

# DÉFICE DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE

## Em duas crianças do sexo feminino

ELÍSIO COSTA, JOSÉ MANUEL CABEDA, MARIA EDUARDA ABREU, ALBINA SILVA,  
LURDES MORAIS, ANA MARGARIDA ALEXANDRINO, BENVINDO JUSTIÇA, JOSÉ BARBOT  
Serviços de Hematologia e Pediatria. Hospital de Crianças Maria Pia. Porto.  
Serviço de Hematologia. Hospital Geral de Santo António. Porto.

### RESUMO

O défice de Glicose-6-fosfato Desidrogenase (G6PD) é a enzimopatia eritrocitária conhecida mais comum, atingindo mais de 400 milhões de pessoas em todo o mundo. Portugal é um país de baixa prevalência da doença sendo, no entanto de registar a forte imigração de áreas endémicas, particularmente para o sul do país. São apresentados os resultados do estudo efectuado dirigido a esta enzima, a nível bioquímico (actividade enzimática, mobilidade electroforética e teste citoquímico) e genético (variante A- e haplótipo associado), em duas crianças do sexo feminino, raça negra e correspondentes familiares, em que se encontrou uma actividade baixa de G6PD (23 e 18%). Discutem-se causas de expressão de doença ligada ao cromossoma X no sexo feminino e refere-se a possibilidade de homozigotia em zonas de alta prevalência do gene mutado.

### SUMMARY

#### Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency in two Girls

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is the most common erythrocyte enzymopathy, affecting over 400 million people worldwide. Portugal is a low prevalence country, but immigrants from endemic regions are common, particularly in the south of the country. In the present study, we report the laboratory findings observed in two black proband children with low G6PD enzyme activity (23 and 18%). The study also included their first-degree relatives. Both biochemical parameters (enzyme activity, electrophoretic mobility and cytochemical test) and genetic determinations (mutation and haplotype characterisation) were performed.

### INTRODUÇÃO

A Glicose-6-fosfato Desidrogenase (G6PD) é uma enzima que actua na via aeróbia do catabolismo da glicose, transformando a glicose-6-fosfato em 6-fosfogluconato, com redução simultânea do NADP a NADPH<sup>1</sup>. Esta via é responsável pelo catabolismo de apenas cerca de 5 % do total da glicose consumida pelo eritrócito, o que torna evidente não ser esta a via essencial no catabolismo da glicose como forma de obter energia. É no entanto claro que a sua principal importância é a obtenção do NADPH, que entra no ciclo da glutatona. Este ciclo é de crucial importância para o eritrócito, pois

protege-o contra os efeitos oxidativos nocivos dos radicais livres de oxigénio produzidos em grande quantidade nestas células<sup>1-5</sup>.

O gene está localizado no cromossoma X, compreendendo 13 exões e 12 intrões distribuídos por 20 Kb de DNA genómico, pelo que em caso de deficiência a morbilidade incide fundamentalmente em indivíduos do sexo masculino<sup>1,2</sup>. A nível genético exhibe um elevado grau de variabilidade, sendo as duas variantes mais frequentes a variante Mediterrânea (563 C→T) e a variante A- (202G→A / 376 A→G).

É uma patologia com distribuição a nível mundial

desigual, com países com uma frequência que atinge os 25% e outros cuja frequência é inferior a 0,5%<sup>2</sup>. Portugal é um país de baixa prevalência, cerca de 0,51%<sup>6</sup>, sendo no entanto de registar uma crescente imigração de áreas endémicas, nomeadamente de países Africanos.

Neste artigo são estudadas tanto do ponto de vista bioquímico como genético duas crianças do sexo feminino, residentes em Portugal, naturais do Zaire e África do Sul.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas, a nível bioquímico e genético, duas crianças do sexo feminino assim como os familiares directos, de raça negra, naturais do Zaire e África do Sul e actualmente a residir em Portugal, em que foi detectado uma actividade baixa de G6PD.

No primeiro caso trata-se de uma lactente que com 37 dias de vida, que desenvolve uma anemia sintomática em contexto infeccioso. Havia referência a hiperbilirrubinemia no período neonatal e a internamento nos primeiros 12 dias de vida por sepsis, no decurso da qual fez anemia grave que motivou uma transfusão de concentrado eritrocitário.

No segundo caso trata-se de uma criança com 18 meses de idade, em que o doseamento foi efectuado no contexto do diagnóstico diferencial de uma anemia ligeira.

