



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química e Farmácia

A deficiência no enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase -
Sensibilidade a fármacos

Daniela Filipa Ribeiro Brás

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Doutora Vera Ribeiro

Prof. Doutora Maria José de Castro

2017



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química e Farmácia

**A deficiência no enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase -
Sensibilidade a fármacos**

Daniela Filipa Ribeiro Brás

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Doutora Vera Ribeiro

Prof. Doutora Maria José de Castro

2017

**A deficiência no enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase –
Sensibilidade a fármacos**

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Daniela Filipa Ribeiro Brás

Copyright, Daniela Filipa Ribeiro Brás

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A realização desta tese representa mais uma meta cumprida a nível profissional e educacional, que resulta do meu empenho pessoal e de todos os intervenientes ao longo desta formação, os quais merecem o meu reconhecimento e gratidão.

O meu agradecimento à Professora Doutora Vera Ribeiro e Professora Doutora Maria José Castro pelo apoio prestado na elaboração deste trabalho e pelos conhecimentos transmitidos.

À minha família, principalmente à minha mãe e ao meu pai, sem eles nada seria possível, o meu agradecimento profundo pela compreensão e pelo apoio prestado.

A todos que me deram o apoio imprescindível para mergulhar nas páginas deste trabalho nesta etapa final. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem.

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.

Ricardo Reis

Resumo

A deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é a anomalia enzimática mais comum dos eritrócitos. A diminuição da atividade do enzima nos eritrócitos aumenta a vulnerabilidade ao *stress* oxidativo causado por exposição a certos medicamentos ou a produtos naturais, como é o caso dos presentes em certos alimentos, de que são exemplo as favas. Entre as manifestações clínicas mais comuns desta condição estão a hemólise aguda, hemólise crónica e icterícia neonatal.

A deficiência em G6PD é a deficiência enzimática mais comum nos seres humanos, que afeta 400 milhões de pessoas em todo o mundo. Sabe-se que a prevalência global da deficiência de G6PD se encontra geograficamente correlacionada com as áreas endémicas em malária, sendo maior na África Subsariana, Médio Oriente, Sudeste da Ásia, Europa Mediterrânica e algumas áreas da América Latina. É herdada como doença recessiva ligada ao cromossoma X. A deficiência de G6PD é polimórfica, com mais de 300 variantes.

Foram estudados neste trabalho os determinantes da deficiência na G6PD, bem como o seu impacto na saúde, nomeadamente o efeito de agentes externos que desencadeiam manifestações clínicas em portadores. Entre os fármacos descritos como potenciadores de sintomas associados a esta deficiência destaca-se a primaquina, um anti-malárico. A hemólise pode ser também desencadeada por infeções e por alguns fármacos com propriedades oxidativas como o ácido acetilsalicílico, a vitamina K, o cloranfenicol e outros antimaláricos. A relação entre a deficiência da G6PD e malária é também discutida.

Palavras-chave: G6PD, hemólise, variantes, fármacos, eritrócito, malária.

Abstract

Deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is the most common enzymatic anomaly of erythrocytes. The reduction of the enzyme activity in erythrocytes increases the vulnerability of the oxidative stress caused by exposure to certain drugs or to natural products, such as those found in certain kinds of food, such as fava beans. Among the most common clinical manifestations of this condition are acute hemolysis, chronic hemolysis and newborn jaundice.

Deficiency in G6PD is the most common enzyme deficiency in humans, which affects 400 million people worldwide. It is known that the global pervasiveness of G6PD deficiency is geographically correlated with endemic areas in malaria, being the highest in Sub-Saharan Africa, Middle East, Southeast Asia, Mediterranean Europe and some areas of Latin America. It is inherited as an X-linked recessive disease. G6PD deficiency is polymorphic, with more than 300 variations.

In this work the determinants of G6PD deficiency were studied, as well as their impact on health namely the effect of external agents that trigger clinical manifestations in people. Among the described medicines that trigger symptoms associated to this deficiency is primaquine, an antimalarial. Hemolysis can be triggered also by infections and by some painkillers with oxidative properties such as acetylsalicylic acid, vitamin K, chloramphenicol and other antimalarials. The relationship between G6PD deficiency and malaria is also discussed.

Key words: G6PD, hemolysis, variations, medicines, erythrocyte, malaria.

ÍNDICE

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	ix
Lista de abreviaturas	x
Introdução	1
Capítulo 1 - Eritrócito	2
1.1. Eritrócito	2
1.2. Metabolismo do eritrócito	5
1.3. Membrana do eritrócito	10
1.4. Destruição normal dos eritrócitos	12
1.5. Introdução às anemias hemolíticas	12
Capítulo 2 - Enzimas	14
2.1. Características	14
2.2. Classificação e número de código	16
2.3. Regulação por controlo da concentração de enzima presente na célula ...	17
2.4. Regulação alostérica	18
2.5. Envelhecimento e espécies reativas	18
2.6. Glutathiona	21
2.7. O papel da glutathiona no equilíbrio redox	22
2.8. Síntese da glutathiona	23
2.9. Funções da glutathiona nas células	24
2.10. Glutathionilação de proteínas	25
Capítulo 3 - Enzima glicose-6-fosfato desidrogenase	27
3.1. Estrutura	27
3.2. Função	29
3.3. Fatores reguladores	29
3.4. O efeito de fármacos	30
3.4.1. Manifestações clínicas	31
3.4.2. O mecanismo de hemólise	32
3.4.3. Anemia hemolítica aguda (AHA)	32

3.4.3.1.Favismo	33
3.4.4.Anemia hemolítica crónica não-esferocítica (CNSHA)	34
3.4.5.Icterícia neonatal.....	34
3.5. Divisão em classes da deficiência da G6PD	36
3.6. Polimorfismos genéticos.....	37
3.6.1.Malária.....	43
3.7. Diagnóstico da deficiência de G6PD.....	46
3.8. Tratamento	48
3.9. Doação de sangue	48
Conclusão.....	50
Referências Bibliográficas.....	51

Índice de figuras

Figura 1.1 - Via glicolítica de Embden Meyerhof.....	3
Figura 1.2 - Ramo oxidativo da via dos fosfatos de pentose.....	4
Figura 1.3 - Desvio de Rapaport-Luebering que regula a concentração de 2,3-DPG no eritrócito.....	6
Figura 1.4 - Fase oxidativa da via dos fosfatos de pentose.....	7
Figura 1.5 - Fase não oxidativa da via dos fosfatos de pentose.....	8
Figura 1.6 - Estrutura da membrana do eritrócito.....	11
Figura 2.1 - Estrutura da glutathiona.....	22
Figura 2.2 - Ciclo redox da glutathiona.....	22
Figura 2.3 - Reações catalisadas por G6PD, GR, GP, CAT e SOD.....	23
Figura 2.4 - Biossíntese da glutathiona.....	24
Figura 3.1 - Um modelo da estrutura tridimensional do dímero de G6PD.....	28
Figura 3.2 - Mortes por malária em pacientes internados.....	44
Figura 3.3 - Previsão através da mediana da frequência alélica da deficiência de G6PD no mapa global em 2010.....	45
Figura 3.4 - Princípio do teste da atividade da G6PD.....	46

Índice de tabelas

Tabela 2.1 - Funções celulares da glutathiona.....	25
Tabela 3.1 - Fármacos e moléculas associados a hemólise na deficiência de G6PD.....	31
Tabela 3.2 - Descrição das classes de variantes de G6PD.....	37
Tabela 3.3 - Algumas variantes fenotípicas da deficiência da G6PD e suas mutações..	43

Lista de abreviaturas

µm – Micrometro

A – Adenina

AP-1 – Proteína ativadora 1

Arg – Arginina

Asn – Asparagina

Asp – Ácido aspártico

ATP – Trifosfato de adenosina

AHA – Anemia hemolítica aguda

C – Citosina

CAT – Catalase

CNSHA – Anemia hemolítica crónica não-esferocítica

Cys – Cisteína

Da – Dalton

DNA – Ácido desoxirribonucleico

Fe²⁺ – Ião ferro

G – Guanina

G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase

GPx – Glutaciona peroxidase

GR – Glutaciona redutase

GSH – Glutaciona reduzida

GST – Glutaciona S-transferase

GSSG – Glutaciona oxidada

Ile – Isoleucina

LDH – Lactato desidrogenase

Leu – Leucina

Met – Metionina

mRNA – RNA mensageiro

NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida

NF-κB – Fator nuclear κB

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação em cadeia da polimerase

Phe – Fenilalanina

Pro – Prolina

RA – Ácido retinóico

RE – Sistema reticuloendotelial

RNA – Ácido ribonucleico

RNS – Espécies reativas de azoto

ROS – Espécies reativas de oxigénio

Ser – Serina

SOD – Superóxido dismutase

SP-1 – Proteína de especificidade 1

T – Timina

Thr – Treonina

Tyr – Tirosina

TxrR – Tiorredoxina redutase

Val – Valina

Introdução

O enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) catalisa o primeiro passo na via dos fosfatos de pentose, oxidando glicose-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona e reduzindo fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADP⁺) a NADPH. O NADPH é crucial na produção de glutathione reduzida no citoplasma de eritrócitos de forma a proteger a hemoglobina contra danos oxidativos. No caso de deficiência de G6PD, a presença de agentes oxidantes leva à oxidação dos grupos sulfidrilo o que leva à agregação de moléculas de hemoglobina, diminuindo assim a sua solubilidade, o que causa hemólise.

A deficiência de G6PD é o defeito enzimático humano mais comum e afeta mais de 400 milhões de pessoas em todo o mundo. É um defeito genético hereditário ligado ao cromossoma X, resultando em variantes de proteína com diferentes níveis de atividade enzimática que estão associados a uma ampla gama de fenótipos bioquímicos e clínicos. As manifestações clínicas mais frequentes da deficiência de G6PD são icterícia neonatal e anemia hemolítica aguda, frequentemente desencadeada por *stress* oxidativo devido a infecção e exposição a medicamentos e certos alimentos (por exemplo, favas). Entre os fármacos descritos como potenciadores de sintomas associados a esta deficiência destaca-se a primaquina, um anti-malárico, não sendo o único fármaco que pode ter efeito hemolítico. A hemólise pode ser desencadeada por infecções e por alguns fármacos com propriedades oxidativas como o ácido acetilsalicílico, a vitamina K, o cloranfenicol e outros antimaláricos.

A hereditariedade da deficiência de G6PD mostra um padrão tipicamente ligado ao cromossoma X no qual são principalmente afetados os homens e as mulheres, caso sejam heterozigotas, apresentam manifestações clínicas menos graves.

A semelhança entre as áreas onde a deficiência de G6PD é comum e áreas onde a malária causada por *Plasmodium falciparum* é endêmica fornece evidência circunstancial de que a deficiência de G6PD confere resistência contra a malária. As frequências mais elevadas são detetadas em África, na Ásia, na região do Mediterrâneo e no Médio Oriente devido a migrações, no entanto, esta desordem também é encontrada na América do Norte e do Sul e nos países do norte da Europa.

Capítulo 1 - Eritrócito

1.1. Eritrócito

Para que a hemoglobina esteja em contacto estreito com os tecidos e para o sucesso das trocas gasosas, o eritrócito, com 8 μm de diâmetro, deve ser capaz de passar repetidamente através dos capilares sanguíneos, cujo diâmetro é 3,5 μm , manter a hemoglobina na forma reduzida (forma ferrosa) e manter o equilíbrio osmótico, apesar da alta concentração de proteína (hemoglobina) na célula.

A viagem completa de um eritrócito, ao longo dos seus 120 dias de vida, foi calculada em 480 Km.

Para executar tais funções, a célula é um disco bicôncavo flexível, com capacidade de gerar energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP) pela via glicolítica anaeróbia (Embden-Meyerhof) (figura 1.1) e gerar poder redutor, como dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADH), por essa via, e como fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADPH) pela via dos fosfatos de pentose (figura 1.2) (Hoffbrand et al., 2008).

