro passo da via oxidativa direta da glicose, no qual a glicose-6-fosfato é oxidada a 6 - fosfogliconolactona, a qual, a seguir, é hidrolisada a 6-fosfogliconato, que é então oxidado a ribose-5-fosfato, na presença de desidrogenase 6-fosfoglicônica, com a produção de dióxido de carbono.

As reações catalisadas pelas enzimas desidrogenase de 6-fosfato de glicose e desidrogenase 6- fosfoglicônica requerem como co-fator essencial o fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADP), que atua como receptor de íons de hidrogênio, resultando no aparecimento do fosfato reduzido de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH). O papel mais importante da via oxidativa direta é, sem dúvida alguma, a geração de NADPH, substância redutora essencial sobretudo à manutenção do glutatião em estado reduzido (GSH), uma vez que a redutase de glutatião oxidado (GSSH) requer NADPH como coenzima.

Em resumo:



O GSH, por sua vez, é fundamental à manutenção da estabilidade da hemoglobina e das enzimas intra-celulares e à proteção de lípidos da membrana contra a oxidação, além de constituir a principal fonte de grupos sulfidrílica no interior da hemácia (Jandl e Allen, 1960; Jaffé, 1970; Oski e Naiman, 1972). Tal composto, cuja estrutura é mostrada na Figura 2, é imprescindível, portanto, à defesa das hemácias contra a agressão de agentes oxidantes, que atuam principalmente sobre os grupos sulfidrílicos ativos de várias enzimas eritrocitárias do citoplasma e da membrana, além do grupo sulfidrílico da posição β^{93} da hemoglobina, promovendo a hemólise. Esses agentes oxidantes, que podem ser de origem endógena ou exógena (drogas, alimentos, elementos atmosféricos), são representados sobretudo pelo peróxido de hidrogênio e provavelmente, por outros peróxidos orgânicos gerados durante processos infecciosos, pela ação de drogas ou mesmo em alguns processos metabólicos normais. Os alvos iniciais da oxidação exógena ou endógena são o GSH, grupos sulfidrílicos de proteínas, o heme e possivelmente os lípidos (Beutler, 1983).

Frente ao exposto, pode-se concluir que a atividade da G-6-PD é indispensável à manutenção da integridade das hemácias e que uma deficiência acentuada dessa enzima pode produzir alterações metabólicas muito sérias, sobretudo na presença de substâncias oxidantes. A principal consequência dessas alterações metabólicas é a hemólise, determinada fundamentalmente, pela precipitação da hemoglobina e formação de corpúsculos de Heinz, pela oxidação dos grupos tiol das enzimas citoplasmáticas e da membrana celular e, secundariamente, pela oxidação de lípidos da membrana.

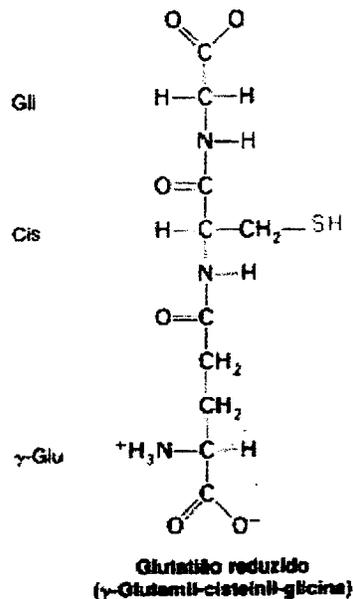


Figura 2 – Glutatião na sua forma reduzida

1.4- A deficiência de G-6-PD

A deficiência de G-6-PD é a mais freqüente das enzimopatias conhecidas: estima-se que cerca de 400 milhões de pessoas em todo o mundo sejam afetadas. As mais altas prevalências (freqüências gênicas de 5% a 25%) são encontradas na África Tropical, Oriente Médio, na Ásia Tropical e Subtropical, em algumas áreas do Mediterrâneo e em Papua Nova Guiné (Luzzato e Metha, 1995).

Geneticamente, a deficiência de G-6-PD (sistema Gd⁻) é uma entidade heterogênea, causada por genes que se expressam como um caráter recessivo ligado ao cromossomo X. Além da enzima normal (Gd⁺), mais de 400 variantes

diferentes foram descritas, com base nas diversas características bioquímicas observadas, 72 das quais são polimórficas. Entretanto, também foram caracterizadas mutações estruturais do gene não acompanhadas de deficiência da atividade enzimática. Assim sendo, as diversas variantes observadas, que alteram a estrutura, a estabilidade ou a atividade da G-6-PD, são agrupadas em cinco classes distintas, com base na atividade enzimática residual (Luzzato e Metha, 1995):

Classe I - associada a anemia hemolítica crônica não esferocítica: 97 variantes, sendo apenas uma polimórfica. Ex. variantes Andadoris, Campinas e Sumaré ;

Classe II - deficiência enzimática grave (<10% de atividade residual): 122 variantes, sendo 37 polimórficas. Ex.: variantes Mediterrânea e Union ;

Classe III - deficiência enzimática moderada (10% a 60% de atividade residual): 103 variantes, sendo 22 polimórficas. Ex.: variantes Africana ou A⁻, Cantão e Seattle ;

Classe IV - atividade enzimática normal ou ligeiramente diminuída (60% a 100% de atividade): 52 variantes, sendo 12 polimórficas. Ex: variante A ;

Classe V - atividade enzimática aumentada (> 150% de atividade): 2 variantes, nenhuma polimórfica. Ex.: variante Verona.

De todas as variantes da G-6-PD com atividade deficiente, as que mostram maior importância, pela sua frequência, são: a variante Negróide ou Africana (variante A⁻), que ocorre comumente em negróides, bem como no Sul da Itália, Espanha, Portugal e Península Arábica; a variante denominada Mediterrânea, que é encontrada mais usualmente em italianos, principalmente da Sardenha e da Sicília, em gregos, judeus orientais, árabes e persas; a variante Cantão, freqüente no sul de China; a variante Seattle, que embora tenha sido descrita pela primeira vez nos EUA, atinge frequências polimórficas na Sardenha, Grécia e Sul da Itália; e a variante Union, encontrada em chineses e no Sul da Itália (Luzzato e Metha, 1995).

Há muito se especula sobre a existência de uma relação entre as variantes A e A⁻, e a análise do DNA confirmou esta hipótese: a substituição de ácido aspártico por asparagina na G-6-PD A deve-se a uma mutação G→A no nucleotídeo 376; a mesma mutação está presente em todos os pacientes com a variante de G-6-PD A⁻, mas a deficiência da enzima que caracteriza a variante é causada por uma segunda substituição; geralmente, esta substituição está no nucleotídeo 202 (G→A), mas outras mutações nos nucleotídeos 680 e 968 podem estar presentes (Beutler *et al.*, 1989). É interessante que todas as mutações que levam à deficiência de G-6-PD em negros ocorram em associação com G-6-PD A: provavelmente a variante G-6-PD A, em algum momento, foi o tipo mais comum de G-6-PD na África (Beutler, 1992).

No Mediterrâneo, a mutação mais freqüente é aquela designada G-6-PD Mediterrânea, que decorre de uma substituição C→T no nucleotídeo 563. Algumas variantes, que outrora pensava-se serem distintas da G-6-PD Mediterrânea, são idênticas a ela do ponto de vista molecular (Beutler, 1990 e Beutler, 1992). Uma mutação no nucleotídeo 1311, que também decorre de uma substituição C→T mas não produz troca de aminoácido, ocorre em cerca de 20% da população do Mediterrâneo; foi detectada também em 98% dos indivíduos portadores de G-6-PD Mediterrânea do Sul da Europa e Oriente Médio, sugerindo que a mutação ocorreu apenas uma vez e recentemente. Entretanto, a mutação 1311 não foi observada em três hindus com G-6-PD Mediterrânea, o que sugere que esta última mutação teve origens diferentes (Beutler *et al.*, 1990).

A clonagem e o seqüenciamento do gene de G-6-PD (Martini *et al.*, 1986; Poggi *et al.*, 1990 e Chen *et al.*, 1991) propiciaram uma nova perspectiva no estudo da genética populacional dessa deficiência enzimática. Até então, para análise bioquímica da enzima, era necessária a coleta de grande quantidade de sangue, com resultados muitas

vezes duvidosos, devido ao transporte, estocagem, purificação e ensaio bioquímico inadequados da proteína. Atualmente, é possível o estudo molecular desta enzima, a partir do DNA estável, extraído de leucócitos obtidos de menos de 1 ml de sangue e utilizando-se várias técnicas independentes de biologia molecular, que podem confirmar uma possível mutação. Essas técnicas incluem seqüenciamento, análise de sítios de restrição e hibridização alelo-específica (Saad *et al.*, 1995).

Comumente, as variantes de alta freqüência populacional e caracterizadas por poucos efeitos adversos são clinicamente idênticas. Entretanto, as variantes que causam anemia hemolítica crônica, devido à seleção adversa, decorrem de mutações recentes e independentes. As regiões de DNA que codificam os domínios de ligação entre o NADP e a G-6-PD são regiões particularmente sujeitas à mutação nas anemias hemolíticas não esferocíticas (Beutler, 1990 ; 1992).

As manifestações clínicas comumente observadas nos deficientes de G-6-PD são a icterícia neonatal e a anemia hemolítica aguda. Em alguns casos, a anemia neonatal é grave o suficiente para causar a morte ou danos neurológicos permanentes (Luzzato e Metha, 1995). A anemia hemolítica aguda pode ser desencadeada por várias drogas, infecções e pela ingestão de fava (*Vicia fava*). Como exemplo de drogas que podem desencadear uma crise hemolítica nos deficientes de G-6-PD, temos os antimaláricos, antibacterianos sulfonamídicos e sulfônicos, antipiréticos/analgésicos (como acetanilida), e outros, como ácido nalidíxico, azul de metileno, quinidina, vitamina K e a naftalina. Algumas destas drogas só desencadeiam a anemia hemolítica aguda em variantes específicas, como é o caso da quinidina na variante Mediterrânea. Outras drogas levam à crise aguda quando associadas a infecções e outros fatores predisponentes, como doenças crônicas (Sena *et al.*, 1986). Salvo esses episódios hemolíticos, muitos indivíduos deficientes de G-6-PD

são totalmente assintomáticos. Na Tabela II são apresentadas as principais drogas capazes de desencadear hemólise nos deficientes de G-6-PD com atividade residual da enzima inferior a 60%, ou seja, nos portadores das variantes das classes II e III.

Tabela 2 - Fármacos associados à hemólise significativa em deficientes de G-6-PD (Luzzato e Metha, 1995)

Droga	Associação inequívoca	Possível associação altas doses em pacientes com deficiência grave ou em recém-nascidos	Associação duvidosa
Antimaláricos	primaquina, pamaquina, pentaquina	cloroquina	quinina, quinacrina
Sulfonamidas	sulfanilamida, sulfacetamida, sulfapiridina, sulfametoxazol	sulfadimidina, sulfameridina, sulfametoxipiridazina	sulfadiazina, sulfoxona, sulfisoxazol
Sulfonas	dapsona, tiazolsulfona	-	-
Nitrofuranos	nitrofurantoína	-	-
Analgésicos antipiréticos	acetanilida	aspirina	fenacetina, aminopirina, acetaminofen
Outros fármacos	ácido nalidíxico, azul de metileno, fenazopiridina	cloranfenicol, análogos da vit. K, ácido ascórbico	PAS, L-DOPA, probenecid, dimercaprol
Outras substâncias químicas	naftalina, nitritos, trinitrotolueno, azul de toluidina	-	-

1.5 – A manutenção do polimorfismo da deficiência de G-6-PD

Um aspecto que sempre despertou o interesse dos geneticistas foi o de a deficiência de G-6-PD atingir freqüências extremamente elevadas em certas populações, apesar do efeito potencialmente deletério do gene que a determina. Outro aspecto interessante é a correlação positiva observada na Sardenha entre a deficiência de G-6-PD e a talassemia beta (Siniscalco *et al.*, 1961), o mesmo ocorrendo entre a deficiência de G-6-PD e o traço falciforme em várias populações (Motulsky, 1964). Essas correlações ganham grande significado pelo fato de a deficiência de G-6-PD ser ligada ao sexo, ao passo que as duas hemoglobinopatias mencionadas são autossômicas (Beiguelman, 1994).

Na verdade, as freqüências da deficiência de G-6-PD são extremamente diferentes nas diversas populações humanas masculinas, variando desde 62% entre judeus curdos, 30% entre italianos da Sardenha, 13% entre árabes e apenas 0,1% entre japoneses (Hamel e Saad, 1998). Da mesma forma, extensos estudos realizados em populações indígenas da América do Sul, constataram entre eles a ausência dessa enzimopenia (Weimer *et al.*, 1998).

Em 1960, Motulsky adaptou para a deficiência de G-6-PD a teoria de Haldane, formulada em 1949 em relação à talassemia beta, sugerindo que os deficientes de G-6-PD também poderiam ter alguma vantagem seletiva frente à malária causada pelo *Plasmodium falciparum*. Da mesma forma que em relação à talassemia beta, essa hipótese baseava-se apenas na semelhança das distribuições geográficas da deficiência de G-6-PD e da malária causada pelo *Plasmodium falciparum*. A mesma hipótese também havia sido aventada por Allison (1954) para explicar o polimorfismo da hemoglobina S na África.

A sugestão de Motulsky (1960) ganhou evidências favoráveis em um estudo realizado logo a seguir por Siniscalco *et al.* (1961) na Sardenha. De fato, tais autores constataram que a frequência de homens deficientes de G-6-PD era relativamente baixa (3% a 4%) nos locais montanhosos da Sardenha e muito alto (podendo atingir 35%) no litoral pantanoso dessa grande ilha, onde a malária foi endêmica. Da mesma forma, Plato *et al.* (1964) também encontraram uma frequência bem maior de deficiência de G-6-PD nas zonas de malária endêmica do litoral de Chipre, do que nas zonas montanhosas do interior dessa ilha. Desde então, a teoria da maior resistência à malária causada pelo *Plasmodium falciparum* foi usada para explicar a manutenção do polimorfismo da deficiência de G-6-PD em algumas populações mediterrâneas e africanas. No continente americano, a deficiência de G-6-PD teria sido introduzida pelo fluxo gênico através dos escravos africanos e dos imigrantes europeus e asiáticos (Ásia Menor), uma vez que ela estava ausente na população indígena autóctone.

O aparecimento da malária endêmica causada pelo *Plasmodium falciparum* foi um desastre ecológico que provavelmente matou mais pessoas do que qualquer outra doença. Tal endemia é atribuída à mudança de hábitos das populações de áreas tropicais e subtropicais, que passaram da vida nômade de caçadores para a vida sedentária de agricultores. De fato, a destruição das florestas, a criação de povoados com cabanas cobertas por folhas e o estabelecimento de condições propícias à estagnação da água e à reprodução do *Anopheles gambiae*, principal mosquito vetor do *Plasmodium falciparum*, foram fatores fundamentais para o aparecimento da malária endêmica em áreas tropicais e subtropicais. Na África, esse desastre ecológico teve início há cerca de 2.000 anos, embora provavelmente ele seja mais antigo em algumas regiões da Europa e da Ásia (Eaton, 1994). Estimativas técnicas situam a mortalidade pela malária causada pelo *Plasmodium*

falciparum em torno de 20% nessas populações (Livingstone, 1971), o que ressalta a importância dessa força seletiva em relação às condições genéticas benignas (traço falciforme, traço talassêmico e deficiência de G-6-PD) que eventualmente conferissem aos seus portadores alguma resistência adicional contra o Plasmodium falciparum.

De acordo com Beiguelman (1994), a maior preservação dos portadores da deficiência de G-6-PD frente ao Plasmodium falciparum talvez seja uma consequência desse parasito desenvolver-se nas hemácias mais velhas, as quais, nos indivíduos com a variante A⁻ de G-6-PD, são as que mostram maior deficiência da atividade enzimática. Assim sabendo-se que: a) as hemácias deficientes de G-6-PD podem ter níveis muito baixos de glutatião reduzido; b) que o Plasmodium falciparum se utiliza da via oxidativa direta da glicólise; c) que tal parasito requer glutatião reduzido para crescer *in vitro*; d) que 50% desse glutatião das hemácias contribuem para a produção de cisteína necessária a estas células, pode-se supor que o Plasmodium falciparum, por causa das suas necessidades nutricionais, tenha preservado não só os homens deficientes de G-6-PD, mas também as mulheres heterozigotas do gene da deficiência, já que elas possuem duas populações de hemácias (normais e deficientes de G-6-PD). Em um ambiente com Plasmodium falciparum, as mulheres heterozigotas poderiam ter ainda uma vantagem seletiva em relação aos homens com deficiência de G-6-PD, porque estes estariam sujeitos às crises hemolíticas e elas não.

Lisa *et al.* (1994) voltaram a chamar a atenção para a importância das heterozigotas do gene da deficiência de G-6-PD na manutenção do polimorfismo dessa enzimopenia, sugerindo que, além da maior resistência ao Plasmodium falciparum, elas também seriam mais férteis. Esses autores encontraram evidências indiretas desse fenômeno da fertilidade diferencial nas heterozigotas na Sardenha, pois, utilizando dados

do censo demográfico de 1961, eles constataram um maior número médio de filhos por mulher nas povoações onde a freqüência da deficiência de G-6-PD era maior. No entanto, a Sardenha ainda era uma área de malária endêmica na década de 60, com interferência dessa doença e/ou da imunidade adquirida contra ela, na fertilidade das mulheres. Além disso, as evidências obtidas por Lisa *et al.* (1994) são muito indiretas e a deficiência de G-6-PD também mostra-se associada à talassemia beta nas populações sardas. Assim, parece desnecessário enfatizar a conveniência da realização de outros estudos de fertilidade diferencial das heterozigotas, sobretudo estudos diretos e em áreas não malarígenas.

1.6 - A deficiência de G-6-PD no Brasil

Nos primeiros estudos realizados em populações brasileiras, já foi possível verificar que a deficiência de G-6-PD pode alcançar proporções consideráveis entre os homens. De fato, estudos realizados em diferentes regiões do Brasil constataram entre os homens negróides prevalências de deficientes de G-6-PD em torno de 10%. Já entre os homens caucasóides dos Estados de São Paulo e do Rio Grande do Sul, foram encontradas freqüências de deficientes de G-6-PD em torno de 1% a 3% (Lewgoy e Salzano, 1965; Beiguelman *et al.*, 1968, Saldanha *et al.* 1969; Marques e Campos, 1975; Ramalho e Beilguelman, 1976; Azevêdo *et al.*, 1978; Ramalho, 1979).