O estudo a nível bioquímico compreendeu:

- doseamento enzimático, pelo método recomendado pelo OMS<sup>1</sup>
- movilidade electroforética, efectuada em acetato de celulose, tampão Tris-EDTA, pH-7,5<sup>7</sup>
- Teste citoquímico (teste de eluição da metahemoglobina)<sup>1,8</sup>

No estudo a nível genético, foi pesquisada directamente a variante A- mais frequente na população de raça negra (202G→A / 376 A→G), por PCR-RFLP (quadro I)<sup>9,10</sup>.

O DNA genómico foi isolado, do sangue total, com o Kit Qiamp Blood (cat. 29106 Quiagen inc., Chatsworth, USA). Os exões 4 e 5 foram amplificados por PCR (Polimerase Chain Reaction), utilizando *primers* específicos (Quadro I). Os ampliões assim obtidos foram submetidos a uma reacção de restrição, utilizando as enzi-

mas apropriadas, nas condições de reacção recomendadas pelo fabricante (New England Biolabs, Beverly, USA). Os fragmentos assim obtidos foram separados em gel de poli-acrilamida a 8%, corados com Brometo de Etídio e visualizados num transiluminador UV.

Foram ainda pesquisados quatro polimorfismos intragénicos, igualmente por PCR-RFLP, usando os *primers* e as enzimas de restrição indicadas no Quadro II.

## RESULTADOS

### CASO 1

No primeiro caso, encontramos uma actividade enzimática de 23%, com uma banda única de mobilidade rápida na electroforese da enzima. No pai encontramos resultados sobreponíveis (actividade enzimática de 24% e mobilidade electroforética de 110%). Na mãe encontramos uma actividade enzimática de 108% com uma banda única na electroforese de mobilidade normal. No teste citoquímico não encontramos células deficientes. O estudo genético mostrou homozigotia na paciente, hemizigotia no pai e heterozigotia na mãe, para as mutações 202 G→A / 376 A→G (figura 1).

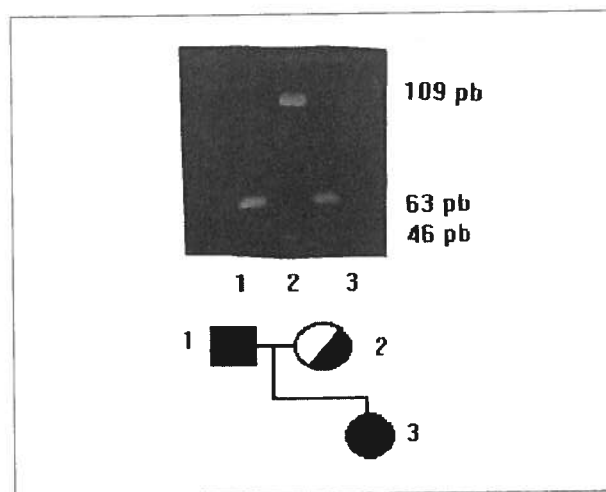


Figura 1 - Detecção da mutação 202 G→A no exão 4 do gene da G6PD. O indivíduo 2 apresenta o gene normal (109 pb), bem como o gene mutado (corte de restrição originando bandas de 63 e 46 pb. Note-se que a fraca intensidade da banda de 46 pb por vezes impossibilita a sua visualização com brometo de etídio). Os indivíduos 1 e 3 apresentam apenas o gene mutado.

Quadro I - Detecção da Variante A- (202G→A / 376A→G) por PCR-RFLP

Mutação	Exão	Sense Primer	Antisense Primer	Enzima de restrição
202G→A	4	5'-GTGGCTGTTCCGGGATGGCCTTCTG-3'	3'-GTTTGTCTCACTCGGGAAGAAGTTC-5'	Nla III
376A→G	5	5'-TGGCCAGTACGATGATGCAG-3'	3'-TGGCGGAGAAGATGGACCGG-5'	Fok I

Quadro II - Determinação do Haplótipo. Detecção dos quatro polimorfismos intragénicos por PCR-RFLP

Polimorfismo <sup>a)</sup>	Exão / Intrão <sup>b)</sup>	Sense Primer	Antisense Primer	Enzima de restrição
611C→G	I-5	5' GCCAGATGTAAGGCTTGCCG	5' CGATGATGCGGTTCCAGCCT	<i>Pvu</i> II
1116G→A	E-10	5' CACGTAGGGGTGCCCTTCAT	5' TCCTTCTCTGTAGGGCACCT	<i>Pst</i> I
1311C→T	E-11	5' ACGTGAAGCTCCCTGACGC	5' TGAAAATACGCCAGGCCTCG	<i>Bcl</i> I
93T→C	I-11	5' ACTTCGTGCGCAGGTGAGGC	5' GCTCGTCGCTGAGGGGACAT	<i>Nla</i> III

a) O número refere-se à sequência do nucleotídeo do cDNA de cada exão, ou de cada intrão <sup>12</sup>.  
 b) I- intrão; E- exão