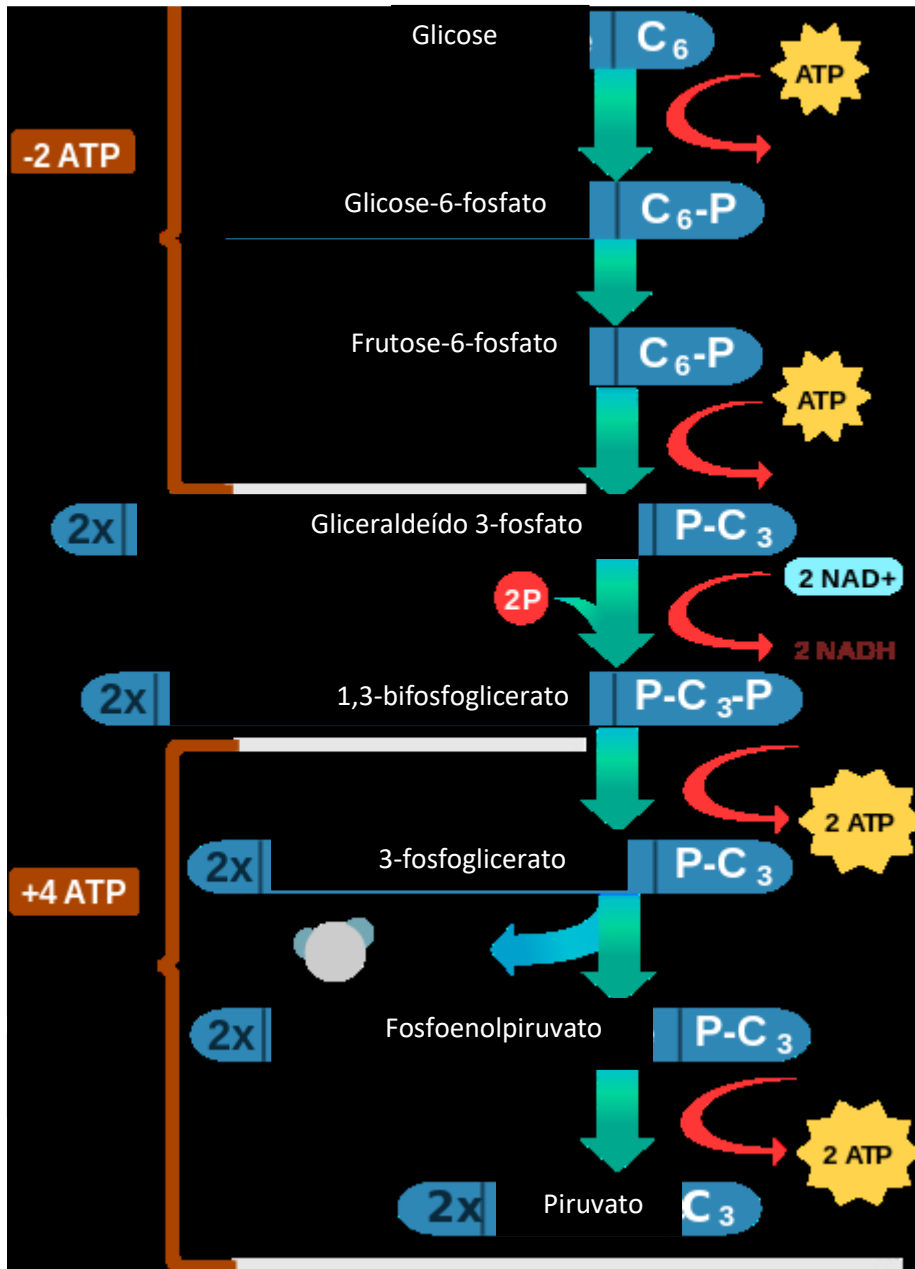


Figura 1.1 - Via glicolítica de Embden-Meyerhof (adaptado de RegisFrey [CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)]).

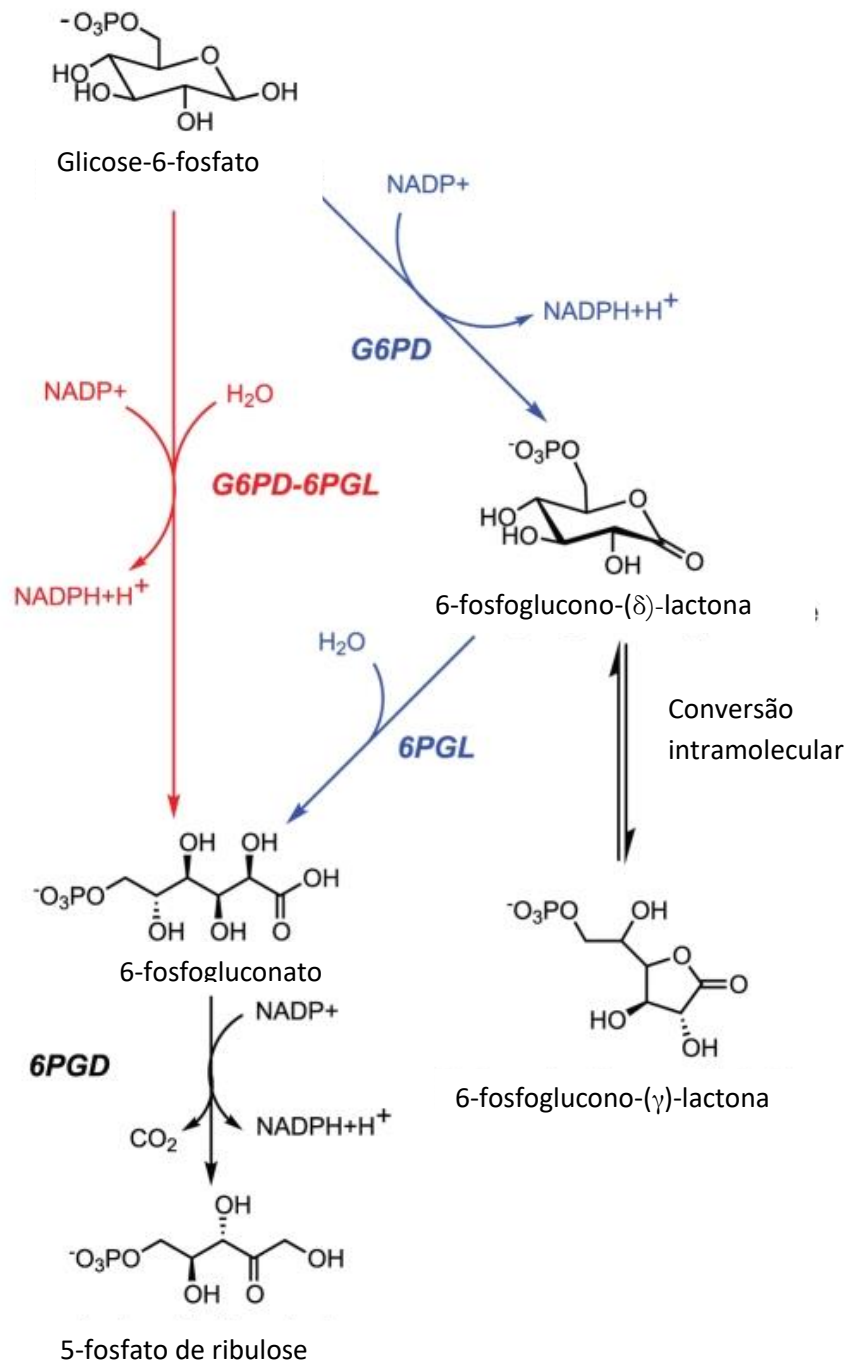


Figura 1.2 – Ramo oxidativo da via dos fosfatos de pentose. A rota seguida por organismos com enzimas bifuncionais é mostrada a vermelho, enquanto a rota seguida por outros organismos com a via dos fosfatos de pentose funcional é mostrada a azul (adaptado de Stover et al., 2011).

1.2. Metabolismo do eritrócito

- **Via de Embden-Meyerhof (Glicólise)**

Nesta série de reações bioquímicas, a glicose do plasma, que entra no eritrócito por difusão facilitada, é metabolizada a lactato através da glicólise anaeróbia. Por cada molécula de glicose são geradas duas moléculas de ATP e, portanto, duas ligações fosfato de alta energia. O ATP fornece energia para a manutenção do volume, da forma e da flexibilidade, bem como para as vias de biossíntese da célula. O eritrócito tem pressão osmótica cinco vezes superior à do plasma e uma fragilidade inerente da membrana resulta num movimento contínuo de Na^+ e K^+ . É necessária uma bomba ATPase de sódio na membrana que usa uma molécula de ATP para movimentar três iões de sódio para fora e dois iões de potássio para dentro da célula.

A via de Embden-Meyerhof também gera NADH necessário para que o enzima metemoglobina-redutase reduza metemoglobina não funcional (hemoglobina oxidada), que contém ião férrico (produzido pela oxidação de cerca de 3% da hemoglobina por dia), para hemoglobina reduzida, funcionalmente ativa.

Esta via metabólica está relacionada, ainda, com a produção de 2,3-DPG, que é gerado no desvio de Rapaport-Luebering (figura 1.3). Este composto forma um complexo 1:1 com a hemoglobina, sendo importante na regulação da sua afinidade pelo oxigénio (Hoffbrand et al., 2008).

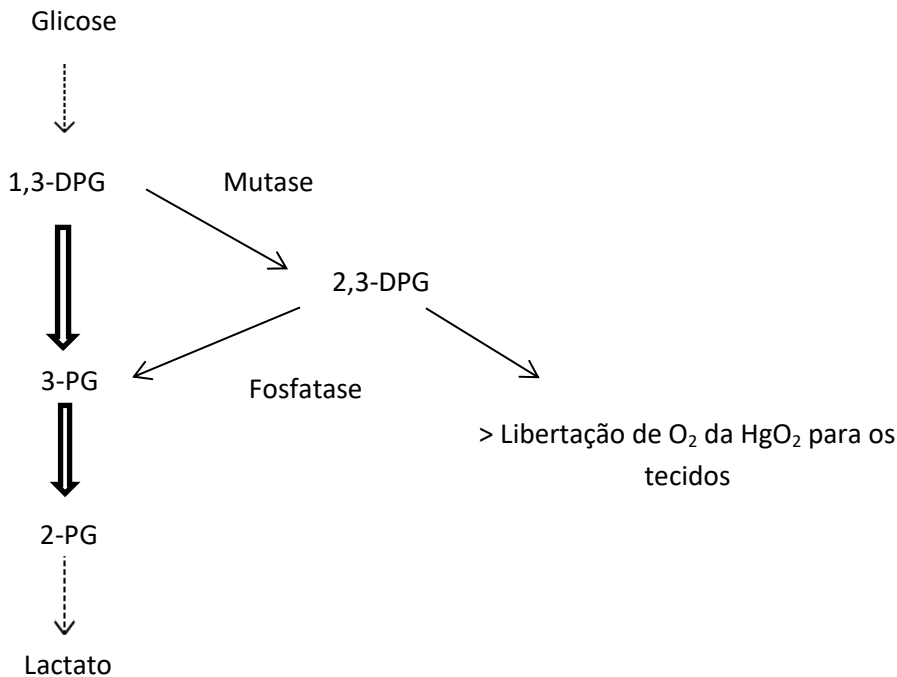


Figura 1.3 – Desvio de Rapaport-Luebering que regula a concentração de 2,3-DPG no eritrócito (adaptado de Hoffbrand et al., 2008).

- **Ciclo de Rapaport-Luebering**

No eritrócito existe uma grande concentração de ácido 2,3-bisfosfoglicérico que se forma por um “desvio” da glicólise, o ciclo de Rapaport-Luebering, podendo-se formar quer pela ação de uma mutase sobre o ácido 1,3-difosfoglicérico, quer pela ação de uma cinase sobre o ácido 3-fosfoglicérico. Este ácido possui um papel importante, visto que as suas cargas negativas interagem com cargas positivas das duas cadeias da hemoglobina, diminuindo a afinidade da hemoglobina para com o oxigênio, e consequentemente, facilitando a liberação do mesmo nos tecidos (Halpern et al., 1997).

- **Via dos fosfatos de pentose**

Por não possuir mitocôndria, o eritrócito é incapaz de obter energia a partir do ciclo de Krebs. Desta forma, esta célula metaboliza 90% da glicose pela via anaeróbia de

Embden-Meyerhof e 10% pela via dos fosfatos de pentose, na qual atua a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD, EC 1.1.1.49). Sendo assim, cerca de 10% das moléculas de glicose-6-fosfato produzidas na glicólise são desviadas para esta via oxidativa, na qual sofrem conversão em 6-fosfogliconato e em ribulose-5-fosfato.

Numa primeira etapa, conhecida como fase oxidativa, o 6-fosfato de D-glicose é oxidado a 5-fosfato de ribulose, em duas reações, com redução de duas moléculas de NADP^+ a NADPH e libertação de uma molécula de CO_2 .