Nessa fase anterior ao advento das técnicas de Biologia Molecular, as variantes de G-6-PD mais freqüentemente caracterizadas no Brasil, por exames bioquímicos, foram a Africana ou A⁻ e a Mediterrânea. Assim, por exemplo, dentre os 30 deficientes de G-6-PD examinados por Azevêdo e Azevêdo (1974) em uma população mestiça de Salvador, BA, 29 apresentaram a variante A⁻ e um apresentava a variante

Mediterrânea. Já entre os 27 deficientes de G-6-PD examinados por Weimer *et al.* (1981) em Porto Alegre, RS, 20 apresentavam a variante A⁻, 6 apresentavam a variante Mediterrânea e um a variante rara "Seattle-like". Em Campinas, SP, dentre os 57 deficientes de G-6-PD examinados por Sena, Barretto e Ramalho (1984), 55 apresentavam a variante A⁻ e apenas 2 a variante Mediterrânea. Como veremos adiante, essa preponderância da variante Africana ou A⁻ demonstrada por esses primeiros estudos, que se valeram da eletroforese de G-6-PD e do ensaio enzimático quantitativo, foi confirmada posteriormente por investigações mais complexas, que se valeram da análise de DNA. Além disso, nesses estudos pioneiros, foram descritas em nosso país novas variantes de G-6-PD, como é caso das variantes Minas Gerais (Azevêdo e Yoshida, 1969), Porto Alegre (Hutz *et al.*, 1977) e Guaíba (Weimer *et al.*, 1981).

Os primeiros estudos a respeito do significado médico da deficiência de G-6-PD no Brasil avaliaram sua morbidade, sua relação com a icterícia neonatal e as conseqüências clínicas da transfusão de sangue de doadores enzimopênicos.

As primeiras avaliações de morbidade da deficiência de G-6-PD em populações brasileiras foram as realizadas por Azevêdo e colaboradores (1978) entre homens negróides de Salvador, BA, e por Sena e Ramalho (1985) entre homens negróides e caucasóides de Campinas, SP. No estudo realizado em Salvador, os autores concluíram que a deficiência de G-6-PD não é suficientemente grave no Nordeste do Brasil para provocar um aumento significativo do número de hospitalizações entre os seus portadores, embora seja capaz de causar icterícia clinicamente detectável. Da mesma forma, os resultados obtidos por Sena e Ramalho (1985) indicaram que a deficiência de G-6-PD não determina o aparecimento de alterações clínicas graves na maioria dos enzimopênicos da região de Campinas. Nesse estudo pôde-se constatar ainda que, embora os deficientes de

G-6-PD mantenham contato freqüente com fatores ambientais potencialmente hemolíticos, tais como naftalina, sulfas e outros medicamentos, a intensidade do contato parece ser insuficiente para desencadear, na maioria dos casos, hemólise importante.

A baixa morbidade da deficiência de G-6-PD observada nesses estudos realizados em Salvador e Campinas deve-se, em grande parte, ao fato de a maioria dos deficientes examinados apresentar a variante Africana ou A⁻ da enzima, mais benigna, pois a deficiência enzimática está limitada às hemácias com mais de cinquenta dias (Beutler, 1959). Sena e Ramalho (1985), no entanto, chamaram a atenção para a possibilidade de casos isolados de deficientes de G-6-PD no Brasil poderem manifestar anemia hemolítica aguda importante, até mesmo fatal, na presença de fatores oxidantes fortes, ressaltando a importância da detecção e da orientação preventiva dos enzimopênicos nas populações, sobretudo naquelas nas quais a probabilidade de encontro da variante Mediterrânea, mais grave, for maior.

A associação entre a deficiência de G-6-PD e a icterícia neonatal também só foi investigada no Estado de São Paulo e na Bahia, com resultados discordantes. No primeiro desses estudos, realizado na cidade de São Paulo, Segre (1971) observou um aumento significativo da freqüência de deficientes de G-6-PD entre os recém-nascidos icterícios caucasóides e negróides do Hospital do Servidor Público Estadual "Francisco Morato de Oliveira" que apresentavam icterícia com níveis de bilirrubina iguais ou superiores a 12 mg%. Já em 1974, Azevêdo e Azevêdo, investigando recém-nascidos mestiços da cidade de Salvador, Bahia, observaram que a freqüência de deficientes de G-6-PD era praticamente a mesma entre as crianças icterícias e não icterícias, afastando a possibilidade de a deficiência de G-6-PD ser um fator etiológico importante, nessa população, de hiperbilirrubinemia neonatal.

Ramalho (1979, 1981), retomando o problema na cidade de Campinas, SP, examinou recém-nascidos a termo do Hospital de Clínicas da UNICAMP, investigando a deficiência de G-6-PD em amostras de sangue do cordão umbilical e seguindo clinicamente os recém-nascidos deficientes para verificar o aparecimento ou não de icterícia. Cerca de 26% das crianças levadas à fototerapia por ocasião desse estudo eram deficientes de G-6-PD, o que levou o autor a suspeitar que tal enzimopenia pudesse ser uma causa importante, na região de Campinas, de icterícia neonatal moderada, que requer tal procedimento.

Outra evidência indireta de uma possível associação entre a deficiência de G-6-PD e a icterícia neonatal em populações paulistas foi fornecida pelo trabalho de Rivero e colaboradores (1981), já que esses autores puderam constatar casos de *kernicterus* entre os deficientes de G-6-PD com retardamento mental matriculados no Instituto da Criança, na cidade de São Paulo.

Para confirmar essas evidências, Garlipp e Ramalho (1988) acompanharam clínica e laboratorialmente 25 recém-nascidos deficientes de G-6-PD da cidade de Campinas, SP (24 Gd⁻ A⁻ e 1 Gd⁻ Mediterrânea), confirmando a existência de uma associação estatisticamente significativa entre essa enzimopenia e a icterícia neonatal moderada, que requer fototerapia. Curiosamente, a deficiência de G-6-PD não se mostrou associada nesse estudo à icterícia leve ou “fisiológica”, que requer apenas observação.

É interessante mencionar que um estudo recente (Kaplan *et al.*, 1997) demonstrou que a hiperbilirrubinemia neonatal dos deficientes de G-6-PD é intensificada pela associação com a síndrome de Gilbert, a qual não é rara na região de Campinas (Magalhães, 1976). Essa interação gênica pode servir de paradigma da interação de polimorfismos genéticos benignos na determinação de doenças. De fato, a associação entre

a deficiência de G-6-PD com o defeito de conjugação da bilirrubina da síndrome de Gilbert aumenta substancialmente o risco de o recém-nascido desenvolver *kernicterus*, com danos neurológicos permanentes.

Outro aspecto clínico importante da deficiência de G-6-PD, se bem que ainda bastante controvertido, é o da transfusão de sangue de doadores enzimopênicos. Em um estudo realizado na cidade de Campinas, SP, em uma época anterior à criação do Hemocamp em que o Hospital das Clínicas se valia de um serviço particular de hemoterapia que não contra-indicava a transfusão de hemácias deficientes de G-6-PD, a freqüência de reações pós-transfusionais não foi significamente maior entre receptores que haviam sido transfundidos com sangue com a variante A⁻ de G-6-PD, do que a observada entre os controles, que haviam recebido hemácias sem essa deficiência enzimática (Ramalho *et al.*, 1985b). Tal resultado não exclui, no entanto, a possibilidade de ocorrência de reações pós-transfusionais graves em casos esporádicos de uso de sangue deficiente de G-6-PD, sobretudo se o doador apresentar a variante Mediterrânea da enzima (Ramalho e Beiguelman, 1976).

O estudo da deficiência de G-6-PD voltou a ser realizado de forma sistemática na UNICAMP nos fins da década de 80, com a pesquisa dessa enzimopenia em pacientes com síndromes falciformes (Saad, 1987; Saad *et al.*, 1995) e com o estudo da dinâmica insulínica e de secreção do cortisol em deficientes de G-6-PD (Monte Alegre *et al.*, 1991). Em 1993 foi descrita a variante Campinas de G-6-PD, não polimórfica e associada à anemia hemolítica crônica (Baronciani *et al.*, 1993) e em 1997, a variante Sumaré (Saad *et al.*, 1997).

Com a implantação do Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia do Departamento de Clínica Médica da FCM e do Hemocentro

da UNICAMP, tiveram início mais recentemente os estudos de análise de DNA de indivíduos portadores da deficiência de G-6-PD. Assim, por exemplo, Saad *et al.* (1997a), caracterizando molecularmente 150 doadores de sangue não consangüíneos da região de Campinas, observaram 146 portadores da mutação A⁻ (202 G → A), 3 indivíduos com a variante Mediterrânea e um portador da variante rara G-6-PD Chatam.

Weimer *et al.* (1998), revendo as novas variantes de G-6-PD encontradas no Brasil, chamaram a atenção para o fato de várias delas ainda não terem sido submetidas à análise molecular, como é o caso, por exemplo, das variantes Minas Gerais, Porto Alegre, Guaíba e Laguna. Dentre as caracterizadas molecularmente, esses autores citam as variantes Lages, São Borja, Farroupilha, Anaheim e Campinas. A essas últimas deve ser acrescentada a variante Sumaré, descrita por Saad *et al.* (1997b)

Do exposto, conclui-se que, apesar das várias pesquisas realizadas sobre o assunto, a literatura nacional ainda carece de estudos comunitários sistematizados a respeito da deficiência de G-6-PD, nos quais os objetivos científicos da Genética Comunitária sejam atingidos, incluindo aqui os aspectos genético-epidemiológicos, moleculares, demográficos, sociais, psicológicos, éticos e culturais, mencionados no início desta introdução.

Considerando que a deficiência de G-6-PD, além do seu aspecto médico, é um importante marcador genético de raças e populações, ela também constitui um elemento precioso para o estudo da composição genética das comunidades do interior de São Paulo, que foram incorporando ao longo da sua história, povos das mais diferentes origens, com diversos graus de miscigenação. Até o momento, não dispomos de nenhuma informação, por exemplo, a respeito da prevalência da variante Mediterrânea de G-6-Pd nessas comunidades paulistas.

OBJETIVOS

II – Objetivos

A presente tese teve por objetivo geral o estudo da deficiência de G-6-PD em uma comunidade brasileira, obedecendo os aspectos científicos e pragmáticos da Genética Comunitária, delineados por Ten Kate (1998). Assim sendo, o trabalho tem os seguintes objetivos específicos:

- 1- Implantar e avaliar um programa de diagnóstico e orientação genética da deficiência de G-6-PD em uma comunidade do interior do Estado de São Paulo;
- 2- Estudar a fertilidade das heterozigotas do gene da deficiência de G-6-PD;
- 3- Caracterizar molecularmente as mutações do gene da G-6-PD encontradas na comunidade;
- 4- Avaliar o custo de implantação do programa comunitário no Núcleo de Hematologia e Hemoterapia da Universidade São Francisco;
- 5- Implantar, no Setor de Hematologia Clínica e Laboratorial da Universidade São Francisco, um serviço de diagnóstico e orientação sobre a deficiência de G-6-PD, capaz de prestar serviços permanentes à comunidade, mesmo após a conclusão do presente trabalho.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

III - Casuística e Métodos

O presente projeto foi elaborado de acordo com os artigos 122 a 130 do capítulo XII (Pesquisa Médica) do Código de Ética Médica do Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo (CREMESP, 1988). Assim, todos os indivíduos examinados participaram voluntariamente da pesquisa, após esclarecimento a respeito dos objetivos e consentimento. A pesquisa visou a proteção da Saúde Pública da comunidade, sem qualquer conotação financeira (todos os exames foram realizados gratuitamente), política, racial ou eugênica. Todos os indivíduos examinados foram beneficiados pela pesquisa, recebendo os resultados dos exames e, sempre que aceita, a orientação genética.

Além disso, o projeto recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da USF (anexo 1).

O trabalho teve início em 1995 e finalizou-se em 1997. Durante 36 meses foram rastreados, com relação à deficiência de G-6-PD, 4621 doadores de sangue do sexo masculino atendidos no Setor de Hematologia Clínica e Laboratorial, vinculado à Hemo-Rede (Rede Estadual de Hematologia e Hemoterapia do Estado de São Paulo) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade São Francisco, em Bragança Paulista, SP. A análise molecular foi realizada em 70 indivíduos não consangüíneos, cuja deficiência de G-6-PD havia sido comprovada por exames bioquímicos.

O programa foi dividido em duas fases, a saber :

III.1 - Fase I : Triagem populacional, comprovação diagnóstica, orientação, avaliação genética e estudo da fertilidade das heterozigotas

De cada indivíduo examinado foi colhida, mediante a utilização de seringas e agulhas descartáveis, uma amostra de 5 mL de sangue venoso, utilizando-se EDTA (sal dissódico de ácido etilenodinitrotetracético) como anticoagulante, para realização dos seguintes exames:

A - Teste de triagem

Foi utilizado o teste de Brewer (teste de redução da metemoglobina) para triagem da deficiência de G-6-PD. Este método baseia-se no princípio de que a hemoglobina, de cor avermelhada, quando oxidada transforma-se em metemoglobina, de cor acastanhada. No entanto, na presença da G-6-PD, esta oxidação pode ser revertida pela adição de azul de metileno. Para execução desta técnica adicionou-se 1 mL de sangue total coletado em EDTA 10% a três tubos de ensaio identificados pelas letras A, B e C (A= tubo que indicava cor de normais, B= tubo que indicava cor de deficientes e C= tubo teste). Adicionou-se 0,05 mL de solução de nitrito de sódio/glicose (5g de glicose e 1,25g de nitrito de sódio em 100 mL de água destilada) nos tubos B e C, e 0,05 mL de cloreto de azul de metileno (150 g de cloreto de azul de metileno tri-hidratado em 1000 mL de água destilada) ao tubo C. Após homogeneização da mistura incubou-se os tubos em banho Maria a 37°C^o por 3 horas. Transferiu-se 0,1 mL dos tubos A, B e C para outros tubos contendo 10 mL de H₂O destilada. Após hemólise a cor do tubo C (tubo teste) foi comparada visualmente com as dos tubos A e B. Os casos em que a cor do tubo C foi igual a cor de A (vermelho claro)

foram considerados normais. Os casos em que a cor foi igual a B (marrom acastanhado) foram considerados deficientes de G-6-PD.

B - Exames bioquímicos para comprovação da deficiência de G-6-PD

B.1 - Quantificação de G-6-PD

A medida da atividade de G-6-PD foi realizada segundo a técnica descrita por Beutler (1983). O hemolisado foi preparado adicionando-se hemácias a uma solução estabilizadora contendo 10 μM de NADP, 7mM de β -mercaptoetanol e 2,7 mM de EDTA sódico pH = 7,0, numa proporção de hemácias para solução estabilizadora de 1:19. Após homogeneização do material e hemólise por congelamento e aquecimento mediu-se a quantidade de hemoglobina presente no hemolisado.

A quantificação da G-6-PD foi realizada utilizando-se dois tubos contendo, em cada um, 580 μL de água deionizada; 100 μL de NADP; 100 μL de tampão tris-HCL 1,0 M pH 8,0 e 100 μL de MgCl_2 0,1M. Adicionou-se 20 μL do hemolisado em cada tubo e incubou-se a 37° C por 10 minutos. Em seguida colocou-se 100 μL de G-6-PD mM no tubo da amostra e 100 μL de água deionizada no tubo branco. Leu-se a densidade óptica a 37° C durante 10 minutos, em cubetas com percurso óptico de 1cm, em comprimento de onda de 340nm.

O cálculo dos resultados foi realizado obedecendo a seguinte equação :

$$\text{Atividade (UI)/g Hb} = \frac{\Delta \text{ Abs./ (minutos) . } 10^5}{6,22.(\text{Hb}) (\text{vol. enzima})}$$

Δ **Abs. /minutos** = Diferença de densidade óptica ou absorvância por minuto com a leitura dos 5 primeiros minutos após estabilização da solução.

Hb. = Hemoglobina do hemolisado em g/dL.

Vol. Enzima = volume de hemolisado colocado nos tubos da amostra e do branco.

Valor de referência para G-6-PD : 10,01 a 14,19 UI (Beutler, 1972).

B.2 - Eletroforese de G-6-PD

A eletroforese foi realizada em acetato de celulose, pH = 9,0 conforme Sparks *et al.*, (1969), com algumas modificações. O hemolisado foi preparado utilizando-se 2 gotas de hemácias lavadas, 2 gotas de água destilada e 2 gotas de tetracloreto de carbono. Centrifugou-se por 10 minutos a 2.000 rpm. Aplicou-se o sobrenadante obtido no hemolisado sobre a fita de acetato (as fitas de acetato foram imersas previamente, durante 10 minutos em 50 mL de tampão tris-HCl-borato pH = 9,0 e 2,5 mg de NADP). Procedeu-se então à corrida eletroforética por 50 minutos em voltagem de 220 volts (0 – 25 MA), com o mesmo tampão. Em uma mesma fita de eletroforese, além do hemolisado do paciente, foi aplicado um controle normal.

Cerca de 20 minutos antes do término da corrida foi preparada outra fita para ser utilizada na coloração. Essa fita foi imersa por alguns minutos em solução corante (9,4 mL de tampão tris-HCL 0,1 M pH = 8,0; 4 mg de NADP; 10 mg de G-6-PD; 2 mg de MTT ; 0,6 mg de fenazina metassulfato) recém-preparada. Retirou-se o excesso de corante e esta fita foi colocada numa cuba fechada, sob a fita onde a eletroforese foi realizada. Após incubação à temperatura ambiente, no escuro e por 15 minutos, foi realizada a leitura, classificando-se a enzima de acordo com a mobilidade eletroforética em normal, rápida ou lenta. O esquema apresentado na Figura 3 mostra as posições da variantes de G-6-PD A⁻, A⁺ e de uma heterozigota AB, em relação à G-6-PD normal B.