CASO 2

No estudo a nível bioquímico do segundo caso em que não tivemos acesso ao pai, encontramos uma actividade de G6PD de 18% na paciente, com uma banda única de mobilidade rápida na electroforese da enzima. Na mãe encontramos uma actividade enzimática de 51%, com dupla banda na electroforese; uma de mobilidade normal e outra de mobilidade rápida de menor intensidade. O estudo a nível genético mostrou homozigotia na paciente e heterozigotia na mãe, para as mutações 202G→A /376A→G (figura 2).

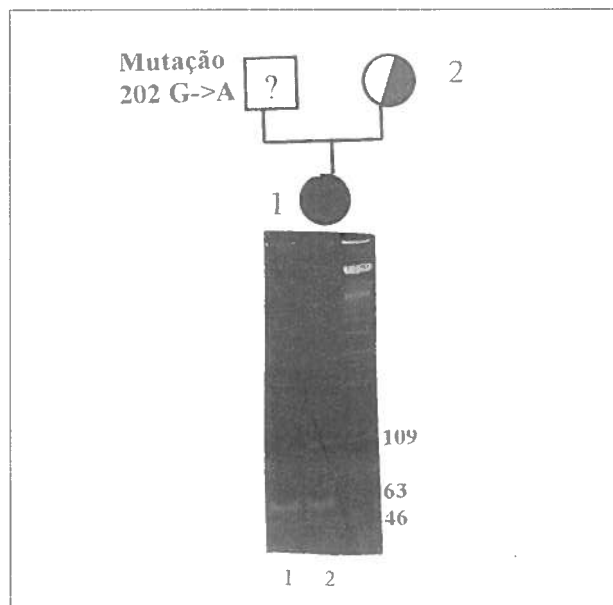


Figura 2- Detecção da mutação 202 G→A no exão 4 do gene da G6PD. O indivíduo 2 apresenta o gene normal (109 pb) e o gene mutado (ver legenda da figura 1), o indivíduo 1 apresenta apenas o gene mutado.

HAPLÓTIPO

Em ambos os casos, encontramos homozigotia para os polimorfismos intragénicos estudados (Quadro III). O haplótipo encontrado (+ - + +) é o já anteriormente descrito como associado a esta variante A- (202G→A /376 A→G)<sup>11</sup>.

Quadro III - Haplótipo<sup>a)</sup> encontrado nos dois casos e nos dois cromossomas estudados

	Intrão 5, 611C→G <sup>b)</sup>	Exão 10, 1116G→A <sup>b)</sup>	Exão 11, 1311C→T <sup>b)</sup>	Intrão 11, 93T→C <sup>b)</sup>
Caso 1	+/+	+/+	-/-	+/+
Caso 2	+/+	+/+	-/-	+/+

a) No texto, o haplótipo é referido com a sequência de 4 sinais +ou -, indicando a presença (+) ou ausência (-) dos polimorfismos, pela seguinte ordem: I-5; E-10; E-11; I-11 (I-intrão; E- exão)  
 b) O número refere-se à sequência do nucleotídeo do cDNA de cada exão, ou de cada intrão<sup>12</sup>.

Quadro IV- Actividade de G6PD e percentagem de células deficientes no teste citoquímico em heterozigóticas para a variante A-

Caso <sup>a)</sup>	Actividade de G6PD (% do Normal)	Teste citoquímico (% de células deficientes)
1	108	0
2	73	40
3	65	32
4	66	20
5	75	39
6	51	48
7	59	51

a) O caso 1 desta tabela é a mãe do primeiro caso aqui descrito. Esta é a única situação observada com uma actividade de G6PD normal, e em que não foram encontradas células deficientes no teste citoquímico, mas que no entanto foi encontrado o alelo mutado.

COMENTÁRIOS

O défice de G6PD é uma doença de hereditariedade recessiva ligada ao cromossoma X<sup>1</sup>, incidindo como tal a morbilidade fundamentalmente em indivíduos do sexo masculino. Este facto não deverá no entanto excluir à partida o diagnóstico no sexo feminino.