Inicialmente o 6-fosfato de D-glicose é oxidado a 6-fosfato de D-gluconolactona com formação de NADPH. Esta lactona é em seguida hidrolisada a 6-fosfogluconato pelo enzima lactonase. Devido à instabilidade química desta lactona, a reação ocorre também por via não enzimática.

O 6-fosfogluconato sofre finalmente uma descarboxilação oxidativa a 5-fosfato de D-ribulose por ação do enzima 6-fosfogluconato desidrogenase, libertando-se CO_2 e ocorrendo redução do NADP^+ a NADPH (figura 1.4).

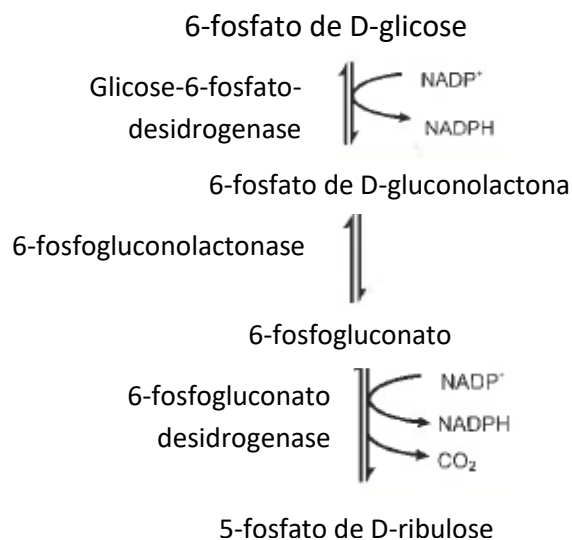


Figura 1.4 – Fase oxidativa da via dos fosfatos de pentose (adaptado Halpern et al., 2008).

Nesta fase inicial cumprem-se duas das principais funções da via dos fosfatos de pentose. A primeira função é a geração de potencial redutor, na forma de NADPH, utilizado como cofactor em reações catalisadas pelo enzima glutathiona redutase bem como nas reações de destoxificação catalisadas pela superfamília dos Citocromos

P450. A segunda função, o metabolismo de pentoses, em particular, na formação de 5-fosfato de D-ribose, essencial na síntese de ácidos nucleicos.

A segunda fase desta via inicia-se com a formação de uma mistura de isómeros do 5-fosfato de D-ribulose, na presença dos enzimas fosfopentose isomerase e fosfopentose epimerase que levam à formação de 5-fosfato de D-xilulose e 5-fosfato de D-ribose, respetivamente. Por ação do transcetolase, o 5-fosfato de D-ribose e o 5-fosfato de D-ribulose originam 3-fosfato de D-gliceraldeído e 7-fosfato de sedo-heptulose. Estes dois ésteres de fosfato com três e sete átomos de carbono formam em seguida 4-fosfato de D-eritrose e 6-fosfato de D-frutose por ação do transaldolase. Finalmente, o transcetolase pode ainda catalisar a formação de 3-fosfato de D-gliceraldeído e 6-fosfato de D-frutose a partir de 4-fosfato de D-eritrose e 5-fosfato de D-xilulose (figura 1.5) (Halpern et al., 2008).

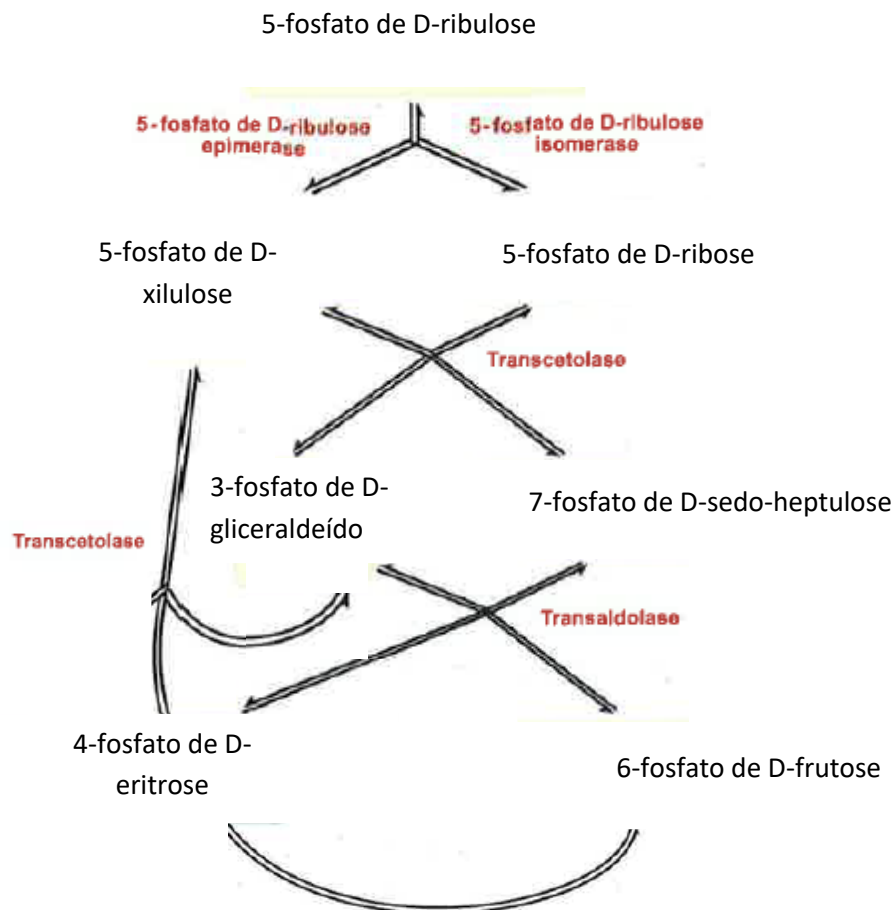


Figura 1.5 – Fase não oxidativa da via dos fosfatos de pentose (adaptado de Cordeiro e Silva, 2008).

- **Enzimas da via**

A G6PD catalisa a oxidação do 6-fosfato de D-glicose a 6-fosfogluconolactona, com redução do NADP^+ a NADPH . O carbono aldeídico (C1) é oxidado a ácido carboxílico. O enzima é específico relativamente a estes substratos.

O enzima 6-fosfogluconolactonase é também conhecido simplesmente como lactonase, tem como função catalisar a hidrólise de uma ligação éster, levando à formação de 6-fosfogluconato a partir do 6-fosfato de D-gluconolactona. Trata-se de uma reação que ocorre espontaneamente em organismos que não possuem este enzima.

O enzima 6-fosfogluconato desidrogenase catalisa a oxidação do 6-fosfogluconato a 5-fosfato de D-ribulose através da formação de uma cetona (oxidação do hidroxilo em C3 com descarboxilação em C1). Assim forma-se CO_2 e ocorre redução do NADP^+ a NADPH .

O enzima 5-fosfato de D-ribulose epimerase catalisa a formação de 5-fosfato de D-xilulose, enquanto o 5-fosfato de D-ribulose isomerase catalisa a formação de 5-fosfato de D-ribose. Estas reações encontram-se praticamente em equilíbrio em condições fisiológicas, ocorrendo a produção de uma mistura de isómeros e 5-fosfato de pentose, que podem reagir entre si ou com outros intermediários da via. O mecanismo de reação apresenta semelhanças com o da reação catalisada por fosfato de triose isomerase, uma vez que no centro das possibilidades reacionais de 2-hidroxicarbonilos se encontra a formação da forma enólica comum. Em termos de especificidade, a posição do grupo fosfato não parece ser relevante. Deve ser considerada a possibilidade de ocorrência de uma eliminação irreversível do fosfato, com formação de 2-oxoaldeídos. Muito provavelmente estas reações ocorrerão também espontaneamente através da via não enzimática.

Por último, referem-se os dois enzimas responsáveis pela não linearidade e sucessivas bifurcações e combinações de metabolitos da via dos fosfatos de pentose, o transcetolase e o transaldolase. Estes enzimas catalisam, respetivamente, reações de transferência de fragmentos com dois ou três átomos de carbono.

O enzima transcetolase transfere um grupo glicolaldeído do 5-fosfato de D-xilulose para o C1 de diversos aceitadores que tenham em comum um aldeído terminal. Desta forma leva à formação de 7-fosfato de D-sedo-heptulose por transferência do grupo glicolaldeído do 5-fosfato de D-xilulose para o 5-fosfato de D-ribose e a formação de 6-fosfato de D-frutose por transferência deste grupo do 5-fosfato de D-xilulose para o 4-fosfato de D-eritrose. Em qualquer uma destas reações forma-se também 3-fosfato de D-gliceraldeído. Esta molécula em C3 provém do 5-fosfato de D-xilulose.

O enzima transaldolase catalisa a transferência de um resíduo de di-hidroxiacetona do 7-fosfato de D-sedo-heptulose para o 3-fosfato de D-gliceraldeído, formando 4-fosfato de D-eritrose e 6-fosfato de D-frutose. Trata-se de uma reação de condensação aldólica muito semelhante à catalisada pela aldolase na glicólise.

Uma das principais características desta via é a sua adaptabilidade às diferentes necessidades da célula. A via pode operar através da sua secção linear e com a formação de 3-fosfato de D-gliceraldeído e 6-fosfato de D-frutose, oxidando o 6-fosfato de D-glucose e com produção de NADPH. A via pode, em alternativa, produzir essencialmente fosfatos de pentose com vista à biossíntese de nucleótidos ou pode metabolizar diferentes pentoses de origem exógena.

Dada a sua importância em processos metabólicos tão díspares mas essenciais à sobrevivência das células em situações de stress oxidativo ou à sua divisão, a via oferece excelentes possibilidades na identificação de potenciais alvos terapêuticos. De salientar ainda a forte possibilidade de diversas reações não enzimáticas, algumas das quais dispensando a necessidade da existência de enzimas como o lactonase, fosfopentose isomerase e fosfopentose epimerase, e ainda a possibilidade de formação de metabolitos reativos como 2-oxoaldeídos, com um número de átomos de carbono superior a três (Halpern et al., 2008).

1.3. Membrana do eritrócito

A membrana do eritrócito compreende uma dupla camada lipídica, proteínas integrais e periféricas da membrana e um esqueleto da membrana. Cerca de 50% da membrana

compõe-se de proteína, 20% de fosfolípidos, 20% de colesterol e 10% de glícidos. Os glícidos só existem na superfície externa, enquanto as proteínas são periféricas ou integrais, penetrando na dupla camada lipídica (figura 1.6).

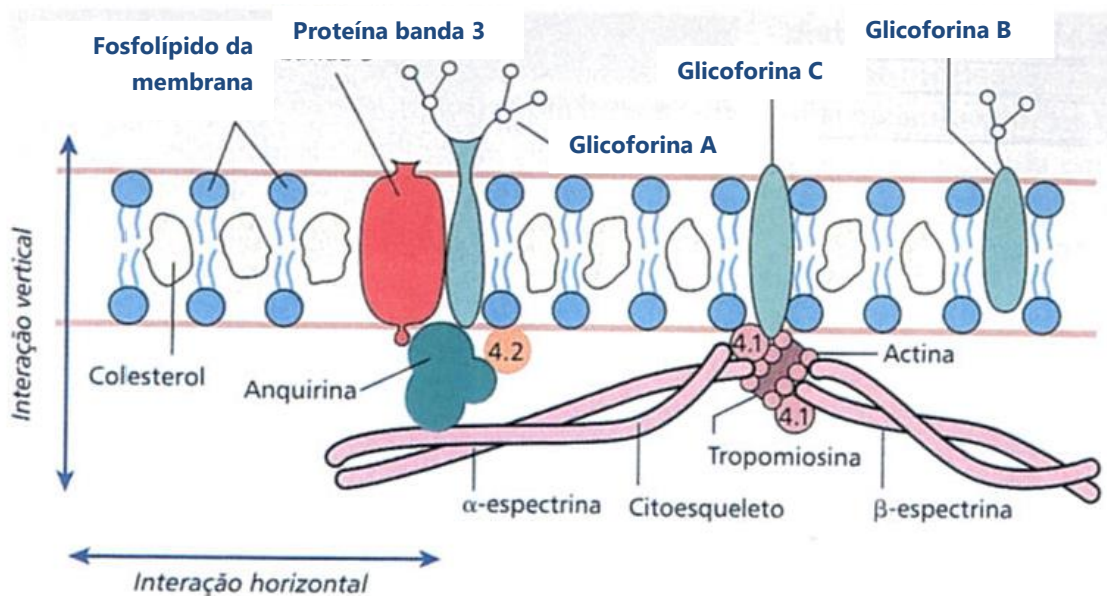


Figura 1.6 - Estrutura da membrana do eritrócito. Algumas das proteínas penetrantes e integrais contêm antígenos glicosilados; outros antígenos são ligados diretamente na camada lipídica (adaptado de Hoffbrand et al., 2008).