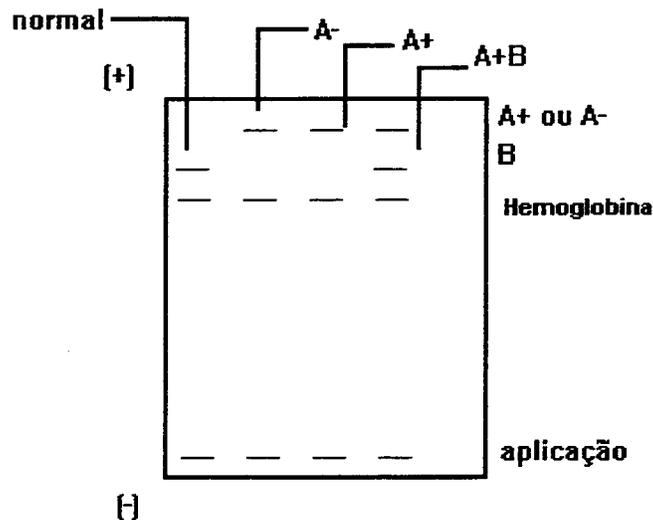


Figura 3 – Esquema da eletroforese de G-6-PD. Representação de um indivíduo normal $Gd^+ B$, de um deficiente de G-6-PD A^- , de um indivíduo com a variante A^+ e de uma heterozigota AB .

Por meio da eletroforese e da dosagem enzimática de G-6-PD, foi possível a caracterização bioquímica das variantes da G-6-PD quanto à sua mobilidade eletroforética e atividade enzimática nos deficientes.

Uma vez diagnosticados pelos exames acima citados, os indivíduos deficientes de G-6-PD foram convidados, por carta, para orientação e, posteriormente para exame de seus parentes (anexo 2), ocasião em que se realizou uma entrevista com relação a seus ancestrais maternos e crises hemolíticas anteriores, sendo fornecida, também, uma cartilha explicativa sobre a deficiência de G-6-PD (anexo 3). Durante a entrevista cada indivíduo teve sua genealogia registrada.

Após seis meses da orientação, os deficientes de G-6-PD foram convidados para avaliação mediante nova entrevista, ocasião em que foi aplicado um questionário a fins de investigar a validade e os efeitos cognitivos e pragmáticos da orientação fornecida

(anexo 4). Nessa ocasião, foi também, oferecida a investigação da deficiência de G-6-PD e os familiares dos indivíduos diagnosticados.

A fim de estudar a fertilidade das heterozigotas da deficiência de G-6-PD, registrou-se, mediante entrevista dos doadores normais e deficientes de G-6-PD, o número total de filhos gerados (filhos vivos, falecidos e natimortos) por 58 mães de doadores deficientes de G-6-PD e por 66 mães de doadores com atividade normal dessa enzima, pertencendo os dois grupos à mesma faixa etária e nível sócio-econômico. A análise de fertilidade foi realizada pela comparação da média de filhos pelo Mann-Whitney Rank Sum Test (programa Sigma Stat 2.0 para Windows da Jandel) entre as amostras de heterozigotas e controles.

Além disso, foi elaborada uma tabela de contingência 2X2, na qual as proporções de heterozigotas e controles com número de filhos menor ou igual e maior que a média foram comparadas pelo teste X^2 (qui-quadrado), adotando-se o nível de significância de 5% ($\alpha = 0.05$).

III.2 - Fase II - Caracterização molecular das mutações

A análise molecular do gene da G-6-PD foi realizada em 70 indivíduos portadores da deficiência desta enzima, diagnosticados através dos exames citados na Fase I. Para esses indivíduos foram desenvolvidos os seguintes procedimentos:

A - Extração do DNA

O DNA genômico foi isolado a partir de 20 mL de sangue venoso coletado em

EDTA 10% (Maniatis *et al.*, 1989). Inicialmente, procedeu-se à centrifugação do sangue a 2.500 rpm por 15 minutos. Descartado o plasma adicionou-se, para lise das hemácias, a solução de NH_4Cl 0,144 M (cloreto de amônio) num volume 5 vezes maior que o de células e a solução de NH_4HCO_3 0,001 M (bicarbonato de amônio) num volume correspondente a 50% do volume de células. A solução foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente e em seguida centrifugada por 15 minutos a 2.500 rpm a 4° C. Repetiu-se esta etapa até a obtenção de um precipitado de leucócitos livre de hemácias.

Os leucócitos foram então dissolvidos em 10 mL de tampão contendo NaCl 0,3M, EDTA 10 mM, tris/HCl pH 7,5 10 mM, uréia 7 M e SDS (duodecil sulfato de sódio 0,5%), e incubada por cerca de 18 h a 37°C. Após a incubação foram realizadas três extrações com igual volume de mistura contendo fenol (redesilado e saturado em tris/HCl pH 8,0, 0,2 mM contendo 0,1 de hidroxiquinolina), clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1. Cada extração foi seguida por centrifugação a 5.000 rpm durante 15 minutos. Ao final, a camada contendo DNA foi transferida para um novo tubo e realizada nova extração com clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1. Para precipitação do DNA foi utilizado etanol absoluto gelado (2,5 vezes o volume) e acetato de sódio 3 M (10% do volume).

O DNA precipitado foi lavado em etanol 70% para eliminar os resíduos de fenol e sal e posteriormente diluído em água estéril. A concentração do DNA foi determinada em espectrofotômetro pela leitura das densidades ópticas nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm em luz ultravioleta (Maniatis *et al.*, 1989)

B - Amplificação de DNA pela reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e digestão com enzimas de restrição

As amostras de DNA foram amplificadas pela reação de polimerase (PCR) (Saiki

et al., 1985). Aqueles indivíduos com deficiência de G-6-PD detectada por testes de rastreamento ou manifestações clínicas, nos quais a quantificação e eletroforese da enzima foi compatível com a variante A⁻ ou Mediterrânea, tiveram os exons 4 e 6 do gene da G-6-PD amplificados e submetidos à digestão pelas enzimas Nla III e Mbo II, respectivamente. O exon 9 foi amplificado para ser submetido à técnica de SSCP, que será discutida posteriormente.

B.1 - Amplificação de DNA pela reação em Cadeia da Polimerase (PCR) :

As reações foram realizadas num volume total de 50 µL contendo 500 ng de DNA genômico, 10 mM de tris/HCl pH 8,5, 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM KCl, 1,0 mM de deoxi-nucleotídeo trifosfato (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 50 ng de cada iniciador e 2 U de Taq DNA polimerase. Acrescentou-se à reação 10% de dimetilsulfóxido para amplificação dos exons 3 e 4. As amostras foram desnaturadas inicialmente por 5 minutos a 94°C e em seguida submetidas a 35 ciclos de amplificação com desnaturação de 1 minuto a 94°C, anelamento de 1 minuto a 55°C, e alongamento a 72°C por 30 segundos a 2 minutos dependendo do tamanho do fragmento a ser amplificado (exons 3 e 4 = 320 pb., exons 6 e 7 = 542 pb. e exon 9 = 253 pb.). As reações foram realizadas em um ciclador automático de temperatura (*Perkin Elmer, Cetus Corp, Boston, MA, USA*). As regiões amplificadas, assim como os iniciadores utilizados encontram-se na figura 4. O material amplificado foi separado em gel de agarose a 1% e então visualizado sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio (Figuras 5, 6 e 7), onde o marcador de peso molecular é representado por ϕ X/Hae III.

1 2 3 4 5 6 7 8 9

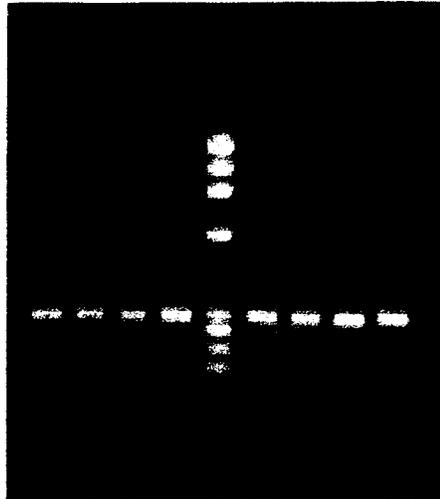


Figura 5 – Produtos de PCR amplificados com iniciadores n e P4 (exons 3 e 4) com fragmento de 320 pb nos poços de 1 a 4 e 6 a 7. - ϕ X/Hae III no poço 5.

1 2

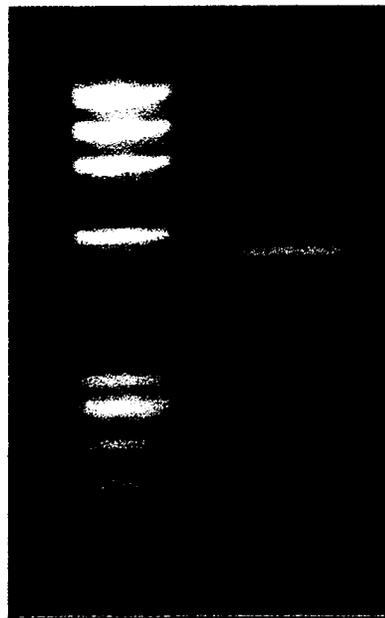


Figura 6 - ϕ X/Hae III no poço 1. - Produto de PCR amplificado com iniciadores B e J (exons 6 e 7) com fragmento de 542 pb no poço 2 .

1 2 3 4 5 6 7 8

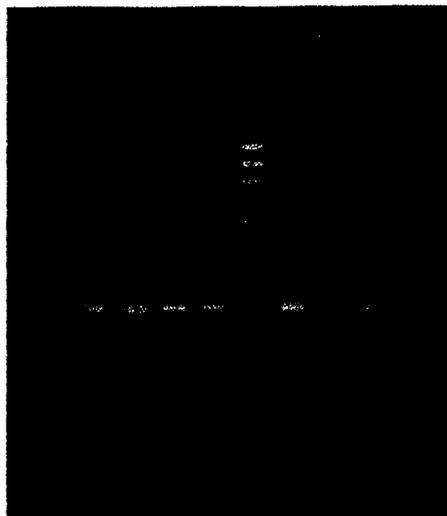


Figura 7 – Produtos de PCR amplificados com iniciadores D e R (exon 9) com fragmento de 253 pb nos poços de 1 a 4 e 6 a 8. ϕ X/Hae III no poço 5 .

B.2 - Digestão com enzimas de restrição :

Após a amplificação dos exons 3 e 4, procedeu-se à digestão dos fragmentos utilizando-se a seguinte reação : 10 μ L de PCR, 1,5 μ L de tampão (50 mM de acetato de potássio, 20 mM de tris-acetato, 10 mM de acetato de magnésio, 1 mM de ditrioteitol – pH = 7,9), 1,5 μ L de BSA e 10 U/ μ L de Nla III. Essas reações foram incubadas a 37°C por cerca de 2 h. Quanto aos exons 6 e 7, após a amplificação a digestão dos fragmentos foi realizada da seguinte forma : 18,5 μ L de PCR, 2,5 μ L de tampão (50 mM de cloreto de sódio, 10 mM de tris-HCl, 10 mM de cloreto de magnésio, 1 mM de ditrioteitol – pH = 7,9) e 20 U/ μ L de Mbo II com incubação por 2 h a 37°C. Os

fragmentos digeridos foram separados em gel de agarose a 2,5% e então visualizados sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio.

C - SSCP (Single Strand Conformation Polimorphism)

Quando a mutação não foi detectada pelo método acima descrito, foi levada a efeito a análise de polimorfismo de conformação em hélice simples (SSCP- Single Strand Conformation Polimorphism).

A análise do SSCP foi realizada de acordo com Orita *et. al.* (1989), com algumas modificações. Como dito anteriormente, a combinação de iniciadores utilizada para amplificação do exon 9 foi D + R. O produto amplificado por PCR foi diluído em uma solução de formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05% na proporção 1:4, e posteriormente desnaturado a 80-100°C por 5 minutos. Dessa solução aplicou-se 1 mL em gel com auxílio de um aparato apropriado. A análise do SSCP foi realizada no sistema de eletroforese *PhastSystem Pharmacia (Pharmacia, Sollentuna, Sweeden)*. As condições de eletroforese foram 25V por 2 h a 15°C. Os fragmentos de DNA foram visualizados pela coloração do gel de prata que consistiu em banhos consecutivos em ácido tricloroacético 20% por 5 minutos a 20° C, glutaraldeído a 5% por 5 minutos a 50°C, água por 2 minutos a 50 °C (duas lavagens), AgNO₃ 0,4% por 8 minutos a 40°C, duas novas lavagens com água, porém por 30 segundos cada a 30°C, Na₂CO₃ 2,5% e formaldeído 0,013% por 4 minutos a 30°C, ácido acético 5% por 2 minutos a 50°C. A análise por SSCP permitiu a seleção de amostras para o seqüenciamento direto.

III. 3 - Indicadores utilizados para a avaliação do programa comunitário

A avaliação do programa comunitário realizou-se segundo os seguintes indicadores distribuídos em Fases I e II :

Fase I :

- Índice de positividade dos deficientes de G-6-PD na fase de triagem e número de deficientes diagnosticados através do teste de redução da metemoglobina (teste de Brewer) comparados com o número de casos confirmados pela eletroforese de G-6-PD e ensaio enzimático;
- Taxa de aceitação e recusa à orientação genética por parte dos doadores deficientes de G-6-PD;
- Porcentagem de doadores deficientes de G-6-PD que trouxeram seus parentes para exame;
- Número médio de pessoas examinadas a partir dos casos – índice;
- Índice de positividade de deficientes de G-6-PD entre os parentes dos doadores;
- Índice de positividade de deficientes de G-6-PD na amostra total;
- Nível de assimilação da orientação fornecida e opinião dos doadores sobre a utilidade da orientação;
- Número médio de filhos viáveis das mães dos deficientes de G-6-PD, comparado com grupo controle (mães dos doadores com atividade enzimática normal).
- Custo de implantação do programa comunitário no Núcleo de Hematologia e Hemoterapia da Universidade São Francisco :

O custo do programa foi calculado com base na Fase I, uma vez que a caracterização molecular das mutações, realizada no Laboratório de Biologia Molecular da

Disciplina de Hematologia e do Hemocentro da UNICAMP, sob a orientação da Prof.a. Dra. Sara T. O. Saad, atendeu a um objetivo científico do projeto que não é indispensável em um programa assistencial comunitário de diagnóstico e orientação de deficientes de G-6-PD.

Para a realização da Fase I do programa, não foi necessária a aquisição de equipamentos laboratoriais ou a contratação de funcionários, uma vez que foram utilizados os recursos materiais e humanos já disponíveis na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade São Francisco. Assim sendo, o custo do programa baseou-se praticamente na aquisição de material de consumo utilizado na fase de triagem e na comprovação bioquímica do diagnóstico da deficiência de G-6-PD nos indivíduos triados e seus familiares.

Evidentemente, também não foram computados os gastos com pessoal, equipamentos e outras despesas, como as de correspondência, impressão de cartilhas, etc., considerando que a pesquisa utilizou a infra-estrutura material e humana de uma universidade. Como veremos na Discussão, no entanto, encerrada a fase de pesquisa, essas despesas devem ser consideradas na manutenção do programa comunitário.

Fase II :

- Número de deficientes com mutação nos exons 4 e 6 e número e tipo de mutações detectadas por SSCP.

RESULTADOS

IV – Resultados

Fase I – Triagem populacional, comprovação diagnóstica, orientação , avaliação genética e estudo da fertilidade das heterozigotas

A – Eficiência do teste de triagem

A.1 - Índice de positividade dos deficientes de G-6-PD (número de deficientes diagnosticados através do teste de redução da metemoglobina - Teste de Brewer, comparado com o número de casos confirmados pela eletroforese de G-6-PD e ensaio enzimático).

Foram detectados pelo método de Brewer 85 deficientes de G-6-PD. No entanto, após a realização da dosagem enzimática quantitativa e da eletroforese da G-6-PD, foram confirmados 80 casos. Assim, o índice de positividade na amostra de doadores foi de 80/4621 (1,7%). Quanto ao teste de Brewer, uma vez que em 5 casos ocorreram resultados falsamente positivos, é possível estimar a porcentagem de erro no teste de triagem utilizado em 5/85, ou seja, cerca de 6%.

B – Viabilidade e eficiência da orientação genética

B.1 - Taxa de aceitação e recusa à orientação genética por parte dos doadores deficientes de G-6-PD

Dos 80 doadores deficientes de G-6-PD, 13 não foram encontrados, tendo as cartas que lhes foram destinadas sido devolvidas pelo serviço de correio e não constando em suas fichas telefone para contato. Assim sendo, 67 doadores de sangue receberam a

carta convite para orientação genética, dos quais 41 compareceram à entrevista agendada. Logo, as taxas de aceitação e de recusa à orientação genética podem ser expressas como se segue :

Taxa de aceitação : $41/67 = 61\%$

Taxa de recusa : $26/67 = 39\%$

B.2 - Porcentagem de doadores deficientes de G-6-PD que trouxeram seus parentes para exame.

Dos 41 doadores que compareceram à orientação genética, apenas 16 trouxeram seus familiares para realizarem a investigação da deficiência de G-6-PD. Logo, as taxas de aceitação e recusa aos exames pelos familiares dos deficientes de G-6-PD podem ser assim expressas :

Taxa de aceitação : $16/41 = 39\%$

Taxa de recusa : $25/41 = 61\%$

B.3 - Número médio de pessoas examinadas a partir dos casos - índice.

Foram examinados 34 familiares de deficientes de G-6-PD, o que permite calcular o seguinte número médio de pessoas examinadas a partir de cada caso - índice :

$N = 34/16 = 2,12$

B.4 - Índice de positividade de deficientes de G-6-PD entre os parentes dos doadores.

Dentre os familiares examinados, foi diagnosticado mais 1 indivíduo deficiente de G-6-PD e 9 heterozigotas. Assim sendo, os índices de positividade entre os parentes dos deficientes de G-6-PD são os seguintes :

Deficientes de G-6-PD : $1/34 = 3\%$
Heterozigotas (portadoras) : $9/34 = 26\%$
Total : $10/34 = 29\%$

É importante ressaltar que as heterozigotas do gene da deficiência de G-6-PD, embora geralmente não corram o risco de manifestar crise hemolítica, são importantes para fins de orientação genética, pois os seus filhos do sexo masculino correm o risco de 50% de serem deficientes de G-6-PD.

B.5 - Índice de positividade de deficientes de G-6-PD na amostra total.

Conforme dados apontados nos índices anteriores, verifica-se que foram detectados 80 doadores de sangue deficientes de G-6-PD nos 4621 exames de rastreamento e 1 deficiente entre os 34 parentes dos doadores examinados. Portanto, o índice proposto neste tópico pode ser assim expresso :

Índice de positividade na amostra total : $81/4655 = 1,74\%$

B.6 - Validade dos efeitos cognitivos e pragmáticos da orientação genética fornecida.