Efectivamente a alta prevalência do gene mutado em determinadas áreas geográficas aliado ao facto da capacidade reprodutora dos hemizigotos não estar afectada, condiciona uma possibilidade real de homozigotia no sexo feminino. A prevalência desta situação na população feminina Americana de etnia Africana está calculada em cerca de 1%, o que condiciona um número elevado de mulheres afectadas<sup>13</sup>.

Outras situações susceptíveis de condicionar doença de hereditariedade recessiva ligada ao cromossoma X no sexo feminino serão; a presença de um único cromossoma (Síndrome de Turner) ou de uma deleção no cromossoma não afectado primariamente. De referir ainda outra possibilidade, condicionada pelo facto de numa fase precoce da embriogénese um dos cromossomas X ser inactivado funcionalmente de forma aleatória, conduzindo a nível celular a um mosaicismo (Teoria de Lyon). Em caso de heterozigotia uma inactivação desequilibrada no sentido da população deficitária pode originar expressão de doença<sup>13</sup>.

A presença de um desequilíbrio pode prejudicar o diagnóstico a nível bioquímico, tanto da condição de heterozigotia como de homozigotia, pelo que o estudo molecular se pode tornar imprescindível. Nos dois casos apresentados a actividade e a electroforese da enzima, sugeriam homozigotia para défice de G6PD. No entanto, no primeiro caso o estudo bioquímico da mãe não era sugestivo de heterozigotia e no segundo caso não tivemos acesso ao pai. Somente o estudo a nível genético foi conclusivo, provando de forma inequívoca homozigotia nas duas crianças assim como heterozigotia na mãe do primeiro caso. O haplótipo encontrado permitiu-nos também confirmar a análise mutacional, dado que o haplótipo (+ - + +), foi encontrado em homozigotia em ambas as crianças e está relacionado com esta Variante A- (202G→A/376 A→G)<sup>11</sup>.

O quadro III mostra o estudo bioquímico da mãe do caso I comparativamente a outras seis portadoras obrigatórias para a variante A-. Esta é a única situação em que se verifica uma actividade enzimática normal aliada

a uma ausência de células deficientes. A explicação mais plausível que encontramos na literatura para esta discrepância é a presença de um fenómeno de "lyonização" desequilibrada no sentido da população normal<sup>1,2</sup>.

## BIBLIOGRAFIA

1. DACIE JV, LEWIS SM: *Practical Haematology*. Edimburg. Churchill Livingstone, 1991:195-225.
2. LUZZATTO L, NATHAM DG, OSKY FA: *Hematology of infancy and childhood*. Philadelphia WB Sanders Company, 1993:674-695.
3. BEUTLER E: The Genetics of glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Sem Haematol* 1990;27: 137-164.
4. BEUTLER E: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase: New perspectives. *Blood* 1989; 73: 1397-1401.
5. BEUTLER E: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. *N Engl J Med* 1991;324: 169-174.
6. MARTINS MC, OLIM G et al: Hereditary anaemias in Portugal: epidemiological public health significance and control. *J Med Genet* 1993;30:235-239.
7. GIBLETT E, ANDERSON JE: Electrophoretic analyses of polymorphic red cell enzymes. In: *Red cell Metabolism: Beutler E*. Churchill Livingstone, Edinburg, 1986:108-123.
8. COSTA E, RODRIGUES M, MARQUES L, BARBOT J: O teste de eluição citoquímica na detecção de heterozigotas para défice de G6PD. *Nascer e Crescer* 1995;4:99-102.
9. BEUTLER E, KUHL W, VIVES-CORRONS JL, PRCHAL JT: Molecular heterogeneity of Glucose-6-phosphate dehydrogenase A-. *Blood* 1989;74: 2550-2555.
10. COSTA E, BARBOT J, COIMBRA E, PINHO L, JUSTIÇA B, CABEDA JM: Défice de Glicose-6-fosfato desidrogenase em 10 famílias residentes no norte de Portugal. *Arquivos de Medicina* 1997;11: 87-91.
11. XU W, WESTWOOD B et al: Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations and haplotypes in various ethnic groups. *Blood* 1995; 85: 257-263.
12. CHEN EY, CHENG AL et al: Sequence of human glucose-6-phosphate dehydrogenase in plasmids and yeast artificial chromosomes. *Genomics* 1991; 10: 792-800.
13. GELEHRTER TD, COLLINS FS: *Principles of Medical Genetics*. Baltimore. Williams and Wilkins, 1990.