O esqueleto da membrana é formado por proteínas estruturais que incluem α e β espectrina, anquirina, proteína 4.1 e actina. Essas proteínas formam uma rede horizontal no lado interno do eritrócito e são importantes na manutenção da forma bicôncava. A espectrina é a mais abundante e consiste em duas cadeias, α e β , enroladas uma à outra para formar heterodímeros que se associam cabeça-a-cabeça para formar tetrâmeros, os quais, por sua vez, são ligados na extremidade caudal com actina e conectados à proteína banda 4.1. Na outra extremidade, as cadeias de α -espectrina ligam-se à anquirina, que se conecta na banda 3, proteína transmembranar que age como canal iônico (“conexões verticais”) (figura 1.6). A proteína 4.2 intensifica essa interação (Hoffbrand et al., 2008).

1.4. Destruição normal dos eritrócitos

Em geral a destruição dos eritrócitos ocorre depois de uma sobrevivência média de 120 dias. Após este período as células são removidas extravascularmente pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial (RE), em especial na medula óssea, mas também no fígado e no baço.

As cadeias de globina são degradadas em aminoácidos que são reutilizados para síntese geral de proteínas no organismo.

As haptoglobinas são proteínas presentes no plasma e são capazes de ligar hemoglobina. O complexo haptoglobina-hemoglobina é removido do plasma pelo sistema RE. A hemólise intravascular (destruição de eritrócitos dentro dos vasos sanguíneos) desempenha um pequeno papel ou mesmo um papel nulo na destruição normal dos eritrócitos.

Como os eritrócitos não têm núcleo, o seu metabolismo deteriora-se gradualmente à medida que os enzimas são degradados e não são repostos, tornando-os inviáveis. O catabolismo do heme dos eritrócitos liberta ferro para recirculação, via transferrina plasmática, para os eritroblastos da medula óssea e protoporfirina, a qual é transformada em bilirrubina. Esta é conjugada, no fígado, com ácido glucurónico, sendo os conjugados excretados no intestino via bÍlis e convertidos em estercobilinogénio e estercobilina (excretados nas fezes). O estercobilinogénio e a estercobilina são parcialmente reabsorvidos e excretados na urina como urobilinogénio e urobilina, respetivamente.

1.5. Introdução às anemias hemolíticas

Anemias hemolíticas são anemias resultantes do aumento do ritmo de destruição dos eritrócitos. Devido à hiperplasia eritropoiética e à expansão da medula óssea, a destruição de eritrócitos pode aumentar muitas vezes antes que o doente fique anémico, o que caracteriza a doença hemolítica compensada. A medula óssea normal do adulto, depois de expansão total, é capaz de produzir eritrócitos num ritmo até 6 a

8 vezes maior do que o normal. Isso causa grande reticulocitose, particularmente em doentes mais anêmicos. A anemia hemolítica pode não ser observada até que a sobrevivência eritrocitária seja inferior a 30 dias (Hoffbrand et al., 2008).

Capítulo 2 - Enzimas

2.1. Caraterísticas

Todos os enzimas são proteínas exceto um pequeno grupo de moléculas de RNA catalíticas. A atividade catalítica depende da integridade das suas conformações nativas. Se um enzima for desnaturado ou dissociado nas suas subunidades, geralmente perde-se a sua atividade catalítica. Se um enzima for degradado até aos aminoácidos que o compõem, a atividade catalítica é sempre destruída. Desta forma, as estruturas proteicas primária, secundária, terciária e quaternária dos enzimas são essenciais para a atividade catalítica.

Os enzimas, assim como as outras proteínas, têm pesos moleculares variando de cerca de 12.000 a mais de um milhão dalton (Da). Alguns enzimas não necessitam de outros grupos químicos além dos seus próprios resíduos de aminoácidos. Outros necessitam de um componente químico adicional denominado cofactor, que pode ser um ou mais iões inorgânicos como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} ou uma molécula orgânica ou metalorgânica complexa, denominada coenzima. Os coenzimas agem como transportadores transitórios de grupos funcionais específicos. A maioria deles é derivada das vitaminas, nutrientes orgânicos cuja presença na dieta é necessária em pequenas quantidades. Alguns enzimas necessitam tanto de um coenzima quanto de um ou mais iões metálicos para terem atividade. Um coenzima ou um ião metálico que se ligue muito firmemente, ou mesmo covalentemente, a um enzima é denominado grupo prostético. Um enzima completo, cataliticamente ativo junto com o seu coenzima e/ou iões metálicos, é denominado holoenzima. A parte proteica de um desses enzimas é denominada apoenzima ou apoproteína. Finalmente, alguns enzimas são modificados covalentemente por fosforilação, glicosilação e outros processos. Muitas dessas modificações estão envolvidas na regulação da atividade enzimática (Nelson e Cox, 2014).

Os enzimas são proteínas com funções catalíticas, isto é, aumentam a velocidade com que se atinge o estado de equilíbrio da reação, porém não afetam esse estado. O enrolamento espontâneo de uma ou mais cadeias polipeptídicas que constituem um

enzima resulta na sua estrutura tridimensional nativa, permitindo uma elevada eficiência e especificidade.

Os enzimas exibem um número de propriedades notáveis em comparação com outros tipos de catalisadores. Os três mais importantes são a sua alta potência catalítica, a sua especificidade e possibilidade da sua atividade catalítica poder ser regulada por uma variedade de compostos que ocorrem naturalmente.

- **Poder catalítico**

Como catalisadores, os enzimas são eficazes em quantidades mínimas (em relação às concentrações dos reagentes) e permanecem inalterados após a libertação de produtos. As reações enzimáticas ocorrem a velocidades 10^4 - 10^{17} vezes superiores às das correspondentes reações na ausência de enzima. Não há muitos exemplos em que pode ser feita uma comparação direta entre as taxas de uma reação catalisada por enzimas e uma reação que ocorra sob condições similares de temperatura, pH, mas na ausência de enzima. Tal acontece porque na ausência de um enzima as taxas podem ser demasiado baixas para serem medidas facilmente. As condições ótimas para a catálise enzimática são normalmente temperaturas moderadas e valores de pH próximos da neutralidade, apesar dos enzimas de algumas arqueobactérias funcionarem sob condições mais extremas.

- **Especificidade**

Os enzimas apresentam especificidade face aos reagentes (designados por substratos). Essa especificidade pode ser para um grupo de substratos com estruturas semelhantes ou para um único substrato. No entanto, alguns enzimas só catalisam reações em que o reagente é um isómero de determinada entidade molecular, designando-se essa característica por estereoespecificidade.

A maioria dos enzimas são altamente específicos, tanto na natureza dos substratos que utilizam como também na reação que catalisam. A gama de especificidade varia entre enzimas. Uma baixa especificidade é usualmente encontrada em enzimas de degradação, mas só muito raramente observada em enzimas biossintéticos (Price et al., 1999).

- **Regulação**

A atividade catalítica dos enzimas pode ser regulada pela interação com moléculas ou iões de pequena dimensão ou por pequenas modificações covalentes da sua estrutura.

Quando integradas em vias metabólicas, algumas reações enzimáticas podem exercer a função de pontos de controlo da sua velocidade. O metabolismo é regulado por diversos fatores que incluem variações da concentração de enzima ativo, de substratos disponíveis e de inibidores de atividade enzimática. Os enzimas regulados são, em geral, moléculas complexas e de grandes dimensões, frequentemente oligómeros com subunidades e diferentes centros de ligação, não só aos substratos, mas também a efetores, moléculas (ligandos) que ao interagirem com o enzima num local específico de ligação provocam uma modificação da atividade enzimática (Halpern et al., 2008).

2.2. Classificação e número de código

A designação sistemática de um enzima deve ser sempre acompanhada, quando este é mencionado pela primeira vez num texto, do número de código e da origem. Este número de código, antecedido por EC (*Enzyme Commission*), contém quatro elementos com o seguinte significado: o primeiro número refere-se a uma das seis classes de reações catalisadas; o segundo número e o terceiro indicam a subclasse e a subsubclasse; o quarto é o número de série na respetiva subsubclasse. As classes de enzimas são: 1) Oxidoredutases – reações de oxidação-redução; 2) Transferases – reações de transferência de grupos; 3) Hidrolases – reações de hidrólise; 4) Liasas – reações de adição a ligações duplas; 5) Isomerases – reações de isomerização; 6) Ligases (sintetases) – reações de formação de ligações acopladas à hidrólise de uma ligação pirofosfato num composto com elevada energia de Gibbs (Halpern et al., 1997). O enzima G6PD pertence a uma classe designada oxidoredutase. Esta classe inclui os enzimas que catalisam oxirreduções. Catalisam reações do tipo: $AH_2 + B \longrightarrow BH_2 + A$. O substrato oxidado é considerado dador de hidrogénio ou de eletrões. A classificação baseia-se no esquema “dador:aceitador-oxidoredutase”.

Sempre que possível o nome recomendado é desidrogenase. No entanto, em alternativa, pode ser utilizada a designação “aceitador-redutase”. Oxidase emprega-se apenas nos casos em que o aceitador é o O₂.

O aceitador, que determina as sub-subclasses em cada subclasse (exceto nos casos em que atuam sobre um só dador, com incorporação de oxigénio molecular (oxigenases) e em que atuam sobre radicais superóxido como aceitador), pode ser: NAD⁺ ou NADP⁺, NADH ou NADPH, outros grupos azotados, um citocromo, oxigénio, um composto dissulfurado, uma quinona, uma proteína de ferro-enxofre e outros (Campos, 2005).

2.3. Regulação por controlo da concentração de enzima presente na célula

A atividade de um enzima (ou de uma proteína) pode ser regulada por controlo da sua concentração e tempo médio de vida. Este controlo pode ser exercido ao nível do gene que o codifica, controlando a transcrição, por exemplo, pela potência de um promotor ou pela ação de um fator de transcrição (ativador ou repressor). Após a transcrição, a concentração de RNA mensageiro (mRNA) pode ainda ser controlada variando a sua velocidade de degradação.

Ao nível da proteína, a sua concentração depende do tempo médio de vida, que por sua vez depende da sua velocidade de degradação.

As proteínas contêm sinais que determinam o seu tempo médio de vida. Assim, enzimas diferentes têm tempos médios de vida diferentes, que vão de alguns minutos a vários dias, dependendo não só da estabilidade estrutural da molécula de proteína, mas também de características específicas do sistema que a célula dispõe para a degradação (envolvendo muitas vezes a identificação de sequências e/ou outras características estruturais). A estabilidade no meio extracelular é também variável e depende da estabilidade intrínseca do enrolamento da proteína e da presença ou não de proteases. As proteínas com tempo médio de vida mais curto são em geral proteínas com função reguladora como é o caso de certos enzimas em vias

metabólicas sendo que a sua degradação rápida permite que a sua concentração varie rapidamente em resposta a determinado estímulo exterior (Freire et al., 2008).

2.4. Regulação alostérica

Alguns enzimas celulares são alostéricos, isto é, possuem um sítio de ligação alostérico. Um sítio de ligação alostérico corresponde a um sítio regulatório no qual se ligam compostos químicos chamados de moduladores alostéricos. A ligação dos moduladores no sítio alostérico afeta profundamente a atividade enzimática, a qual pode ser aumentada ou diminuída. Quando a ligação do modulador promove um aumento da atividade enzimática é chamado de modulador alostérico positivo e quando a ligação do modulador promove uma diminuição da atividade enzimática é chamado de modulador alostérico negativo (Malheiros, 2006).

2.5. Envelhecimento e espécies reativas

O processo exato de envelhecimento ainda não é bem compreendido, mas muitas evidências suportam que está associado com a produção excessiva de radicais livres na forma de espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de azoto (RNS) ao longo da vida. Os eritrócitos estão equipados com um sistema de defesa antioxidante que inclui antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Quando os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos do organismo são incapazes de eliminar os radicais livres, o excesso de ROS / RNS pode conduzir a danos em proteínas, lípidos e ácidos nucleicos.

O sistema de proteção constituído por antioxidantes enzimáticos inclui a superóxido dismutase (SOD), que destoxifica o radical superóxido (O_2^-), a catalase (CAT), que está envolvida na conversão de H_2O_2 em H_2O e outros antioxidantes enzimáticos, como a glutathione redutase (GR), a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione S-transferases (GSTs). Os dois enzimas compartilhados na destoxificação de H_2O_2 são CAT e GPx, mas a sua significância relativa na eliminação de H_2O_2 ainda não está clara.