Neste item foram avaliados os 16 doadores que compareceram para análise dos efeitos cognitivos e pragmáticos da orientação genética fornecida . Conforme o anexo 4, o questionário aplicado permitiu a verificação de dois aspectos :

B.6.1- Nível de assimilação da orientação fornecida (Parte II)

B.6.2- Opinião dos doadores sobre a utilidade da orientação (Parte I)

Os critérios de avaliação usados na classificação dos resultados podem ser assim resumidos: quanto á assimilação da orientação genética fornecida em um total de 5 questões da parte II do questionário, foi estabelecida uma relação entre o número de acertos e os conceitos atribuídos; 5 corretas = excelente, 4 corretas = bom , 3 corretas = regular, 2 corretas = ruim e 1 correta ou nenhuma = nulo. Foram considerados como **Satisfatórios** os conceitos excelente, bom e regular e como **Insatisfatórios** os conceitos ruim e nulo.

Assim, os resultados são expressos como se segue :

B.6.1 - Nível de assimilação da orientação fornecida:

<p>Satisfatórios: 13/16 = 81% (sendo 5 excelente,5 bom e 3 regular)</p> <p>Insatisfatório: 3/16 = 19% (sendo 2 ruim e 1 nulo – 1 correta)</p>

B.6.2 - Opinião dos doadores sobre a utilidade da orientação

A opinião dos doadores sobre a utilidade da orientação pode ser resumida na Tabela 3, onde as palavras chave da parte I do questionário estão numeradas e o número de doadores que responderam às possíveis opções encontra-se entre parênteses. O grau de escolaridade desses doadores, sem levar em conta a conclusão ou não, era o seguinte: 2º grau (8), 1º grau (7) e analfabeto (1).

Tabela 3 - Opinião dos doadores sobre a utilidade da orientação genética fornecida.

1 - Serviu para esclarecimento	Sim (16/16 = 100%)
2 - O recebimento de documento foi útil	Sim (16/16 = 100%)
3 - Possui o documento	Sim (15/16 = 93,75%)
4 - Mudou algo em sua vida	Sim (11/16 = 68,75%)

C - Fertilidade diferencial das heterozigotas do gene da deficiência de G-6-PD

C.1 - Número médio de filhos viáveis das mães dos deficientes de G-6-PD comparado com grupo controle (mães dos doadores com atividade enzimática normal).

Em 58 mães de deficientes de G-6-PD, verificou-se que o número total de filhos era igual a 328, enquanto que no grupo controle, de 66 mães de doadores com atividade enzimática normal, foram registrados 343 filhos. Assim, o número médio de filhos foi calculado conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Número médio de filhos calculados a partir de mães de doadores deficientes e de mães de doadores normais.

Mães	Filhos	N.º médio de filhos
Mães de doadores deficientes (n=58)	328	328/58 = 5,655
Mães de doadores normais (n=66)	409	409/66 = 6,196
Total (n=124)	737	737/124= 5,943

Fazendo-se a comparação de médias pelo teste *Mann-Whitney (Mann-Whitney Rank Sum test)* é possível constatar que não existe diferença significativa entre a média de filhos das heterozigotas e controles ($p = 0,176$).

C.2 – Proporção de heterozigotas e controles com número de filhos menor ou igual e superior à média.

Na Tabela 5 comparou-se o tamanho da prole das heterozigotas e do grupo controle.

Tabela 5 – Tamanho da prole das heterozigotas e controles.

Mães / N.º filhos	Heterozigotas	Controles	Total
Até 5	35	40	75
Mais que 5	23	26	49
Total	58	66	124

Com os dados dessa tabela constata-se que o tamanho da prole não diferiu significativamente entre as heterozigotas e controles ($X^2 = 0,0238$; GL = 1; $p = 0,877$).

D – Custo de implantação do programa comunitário no Núcleo de Hematologia e Hemoterapia da Universidade São Francisco.

Tomando por base o preço dos reagentes utilizados, bem como o número de exames realizados, pôde-se estimar as seguintes relações custo/benefício para implantar o programa :

<p style="text-align: center;">Triagem:</p> <p>Custo dos reagentes = US\$ 49,95 N.º de exames realizados = 4655 (4621 doadores + 32 familiares) Custo individual = US\$ 0,011</p> <p style="text-align: center;">Confirmação diagnóstica</p> <p>Custo dos reagentes = US\$ 767,00 N.º de exames realizados = 95 (85 doadores + 10 familiares) Custo individual = US\$ 8,07</p> <p style="text-align: center;">Custo total de implantação</p> <p>Custo total dos reagentes = US\$ 816,95 N.º de exames realizados = 4750 Custo individual = US\$ 0,172</p>
--

O anexo 5 traz o orçamento realizado em 1995, cujas cotações encontram-se em dólar. Os itens de 1 a 4 são os reagentes da triagem, enquanto os demais foram utilizados para a confirmação diagnóstica.

Fase II - Caracterização molecular das mutações

A caracterização molecular das mutações demonstrou os seguintes resultados:

Mutação no exon 4 (Variante A -, 202 G → A) : 69/70 = 98,57%

Mutação no exon 6 (Variante Mediterrânea) = 0%

Outras mutações : 1/70 = 1,43%

A caracterização da variante A⁻ (202 G → A) de algumas amostras, pode ser observada na Figura 8, onde os exons 3 e 4, após terem sido amplificados por PCR fornecendo um fragmento de 320 pb, foram submetidos a digestão com a enzima de restrição Nla III. A mutação 202 G → A cria um sítio de restrição para essa enzima e, em sendo assim, nos casos positivos pode-se verificar dois fragmentos resultantes da referida digestão: um de 213 pb e o outro de 97 pb. Para os casos negativos, não existe sítio de restrição para a enzima Nla III, assim o resultado da digestão seria o fragmento amplificado de 320 pb.

A mutação no exon 6, responsável pela variante mediterrânea, não foi encontrada em nenhum dos doadores investigados. No entanto, uma outra mutação, cuja variante ainda não foi caracterizada, revelou estar presente no exon 9 do gene da G-6-PD. A determinação dessa mutação no exon 9 foi possível a partir da análise do polimorfismo de conformação em hélice simples (SSCP) desse exon, cujos resultados encontram-se na Figura 9. Note-se nessa figura que o poço 1 mostra a conformação em hélice simples de um controle negativo - B para G-6-PD, enquanto no poço 2 é possível se verificar a conformação em hélice simples da mutação a ser caracterizada.

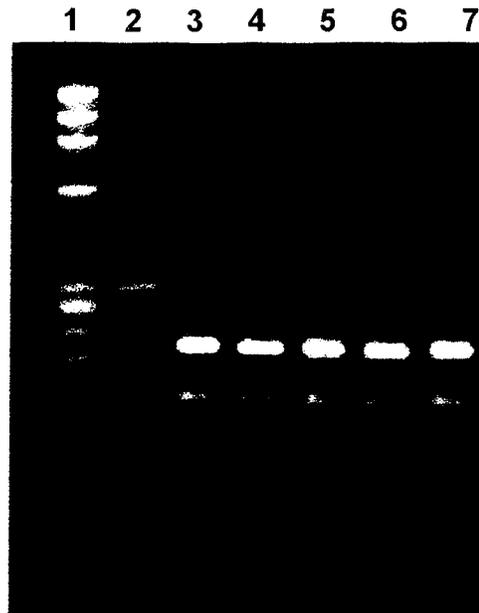


Figura 8 : - ϕ X/Hae III no poço 1; Produto de PCR amplificado com iniciadores n e P4 (exons 3 e 4) fragmento de 320 pb no poço 2 ; Produtos digeridos com a enzima Nla III apresentando fragmentos de 213 e 97 pb nos poços 3 a 7 onde a mutação 202 G→A esteve presente.



Figura 9 : - SSCP de produtos de PCR amplificados com iniciadores D e R (exon 9) nos poços 1 e 2 , sendo no poço 1 – Controle negativo e no poço 2 a amostra da mutação mais rara.

DISCUSSÃO

V- Discussão

O primeiro aspecto a ser discutido em relação ao presente trabalho diz respeito à abordagem da comunidade a partir dos doadores de sangue. Outros grupos de indivíduos poderiam também ter sido escolhidos, tais como os estudantes, recrutas do serviço militar, recém-nascidos, etc., porém os doadores de sangue apresentam várias conveniências de ordem prática, tais como:

- a) preponderância de indivíduos do sexo masculino, o que favorece a triagem de uma condição de herança recessiva ligada ao cromossomo X ;
- b) os indivíduos submetidos à triagem já estão colhendo voluntariamente amostras de sangue;
- c) o atual processo de doação de sangue realizado nos Hemocentros favorece a heterogeneidade racial e sócio - econômica dos doadores;
- d) a doação de sangue ocorre de forma contínua durante todo o ano, permitindo um fluxo igualmente contínuo de triagem;
- e) a identificação dos doadores deficientes de G-6-PD é recomendada em hemoterapia, o que justifica a triagem sistemática desses indivíduos do ponto de vista da ética médica.

É importante esclarecer que o atual sistema de doação de sangue, voluntário e não remunerado, mudou o perfil social do doador, que não pertence mais quase que exclusivamente às classes sócio-econômicas menos privilegiadas, como acontecia há alguns anos atrás. De fato, em um extenso levantamento realizado por Paiva e Silva e Ramalho (1997) no Hemocentro da UNICAMP, constatou-se que o altruísmo é o maior motivador da doação de sangue, pertencendo os doadores a diversas classes sócio-

econômicas, com preponderância das classes médias e média – baixa. No entanto, como o Núcleo de Hematologia e Hemoterapia da USF é o único “banco de sangue” da cidade de Bragança Paulista, mesmo as classes economicamente mais privilegiadas têm que recorrer a ele. Pode-se dizer, portanto, que a amostragem de doadores de sangue representa satisfatoriamente a comunidade da região de Bragança Paulista, embora alguns dos seus componentes (como a colônia japonesa, por exemplo) não estejam perfeitamente representados.

A pesquisa rotineira da atividade de G-6-PD durante a relação de doadores de sangue é duplamente útil, pois permite a identificação dos indivíduos deficientes, bem como evita a transfusão de hemácias com essa enzimopenia a pacientes expostos ao riscos de uma crise hemolítica, dependendo da medicação a eles ministrada (Ramalho e Beiguelman, 1976; Ramalho, 1979). De fato, apesar da sobrevivência das hemácias com deficiência de G-6-PD ser, em condições normais, de 80 a 100 dias (Brewer *et al.*, 1961; Bernini *et al.*, 1964), se o receptor ingerir uma das drogas mencionadas na Tabela 2 (página15), poderá ocorrer uma rápida destruição das células deficientes (Pannacciulli *et al.*, 1965; Mollison, 1974). Além disso, existem evidências de diminuição da viabilidade das hemácias deficientes de G-6-PD durante a estocagem do sangue (Orlina *et al.*, 1970).

A contra-indicação do emprego de sangue de doadores deficientes de G-6-PD em transfusões é, no entanto, bastante controversa na literatura especializada. De fato, enquanto alguns autores, como Beutler (1981), por exemplo, não fazem restrições sérias a esse tipo de transfusão, a não ser em algumas situações especiais, outros autores, como Mollison (1974), a contra-indicam formalmente. Como foi mencionado na parte introdutória do presente trabalho, Ramalho *et al.* (1985b) não encontraram aumento de reações pós-transfusionais em 29 receptores que haviam sido transfundidos com sangues

com a variante A⁻ de G-6-PD. Como comentam esses autores, no entanto, a ausência de manifestações hemolíticas graves imediatamente após a transfusão de sangue com a variante A⁻ de G-6-PD não exclui a possibilidade da ocorrência de outras reações indesejadas, tais como a hemólise sub-clínica e a diminuição da vida média das hemácias deficientes transfundidas. Além disso, não é possível afastar totalmente a possibilidade do aparecimento de reações pós-transfusionais importantes em casos esporádicos de transfusão de sangues deficientes de G-6-PD, sobretudo se o doador possuir a variante Mediterrânea ou outra variante grave da enzima.

Do ponto de vista da triagem populacional, os doadores de sangue mostraram-se adequados, tendo sido possível examinar 4.621 indivíduos do sexo masculino no período de 36 meses (média mensal de 128 indivíduos), identificando-se 80 famílias com a deficiência de G-6-PD na comunidade. Para uma população de 110.000 habitantes, tais cifras são adequadas do ponto de vista da Genética de Comunidade.

A triagem da deficiência de G-6-PD em doadores de sangue mostrou-se mais eficiente do que a triagem de hemoglobinopatias hereditárias em estudantes de primeiro e segundo graus realizada na mesma comunidade (Compri *et al.*, 1996). De fato, embora 2.074 estudantes tenham sido convidados para a investigação de hemoglobinopatias, através de cartas explicativas enviadas aos seus pais ou responsáveis, apenas 1.118 (54%) participaram da triagem, realizada em um período de 24 meses, o que equivale a uma média de apenas 47 indivíduos triados por mês. Em 21% dos casos, os pais dos estudantes não forneceram qualquer resposta ou justificativa à carta – convite. Já dentre os 25% dos casos que responderam negativamente, as justificativas mais freqüentes foram as de que a criança havia feito exame de sangue recentemente (50%), que a criança era saudável e não precisava ser submetida a exame de sangue (23%), que a criança tinha

medo da punção venosa ou desmaiava (13%), risco de contaminação (8%) e outros (6%). Um fator cultural (religião) foi o responsável por apenas 0,4% das negativas. Esses dados demonstram que a comunidade de Bragança Paulista, e possivelmente outras comunidades paulistas, é pouco receptiva ao processo de triagem em crianças, sobretudo quando tal processo exige a punção venosa.

A triagem de doadores de sangue também apresenta, no entanto, alguns fatores desfavoráveis. O primeiro deles diz respeito ao fato de os homens brasileiros serem menos receptivos à orientação genética do que as mulheres (Teixeira e Ramalho, 1994; Paiva e Silva e Ramalho, 1997). O outro fator desfavorável relaciona-se ao fato de a maioria dos doadores de sangue de uma comunidade serem “doadores habituais” (Paiva e Silva, 1995). Assim sendo, após algum tempo, são praticamente os mesmos indivíduos que se apresentam para a triagem, impossibilitando que ela mantenha o mesmo nível de eficiência.

Uma opção alternativa seria a triagem de mulheres heterozigotas do gene da deficiência de G-6-PD em gestantes, uma vez que a triagem realizada no período pré-natal apresenta grandes vantagens de ordem pragmática (Teixeira e Ramalho, 1994). No caso específico da deficiência de G-6-PD, tal procedimento seria duplamente útil, pois permitiria a prevenção de alguns casos de icterícia neonatal (Garlipp e Ramalho, 1988). O empecilho ético a esse procedimento, além do aspecto psicológico, é o fato de as heterozigotas geralmente não apresentarem risco de manifestar crise hemolítica quando em contato com agentes oxidantes, não necessitando, portanto, de orientação preventiva. Outro aspecto importante a ser considerado é o da falta de garantia da eficiência dos testes de triagem usuais da deficiência G-6-PD na detecção das heterozigotas, que, em sua

maciça maioria, não são “deficientes” da enzima. Como veremos a seguir, mesmo em relação aos homens deficientes de G-6-PD, sabe-se que até os melhores testes de triagem não têm uma eficiência de 100%.

Não poderíamos concluir esta discussão a respeito da fase de triagem do trabalho sem mencionar os riscos teóricos da triagem genética. Dentre eles, Wilkie (1994) inclui os riscos de rotulação, estigmatização, invasão de privacidade, perda de auto-estima e discriminação dos indivíduos detectados como portadores de alguma alteração genética. Apesar disso, Paiva e Silva e Ramalho (1997) demonstraram que tais riscos são mínimos quando alguns princípios éticos são respeitados na triagem genética da comunidade. Dentre eles, merecem destaque o sigilo médico, a autonomia para participar ou não da triagem, da orientação genética e do estudo familiar, e a falta de conotação eugênica, racial ou financeira do programa. Evidentemente, todos esses princípios foram respeitados no presente trabalho, conforme já foi especificado no capítulo III.

Outro aspecto a ser discutido e que já foi mencionado linhas atrás, é o da eficiência do teste laboratorial de triagem empregado na pesquisa. Um dos princípios éticos fundamentais da Genética é o princípio da qualidade, que assegura que todos os testes oferecidos à comunidade devam ter especificidade e sensibilidade adequadas, sendo realizados em laboratórios capacitados e com monitoragem profissional e competente (Knoppers e Chadwick, 1994).

Vários exames laboratoriais podem ser utilizados na triagem dos deficientes de G-6-PD, como é o caso, por exemplo, do teste da redução metemoglobina (Brewer *et al.*, 1962), de descoramento do azul cresil brilhante (Motulsky e Campbell-Kraut, 1960), do ascorbato-cianeto (Jacob e Jandl, 1966) e da fluorescência (Beutler, 1966). No presente trabalho, utilizou-se o teste de redução da metemoglobina, que é considerado como um dos

mais adequados para grandes estudos populacionais, por ser extremamente simples e econômico, e utiliza reagentes de baixo custo, ou seja, nitrito de sódio, glicose e azul de metileno. Atendendo ao princípio da qualidade, os 85 indivíduos triados pelo teste de redução da metemoglobina foram submetidos à eletroforese de G-6-PD e ao ensaio enzimático quantitativo, verificando-se que 80 deles eram realmente deficientes de G-6-PD. Assim sendo, a porcentagem de casos falsamente positivos pelo teste utilizado foi de 6%, que é uma cifra aceitável para um exame de triagem. Esse resultado confirma a sugestão de Ramalho, Sena e Barretto (1985a) de que o teste de redução da metemoglobina é adequado para a triagem da deficiência de G-6-PD em indivíduos adultos. É importante ressaltar, no entanto, que esse exame pode acusar uma taxa muito alta de casos falsamente positivos, da ordem de até 45%, quando usado em recém-nascidos, sobretudo em prematuros (Bapat *et al.*, 1976; Garlipp e Ramalho, 1988). Parece desnecessário comentar, no entanto, que os casos diagnosticados por testes de triagem, mesmo em adultos, devem necessariamente ser confirmados por exames mais específicos, antes que seja oferecida a orientação genética ao indivíduo, uma vez que o diagnóstico preciso é um dos requisitos fundamentais do processo de aconselhamento genético (Ramalho *et al.*, 1996a).