GST estão envolvidas em várias funções biológicas em mamíferos que incluem a destoxificação de substâncias tóxicas, catálise de vários processos biológicos, várias funções associadas com o metabolismo e resistência a fármacos. Incluem diferentes classes de enzimas que desempenham um papel muito importante na conversão de compostos potencialmente perigosos em compostos menos tóxicos. As GSTs também desempenham um papel significativo no desenvolvimento de resistências a fármacos em células tumorais, na doença de Alzheimer, doença de Parkinson e aterosclerose. GST estão envolvidas em várias funções biológicas em mamíferos que incluem a destoxificação de substâncias tóxicas, catálise de vários processos biológicos, várias funções associadas com o metabolismo e resistência a fármacos (Maurya, 2015).

Os antioxidantes não-enzimáticos incluem compostos de baixo peso molecular, tais como vitaminas (vitaminas C e E), β -caroteno, ácido úrico e a glutathiona (GSH), um tripéptido que compreende um grupo tiol (sulfidrílo).

A vitamina C (ácido ascórbico) sendo hidrossolúvel fornece capacidade antioxidante a nível intracelular e extracelular em fase aquosa, principalmente através da eliminação de radicais livres de oxigénio. Um exemplo disso é a conversão dos radicais livres de vitamina E em vitamina E. Os seus níveis plasmáticos diminuem com a idade.

Dado que os eritrócitos não possuem núcleo e outros organelos (por exemplo mitocôndrias), a via dos fosfatos de pentose torna-se a sua única forma de produzir NADPH. Como resultado, em comparação com células normais com núcleo, os eritrócitos parecem ser mais sensíveis ao *stress* oxidativo e a eriptose, o processo de morte celular programada, pode ser mais facilmente induzida. Além disso, como a eriptose excessiva é suscetível de causar doenças como a anemia, diabetes *mellitus*, insuficiência renal e síndrome hemolítico-urémico, o desenvolvimento de potenciais tratamentos torna-se cada vez mais urgente. Demonstrou-se que doses farmacológicas de vitamina C aliviam a hemólise nos doentes que apresentam deficiência em G6PD (Rees et al., 1993).

Tal acontecimento pode ser explicado pelo facto de que a vitamina C pode promover a formação de NADPH através do reforço das capacidades de redução da metemoglobina redutase dependente de NADPH. A capacidade anti-oxidante da

vitamina C não pode ser ignorada, embora a sua concentração de ação seja muito superior à concentração natural. Sendo assim, a vitamina C pode eliminar o excesso de radicais livres de oxigénio decorrentes da deficiência de G6PD ou danos induzidos pelo peróxido de hidrogénio. Além disso, a vitamina C também poderia ajudar na reciclagem de vitamina E oxidada de forma indireta.

No entanto, é inegável que uma sobredosagem de vitamina C também poderá contribuir para um agravamento da hemólise dos eritrócitos com deficiência em G6PD, ocorrência que recomenda precaução no uso de vitamina C em portadores da deficiência em G6PD, estando ainda por esclarecer os mecanismos por detrás desta aparente contradição (Huang et al., 2014).

Embora alguns estudos tenham demonstrado os efeitos de H_2O_2 e vitamina C na eriptose entre amostras com deficiência de G6PD ou atividade normal de G6PD *in vitro*, os resultados têm ainda de ser confirmados *in vivo*. Finalmente, são ainda necessárias tecnologias mais específicas e precisas para qualificar e quantificar o processo de eriptose (Shan et al., 2016).

A vitamina E lipídica (α -tocoferol) é concentrada no interior hidrófobo da membrana celular e é a principal defesa contra as lesões induzidas por oxidantes da membrana. A vitamina E doa eletrões ao radical peroxil, que é produzido durante a peroxidação lipídica. O α -tocoferol é a forma mais ativa de vitamina E e o principal antioxidante ligado à membrana celular. A vitamina E desencadeia a apoptose das células cancerosas e inibe a formação de radicais livres.

A glutatona reduzida (GSH) é altamente abundante em todos os compartimentos celulares e é o principal antioxidante solúvel. A razão entre as formas reduzida e oxidada (GSH/GSSG) é um dos principais determinantes do *stress* oxidativo. A GSH mostra os seus efeitos antioxidantes de várias maneiras. É essencial na destoxificação do peróxido de hidrogénio e peróxidos lipídicos por ação de GPx. A GSH doa os seus eletrões ao H_2O_2 reduzindo-o a H_2O e O_2 . A GSSG é novamente reduzida a GSH pela GSH redutase que usa NAD(P)H como o doador de eletrões. A GPx também são importantes para proteger a membrana celular da peroxidação lipídica. A glutatona reduzida doa protões aos lípidos da membrana e protege-os de ataques de oxidantes.

A GSH é um cofator de vários enzimas destoxicantes, tais como GPx e GST. Tem um papel na conversão de vitamina C e E de volta para as suas formas ativas. A GSH protege as células contra a apoptose interagindo com vias de sinalização pro-apoptóticas e anti-apoptóticas. Ela também regula e ativa vários fatores de transcrição, como AP-1, NF-κB e Sp-1.

Carotenóides (β-caroteno) são pigmentos encontrados em plantas. Primariamente verificou-se que o β-caroteno reage com radicais peróxido (ROO·), hidróxido (OH·) e superóxido (O₂⁻). Os carotenóides mostram os seus efeitos antioxidantes a baixa pressão parcial de oxigénio mas podem ter efeitos pró-oxidantes com maiores concentrações de oxigénio. Ambos os carotenóides e ácido retinóico (RA) são capazes de regular fatores de transcrição. O β-caroteno inibe a activação, induzida por oxidantes, do fator de transcrição NF-κB e interleucina-6 (IL-6) e a produção de fator-α de necrose tumoral. Os carotenóides também afetam a apoptose de células. Vários estudos têm demonstrado os efeitos antiproliferativos de RA. Este efeito do RA é mediado principalmente por recetores do ácido retinóico e variam entre os tipos de células. Em células de carcinoma da mama, o recetor de ácido retinóico mostrou provocar a inibição do crescimento por indução de paragem do ciclo celular, apoptose ou ambos (Birben et al., 2012).

2.6. Glutathiona

O tripéptido L-γ-glutamil-L-cisteinil-L-glicina, designado também por glutathiona, foi descoberto por Rey-Pailhade, em 1888. Tratava-se de um composto presente no extrato de levedura, capaz de reduzir o enxofre à temperatura ambiente. Devido à sua afinidade para o enxofre foi denominado *Philothion*. Apenas em 1921, Hopkins concluiu que se tratava de um péptido contendo glutamato ligado a um composto de enxofre e propôs, provisoriamente, a designação *Glutathione* (péptido com glutamato, idêntico ao *Philothion*). Encontra-se em todos os seres vivos, embora nos tripanossomatídeos seja funcionalmente substituído por um análogo, a tripanotiona [N¹,N⁸-bis(glutathionil-espermidina)]. A designação glutathiona permanece até hoje (figura 2.1) (Cordeiro e Silva, 2008).

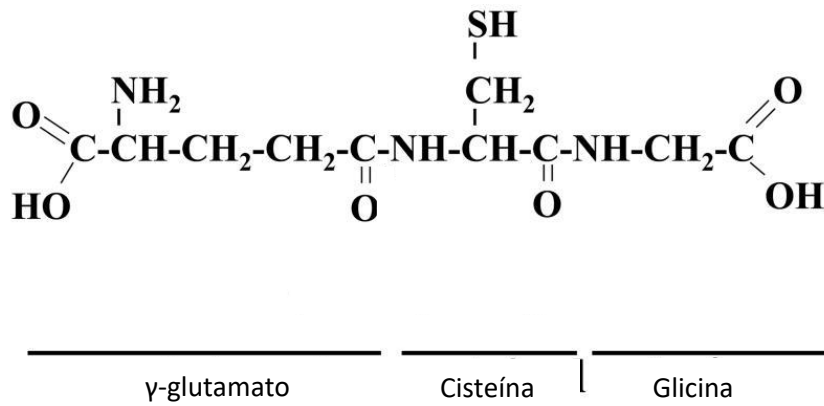


Figura 2.1 – Estrutura da glutatona (adaptado de Lu, 2009).

2.7. O papel da glutatona no equilíbrio redox

Uma das principais funções da via dos fosfatos de pentose é a geração de NADPH. Na reação catalisada pelo enzima glutatona redutase, o NADPH permite regenerar a glutatona na sua forma reduzida, GSH ($\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$), sendo utilizada pelas células na defesa antioxidante, no metabolismo de xenobióticos e em reações de regulação (figura 2.2) (Cordeiro e Silva, 2008).

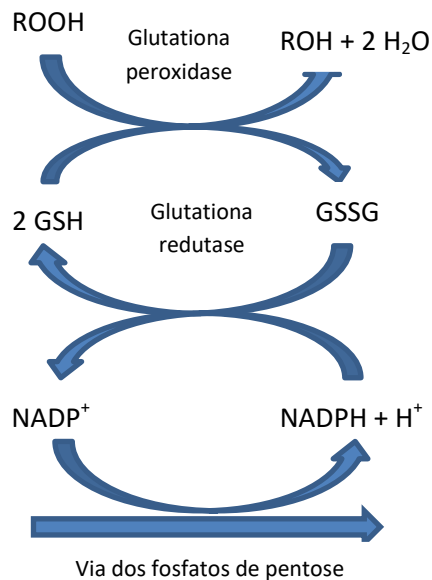


Figura 2.2 – Ciclo redox da glutatona (adaptado de Halpern et al., 2008).

Qualquer deficiência na produção de NADPH pode ter consequências graves na capacidade de resposta das células ao *stress* oxidativo (Halpern et al., 2008).

A glutathiona possui uma relevante importância em todas as células para a preservação dos grupos sulfidrilo em numerosas proteínas e para a prevenção de danos oxidativos em geral. Este enzima possui uma ligação covalente a um átomo de selênio, na forma de selenocisteína, essencial para a sua atividade. O papel da glutathiona é particularmente crucial nos eritrócitos, porque são transportadores de oxigênio por excelência. Desta forma têm incorporado um perigo de dano por radicais de oxigênio que são originados continuamente no decurso da formação de meta-hemoglobina. Os radicais de oxigênio, altamente reativos, decompõem-se espontaneamente ou são convertidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A destoxificação do H_2O_2 por conversão em água (H_2O) é efetivada pela glutathiona peroxidase (GPx): uma molécula de glutathiona (GSH) é oxidada para GSSG por cada molécula de H_2O_2 destoxificada (figura 2.3).

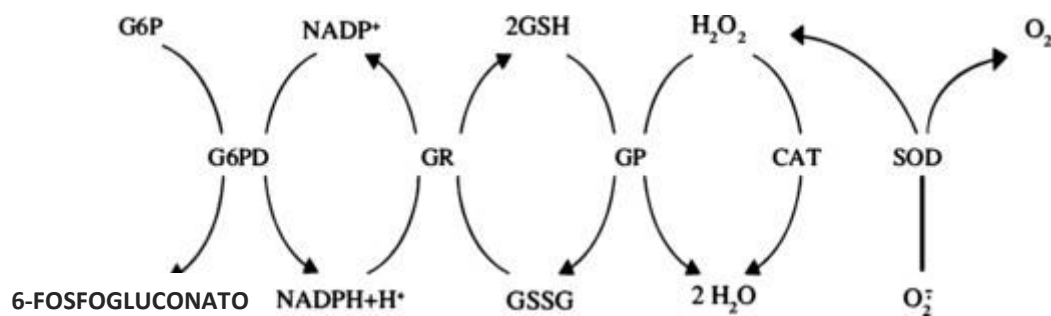


Figura 2.3 - Reações catalisadas por G6PD, GR, GP, CAT e SOD (adaptado de Hisar et al., 2012).

2.8. Síntese da glutathiona

A glutathiona é o tiol de baixo peso molecular mais abundante a nível celular, localizando-se maioritariamente no citoplasma. A sua síntese a partir do glutamato, cisteína e glicina é catalisada sequencialmente por dois enzimas citoplasmáticos, a glutamato-cisteína ligase, também conhecido por γ -glutamil-cisteína sintetase e a glutathiona sintetase.

O primeiro, o enzima γ -glutamil-cisteína sintetase catalisa a reação de ligação do L-glutamato a L-cisteína através da ativação pelo ATP do grupo γ -carboxilo do glutamato, formando um intermediário fosfato de acilo, permitindo a ligação do grupo α -amina da cisteína. A glutathiona sintetase catalisa a ativação do grupo α -carboxilo da cisteína pelo ATP, formando um fosfato de acilo, e a posterior ligação da glicina, formando-se glutathiona (figura 2.4) (Halpern et al., 2008).

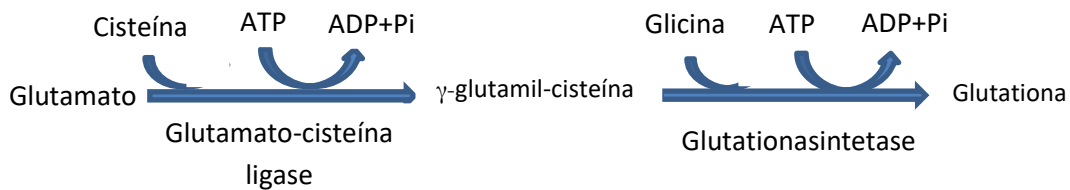


Figura 2.4 – Biossíntese da glutathiona (adaptado de Halpern et al., 2008).

O quociente [GSH]:[GSSG], utilizado como um indicador do estado redox das células, é superior a 10 em condições fisiológicas normais. Em vários modelos de stress oxidativo a razão GSH:GSSG pode descer até valores de 1:1 (Zitka et al., 2012). Este quociente é dependente da velocidade de remoção do H_2O_2 catalisada pelos GSH peroxidases e da velocidade de redução do GSSG pelo NADPH catalisada pelo GSSG redutase. No entanto, os GSH peroxidases não são específicos para o H_2O_2 , uma vez que também catalisam a redução de outros hidroperóxidos pelo GSH (Grácio, 2011).

O par redox GSH/GSSG é provavelmente o principal determinante da capacidade antioxidante das células, sendo o seu valor afetado por outros pares redox, como o NADPH/NADP⁺ e tiorredoxina_{red}/tiorredoxina_{ox}. É fundamental a existência de glutathiona reduzida disponível nas células sendo vital que a produção de NADPH da via dos fosfatos de pentose não sofra alterações (Halpern et al., 2008).

2.9. Funções da glutathiona nas células

A glutathiona desempenha um papel fundamental na defesa antioxidante da célula, sendo importante para inúmeras funções celulares como na regulação de vias

metabólicas essenciais. As diferentes funções da glutatona encontram-se descritas na tabela 2.1 (Halpern et al., 2008).

Tabela 2.1 – Funções celulares da glutatona (adaptado de Halpern et al., 2008).

Defesa antioxidante	Metabolismo	Regulação
Redução de radicais e espécies reativas de oxigénio	Síntese de leucotrienos e prostaglandinas	Definição do estado redox intracelular
Remoção de peróxidos de hidrogénio e lipídicos	Conversão do formaldeído em formato	Transdução de sinal e expressão de genes
Prevenção da oxidação de biomoléculas	Dismutação do metilglioxal a D-lactato	Síntese de DNA e proteínas e proteólise
	Formação de mercapturatos a partir de eletrólitos	Proliferação celular e apoptose
	Formação de conjugados de glutatona-NO	Produção de citocinas e resposta imune
	Armazenamento e transporte de cisteína	Glutationilação de proteínas
		Função e integridade da mitocôndria

2.10. Glutationilação de proteínas

A glutationilação de proteínas é um processo celular extremamente importante. Acredita-se que seja uma forma das células armazenarem a glutatona durante o *stress* oxidativo ou como proteção dos grupos tiol das proteínas de oxidações irreversíveis. Este processo pode ainda ser visto como uma modificação pós-traducional através do qual as atividades dos enzimas podem ser reguladas. Temos o exemplo do enzima metionina sintase, no qual um resíduo de cisteína próximo do centro ativo é glutationilado em células expostas ao *stress* oxidativo. Esta modificação bloqueia o acesso do substrato e previne a síntese de metionina. Quando o *stress* é removido, a ligação dissulfureto é rapidamente reduzida e o acesso ao substrato é restaurado.

A glutationilação de proteínas é reversível, sendo catalisada por enzimas da família dos tiol dissulfuretooxidoreduções, glutarredoxinas e, em menor extensão, tiorredoxinas. Estes enzimas estão envolvidos na manutenção da homeostase redox nas células.

O sistema da glutarredoxina é constituído pelo enzima glutarredoxina (Grx), glutationa e o enzima glutationa redutase dependente do NADPH. O Grx catalisa reações por um mecanismo monotiol (apenas uma cisteína é modificada) ou ditiol (dois resíduos de cisteína são modificados).

O sistema da tiorredoxina é constituído pelos enzimas tiorredoxina (Trx) e tiorredoxina redutase dependente do NADPH (TxrR). A redução das proteínas é feita utilizando dois resíduos de cisteína no seu centro ativo (mecanismo ditiol) (Halpern et al., 2008).

Capítulo 3 - Enzima glicose-6-fosfato desidrogenase

3.1. Estrutura

Na sua forma ativa o enzima G6PD é um dímero (figura 3.1) ou um tetrâmero que consiste em subunidades idênticas.

A sequência de aminoácidos da G6PD foi altamente conservada através da evolução. A estrutura da G6PD da bactéria *Leuconostocmesenteroides* (G6PD LM) foi determinada em 1994 demonstrando que o enzima é um dímero e que cada subunidade contém um único sítio ativo. As estruturas bacterianas e humanas apresentam 35% de semelhança estrutural, sendo compostas por dois domínios, um domínio de ligação ao co-enzima e um domínio que contém a superfície que contacta com a mesma região de outra subunidade para formar o dímero. A interface de dimerização é extensa e envolve 57 resíduos, sendo 31 hidrofóbicos. Comparando as estruturas bacterianas e humanas, os resíduos não são conservados, mas a estrutura da interface é conservada.

O alinhamento de sequências revela três regiões conservadas: um péptido de nove resíduos (RIDHYLGKE, resíduos 198-206 do enzima humano), uma “impressão digital” de ligação a sequências de nucleótidos (GxxG- GDLA, resíduos 38-44 do enzima humano) e a sequência de EKPxG (resíduos 170-174 do enzima humano). No péptido de nove resíduos demonstrou-se que o aspartato, histidina e lisina são importantes na ligação e catálise de G6P em G6PD LM e que Lys205 está implicada na ligação e catálise do enzima humana (Kotaka et al., 2005).

A causa da forma mais grave de deficiência de G6PD, associada a anemia hemolítica crónica não esferocítica, está relacionada com mutações que conduzem a alterações estruturais situadas no local de dimerização (Manganelli et al., 2010).

O monómero de G6PD humana é constituído por 515 resíduos de aminoácidos, apresentando um peso molecular calculado de 59,256 daltons. A agregação dos monómeros inativos em dímeros cataliticamente ativos e formas superiores requer a ligação de NADP⁺. Desta forma, o NADP⁺ parece estar ligado ao enzima não só como um elemento estrutural mas também como um dos substratos da reação. Os sítios de ligação para este coenzima não foram identificados ao nível estrutural, mas o exame a

mutantes sugeriu que os aminoácidos 386 e 387, os aminoácidos básicos lisina e arginina, respetivamente, parecem ligar um dos fosfatos do NADP^+ . A evidência de que este local está envolvido na ligação de NADP^+ é como se segue: (1) todos os mutantes que perdem rapidamente a atividade numa concentração de NADP^+ de $10 \mu\text{mol/L}$, mas que são reativados em altas concentrações de NADP^+ têm mutações nesta região; (2) estas mutações resultam na migração eletroforética paradoxal do enzima como se se tivesse tornado mais positivamente carregado, mesmo quando a alteração de aminoácido adiciona uma carga negativa, o que sugere a falha de ligação de NADP^+ . Foi também sugerido, com base na dedução da conformação da cadeia peptídica do enzima de levedura, que o sítio de ligação de NADP pode estar noutra lugar. O local de ligação do substrato foi identificado no aminoácido 205, localizando-se nesta posição uma lisina que é reativa com fosfato de piridoxal em competição com a glicose-6-fosfato (Beutler, 1994).

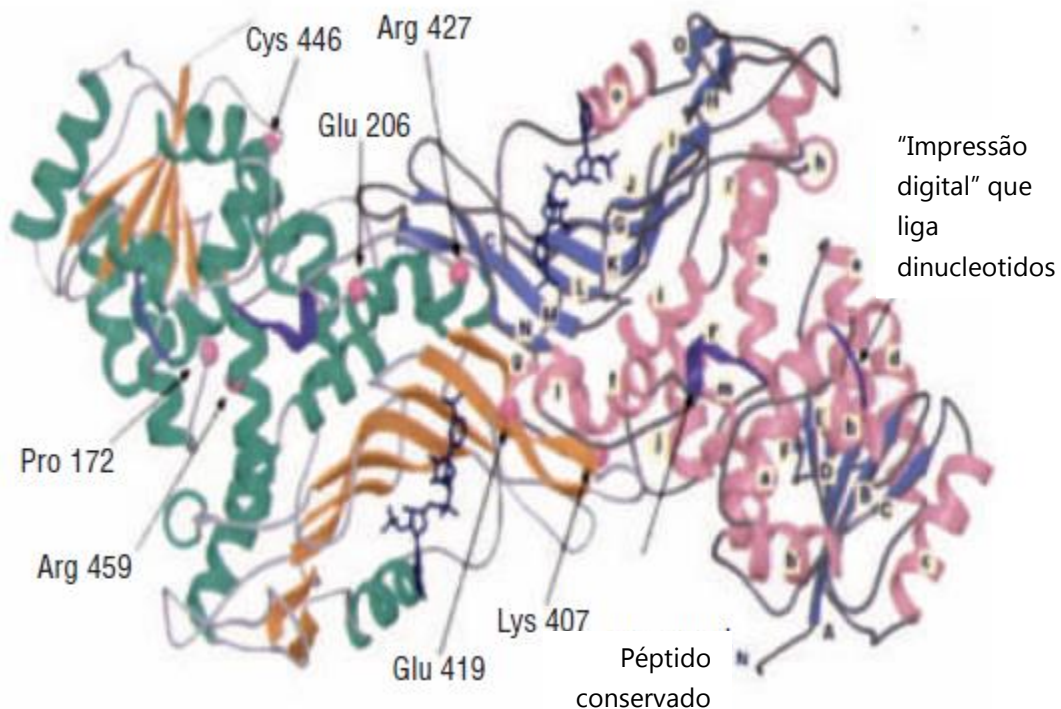


Figura 3.1 - Um modelo da estrutura tridimensional do dímero de G6PD (adaptado de Manganeli et al., 2010).

3.2. Função

A G6PD é um enzima citoplasmático cuja função primordial é assegurar o potencial “redox” da célula. Este enzima existe em todas as células do organismo humano e em todos os organismos da cadeia evolutiva, desde os protozoários às plantas e animais, o que pressupõe que a sua atividade seja um fator biológico indispensável.

A necessidade da atividade de G6PD no eritrócito para assegurar níveis suficientes de NADPH e glutathione reduzida fica provada pelo facto de indivíduos portadores de variantes com atividade reduzida sofrerem episódios de hemólise intravascular por ação de fatores oxidantes (favas, fármacos e infeções) ou anemia hemolítica persistente (Gomes et al., 2013).

Este enzima crítico permite a manutenção de todas as células aeróbicas no seu metabolismo redox. A deficiência de G6PD é um excelente exemplo de uma condição que origina anemia hemolítica devido a uma interação entre uma causa intracelular e uma causa extracelular, porque na maioria dos casos a hemólise é desencadeada por um agente exógeno (Luzzatto, 2006).

3.3. Fatores reguladores

A atividade de G6PD sobe de uma situação basal como consequência de uma dieta rica em glícidos, enquanto uma dieta rica em ácidos gordos poliinsaturados inibe tal atividade. A dieta determina a presença de hormonas, tais como a insulina e glucagon. A regulação tem lugar ao nível da velocidade de síntese de mRNA maduro, que envolve mudanças na velocidade de splicing de pré-mRNA e é enviado para o retículo endoplasmático e para o citosol. Em adição a estes elementos reguladores, a relação NADPH/NADP⁺ deve ser considerada como um elemento regulador principal da atividade de G6PD e, por extensão, do fluxo através da via. O NADP⁺ é sintetizado a partir de NAD⁺ pela enzima NAD⁺ cinase. O NADP⁺ é rapidamente reduzido a NADPH mesmo em condições basais. Existe um consenso generalizado sobre o valor basal de

rácio de NADPH / NADP⁺, com valores que variam entre 70 e 300, dependendo dos tecidos (Barcia-Vieitez et al., 2014).