Dentre os 67 deficientes de G-6-PD que possuíam endereço definido para contato postal ou telefônico, 41 (61%) aceitaram o convite para receber a orientação genética. Essa taxa de aceitação pode ser considerada satisfatória, embora menor que a teoricamente desejável. Curiosamente, ela foi igual à taxa de aceitação da orientação genética oferecida opcionalmente a portadores de hemoglobinopatias de Araras, SP (Teixeira e Ramalho, 1994) e não diferiu significativamente da taxa de aceitação de 72% observada entre doadores de sangue com o traço falciforme de Campinas, SP ($\chi^2 = 1,95$;

GL = 1; $0,10 < p < 0,20$) (Paiva e Silva e Ramalho, 1997). Essas cifras demonstram que, quando o convite para a orientação genética é feito da forma eticamente correta, a taxa de aceitação pelos indivíduos da comunidade é regularmente satisfatória, variando de 60% a 70%. Cabe aqui ressaltar que a carta-convite já deve sempre esclarecer que a alteração genética em questão é benigna, que não se trata de uma doença, mas que os esclarecimentos a seu respeito são úteis para o indivíduo (ver anexo 2). Evidentemente, se os doadores fossem simplesmente convocados para esclarecimento a respeito de uma alteração detectada em seu sangue, a porcentagem de comparecimento seria provavelmente mais alta. Tal procedimento, além de anti-ético, criaria um viés na pesquisa, apontando “taxas de aceitação” da orientação genética pela comunidade irrealis e excessivamente altas.

Durante a orientação genética, os deficientes de G-6-PD foram esclarecidos a respeito da sua condição e receberam, como comentado no item “Casuística e Métodos”, uma cartilha explicativa (anexo 3) na qual estão relacionados os principais fármacos que lhes são potencialmente prejudiciais. Como tais indivíduos foram orientados a apresentar tal documento sempre que procurassem um médico ou um serviço de saúde, a problemática da deficiência de G-6-PD passou a ser divulgada entre os clínicos da cidade, cumprindo-se assim um dos principais objetivos da Genética Comunitária, que é a educação da comunidade.

Um dos princípios básicos dos programas comunitários é o de que ele inclua alguma modalidade de avaliação dos seus efeitos (Ten Kate, 1998), uma vez que o fato de um indivíduo ter recebido a orientação genética não garante que ele tenha assimilado as informações fornecidas e as use em sua vida. Nesse sentido, dentre os deficientes de G-6-PD avaliados seis meses após o fornecimento da orientação genética, 81% deles revelaram

ter assimilado satisfatoriamente as informações fornecidas e 94% ainda traziam consigo o documento explicativo. Concordando com esse resultado, outras avaliações realizadas em nosso meio a respeito dos efeitos cognitivos e pragmáticos da orientação genética fornecida a portadores do traço talassêmico beta (Serra *et al.*, 1995) e do traço falciforme (Paiva e Silva e Ramalho, 1997) revelaram que os indivíduos geralmente assimilam satisfatoriamente as informações de caráter prático, mesmo que não memorizem adequadamente as informações de caráter acadêmico. O fornecimento de cartilhas explicativas é importante justamente por compensar, pelo menos em parte, tal deficiência na assimilação dos detalhes acadêmicos do problema genético discutido.

O processo de orientação genética dos deficientes de G-6-PD mostrou-se, no entanto, pouco eficiente no que diz respeito ao exame de outras pessoas da família. De fato, a partir dos 41 indivíduos orientados, foram examinadas apenas outras 16 pessoas, detectando-se mais um deficiente de G-6-PD e 9 heterozigotas. Esse fato não pode ser considerado surpreendente ou inesperado, uma vez que grande parte dos doadores de sangue eram solteiros, e mesmo os casados estavam conscientes de que não corriam o risco de transmitir aos filhos do sexo masculino a deficiência de G-6-PD, sendo as suas filhas heterozigotas e assintomáticas. A alta taxa de recusa a um exame oferecido em caráter opcional geralmente causa uma certa frustração aos profissionais médicos e paramédicos brasileiros que, com sua formação diretiva, alimentam, consciente ou inconscientemente, uma expectativa de um "procedimento adequado" por parte dos seus pacientes. O conceito de não - diretividade baseia-se nos princípios da autonomia pessoal e da escolha individual, que, segundo Wertz (1998), estão mais incorporados culturalmente aos povos de língua inglesa e do Norte da Europa, do que aos povos latinos. Dentro dos princípios da Genética de Comunidade, no entanto, tal resultado deve ser analisado

de forma neutra, sendo interpretado como uma decorrência das características sócio - econômicas, psicológicas e culturais da população estudada. Quanto a esse aspecto, é importante ressaltar que a deficiência de G-6-PD não é uma doença em si, mas um erro inato do metabolismo com potencial de morbidade, podendo ser classificada dentre as alterações genéticas circunstanciais. Curiosamente, a deficiência de G-6-PD é estudada pela Farmacogenética, pela Trofogenética e pela Ecogenética, uma vez que as suas reações indesejadas podem ser desencadeadas, respectivamente, por fármacos, por alimentos ou por fatores do meio ambiente. Assim sendo, ao contrário de outros programas comunitários de aconselhamento genético, voltados primariamente para a orientação reprodutiva de casais com risco de gerar crianças doentes (Ex.: hemoglobinopatias, fibrose cística, doença de Tay-Sachs, etc.), os programas de deficiência de G-6-PD estão voltados primariamente para a orientação do próprio deficiente da enzima, evitando que ele se exponha a fatores potencialmente lesivos à sua saúde. Evidentemente, é altamente desejável que outros casos da deficiência de G-6-PD sejam diagnosticados na família dos indivíduos triados (entre os seus irmãos, por exemplo), mas, na prática, isso não ocorre na proporção esperada. De fato, outros estudos realizados em populações brasileiras demonstram que os indivíduos sob orientação genética preocupam-se fundamentalmente (e quase que exclusivamente) em investigar a presença da alteração em seus filhos (Teixeira e Ramalho, 1994, Serra *et al.*, 1995; Paiva e Silva e Ramalho, 1997).

Propositadamente, deixamos para a parte final desta discussão os dois aspectos mais interessantes do ponto de vista científico da Genética de Comunidade, que são a fertilidade das heterozigotas da deficiência de G-6-PD e a caracterização molecular das mutações presentes na comunidade, ambas da maior relevância em termos genético-epidemiológicos.

Em 1960, Motulsky sugeriu que os portadores da deficiência de G-6-PD seriam mais resistentes à malária causada pelo *Plasmodium falciparum* e, desde então, essa vantagem seletiva vem sendo empregada para explicar a manutenção do polimorfismo dessa enzimopenia em diversas populações.

Mais recentemente, *Lisa et al.* (1994) retomaram a discussão desse assunto, sugerindo que as heterozigotas do gene da deficiência de G-6-PD seriam mais férteis e que a fertilidade diferencial poderia ser um mecanismo alternativo de manutenção do polimorfismo dessa condição genética. Tais autores realizaram um estudo indireto de fertilidade na Sardenha, utilizando dados demográficos de 1961. Foram analisados os dados de 52 povoações da ilha, classificados de acordo com a freqüência alta ou baixa da deficiência de G-6-PD. Os resultados obtidos apoiaram a hipótese de aumento da fertilidade média das mulheres nos locais onde a freqüência de deficientes de G-6-PD era alta. Realmente, um maior número médio de filhos por mulher e uma baixa porcentagem de mulheres casadas sem filhos foram demonstradas nas povoações com alta prevalência de deficientes de G-6-PD. Em tais locais, o número médio de filhos por mulher era 10% a 20% maior do que em áreas com baixa freqüência da enzimopenia.

Ao analisar, no entanto, o aumento de fertilidade média em locais com alta freqüência de deficientes de G-6-PD e alta incidência de malária, como é o caso da Sardenha na década de 60, dois aspectos devem ser considerados. Em primeiro lugar, a maior fertilidade pode ser realmente atribuída à maior quantidade de heterozigotas na população, as quais teriam, por razões desconhecidas, maior fertilidade. Vale a pena ressaltar que *Lisa et al.* (1964) sugeriam que não apenas as heterozigotas da deficiência de G-6-PD, mas também as heterozigotas da talassemia beta, igualmente freqüentes na ilha, teriam um aumento de fertilidade. O outro aspecto a ser considerado é o de que a

maior fertilidade também pode ser atribuída à maior quantidade de mulheres com imunidade à malária, adquirida já na infância e, conseqüentemente, com menor perda fetal por malária. De fato, o efeito de diferentes graus de malária sobre o comportamento reprodutivo já havia sido demonstrado anteriormente na Sardenha por Zei *et al.* (1990).

Para avaliar, portanto, o efeito da composição genética e dos dados epidemiológicos da malária sobre o comportamento reprodutivo nas diversas povoações sardas, Lisa *et al.* (1994) classificaram os dados de fertilidade de acordo com a frequência de heterozigotas e o nível de morbidade da malária. Assim procedendo, eles constataram um efeito combinado do fator genético e da imunidade adquirida sobre a taxa de fertilidade na Sardenha. Esse resultado indica, portanto, a necessidade de estudos diretos de comportamento reprodutivo nas famílias das heterozigotas.

O presente trabalho forneceu condições bastante propícias ao estudo desse aspecto de fertilidade diferencial das heterozigotas do gene da deficiência do G-6-PD. Em primeiro lugar, por possibilitar o estudo direto de fertilidade das heterozigotas, comparando-a com a de controles da mesma comunidade, faixa etária e nível sócio econômico e cultural. Em segundo lugar, pelo fato de Bragança Paulista não ser (e nunca ter sido) uma área endêmica de malária, o que afasta a interferência desta doença e de sua imunidade nos resultados obtidos. De fato, comparando a média de filhos das mães dos doadores deficientes de G-6-PD (obrigatoriamente heterozigotas ou, com baixa probabilidade, homozigotas deficientes) com a média de filhos das mães de doadores com atividade normal desta enzima (muito provavelmente todas homozigotas normais) não se observou diferenças estatisticamente significativa, resultado esse que não apóia a hipótese de Lisa *et al.* (1994). Da mesma forma, Ramalho (comunicação pessoal), comparando a média de filhos pelo teste *Mann-Whitney* entre 44 talassêmicas heterozigotas e 43 de suas irmãs normais, também não encontrou diferença significativa ($p=0,89$).

Teoricamente, tal diversidade de resultados poderia ser atribuída à diferença entre as variantes de G-6-PD prevalentes em Bragança Paulista (variante A⁻) e na Sardenha (variante Mediterrânea e outras). É difícil aceitar, no entanto, que a hipótese de Lisa *et al.* (1994) valha para a variante Mediterrânea de G-6-PD, mas não valha para a variante A⁻ dessa enzima, uma vez que ambas são polimórficas. Também é difícil imaginar quais mecanismos fisiológicos estariam envolvidos no aumento de fertilidade das heterozigotas de duas alterações eritrocitárias benignas tão diferentes como o traço talassêmico beta e a deficiência de G-6-PD. Outra grande crítica à hipótese de Lisa *et al.* (1994) é a deles não terem levado em consideração as diferenças ambientais (climáticas, alimentares, comportamentais, etc.) entre as povoações com freqüências altas e baixas de talassemia beta e deficiência de G-6-PD. De fato, desde a década de 50 é bastante conhecido que essas duas alterações sangüíneas são muito mais freqüentes nas zonas pantanosas baixas da Sardenha do que em suas regiões montanhosas (Carcassi *et al.*, 1967). Evidentemente, alguns hábitos (como a idade média ao casar-se, por exemplo) podem variar entre essas regiões.

Frente a este resultado, é possível concluir que a alta freqüência de deficiência de G-6-PD na comunidade de Bragança Paulista pode ser atribuída exclusivamente ao fluxo gênico recebido por sua população ao longo dos tempos, inicialmente por meio dos escravos africanos e, posteriormente, por intermédio dos imigrantes de origem ibérica e mediterrânea, conforme apresentado na parte introdutória do presente trabalho. Nesse sentido, a caracterização molecular das mutações presentes na comunidade é do maior interesse.

Conforme já foi apresentado, com os detalhes laboratoriais, nos capítulos III e IV, dentre os 70 deficientes de G-6-PD submetidos à análise molecular, 69 (98,6%)

apresentavam a variante A⁻ (202 G→A) da enzima e apenas 1 (1,4 %) apresentava uma variante mais rara, que ainda está sendo caracterizada pelo seqüenciamento direto de DNA. Os exons 4 e 6 foram inicialmente investigados na busca dessa variante mais rara, dadas as freqüências de mutações encontradas nesses exons no Brasil e a informação, por parte do doador, de que sua genitora era descendente de italianos. A digestão do exon 4 pela enzima de restrição Nla III e do exon 6 pela enzima de restrição Mbo II revelou que este deficiente de G-6-PD não possuía a variante A⁻ e nem a variante Mediterrânea da enzima. Uma vez que os resultados para estes exons foram negativos, buscou-se nos exames bioquímicos e nas informações clínicas uma possível indicação de que tipo de mutação se tratava. Assim, a atividade enzimática da G-6-PD neste doador revelou valores entre 10 e 60% do normal, a eletroforese mostrou mobilidade normal, o doador não apresentava anemia e revelou não ter sido acometido no passado por algum episódio sugestivo de hemólise (escurecimento de urina, icterícia, etc.) . Verificou-se, então que a mutação poderia ser uma das variantes da classe 3 de migração eletroforética normal (Beutler, 1990), embora as variantes pertencentes a esta classe não serem típicas das populações italianas. No entanto, na classe 3 encontra-se a variante Chatam, que por sua vez já foi encontrada em um doador de sangue do Hemocentro de Campinas (Saad *et al.*, 1997a) . Deste modo, uma vez que a mutação Chatam encontra-se no exon 9, este exon foi investigado por SSCP, revelando um polimorfismo de conformação em hélice simples, quando comparado a um controle de G-6-PD B. Assim, está sendo levado a efeito o seqüenciamento direto deste exon, a fim de se verificar se a mutação é, de fato, a Chatam. Convém relatar que outros exames como hemograma completo, urina tipo I, dosagem de haptoglobinas e bilirrubinas e pesquisa de hemossiderina foram realizados no doador e todos os resultados foram normais.

Os resultados obtidos demonstraram, portanto, que nenhum dos deficientes de G-6-PD investigados possuía a variante Mediterrânea da enzima. Tal resultado permite algumas especulações interessantes, do ponto de vista genético–epidemiológico, a respeito da deficiência de G-6-PD na comunidade. Em primeiro lugar, contraria a suposição de que os estudos moleculares realizados em comunidades pequenas ou médias do interior do Estado de São Paulo encontrariam proporções da variante Mediterrânea de G-6-PD superiores às observadas em estudos realizados em grande centros urbanos, como é o caso, por exemplo, da cidade de Campinas, nos quais, pelo seu caráter cosmopolita, a influência da imigração italiana estaria mais diluída. De fato, conforme já foi mencionado na parte introdutória do presente trabalho, Saad *et al.* (1997a), caracterizando molecularmente 150 doadores de sangue deficientes de G-6-PD não consangüíneos de Campinas, SP, encontraram 146 portadores da variante A⁻ (202 G→A) (97,0%), 3 portadores da variante mediterrânea (2,0 %) e 1 portador da variante rara Chatam (1,0%). Como é possível observar, a proporção de deficientes com a variante A⁻ (202 G→A) de G-6-PD não diferiu significativamente entre as duas amostras ($X^2 = 0,33; 0,50; GL = 1; < p < 0,70$), constituindo a quase totalidade dos casos.

Entre os anos de 1884 e 1944, o Brasil recebeu cerca de 1.500.000 imigrantes italianos (Salzano e Freire-Maia, 1970), que se estabeleceram principalmente nos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná. As populações paulistas receberam imigrantes italianos predominantemente de Veneto (Veneza, Pádua, Treviso, Rovigo, Verona), Lombardia (Mântua, Milão) e Emília Romana (Ferrara, Bolonha, Parma, Módena), os quais, de início, estabeleceram-se em grande parte na zona rural, chegando inclusive a fundar alguns núcleos de colonização italiana (Ramalho, 1986). A influência do fluxo gênico dessas populações italianas migrantes ainda é atualmente bastante acentuada no caso da

talassemia beta, tanto nos grandes centros urbanos quanto nas populações menores do Estado de São Paulo (Ramalho, 1976; 1979; Zago *et al.*, 1981). Nas comunidades de Bragança Paulista e Araras, por exemplo, foram identificadas muitas famílias com recorrência da talassemia beta (Teixeira e Ramalho, 1994; Compri *et al.*, 1996). Já no caso da variante Mediterrânea de G-6-PD, tal influência parece ter sido menos acentuada e diluiu-se no decorrer do tempo, a não ser, talvez, nos núcleos de colonização italiana, como é o caso das cidades de Capivari, Rio das Pedras, etc., o que merece ser investigado. Ilustrando esse fato, a Tabela 6 mostra a freqüência relativa de diversos grupos estrangeiros registrados em um núcleo paulista de colonização predominantemente italiana (Capivari), bem como no Estado de São Paulo e no Brasil durante o censo de 1950 (Saldanha, 1968).

Como é possível observar nesta tabela, em tais comunidades a freqüência de italianos não refletia naquela época a sua proporção relativa observada no Estado de São Paulo como um todo, sendo quase três vezes maior. Esse é um aspecto que merece ser investigado, uma vez que em tais cidades a proporção de descendentes não miscigenados de italianos deve ser mais significativa.

Tabela 6 - Freqüência relativa de diversos grupos estrangeiros registrados em Capivari, SP, no Estado de São Paulo e no Brasil durante o censo de 1950 (Saldanha, 1968).

Local	Italianos(%)	Espanhóis (%)	Portugueses (%)	Sírio Libaneses (%)	Outros (%)
Capivari	66,8	14,4	4,0	10,6	4,2
Estado de São Paulo	23,2	14,4	22,2	3,3	36,9
Brasil	18,2	10,6	28,6	3,7	38,9

A talassemia beta, exaustivamente estudada dos pontos de vista médico, populacional e molecular no Estado de São Paulo, constituiu, de fato, um excelente referencial comparativo para o estudo da dinâmica do gene da variante Mediterrânea de G-6-PD na população paulista. Evidentemente, ambas as condições genéticas foram introduzidas, na sua quase totalidade, pelos imigrantes italianos que aqui chegaram no século XIX.

O casamento entre indivíduos de origem italiana representou, obviamente, uma barreira à diluição dos genes da talassemia beta e da variante Mediterrânea de G-6-PD na nossa população. Tal evento ocorreu em proporção apreciável nos primeiros tempos da imigração italiana no Brasil. No entanto, a tendência para a quebra dos isolados, e conseqüente miscigenação com a população receptora, aumentou progressivamente, principalmente nos centros urbanos, sobretudo devido à ausência de grandes barreiras raciais e religiosas, bem como em decorrência das facilidades de mobilidade social.

Na cidade de Campinas, onde a freqüência populacional de heterozigotos da talassemia beta foi estimada em 1%, foi possível calcular a contribuição italiana nessa população em cerca de 15%, sendo a contribuição da população receptora de, aproximadamente, 85% (Ramalho, 1975). Curiosamente, em um levantamento populacional realizado pela autora do presente trabalho na população urbana de Bragança Paulista, observou-se uma freqüência de heterozigotos da talassemia beta de 1,2% (Compri *et al.*, 1996), praticamente igual, portanto, à anteriormente descrita em Campinas. Esses dados indicam, evidentemente, que, guardadas as devidas proporções, a dinâmica do gene da talassemia beta, em termos de contribuição da população imigrante, taxa de miscigenação, proporção da população receptora, etc., foi muito semelhante nas cidades de Campinas e Bragança Paulista. Assim sendo, não é de se estranhar que a dinâmica do gene da

variante Mediterrânea de G-6-PD também não difira muito nos dois centros urbanos. Ressalte-se, no entanto, que não estamos afirmando com isso que a dinâmica do gene da talassemia beta seja igual à do gene da G-6-PD, uma vez que ambos possuem mecanismos de herança distintos.

Outro mecanismo a ser considerado é o da proveniência dos imigrantes italianos que vieram para o Estado de São Paulo (predominantemente da região do Vale do Pó e outras regiões do Norte da Itália). De fato, enquanto a frequência da talassemia beta é alta no Norte da Itália, a variante Mediterrânea de G-6-PD predomina na Sardenha, na Sicília e no Sul da Itália (Beutler, 1994).

A variante Mediterrânea de G-6-PD é mais prevalente na população do Rio Grande do Sul, onde sua frequência alélica foi estimada recentemente por Weimer *et al.* (1998) em 10:1.000. Isso quer dizer, evidentemente, que a frequência de homens com tal variante nessa população é aproximadamente, 1%. Esses autores chamam a atenção para a ausência dessa variante de G-6-PD em populações do norte, do nordeste e em populações indígenas do Brasil, bem como em um estudo realizado em Santa Catarina.

Outro aspecto a ser considerado em relação ao presente trabalho é o de que, na comunidade analisada, a variante A⁻ de G-6-PD não é "característica dos negróides", como é freqüentemente referido em livros didáticos (Beiguelman, 1983). Dentre os 69 indivíduos com essa variante, classificados racialmente pela própria autora, levando em consideração a cor da pele, as características faciais e a textura do cabelo, 59 (86%) eram caucasóides e apenas 10 (14%) eram negróides. Certamente, alguns desses indivíduos receberam, através da miscigenação, fluxo gênico negróide. No entanto, também é preciso considerar a contribuição dos imigrantes, uma vez que a variante A⁻ de G-6-PD é freqüente em populações caucasóides do Sul da Itália, da Espanha, de Portugal e da Península Árábica (Luzzatto e Mehta, 1995).

Até 1930, os italianos eram os mais numerosos (34%) entre os imigrantes europeus que vieram para o Brasil, seguidos pelos portugueses (29%) e pelos espanhóis. Depois de 1930, somente os portugueses, por não serem considerados propriamente estrangeiros, continuaram migrando em massa para o Brasil. Ainda outros povos, como árabes, judeus e sírio-libaneses migraram para o Brasil, porém em colônias numericamente pequenas (Azevêdo, 1987).

Conforme já foi comentado na parte introdutória deste trabalho, os espanhóis, além dos italianos, tiveram uma participação importante na formação da comunidade de Bragança Paulista. Entre os anos de 1884 e 1944, cerca de 585.000 espanhóis imigraram para o Brasil, muitos dos quais se estabeleceram no Estado de São Paulo (Salzano e Freire-Maia, 1970).

O anuário de Bragança Paulista de 1902, organizado por Pinheiro Lima (1902), traz a estatística demográfico-sanitária de Bragança Paulista, onde foram registrados os nascimentos que ocorreram de 01 de janeiro a 30 de setembro de 1901, acompanhados da naturalidade e nacionalidade dos pais. Alguns desses dados encontram-se na Tabela 7.

Nesta tabela de nascimentos, um dado interessante e que merece ser destacado é o nascimento de crianças, filhos de um genitor estrangeiro e o outro brasileiro, pois tais dados refletem o processo de miscigenação que já começou a ocorrer no início deste século, na cidade de Bragança Paulista.

Já o recenseamento feito em Bragança Paulista em 1903, mostra a nacionalidade e o número de estrangeiros nesta cidade, naquela época. A Tabela 8 resume alguns desses dados.

Tabela 7 – Número de nascimentos, nacionalidade e/ou naturalidade dos pais registrados em Bragança Paulista, SP, em 1901.

Nacionalidade e/ou Naturalidade dos pais	N.º de nascimentos
Italianos	205
Espanhóis	51
Portugueses	7
Italiana e Paulista	22
Espanhola e Paulista	6
Portuguesa e Paulista	4

Tabela 8 – Número e nacionalidade de estrangeiros registrados em Bragança Paulista, SP, durante o censo de 1903 (Junior *et al.*, 1904).

Nacionalidade	N.º de estrangeiros
Italianos	4.260
Espanhóis	938
Portugueses	286
Turcos	71
Alemães	23
Africanos	23
Asiáticos	9
Outros	71

Um estudo molecular recente realizado na Espanha demonstrou que, apesar de a deficiência de G-6-PD ser uma entidade genética heterogênea nesse país, a variante A⁻ (202 G→A) é a mais freqüente na população caucasóide espanhola (Carrons *et al.*, 1997). Esse fato, bem como o encontro das variantes G-6-PD Aures e G-6-PD Santa Maria, que são polimórficas na Argélia, demonstram que no passado ocorreu um significativo fluxo gênico da África para a Europa, através da Espanha. Lembre-se, também, que na Idade Média os conquistadores árabes (mourous) estabeleceram-se no Marrocos, Argélia, Tunísia e Espanha. Além disso, embora os doadores de sangue triados não tenham sido classificados racialmente, uma vez que essa classificação certamente seria inadequada para uso científico, a freqüência de deficientes de G-6-PD na amostra total (80/4.621 = 1,7 %) demonstra claramente que a grande maioria desses indivíduos eram caucasóides. De fato, estudos realizados em populações paulistas demonstraram que a freqüência de deficientes de G-6-PD entre homens negróides é de cerca de 10% (Beiguelman *et al.*, 1968; Saldanha *et al.*, 1969; Ramalho e Beiguelman, 1976; Ramalho, 1979; 1981; Sena e Ramalho, 1985; Garlipp e Ramalho, 1988). Assim sendo, a existência de uma proporção significativa de negróides entre os doadores de sangue triados estaria associada, obrigatoriamente, a uma freqüência mais alta de deficientes de G-6-PD na amostra total.

Somando-se os dados do presente trabalho aos de Saad *et al.* (1997a) e de Weimer *et al.* (1998), é possível constatar uma grande homogeneidade da população brasileira quanto à notável preponderância da variante A⁻ (202 G→A) de G-6-PD. Tal homogeneidade em relação à variante A⁻ (202 G→A) de G-6-PD só é observada na África Tropical, uma vez que na maioria das áreas de alta prevalência dessa enzimopenia, como é

o caso do Mediterrâneo, da Índia, do Sudeste Asiático e da China, são encontrados múltiplos alelos polimórficos (Luzzatto e Metha, 1995).

Realmente, a análise molecular de brasileiros deficientes de G-6-PD tem demonstrado a absoluta preponderância da variante A⁻ (202 G→A), com ausência da variante A⁻ (680 G→T). Curiosamente, a variante A⁻ (968 T→C) só foi encontrada em 14 deficientes de G-6-PD do Estado do Pará (Hamel e Saad, 1998). Excetuando-se a variante Mediterrânea no Rio Grande do Sul, outros alelos polimórficos da deficiência de G-6-PD não aparecem em proporção significativas nas populações brasileiras, juntamente com a variante A⁻ (202 G→A).

O fato de a variante A⁻ de G-6-PD ser mais benigna do ponto de vista clínico que a variante Mediterrânea dessa enzima não significa, evidentemente, que ela seja desprovida de importância médica.

Nas pessoas com a variante A⁻ de G-6-PD, a crise hemolítica provocada por medicamentos se inicia de 24 a 48 horas após o início da medicação, sendo a gravidade da crise bastante variável. A intensidade do contato com o fator desencadeante da crise hemolítica é muito importante na determinação do quadro clínico. Muitas vezes, a crise pode consistir em uma leve anemia transitória, às vezes imperceptível pelo indivíduo que a manifesta. Frequentemente, o escurecimento da urina e uma leve icterícia de conjuntiva são os únicos sinais perceptíveis. Algumas vezes, no entanto, a crise pode chegar a ser grave, com o paciente acusando dores musculares, abdominais e lombares, febre alta, calafrios, náuseas e vômitos, anemia, icterícia, reticulocitose e hemoglobinúria. Havendo hemoglobinúria, que indica que a capacidade das haptoglobinas do plasma captarem a hemoglobina livre foi superada, pode haver lesão tubular renal, com oligúria, anúria e choque (Ramalho, 1986).

Se a medicação for suspensa, os indivíduos A⁻ voltarão ao normal em poucas semanas, mas se a crise hemolítica não for muito séria, a medicação pode ser continuada, porque, surpreendentemente, também nesse caso haverá melhora. Isso decorre do fato de que apenas as hemácias com mais de 50 dias apresentam deficiência acentuada de atividade de G-6-PD, enquanto nas hemácias jovens a variante A⁻ tem atividade suficiente para resistir à ação hemolítica da medicação empregada (Beiguelman,1983; Ramalho,1986). Isso se deve, evidentemente, à instabilidade da enzima A⁻, causada pela dupla substituição de resíduos aminoácidos (68 val → met + 126 asn → asp).

Além da crise hemolítica, também é preciso levar em consideração as relações entre a variante A⁻ de G-6-PD e a icterícia do recém-nascido, amplamente demonstradas em nosso meio (Ramalho, 1979; 1981; Garlipp e Ramalho, 1988).

É importante comentar que uma fração significativa da comunidade de Bragança Paulista, representada pela colônia japonesa, é relativamente pouco afetada pela problemática da deficiência de G-6-PD.

A migração japonesa para o Brasil, iniciada em 1908, ocorreu sobremodo depois da Primeira Guerra Mundial, foi interrompida durante a Segunda e atingiu um total aproximado de 200.000 pessoas. Os japoneses estabeleceram-se principalmente no Estado de São Paulo e mantiveram-se em relativo isolamento (Azevêdo, 1970).

As condições agrícolas da região de Bragança Paulista atraíram muitos imigrantes japoneses, que se dedicaram inicialmente ao cultivo da batata e, posteriormente, à horticultura e ao cultivo do morango, atividades que, juntamente com o comércio, mantêm até os dias atuais. Considerando-se a taxa reduzida de miscigenação com outros grupos étnicos, é possível deduzir que a freqüência de deficientes de G-6-PD entre os bragantinos

descendentes de japoneses deve ser bastante baixa, uma vez que em seu país de origem essa enzimopenia afeta 0,1% dos homens (Beutler *et al.*, 1989).

Concluindo esta discussão, é importante mencionar o custo de implantação do programa comunitário no Núcleo de Hematologia e Hemoterapia da Universidade São Francisco, no qual com um gasto anual de apenas US\$ 272,30, foi possível diagnosticar e orientar um número significativo de deficientes de G-6-PD e iniciar a educação da comunidade a respeito do problema. Como comentado anteriormente, não estão aqui incluídos os gastos relativos à caracterização molecular das mutações, de interesse fundamentalmente científico, e outras despesas como funcionários, correspondência, impressão de material didático.

Levando em consideração os resultados obtidos neste trabalho, com a absoluta preponderância na comunidade de uma variante clinicamente benigna da G-6-PD, torna-se necessário definir a estratégia mais adequada para continuidade do programa comunitário. Uma vez que o Núcleo de Hematologia e Hemoterapia da Universidade São Francisco está agora preparado para diagnosticar e orientar casos dessa enzimopenia, a divulgação do problema na comunidade deve continuar. Isso pode ser feito, sem alarmes desnecessários, por intermédio dos próprios doadores de sangue. Uma vez divulgada a alteração genética, o Núcleo deve aguardar a demanda espontânea da comunidade. Uma atuação mais diretiva deve ser utilizada nos casos de hemólise e icterícia neonatal diagnosticados no hospital universitário.

Assim, dentre os benefícios permanentes do programa, deve-se enfatizar a implantação de um setor especializado na Universidade São Francisco, em Bragança Paulista, capaz de diagnosticar e orientar os deficientes de G-6-PD da comunidade, além de fornecer treinamento à alunos e estagiários interessados no assunto.

CONCLUSÕES

VI – CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu as seguintes conclusões, relacionadas aos seus objetivos específicos:

- 1 - A triagem populacional a partir dos doadores de sangue mostrou-se adequada, com uma média mensal de casos triados satisfatória e com a detecção de um número significativo de famílias com a deficiência de G-6-PD na comunidade;
- 2 - O teste laboratorial de triagem utilizado (teste de redução da metemoglobina) mostrou-se com uma porcentagem baixa de casos falsamente positivos, uma vez que foi utilizado em indivíduos adultos;
- 3 - A receptividade dos deficientes de G-6-PD à orientação genética oferecida em caráter opcional foi satisfatória, embora menor que a teoricamente desejável. Essa taxa de aceitação genética (61%) não diferiu significativamente da observada em programas comunitários de hemoglobinopatias hereditárias realizadas em outras cidades paulistas;
- 4 - A avaliação cognitiva realizada seis meses após a orientação genética demonstrou que uma alta porcentagem dos deficientes de G-6-PD assimilam satisfatoriamente as informações fornecidas;
- 5 - O processo de orientação genética dos deficientes de G-6-PD mostrou-se pouco eficiente no que diz respeito ao exame de outras pessoas da família;
- 6 - A média de filhos em mães de indivíduos deficientes de G-6-PD não diferiu significativamente da observada em mães de indivíduos com atividade normal dessa enzima. Este dado não apóia a hipótese de aumento de fertilidade das heterozigotas do gene da deficiência de G-6-PD;

7 - Com relação as mutações verificadas:

a) A mutação A⁻ (202 G→A) é responsável pela quase totalidade dos casos de deficiência de G-6-PD observados na comunidade. A proporção de portadores dessa mutação não diferiu significativamente da observada em estudos realizados em grandes centros urbanos;

b) A mutação A⁻ não é característica dos negróides da comunidade, aparecendo em grande proporção em deficientes de G-6-PD caucasóides. Em relação a esses últimos deve ser considerada não apenas a miscigenação com negróides, mas também a contribuição de imigrantes caucasóides provenientes do Sul da Itália, Espanha, Portugal e Península Arábica;

c) No que diz respeito à variante Mediterrânea de G-6-PD, a influência da imigração italiana não foi muito acentuada no Estado de São Paulo e diluiu-se no decorrer do tempo, através do processo da miscigenação. Os núcleos paulistas de colonização italiana podem constituir uma exceção a essa regra;

8 - O programa mostrou um custo de implantação adequado, sendo possível, com um gasto anual baixo, diagnosticar e orientar um número significativo de deficientes de G-6-PD, além de iniciar a educação da comunidade a respeito do problema;

9 - O programa possibilitou a implantação de um setor especializado na Universidade local, capaz de oferecer benefícios permanentes à comunidade, em termos de diagnóstico e orientação de portadores da deficiência de G-6-PD.

SUMMARY

VII – Summary

The purpose of the present theses is to study the deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) in a community in the interior of the State of São Paulo (Bragança Paulista), according to the scientific and pragmatic criteria of the communitarian genetics, involving genetic-epidemiological, molecular, demographic, social as well as ethic and cultural aspects.

In a period of 36 months, 4.621 male blood donors were investigated. Among them, 80 showed G-6-PD deficiency. This diagnosis was confirmed through enzymatic quantification and through eletrophoresis of enzyme. The positivity rate in the sample was 1,7%, the acceptance rate to the genetic orientation got to 61% and the level of assimilation of defficients in relation to the offered information was 81%.

Because there are in the literature indirect evidences of fertility increase of the G-6-PD deficient heterozygous women in the malarious areas, this aspect was investigated directly in the research, in non-malarious areas. However, no significant difference between the average number of children of the heterozygous women was observed when compared to the average control group of the same age and same cultural, social and economic level ($p=0,176$).

The molecular analysis was made in the 70 unrelated G-6-PD defficients, through DNA amplification followed by digestion by restriction enzymes and single strand conformation polymorphism analysis (SSCP). In 98,6% of the deficiencies, the G-6-PD A⁻ (202 G→A) mutation through digestion of exon 4 with Nla III was observed. It was also observed the presence of the more uncommon mutation in the exon 9, through SSCP. No case of Mediterranean variant was observed. These results allow some information about G-6-PD deficiency in the community : the A⁻ (202 G→A) variant, almost exclusive, was introduced in the community not only by negroes, but also by european immigrants, mainly spanish, portuguese and italian; The italian contribution in terms of G-6-PD Mediterranean was smaller then the contribution in terms of the thalassemia beta and weakened as time by.