3.4. O efeito de fármacos

A hemólise relacionada com a deficiência de G6PD induzida por fármacos foi relatada após a terapêutica com uma gama de medicamentos contra a malária, incluindo a primaquina, azul de metileno e o fármaco diaminodifenilsulfona (dapsona). A dapsona é usada para uma variedade de indicações, incluindo no tratamento da lepra, várias doenças de pele, e, mais recentemente, infeções com *Pneumocystis carinii*, especialmente em doentes HIV positivos, mas também pode ser usado em combinação com fármacos antimaláricos (pirimetamina, proguanil e clorproguanil) para a quimioprofilaxia e tratamento da malária (Poirot et al., 2015).

O risco e a gravidade da hemólise correlacionam-se com a dose e a duração do tratamento e com a presença de *stress* oxidativo proveniente de uma fonte adicional, como por exemplo numa situação de infeção. Tipicamente, a hemólise começa 2 ou 3 dias após o início da terapêutica, é predominantemente intra-vascular e pode associar-se a hemoglobinúria. Na tabela 3.1 encontram-se os fármacos mais frequentemente associados a hemólise (Gomes et al., 2013).

Tabela 3.1 – Fármacos e moléculas associados a hemólise na deficiência de G6PD (adaptado de Gomes et al., 2013).

Grupo farmacológico	Exemplo de fármacos
Antimaláricos	Primaquina
Sulfamidas	Sulfanilamida, Sulfapiridina, Sulfametoxazol
Sulfonas	Dapsona
Fármacos de conteúdo sulfúrico	Glibenclamida
Nitrofuranos	Nitrofurantoína
Analgésicos	Acetanilida, Ácido acetilsalicílico
Antipiréticos	Fenilhidrazina
Antibióticos	Cloranfenicol
Outros	Naftaleno, Azul-de-metileno, Fosfina, Espiramicina, Fenazopiridina, Vitamina K

A hemólise pode ser desencadeada por infeções e por fármacos com propriedades oxidativas como o ácido acetilsalicílico, a vitamina K, o cloranfenicol, além de antimaláricos. Hepatite alcoólica, hepatite viral, pneumonias, septicemias, acidose diabética e malária são alguns exemplos de fatores que podem desencadear hemólise (Perinoto et al., 2013).

3.4.1. Manifestações clínicas

Uma deficiência total de G6PD é incompatível com a vida e é importante salientar que a grande maioria das pessoas que possuem deficiência de G6PD permanecem clinicamente assintomáticas durante toda a vida. As manifestações clínicas da deficiência de G6PD traduzem-se em anemia hemolítica aguda (AHA), anemia hemolítica crónica não-esferocítica (CNSHA) e icterícia neonatal (Manganelli et al., 2010).

3.4.2. O mecanismo de hemólise

Nos eritrócitos, existindo deficiência de G6PD, o NADPH não se pode formar o que cria uma deficiência na conversão da forma oxidada da glutatona (GSSG), para a sua forma reduzida (GSH). Normalmente há bastante GSH nos eritrócitos, o que protege a célula de agentes oxidantes. Se a G6PD é deficiente, a hemoglobina é oxidada por substâncias oxidativas que não são eficientemente eliminadas e retorna a metahemoglobina, que não funciona normalmente. Além disso, com desnaturação, a hemoglobina precipita no citoplasma formando corpos de Heinz. Estas estruturas ligam-se à membrana com ligações dissulfureto e perturbam a sua estrutura normal. Estes aparecem nos estádios iniciais da administração de fármacos e desaparecem à medida que a hemólise progride. Os eritrócitos que contêm corpos de Heinz no seu citoplasma são sequestrados por macrófagos no baço e são removidos da circulação (Allahverdiyev et al., 2012).

O aparecimento de corpos de Heinz tanto *in vivo* como *in vitro* em células com deficiência em G6PD e a sua incapacidade de proteger a GSH contra a toxicidade de fármacos sugere que um grande componente do processo hemolítico é a incapacidade dos eritrócitos para proteger grupos sulfidriilo contra danos oxidativos (Beutler, 2008).

3.4.3. Anemia hemolítica aguda (AHA)

Indivíduos com deficiência em G6PD possuem um risco de desenvolver AHA em resposta a três tipos de fatores: ingestão de favas, infeções ou fármacos.

A hemólise ocorre após a exposição ao agente que causa stress, originando um ataque hemolítico acompanhado de mal-estar, fraqueza e dor abdominal ou lombar. O doente desenvolve icterícia e urina escura devido à hemoglobinúria após um intervalo de várias horas a 2 a 3 dias. A ingestão de fármacos oxidativos por uma mulher que está a amamentar pode traduzir-se num risco do fármaco ser transmitido no leite materno e poder causar hemólise aguda numa criança que apresenta deficiência.

Em pessoas com deficiência em G6PD a infecção é a causa mais comum de anemia hemolítica, embora o mecanismo exato pelo qual tal ocorre ainda não ser conhecido (Manganelli et al., 2010). Os leucócitos podem libertar agentes oxidantes durante a fagocitose e como consequência causar stress oxidativo nos eritrócitos. No entanto, apenas esta explicação não clarificaria a variedade de infecções associadas a hemólise em pessoas com deficiência em G6PD. Os agentes infecciosos mais comuns que causam hemólise incluem *Salmonella*, *Escherichia coli*, streptococcus beta-hemolítico, Rickettsias, vírus da gripe e, de um modo particularmente importante, as hepatites virais (Frank, 2005).

Uma deficiência na atividade do enzima pode comprometer a proteção contra danos oxidativos noutras células para além dos eritrócitos. Mais especificamente, os leucócitos de indivíduos com deficiência de G6PD mostram uma redução na resposta a infecções bacterianas (Dore et al., 2016).

A hemólise ocorre após a exposição ao agente que provoca stress, mas não continua apesar da infecção ou ingestão contínua. Provavelmente tal é devido aos eritrócitos mais velhos terem uma maior deficiência do enzima e serem submetidos a hemólise em primeiro lugar. Dado que a população de eritrócitos com deficiência sofreu hemólise, os eritrócitos e reticulócitos jovens, que tipicamente têm níveis mais elevados de atividade do enzima, são capazes de sustentar o dano oxidativo sem hemólise (Frank, 2005).

3.4.3.1. Favismo

A associação entre a deficiência de G6PD e a ingestão de favas, ou até mesmo a inalação do pólen da planta, é reconhecida há séculos.

As favas têm sido uma importante fonte de alimento no Mediterrâneo e no Médio Oriente desde a Antiguidade. O filósofo e matemático grego Pitágoras proibia os seus seguidores de se alimentarem de favas, talvez porque o seu consumo deixava muitas pessoas doentes com uma condição chamada de favismo, que pode ser fatal.

No favismo os eritrócitos começam a sofrer lise 24 a 48 horas após a ingestão das favas, libertando hemoglobina livre no sangue, podendo resultar em icterícia e algumas vezes em falência renal. A ingestão de certos fármacos contra a malária ou antibióticos da classe das sulfamidas ou após a exposição a certos herbicidas podem originar sintomas similares. Esses sintomas têm uma base genética, a deficiência na atividade de G6PD (Nelson e Cox, 2014).

Durante a segunda metade do século XX foi relatada anemia hemolítica grave em indivíduos que ingeriram favas, mais comumente em crianças. Presume-se que as favas precipitam o dano oxidativo por meio de um componente desconhecido, possivelmente vicina, convicina ou isouramil. Todos são glucosídeos encontrados no trato digestivo e são capazes de causar hemólise em crianças deficientes em G6PD (Hernández-Pérez et al., 2015).

3.4.4. Anemia hemolítica crônica não-esferocítica (CNSHA)

Uma pequena minoria de indivíduos que apresentam deficiência de G6PD tem anemia crônica com grau variável de gravidade. O doente é sempre do gênero masculino. É geralmente causada por uma mutação genética esporádica no cromossoma X e a hemólise ocorre durante o metabolismo normal do eritrócito. Em geral, o baço nas crianças de tenra idade doentes está moderadamente aumentado e subsequentemente o aumento adicional de tamanho é suficiente para causar desconforto mecânico, hiperesplenismo ou ambos. A gravidade da hemólise varia, podendo ser desde hemólise ligeira a anemias dependentes de transfusão. Na deficiência em G6PD a exposição ao *stress* oxidativo pode causar hemólise exacerbada (Manganelli et al., 2010).

3.4.5. Icterícia neonatal

A icterícia neonatal é um fenómeno comum durante a primeira semana de vida pós-natal e afeta quase dois terços dos recém-nascidos. O mecanismo de

hiperbilirrubinemia neonatal é multifatorial, compreendendo principalmente processos que contribuem para o aumento da carga de bilirrubina ou diminuição de depuração de bilirrubina. O primeiro pode resultar de causas que potenciam a produção de bilirrubina e a circulação entero-hepática, enquanto o último pode resultar da capacidade imatura de absorção ou excreção hepática por conjugação.

O desequilíbrio entre a produção de bilirrubina e a eliminação por conjugação desempenha um papel importante no mecanismo de bilirrubinemia neonatal. Embora tanto os fatores genéticos como ambientais possam contribuir para o desenvolvimento de hiperbilirrubinemia neonatal, a importância das condições genéticas têm cada vez mais reconhecimento (Cherepnalkovski & Krzelj, 2015).

Acredita-se que a icterícia neonatal pode ser agravada devido a uma atividade deficiente da G6PD. No entanto, as técnicas modernas mostram apenas uma diminuição modesta do tempo de vida médio dos eritrócitos. A principal causa da icterícia neonatal em recém-nascidos com deficiência de G6PD é a incapacidade do fígado para conjugar adequadamente a bilirrubina. Além disso, este problema é agravado quando o lactente herda o polimorfismo do promotor do gene que codifica a UDP-glucuronosiltransferase associado com a doença de Gilbert (Cherepnalkovski e Marusic, 2015).

Ainda não é completamente compreendido o mecanismo e qual a razão da deficiência de G6PD originar hiperbilirrubinemia neonatal. O risco de desenvolver icterícia neonatal é muito maior em recém-nascidos deficientes em G6PD do que nos que possuem a versão normal do enzima. O grau da associação entre a deficiência de G6PD e a icterícia neonatal parece variar em diferentes populações. O quadro clínico da icterícia neonatal relacionada com a deficiência de G6PD difere do quadro clínico clássico. Quando recém-nascidos desenvolvem hiperbilirrubinemia dentro das primeiras 24 horas de vida a deficiência de G6PD deve ser considerada como causa da ocorrência. A deficiência de G6PD pode levar a um aumento do risco e a um início mais precoce de icterícia, o que pode exigir fototerapia ou transfusão sanguínea (Manganelli et al., 2010).

A prevalência de hiperbilirrubinemia neonatal em homens que possuem o gene defeituoso e em mulheres homozigóticas é o dobro comparativamente com a população em geral. Raramente ocorre em mulheres heterozigóticas (Frank, 2005).

3.5. Divisão em classes da deficiência da G6PD

Foram descritas numerosas variantes de G6PD. As variantes G6PD são agrupadas em cinco classes (tabela 3.2) com base nas diretrizes da OMS e de acordo com a magnitude da deficiência enzimática e a gravidade da hemólise. Esta classificação dá alguma aproximação da magnitude da hemólise que um indivíduo pode incorrer no decorrer de *stress* oxidativo. Unicamente as classes I, II e III têm significância clínica. A classe I é a classe mais severa e a classe V é a classe menos severa. Estima-se que pelo menos 400 milhões de pessoas em todo o mundo possuem deficiência em G6PD e o maior número pertence à classe III (deficiência moderada). A pesquisa extensiva na deficiência de G6PD levou à elucidação da sequência do gene, da sequência da proteína e da estrutura cristalina da G6PD. É agora claro que a G6PD é um enzima metabólico crítico que está sujeito a um controle complexo, e que reside num centro de uma rede metabólica essencial, afetando muitos processos fisiológicos (Stanton, 2012).