The cost of the implantation of the community program in the Universidade São Francisco shows to be possible, at a very low annual cost (US\$ 272,00), not only to make diagnosis and to advise in a ethical way a significant number of families with G-6-PD deficiency but also to start the education of the community in relation to the problem and establish a center of study of this enzymopathy.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII - Referências bibliográficas

- ALLISON, A. C. – Protection afforded by sickle cell trait against subtertian malarial infection. **Br. Med. J.**, 1: 290-294, 1954.
- AZEVÊDO, E. – **Raça conceito e preconceito**. São Paulo, Editora Ática, 1987.
- AZEVÊDO, E. S. and YOSHIDA, H. – Brazilian variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase (Gd Minas Gerais). **Nature**, 222: 380-382, 1969.
- AZEVÊDO, E. S. E AZEVÊDO, T. F. S. – Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and neonatal jaundice in Bahia, Brazil. **Ciência e Cultura**, 26: 1044-1047, 1974.
- AZEVÊDO, W. C.; SILVA, M. L. F.; GRASSE, C. B. E AZEVÊDO, E. S. – Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes de um hospital de Salvador, Bahia, Brasil. **Rev. Bras. Pesq. Med. e Biol.**, 11: 49-52, 1978.
- BAPAT, J. P.; BAXI, A. J. AND BHATIA, H. M. - Is methemoglobin reduction test a true index of G-6-PD deficiency ? **Indian J. Med Res.**, 64: 1687-1690, 1976.
- BARONCIANI, L.; TRICTA, F. AND BEUTLER, E. - G-6-PD Campinas: a deficient enzyme with a mutation at the for 3' end of the gene. **Hum Mutat .** , 3: 77-78, 1993.
- BEIGUELMAN, B. – **Farmacogenética e os sistemas sangüíneos eritrocitários**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S. A ., 1983.
- BEIGUELMAN, B. – **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. Ribeirão Preto, Editora da Sociedade Brasileira de Genética, 1994.
- BEIGUELMAN, B.; PINTO JR. W.; DALL'AGLIO, F. F.; SILVA, E. e VOZZA, J. A. – G-6-PD deficiency among lepers and health people in Brazil. **Acta Genet**, 18: 159-162, 1968.
- BERNINI, L.; LATTE, B.; SINISCALCO, M.; PIOMELLI, S.; SPADA, V.; ADINOLFI, M. and MOLLISON, P. L.- Survival of 51- Cr labelled red cells in subjects with thalassemia trait, G6PD deficiency or both abnormalities. **Br. J. Haemat.**, 10: 171, 1964.
- BEUTLER, E. – The hemolytic effect of primaquine and related compounds: a review. **Blood**, 14: 103-139, 1959.
- BEUTLER, E. - A series of new screening procedures for pyruvate Kinase deficiency, glucose-6-phosphate deficiency and glutathione reductase deficiency. **Blood**, 28: 253-262, 1966.
- BEUTLER, E. – **Red cell metabolism – A manual of biochemical methods**. 2ª ed. N. York , . Goune and Stratton, p. 69, 1972.

- BEUTLER, E. - Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. In: Stanbury J. B.; Wyngarden, J. B.; Fredrikson, D. S. (Eds.) - **Bases metabólicas de doenças hereditárias**, 4ª ed., vol.2, Rio de Janeiro, Guanabara - Koogan, 1981.
- BEUTLER, E. - Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency In: Stanbury, J. B.; Wyngarden, J. B.; Fredrikson, D. S.; Goldstein, J. L. e Brown, M. S. - **The metabolic basis of inherited disease**, 5ª .ed, N. York, Mc Graw-Hill, p. 1629-1653, 1983.
- BEUTLER, E. - The genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Seminars in Hematology**, **27** : 137-164, 1990.
- BEUTLER, E. - The molecular biology of G-6-PD variants and other red cell enzyme defects. **Annu Rev. Med**, **43**: 47-49, 1992.
- BEUTLER, E. - G-6-PD deficiency. **Blood**, **84** : 3613 – 36, 1994.
- BEUTLER, E.; GAETANI, G; DERKALOUSTION, V.; LUZZATTO, L.; NIWA, S; PANNICH, V.; SODEINDE, O.; BELSEY, M.; KULIEV, A. M.; MODELL, B. and SHAH, P. M. – Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Bull. WHO**, **76**: 601-611, 1989.
- BEUTLER, E., KUHL, W., VIVES-CORRONS, J. L. e PRCHAL, L. T - Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **A - Blood**, **74**: 2530-2535, 1989.
- BEUTLER, E. and KUHL, W. - The NT 1311 polymorphism of G-6-PD mediterranean mutation may originated independently in Europe and Ásia. **Hum Genet**, **47**: 1008-1012, 1990.
- BOWMAN, J. - Prenatal screening for hemoglobinopathies. **Am. J. Hum Genet.**, **48**: 433-438, 1991.
- BREWER, G. J.; TARLOV, A. R. and KELLERMEYER, R. W. - The hemolytic effect of primaquine. **J. Lab. Clin. Med.**, **58**: 217, 1961.
- BREWER, G. J.; TARLOV, A. R. and ALVING, A. S.- The methemoglobin reduction test of primaquine type sensitivity of erythrocytes. A simplified procedure for detecting a specific hyper-susceptibility to drug hemolysis. **J. A. M. A.**, **5**: 126-128, 1962.
- BUENO, M. F. G. – Fotografias: Do olhar de fotógrafo à trama urbana. **Cadernos do centro de memória regional; ed. Especial: Memória fotográfica de Bragança Paulista V. 1(2)**, 1993.
- CARCASSI, V.; CEPPELLINI, R. and PIZUS, A. - Frequenza della thalassaemia in quattro popolazione Sarde e suoi rapporti com la destribuzione dei gruppi sanguini e della malária. **Boll. Ist. Suroter. (Milan)**, **36**: 206-218, 1957.

- CARRONS, J. L. V.; ZARZA, R.; AYMERICH, J. M. et al. – Análises molecular del déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenosa. **Sangre**, **42**: 391-398, 1997.
- CHEN, E. Y., CHENG, A., LEE, A., KUANG, W. J. e HILLIER, L. - Sequence Of Human glucose-6-phosphate desidrogenase cloned in plasmis and a yest artificial chromosome. **Genomics**, **10** : 792-800, 1991.
- COMPRI, M. B.; POLIMENO, N. C.; STELLA, M. B. e RAMALHO, A .S. - Programa comunitário de hemoglobinopatias hereditárias em populações estudantil brasileira. **Rev. Saúde Pública USP**, **30**: 187-195, 1996.
- CREMESP - CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Código de ética médica**. São Paulo, 1988.
- EATON, J. W. – Malaria and the selection of the sickle gene In: Embury, S. H. ; Hebbel, R. P.; Mahodas, N. and Steinberg, M. H. (Eds.) **Sickle cell disease. Basic principles and clinical practice**. N. York, Raven Press, 1994.
- GARLIPP, C. R. e RAMALHO, A. S. – Aspectos clínicos e laboratoriais da deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6-PD) em recém-nascidos brasileiros. **Rev. Bras. Genet.**, **11**: 717-728, 1988.
- HALDANE, J. B. S. – Disease and evolution. **Ric. Sci**, **19** (Suppl.): 68-76, 1949.
- HAMEL, A. R. e SAAD, S. T. O. – Caracterização molecular das variantes de G6PD em doadores de sangue da Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará. Projeto de qualificação ao doutorado. Instituto de Biologia da UNICAMP, 1998.
- HUTZ, M. H.; YOSHIDA, A. and SALZANO, F. M. – Three rare G-6-PD variants from Porto Alegre, R. S., Brazil. **Hum Genet.**, **39**: 191-197, 1977.
- JACOB, H. S. and JANDL, J. H. - Effects of sulphy dryl inhibition on red blood cells II - Gluthatione in the regulation of the hexose monophosphate pathway. **J. Biol. Chem**, **241**: 4243-4250, 1966.
- JAFFÉ, E. - Hereditary hemolytic disorders and enzymatic deficiencies of human erythrocytes. **Blood**, **35**: 116-134, 1970.
- JANDL, J. H. and ALLEN, D. W.- Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. Heinz body anemia as an accelerated form of red cell aging. **J. Clin. Invest.**, **39**: 1000-1008, 1960.
- JUNIOR, C. e JUNIOR, N. A – **Anuário de Bragança Paulista para 1904**. Ed. TYP. Andrade & Mello. São Paulo, pp. 329, 1904.

- KAPLAN, M.; RENBAUM, P.; LEUY-LAHAD, E.; HAMMERMAN, C.; LAHAD, A. and BEUTLER, E. – Gilbert syndrome and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a dose-dependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia. **Proac. Natl. Acad. Sci. USA**, **94**: 12.128-32, 1997.
- KEATS, B.- Genetic mapping: X chromosome. **Hum Genet.**, **64**: 28-32, 1983.
- KNOPPERS, B. M. e CHADWICK, R. - The human genome project: under an international ethical microscope. **Science**, **265**: 2035-2036, 1994.
- LEITE, B. W. C. - **Região Bragantina: Estudo Econômico Social (1653-1836)**. Tese de Mestrado, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Faculdade de Marília.
- LEWGOY, F. e SALZANO, F. M.- Dinâmica do gene que condiciona a deficiência de G-6-PD na população de Porto Alegre. **Ciência e Cultura**, **17**: 152, 1965.
- LIMA, P. M. J. – **Anuário de Bragança para 1902**. Ed. TYP da “Cidade de Bragança”. Bragança Paulista - S.P, pp. 75, 1902.
- LISA, A.; ASTOLFI, P.; DEGIOANNI, A.; PASQUALE, C. D. and ZEI, G. – Differential fertility as a mechanism maintaining balanced polymorphisms in Sardinia. **Hum Biol**, **66**: 683-698, 1994.
- LIVINGSTONE, F. B. – Malaria and human polymorphisms. **Ann. Rev. Hum Genet.**, **5**: 33-64, 1971.
- LUZZATTO, L. and MEHTA, A. - Glucose-6-phosphatate dehydrogenase deficiency. In: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S. and Valle, D. (Eds.) - **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. N. York, Mc Graw - Hill, vol. III, pp. 3367–3398, 1995.
- MAGALHÃES, A. F. N. – **Síndrome de Gilbert: contribuição para o seu diagnóstico**. Tese de Livre Docência, Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, 1976.
- MANIATIS T., FRITSCH E.F. e SAMBROOCK, J. . **Molecular cloning, a laboratory manual**. Spring Harbor, New York, USA, 1989.
- MARQUES, J. e CAMPOS, J. O. – Incidência da deficiência de glicose-6-fosfato de hidrogenase em negros de Minas Gerais. **Rev. Ass. Med. Bras.**, **21**: 111-112, 1975.
- MARTINI, G., TONIOLO, D. VULLIAMY, T. LUZZATO, L. and DONO, R. - Strutral analyses of X-linked gene encoding human glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Embo J.**, **5**: 1849-1855, 1986.
- MARTINS, S. N. e LAURITO, D. - **Bragança: 1763-1942; Coleção “ São Paulo através da História” Vol III**. São Paulo, Ed. Mario M. Ponzini e Cia., pp 96-99, 1943.

- MODELL, B. - Cystic fibrosis screening and community genetics. **J. Med. Genet.**, **27**: 475-479, 1990.
- MODELL, B. and KULIEV, A. - The history of Community Genetics: the contribution of the haemoglobin disorders. **J. Community Genet.**, **1**: 3-11, 1998.
- MOLLISON, P. L.- **Blood transfusion in clinical medicine**. Oxford, Blackwell, 1974.
- MONTE ALEGRE, S.; SAAD, M. J. A.; DELATRE, E. and SAAD, S. T. O. Insulin secretion in patients deficient in glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Horm. Metab. Res.**, **23**: 171-173, 1991.
- MOREIRA, A. S.; ARENDITE, E. J.; e MATTOS, F. A. M.; Economia regional: Bragança Paulista. **Cadernos de IFAN**; **17**, 1997.
- MOTULSKY, A. G. – Metabolic polymorphisms and the role of infections diseases in human evolution. **Hum Biol**, **32**: 28-62, 1960.
- MOTULSKY, A. G. - Current concepts of the genetics of the thalassaemias. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, **29**: 399-412, 1964.
- MOTULSKY, A. G. and CAMPBELL-KRAUT, I. M. - Population genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency of the red cells. **Proceedings of the Conference in Polymorphism and Geographical Variations in Disease**, **23**: 258-292, 1960.
- ORITA, M. ; IWAHANA, H.; KANAZAWA, K. and SEKIYA, T. - Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as a single strand conformation polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **86**: 2766- 2270, 1989.
- ORLINA, A. R.; JOSEPHSON, A. M. and MC DONALD, B. J.- The poststorage viability of G6PD deficient erythrocytes. **Lab. Clin. Med.**, **75**: 930, 1970.
- OSKI, F. A. and NAIMAN, J. L. - Disorders of red cell metabolism. In: **Hematologic problems in the newborn**. 2^a ed. Philadelphia, Saunders, Cap. V, 83-132, 1972.
- PAIVA E SILVA, R. B. - **Efeitos da orientação genética fornecida a doadores de sangue com o traços falciforme: riscos e benefícios**. Tese de doutoramento, Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, 1995.
- PAIVA E SILVA, R. B. e RAMALHO, A. S. - Riscos e benefícios da triagem genética: o traço falciforme como modelo de estudo em uma população brasileira. **Cad. Saúde Publ.**, **13**: 285-294, 1997.
- PANNACCIULLI, I.; TIZIANELLO, A. ; AJMAR, F. and SALVIDIO, E. - The course of experimentally induced hemolytic anemia in a primaquine-sensitive caucasian. **Blood**, **25**: 92, 1965.

- PLATO, C. C. ; RUCKNAGEL, D. L. and GERSHOWITZ, H. – Studies on the distribution of G-6-PD deficiency, thalassemia and other genetic traits in the coastal and mountain villages of Cyprus. **Am. J. Hum Genet.**, **16**: 267-283, 1964.
- POGGI, V., TOWN, M., FOULFES, N. S. and 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.**, **271**: 157-160, 1990.
- RAMALHO, A. S. – **Investigação dos traços talassêmicos beta e delta-beta em uma amostra da população estudantil de Campinas, SP.** Tese de doutoramento, Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, 1975.
- RAMALHO, A. S. – Investigação genético-epidemiológica das talassemias beta e delta-beta no Estado de São Paulo. **Rev. Paul. Med.**, **88**: 68, 1976.
- RAMALHO, A. S. – **Estudo médico de polimorfismos genéticos de importância clínica no Brasil.** Tese de Livre Docência. Universidade Estadual de Campinas, 1979.
- RAMALHO, A. S. – Deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6-PD) em recém-nascidos brasileiros. **Rev. Ass. Med. Bras.**, **27**: 343-345, 1981.
- RAMALHO, A. S. – **As hemoglobinopatias hereditárias – Um problema de Saúde Pública no Brasil.** Riberão Preto, Editora da Sociedade Brasileira de Genética, 1986.
- RAMALHO, A. S. e BEIGUELMAN, B. – Deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6-PD) em doadores de sangue brasileiros. **Folha Med.** **73**: 281-282, 1976.
- RAMALHO, A. S.; SENA, L. L. A. e BARRETTO, O. C. O. - Os testes de triagem para a deficiência de G-6-PD. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, **17**: 23-25, 1985 a.
- RAMALHO, A. S.; SENA, L. L. A. E VENTURELLI, L. E. – Deficiência de G-6-PD e hemoterapia no Brasil. **Rev. Paul. Med.**, **103**: 11-14, 1985 b.
- RAMALHO, A. S.; BERTUZZO, C. S. e PAIVA E SILVA, R. B. - **Aconselhamento genético.** Vb Medical Master: Anais de Atualização Médica, Volume 2, Tomo IV , pp. 209-213, (Ed. Almeida, E. A.), Campinas, Editora Unieme, 1996a.
- RAMALHO, A. S.; TEIXEIRA, R. C.; TEIXEIRA, P. A. ; COMPRI, M. B.; STELLA, M. B. e POLIMENO, N. C. - Genética e Saúde Pública no Brasil: os programas comunitários de hemoglobinopatias hereditárias. **Anais Acad. Nac. Med.**, **156**: 13-18, 1996b.
- RIVERO, M. E. J.; DINIZ, E. M. A.; NONOYAMA, K.; BARRETTO, O. C. O. e VAZ, F. A. C. – Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em recém-nascidos. **Pediatria**, **3**: 214-216, 1981.

- SAAD, S. T. O. – **Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em doenças falciformes**. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 1987.
- SAAD, S. T. O., COSTA, F. F., SALLES, T. S. I., SONATI, M. F. e FIGUEREDO, M. S. - Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in sickle cell disease by DNA analysis. **A Blood**, **85,2**: 601-602, 1995.
- SAAD, S. T. O.; SALLES, T. S. I.; CARVALHO, M. H. M. and COSTA, F. F. – Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Brazil. **Hum Hered.**, **47**: 17-21, 1997a.
- SAAD, S. T. O.; SALLES, T. S. I.; ARRUDA, V. R.; SONATI, M. F. and COSTA, F. F. – G6PD Sumaré: A novel mutation in the G6PD gene (1297 T→G) associated with chronic non spherocytic anemia. **Hum Mutat.**, **10**: 245-247, 1997b.
- SAIKI, R., SCHARF, S. FALLONA, F., MULLIS, K.B., HORNG, T., ERLICH, H.A. e ARNHEIM, N. – Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** **230** : 1350-4, 1985.
- SALDANHA, P. H. – Efeito da migração sobre a estrutura genética de uma comunidade paulista. Bol. n.º 248 (Biol. N.º 12) da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1968.
- SALDANHA, P. H.; NÓBREGA, F. C. e MAIA, J. C. C. – Distribution and Heredity of erythrocyte G-6-PD activity and electrophoretic variants among different racial groups at São Paulo, Brazil. **J. Med. Genet.**, **6**: 48-54, 1969.
- SALZANO, F. M. AND FREIRE-MAIA, N. - **Problems in Human Biology. A study of Brazilian populations**. Detroit, Wayne State University Press, 1970.
- SEGRE, C. A. M. - **Contribuição ao estudo da importância da deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase como causa de icterícia neonatal**. Tese de doutoramento. Escola Paulista de Medicina, 1971.
- SENA, L. L. A.; BARRETTO, O. C. O. E RAMALHO, A. S. – Variantes de G-6-PD em uma população brasileira. **Rev. Bras. Patol. Clin.**, **20**: 113-115, 1984.
- SENA, L. L. A. and RAMALHO, A. S. – Clinical evolution of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in a Brazilian population. **Braz. J. Genet.**, **8**: 89-96, 1985.
- SENA, L. L. A. , RAMALHO A. S., BARRETO, O. C. O e LIMA, F. A. M. - Deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6-PD): dados de prevalência e de morbidade na região de Natal, RN. **Rev. Ass. Med. Brasil**, **32,1 e 2**: 17-20, 1986.

- SERRA, H. G., MARTINS, C. S. B.; PAIVA E SILVA, R. B. and RAMALHO, A. S. - Evaluation of genetic counseling offered to Brazilian carriers of the beta - thalassemia trait and to their relatives. **Rev. Bras. Genet.**, **18**: 479-484, 1995.
- SINISCALCO, M.; BERNINI, L.; LATTE, B. and MATULSKY, A. G. - Favism and thalassemia in Sardinia and their relationship to malaria. **Nature**, **190**: 1170-1180, 1961.
- SPARKS, R. S., BALLUDA, M. C. e TOWNSEND D. E. - Cellulose acetate electrophoresis of human G-6-PD. **J. Lab. Clin. Med.** **73** : 531 - 534, 1969.
- TEIXEIRA, R. C. e RAMALHO, A .S.- Programa de hemoglobinopatias em comunidade brasileira (Araras, SP) abordada pelas gestantes. **Rev. Bras. Genet.**, **16** (Supl. 3): 90, 1993.
- TEIXEIRA, R. C. and RAMALHO, A. S. - Genetics and Public Health: response of a Brazilian population to an optional hemoglobinopathy program. **Rev. Bras. Genet.**, **17**: 435-438, 1994.
- TEN KATE, L. P. - Editorial **Community Genetics**, **1**: 1-2, 1998.
- WEIMER, T. A.; SALZANO, F. M. and HUTZ, M. H. - Erythrocyte isozymes and hemoglobin types in a Southern Brazilian population. **J. Hum. Evol.**, **10**: 319-328, 1981.
- WEIMER, T. A.; SALZANO, F. M.; WESTWOOD, B. and BEUTLER, E. - G6PD variants in three South American ethnic groups: population distribution and description of two new mutations. **Hum. Hered.**, **48**: 92-96, 1998.
- WERTZ, D. C. - Genetic counseling in México. **Am. J. Med. Genet.**, **75**: 424-425, 1998.
- WILKIE, T. - **Projeto Genoma Humano. Um Conhecimento Perigoso**. Rio de Janeiro, Editora Jorge Zahar, 1994.
- WHO - World Health Organization. Glicose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Report of a WHO working group. **Bull. Word Health Organiz.**, **67**: 601 - 611, 1985.
- ZAGO, M. A.; COSTA, F. F. and BOTURA, C. - Beta - thalassemia in Brazil. **Rev. Bras. Pesq. Med. Biol**, **14**: 383, 1981.
- ZEI, G., LISA, A. and ASTOLFY, P. - Fertility and Malária in Sardinia. **Ann. Hum Biol.**, **17**: 315-330, 1990.

ANEXOS



Bragança Paulista, 08 de agosto de 1997

96102

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - USF

Estudo: "Origem da Deficiência de G6PD em uma Comunidade Brasileira (Bragança Paulista - SP) Abordada a partir de Doadores de Sangue".

Autores: Prof.a. Ms. Mariani Bernadete Compri
Maria Júlia Acedo Vieira
Newton Carlos Polimeno
Antonio S. Ramalho
Sara T. O. Saad

O CEP-USF, em sua reunião ordinária realizada em 02 de julho de 1997, analisou o projeto supracitado e concluiu que, os indivíduos que porventura apresentem esta deficiência sejam informados que tanto sua participação quanto a de seus familiares, é voluntária; e que a não participação no estudo, não acarretará qualquer dano ao seu atendimento pela equipe médica do HUSF.

Parecer: atendida a ressalva acima, parecer favorável à aprovação.


Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade São Francisco

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Prezado(a) Sr(a) . _____

Venho por meio desta informar que embora todos os resultados dos seus exames estejam normais, verificamos no seu sangue que o Sr(a). pode ter anemia mais facilmente que a maioria das pessoas. Esse tipo de anemia ocorre quando se toma certos remédios ou entra em contato com algumas substâncias. Para confirmarmos se o Sr(a). tem realmente essa tendência à ter anemia, precisaremos realizar outros testes .Logo o resultado não é definitivo .Em breve enviaremos uma carta marcando dia, hora e local para que o Sr(a). compareça a fim de esclarecermos mais sobre esta característica e realizarmos outros testes, caso o Sr(a). deseje. O Sr(a). **não está doente**, portanto não é preciso ficar assustado. No entanto, sua presença será muito importante.

Sem mais para o momento, despeço-me

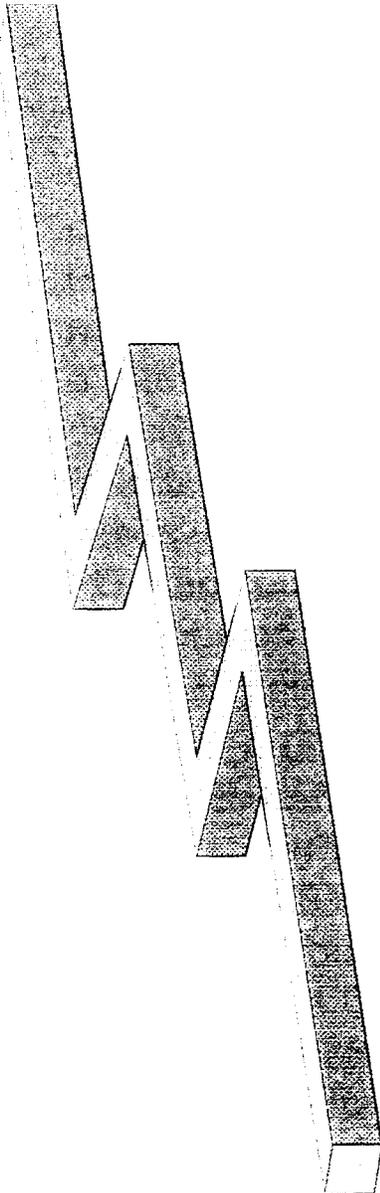
Atenciosamente

Mariane B. Compri

Obs.: Em caso de dúvidas, ligar para 7844 - 8241 e falar com Maria Julia.

ANEXO 3

Deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G-6-PD)



- **O que é G-6-PD ?**
A glicose-6-fosfato desidrogenase é uma proteína que é produzida por nosso organismo.
- **Em que parte de nosso organismo encontramos esta proteína ?**
Em muitos órgão e tecidos, mas o importante é falarmos da presença da G-6-PD em nossos glóbulos vermelhos.
- **Por que a G-6-PD é importante em nossos glóbulos vermelhos ?**
Por que esta proteína impede que nossos glóbulos vermelhos se rompam quando em contato com certas substâncias.
- **Então , a G-6-PD protege os glóbulos vermelhos ?**
Sim, pois os glóbulos vermelhos transportam o oxigênio para todas as partes de nosso organismo.

O que é a deficiência de G-6-PD?

É uma característica hereditária, ou seja, que herdamos de nossos pais, onde nossas células produzem a proteína G-6-PD diferente do tipo mais comum.

- **O que acontece com um indivíduo quando tem a deficiência de G-6-PD ?**

Existem muitas variantes da G-6-PD. Em algumas a deficiência da G-6-PD é leve (ex: **A**), em outras, moderada (ex: **A⁻**) e ainda existem algumas cuja deficiência é grave (ex: **Mediterrânea**). Em todos os casos a deficiência de G-6-PD não consegue proteger os glóbulos vermelhos adequadamente.

- **Existem muitas pessoas com este defeito nos glóbulos vermelhos ?**

Cerca de 400 milhões de pessoas no mundo são deficientes de G-6-PD. No Brasil, a deficiência de G-6-PD é muito frequente, sobretudo entre indivíduos do sexo masculino. No Estado de São Paulo, por exemplo de cada 100 homens, 2 a 10 são deficientes de G-6-PD.



Por que é importante saber se temos deficiência de G-6-PD ?

Porque os deficientes de G-6-PD quando ingerem ou têm contato com certas substâncias podem ter anemia. Tais substâncias estão relacionadas na tabela a seguir.

Fármacos associados à hemólise significativa em deficientes de G-6-PD

Droga	Associação inequívoca	Possível associação altas doses em pacientes com deficiência grave ou em recém-nascidos	Associação duvidosa
Antimaláricos	primaquina, pamaquina, pentaquina	cloroquina	quinina, quinacrina
Sulfonamidas	sulfanilamida, sulfacetamida, sulfapiridina, sulfametoxazol	sulfadimidina, sulfameridina, sulfametoxipiridazina	sulfadiazina, sulfoxona, sulfisoxazol
Sulfonas	dapsona, tiazolsulfona	-	-
Nitrofuranos	nitrofurantoína	-	-
Analgésicos antipiréticos	acetanilida	aspirina	fenacetina, aminopirina, acetaminofen
Outros fármacos	ácido nalidíxico, azul de metileno, fenazopiridina	cloranfenicol, análogos da vit. K, ácido ascórbico	PAS, L-DOPA, probenecid, dimercaprol
Outras substâncias químicas	naftalina, nitritos, trinitrotolueno, azul de toluidina	-	-

A deficiência da G-6-PD é uma doença ?

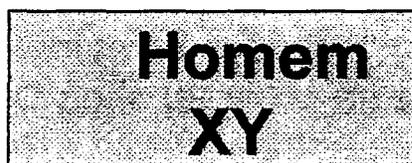
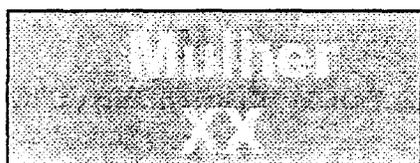
Não, é apenas uma característica da pessoa. Se o deficiente de G-6-PD evitar as substâncias mencionadas na página anterior, não terá problema algum.

A deficiência da G-6-PD tem cura ?

Não, mas a anemia pode ser prevenida evitando-se as substâncias citadas na tabela anterior. Assim, toda vez que voce for ao médico, comunique a ele que voce é deficiente de G-6-PD. Também é conveniente mostrar ao médico a tabela, para que ele possa receitar remédios que não façam mal ao deficiente de G-6-PD.

Mas afinal , como eu herdei a deficiência de G-6-PD de meus pais ?

Todas as informações para nossas características estão contidas no interior do óvulo de nossa mãe e do espermatozóide de nosso pai em estruturas denominadas cromossomos. A informação para formação da G-6-PD está no cromossomo sexual X. As mulheres têm dois cromossomos X e os homens têm um cromossomo X e outro Y.



Quando o óvulo e o espermatozóide se formam os cromossomos se separam. Assim cada óvulo possui apenas um cromossomo X e cada espermatozóide possui um X ou um Y.



Quando óvulo e espermatozóide se unem dão origem a um novo indivíduo que recebe um dos cromossomos X da mãe e um X ou Y do pai.

Vamos marcar a informação da Deficiência de G-6-PD com um (*) no cromossomo X .

Assim os homens podem ser : XY (não tem a deficiência de G-6-PD) ou X*Y (tem a deficiência de G-6-PD)

Já as mulheres podem ser : XX (não tem a deficiência de G-6-PD) , X*X* (tem a deficiência de G-6-PD) ou X*X (possuem a informação da deficiência de G-6-PD, mas não manifestam, pois um dos seus cromossomos “funciona” normalmente ; são apenas portadoras da informação.

Já que tenho deficiência de G-6-PD , o que provavelmente ocorreu em meu caso ?

Para os homens : Se seu pai nunca teve problemas de anemia,provavelmente sua mãe é X*X e seu pai XY. Voce recebeu o X* de sua mãe e o Y de seu pai.

Para as mulheres : Seu pai já deve ter tido problemas de anemia e é X*Y. Sua mãe, provavelmente é X*X (se ela não tem problemas de anemia). Você recebeu o X* de sua mãe e o X* de seu pai e é X*X* .

Mas eu nunca tive problemas de anemia ?

Então, provavelmente você é X*X, e o X* pode ter vindo de sua mãe ou de seu pai .

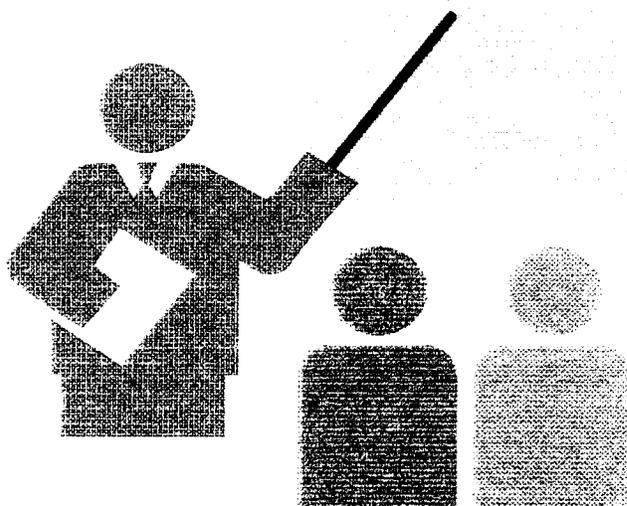
Eu posso gerar uma criança com deficiência de G-6-PD ?

Vejamos algumas possibilidades mais comuns : Agora voce mesmo pinta.

	X *	Y		X	Y		X	Y
X	X*X	XY	X*	X*X	X*Y	X*	X*X	X*Y
X	X*X	XY	X	XX	XY	X*	X*X	X*Y

<p>Todas as mulheres serão portadoras</p>	<p>Se tiver uma mulher, existe 50% de chance de ser portadora e se for homem a chance de ser deficiente de G-6-PD é de 50%</p>	<p>Neste caso todas as mulheres serão portadoras e todos os homens deficientes de G-6-PD</p>
---	--	--

Então é importante saber se temos a deficiência de G-6-PD, ou ainda se somos apenas portadores dessa informação, pois podemos prevenir a anemia conhecer a chance de transmitirmos a informação da deficiência de G-6-PD para nossos filhos.



- **O que devo fazer para saber se sou deficiente de G-6-PD?**

Procure o Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade São Francisco (Banco de Sangue). Os exames serão feitos gratuitamente e voce receberá todas as informações e orientações que precisar.

Nome : _____

“Avaliação da Orientação Genética Fornecida à Deficientes de G-6-PD “

Nome:

Escolaridade:

Parte I

1 - Você se lembra, quanto tempo faz que veio ao banco de sangue para conversar sobre seu sangue ?

R: _____

2 - Naquela época você foi esclarecido sobre o que você tinha ?

Sim () Não ()

3 - Você recebeu algum documento sobre o que você têm ?

Sim () Não ()

4 - Você o mantém ainda ?

Sim () Não ()

5 - A orientação que você recebeu mudou alguma coisa em sua vida ?

Sim () Não ()

Parte II

1 - O que você tem no seu sangue :

- a - uma doença grave
- b - uma doença, mas não é grave
- c - não sou doente, tenho uma característica diferente em meu sangue
- d - não sei

2 - Você se lembra, se o que você têm é :

- a - falta de ferro no sangue
- b - falta de uma proteína que você mesmo produz
- c - falta de uma proteína que é encontrada nos alimentos
- d - não sei

3 - A deficiência de G-6-PD, que você têm, poderá fazer com que você :

- a - Tenha uma anemia quando entrar em contato com certos medicamentos, naftalina, embutidos
- b - Tenha anemia por não se alimentar corretamente
- c - não tem nada haver com anemia
- d - não sei

4 - Quais os cuidados que você deve ter por causa dessa deficiência :

- a - Sempre que for ao médico avisá-lo que você têm a deficiência de G-6-PD e mostrar a cartilha de orientação
- b - não tomar mais remédios, nem comer enlatados / embutidos
- c - não é preciso ter nenhum cuidado
- d - não sei

5 - Com relação a Deficiência de G-6-PD é **errado** dizer que :

- a - você recebeu essa característica de seus pais
- b - você pegou de alguém
- c - você pode transmitir a seus filhos
- d - não sei

ORÇAMENTO

Despesas de Custeio

Material de Consumo

Fase I : (Fornecedores : Glicolabor e Merse)

Materiais e quantidades	unidade	valor em US\$
1 - EDTA (1Fr)	Fr 500 grs	17,05
2 - Glicose (2 Fr)	Fr 500 grs	7,00
3 - NaNO ₂ (2 fr)	Fr 500 grs	10,90
4 - Azul de Metileno trihidratado	-	15,00
5 - Tris (1Fr)	Fr 100 grs	29,58
6 - KCN (2Fr)	Fr 500 grs	19,80
7 - H ₃ BO ₃ (1Lt)	1 Lt	9,57
8 - NADP	-	30,00
9 - G-6-P	-	20,00
10 - Corante MTT (Sigma) (2 Fr)	Fr 50 grs	31,80
11 - Corante PMS (Sigma) (500 ml)	500 ml	12,70
12 - HCl (1Lt)	1 Lt	3,63
13 - NaCl (4Lt)	1 Lt	2,76
14 - Beta-mercaptoetanol	-	45,00
15 - K ₃ Fe(CN) ₆ (1Fr)	Fr 500 grs	18,15
16 - NaHCO ₃ (1Fr)	Fr 500 grs	2,73
17 - NaOH (1Fr)	Fr 500 grs	5,45
18 - MgCl ₂ (1Fr)	Fr 500 grs	3,63
19 - Fitas de acetato de celulose (8 Pt)	Pt c/ 25	552,00
Total = 816,95 US\$		

ORÇAMENTO

Despesas de Custeio

Material de Consumo

Fase I : (Fornecedores : Glicolabor e Merse)

Materiais e quantidades	unidade	valor em US\$
1 - EDTA (1Fr)	Fr 500 grs	17,05
2 - Glicose (2 Fr)	Fr 500 grs	7,00
3 - NaNO ₂ (2 fr)	Fr 500 grs	10,90
4 - Azul de Metileno trihidratado	-	15,00
5 - Tris (1Fr)	Fr 100 grs	29,58
6 - KCN (2Fr)	Fr 500 grs	19,80
7 - H ₃ BO ₃ (1Lt)	1 Lt	9,57
8 - NADP	-	30,00
9 - G-6-P	-	20,00
10 - Corante MTT (Sigma) (2 Fr)	Fr 50 grs	31,80
11 - Corante PMS (Sigma) (500 ml)	500 ml	12,70
12 - HCl (1Lt)	1 Lt	3,63
13 - NaCl (4Lt)	1 Lt	2,76
14 - Beta-mercaptoetanol	-	45,00
15 - K ₃ Fe(CN) ₆ (1Fr)	Fr 500 grs	18,15
16 - NaHCO ₃ (1Fr)	Fr 500 grs	2,73
17 - NaOH (1Fr)	Fr 500 grs	5,45
18 - MgCl ₂ (1Fr)	Fr 500 grs	3,63
19 - Fitas de acetato de celulose (8 Pt)	Pt c/ 25	552,00
Total = 816,95 US\$		