Doentes com variantes de classe I têm um síndrome clínico reconhecível ao longo da vida. Além disso, as variantes de classe I são muito raras (muitas delas foram relatadas apenas uma vez). Variantes de classe II possuem atividade de G6PD inferior a 10% mas sem CNSHA. Variantes de classe III possuem atividade de G6PD entre 10 e 60% do normal. Variantes de classe II e III são assintomáticas a maior parte do tempo (por definição não há CNSHA), mas são clinicamente importantes porque implicam o risco de AHA induzida por fármacos. Dos milhões de pessoas que têm deficiência em G6PD, quase todas têm pelo menos uma variante de classe II ou de classe III. Uma vez que, por definição, variantes de classe II possuem uma atividade do enzima de G6PD média menor do que a de variantes de classe III, é lógico que AHA pode ser mais grave em portadores das primeiras do que com as últimas. No entanto, isso não significa que as

variantes de classe III podem ser consideradas como "suaves"; por exemplo, em ensaios com diaminodifenilsulfona (dapsona) em crianças com G6PD A- (classe III), 98% dos homens deficientes em G6PD desenvolveram AHA, 11% dos quais necessitaram transfusão de sangue. A classe IV inclui variantes com atividade normal, a grande maioria tem G6PD B, mas cerca de 20% das pessoas de ascendência Africana tem G6PD A. A classe V é reservada para as variantes com maior atividade do que a atividade normal (Frank, 2005).

Tabela 3.2 – Descrição das classes de variantes de G6PD (Frank, 2005).

Classe	Nível de deficiência	Atividade enzimática	Prevalência
I	Severa	Anemia hemolítica crónica não esferocítica (CNCHA) na presença de função normal dos eritrócitos	Não é comum; ocorre entre populações
II	Severa	Menos de 10% do normal	Varia; mais comum em populações asiáticas e mediterrâneas
III	Moderado	10% a 60% do normal	10% dos homens nos Estados Unidos
IV	Suave a nenhuma	60% a 150% do normal	Rara
V	Nenhuma	Mais do que 150% do normal	Rara

3.6. Polimorfismos genéticos

A deficiência de G6PD é frequentemente citada como um exemplo de seleção natural, com a malária sendo considerada uma grande força evolutiva. A distribuição geográfica das variantes que originam a deficiência de G6PD sobrepõe notavelmente com áreas historicamente endémicas de malária, como a África, Ásia e região do Mediterrâneo. Além disso, certas variantes da deficiência de G6PD, tais como a forma

Africana A- e Sudeste Asiático Mahidol mutação 487A, conferem certos graus de proteção contra a malária *falciparum* grave e reduzem a densidade de parasitas *Plasmodium vivax*, respetivamente. A vantagem seletiva contra a malária permitiu que a persistência da deficiência de G6PD em populações humanas com muitas variantes atingisse frequências altas. Consequentemente, a prevalência de deficiência de G6PD é alta em áreas endémicas de malária, que varia de 5% a 20% na Ásia e na África ou ainda maior em algumas comunidades. Além disso, as variantes G6PD têm padrões geográficos aparentes. Por exemplo, a mutação de G6PD^{-202A} é a predominante na África, enquanto a variante mediterrânica é mais difundida na Ásia ocidental. No sudeste da Ásia, no entanto, existe uma heterogeneidade significativa de variantes dominantes em diferentes áreas, o que parece estar estreitamente relacionado com as localizações geográficas e associados a diferentes grupos étnicos e raciais. G6PD Kaiping 1388G>A e Canton 1376G>T são as variantes mais comuns no sul da China, com prevalência 4-16%. Assim, a composição genética das populações humanas na região pode refletir o passado histórico de exposição à malária, bem como isolamentos genéticos de diferentes grupos étnicos (Li et al., 2015).

O gene G6PD é provavelmente o locus mais polimórfico em humanos, com mais de 400 variantes alélicas conhecidas. Estas variantes foram caracterizadas bioquimicamente com base nas diferentes atividades enzimáticas residuais, padrões de mobilidade eletroforética e propriedades físico-químicas (tais como termoestabilidade e comportamento cromatográfico) ou propriedades cinéticas (K_m para glicose-6-fosfato ou NADPH, dependência do pH e utilização de análogos de substrato).

Todas as mutações de G6PD que determinam uma deficiência enzimática afetam toda a sequência de codificação. Foram relatadas cerca de 160 mutações, a maioria das quais são substituições de base única que conduzem a substituições de aminoácidos, enquanto raramente uma segunda mutação está presente em cis. A G6PD A- é um genótipo peculiar determinado pela presença concomitante de mutações A376G e G202A. Embora a substituição do nucleótido 202 represente pelo menos 95% das variantes moleculares G6PD A- em África, foram identificados dois locais de segunda mutação menos frequentes nos nucleótidos 680 e 968. Um segundo genótipo menos

comum, nomeadamente G6PD-Santamaria, uma variante de Classe II, é também determinado por duas mutações concomitantes nos nucleótidos 376 e 524. Esta mutação foi encontrada em primeiro lugar na Costa Rica e é relativamente menos frequente no sul de Itália. As pequenas deleções e alterações do quadro de leitura são exceções; a ausência de mutações genéticas que determinam a abolição completa da funcionalidade de G6PD (tais como deleções grandes, mutações de nonsense do quadro de leitura) sugere que a ausência completa da enzima G6PD é incompatível com a vida. Finalmente, também a sequência não codificante de G6PD deve estar envolvida na determinação da deficiência de G6PD (Minucci et al., 2009).

- **G6PD Mediterrâneo**

G6PD SASSARI

G6PD CAGLIARI

G6PD, SER188PHE

A variante mediterrânea G6PD (563C>T) é a variante anormal mais comum em caucasianos, particularmente indivíduos da região do mediterrâneo e do médio oriente. É uma variante de classe II associada a hemólise grave. A meia-vida desta variante é medida em horas. Deste modo, a maioria dos eritrócitos circulantes têm uma atividade de enzima G6PD extremamente deficiente e sofrerão hemólise após exposição a uma lesão oxidativa. Contudo, na ausência de *stress* oxidativo, a hemólise tipicamente não ocorre e não há anemia ou reticulocitose (Glader, 2016).

Uma mudança de citosina para timina na posição base 563 (no exão 6) provoca uma mudança de serina para fenilalanina na posição de aminoácido 188. De Vita et al. (1989) descobriram que G6PD Mediterrâneo, G6PD Sassari e G6PD Cagliari têm a mesma mutação, resultante de uma mutação TCC para TTC no exão 6. Existe uma segunda mutação silenciosa de TAC para TAT no codão 437 no exão 11 (C para T no nucleótido 1311); ambos os codões codificam a tirosina. Esta mutação é um polimorfismo e causa anormalia de classe II. Um polimorfismo genético é uma alteração no ácido desoxirribonucleico (DNA), hereditária, cuja frequência é superior a 1% (OMIM, 2013).

- **G6PD Coimbra**

G6PD, ARG198CYS

No filho de uma mulher portuguesa que sofreu um ataque de favismo, Corcoran et al. (1992) identificaram um mutante G6PD com as propriedades químicas do tipo mediterrânico. No entanto, ao nível do DNA, demonstraram que a mutação era uma transição de C para T, 29 nucleótidos a jusante da mutação no alelo Mediterrâneo, resultando na substituição de cisteína por arginina, 10 aminoácidos a jusante da mudança do alelo Mediterrâneo. A mesma mutação foi encontrada num paciente no sul de Itália. A nova variante foi denominada G6PD Coimbra.

Em 3 indivíduos com deficiência de G6PD de grupos tribais no sul da Índia, Chalvam et al. (2008) identificaram a variante de Coimbra e declararam que a mutação teve uma frequência de 7,5% nessa população (OMIM,2013).

- **G6PD Aveiro**

G6PD, CYS269TYR

Anemia hemolítica não-esferocítica devida à deficiência G6PD

Num menino nascido em Aveiro, Portugal, com anemia hemolítica crónica grave presente desde o nascimento, Costa et al. (2000) descobriram que a atividade indetetável de G6PD foi causada por uma transição G para A na posição nucleotídica 806 do gene G6PD resultando numa substituição de aminoácidos Cys269 para Tyr (C269Y). Esta mutação, designada G6PD Aveiro, não foi detetada na sua mãe ou irmã. Com a idade de 5 anos, o doente tinha tido 6 episódios de hemólise intravascular aguda grave que requereram hospitalização e transfusão de eritrócitos. O baço era palpável 6 cm abaixo da margem costal esquerda. Costa et al. (2000) apontaram que os mutantes de G6PD que causam variantes de classe I (as formas mais graves da doença) se aglomeram no exão 10, numa região que, ao nível da proteína, está

implicada na dimerização. A mutação nesta nova variante de classe I corresponde ao exão 8. Os alelos mutantes e normais foram encontrados em células hematopoiéticas e bucais, indicando mosaicismo (OMIM, 2013).

- **G6PD Canton**

G6PD GIFU

G6PD AGRIGENTO

G6PD TAIWAN-HAKKA

G6PD, ARG459LEU

G6PD Canton é uma das variantes deficientes mais comuns nos orientais, atingindo uma frequência genética de 1,7% no sul da China. Stevens et al. (1990) demonstraram que o codão 459 em G6PDB é alterado de CGT (arginina) para CTT (leucina).

A alteração G para T ocorre no nucleótido 1376. Tang et al. (1992) encontraram esta mutação em 3 taiwaneses e 1 hakkaneses em Taiwan. Eles apontam que a mesma mutação ocorre em três outras variantes chinesas de G6PD em Guangdong, China: Taiwan-Hakka, Gifu e Agrigento.

A variante G6PD Gifu foi descoberta num rapaz japonês com 9 anos de idade com hemólise crónica e crises hemolíticas após infeções respiratórias superiores. A atividade enzimática foi de 2,9% do normal.

A G6PD do doente mostrou uma maior utilização do substrato análogo, deamino-NADP⁺ e instabilidade térmica (OMIM, 2013).

- **G6PD Asahi**

G6PD, VAL68MET

G6PD A- é uma variante comum de G6PD entre as pessoas africanas que pode causar hemólise aguda desencadeada por infeções e certos medicamentos, bem como por favas. Este fenótipo de classe III pode ser causado por uma combinação da mutação comum 376A-G (Asn126 a Asp) e qualquer uma das 3 mutações adicionais que incluem

202G-A (Val68 a Met). A mutação *missense* 376A-G (Asn126 a Asp) por si só provoca uma variante assintomática de classe IV G6PD A com atividade enzimática normal, enquanto a outra mutação, 202G-A, não foi encontrada em seres humanos por si só. Hirono et al. (2002) descreveram um paciente deficiente em G6PD assintomático com a mutação *missense* 202G-A, mas não o 376A-G. Este era um menino japonês de 3 anos de idade em que se notou ter icterícia e anemia na admissão ao Hospital General Asahi. Esta foi a única mutação encontrada e deve ter surgido separadamente daqueles comuns em africanos, porque o doente não tinha nenhuma das mutações silenciosas estreitamente ligadas à mutação africana, enquanto ele tinha uma exclusão intrónica de base única comum em mongóides. Town et al. (1992) descobriram num estudo *in vitro* utilizando mutantes de G6PD humanos recombinantes expressos em *E. coli* que 202G-A, assim como 376A-G, não provoca a deficiência de enzima por si só, e a acção sinérgica destas 2 mutações é necessária para produzir o fenótipo de classe 3 de G6PD A-. A interação sinérgica também foi apoiada pelo fato de que Val68 e Asn126 estão intimamente localizados em um modelo tridimensional de G6PD humano. Os resultados de Hirono et al. (2002) parecem inconsistentes com a ideia de que 202G-A não pode produzir hemólise aguda por si só.

Tabela 3.3 – Algumas variantes fenotípicas da deficiência da G6PD e suas mutações (OMIM, 2013).

Fenótipo	Mutação
G6PD A+	G6PD, Asn126Asp
G6PD A- G6PD Matera G6PD Betica G6PD Castilla G6PD Distrito Federal G6PD Tepic	G6PD, Val68Met, Asn126Asp
G6PD Mediterrânea G6PD Sassari G6PD Cagliari	G6PD, Ser188Phe
G6PD Canton G6PD Gifu G6PD Agrigento G6PD Taiwan-Hakka	G6PD, Arg459Leu
G6PD A-	G6PD, Arg227Leu
G6PD A-	G6PD, Leu323Pro
G6PD Coimbra	G6PD, Arg198Cys
G6PD Aveiro	G6PD, Cys269Tyr
G6PD Asahi	G6PD, Val68Met

3.6.1. Malária

A malária é uma doença causada por parasitas que são transmitidos aos seres humanos por mosquitos *Anopheles*. Duas espécies relacionadas de parasitas causam a maior parte dos casos da doença e morte por malária - *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*.

Em áreas afetadas pela malária as crianças e as mulheres grávidas são especialmente vulneráveis sendo esta condição agravada pela pobreza. Em África, onde 80% dos casos de malária são tratados em casa, a doença mata uma criança em vinte antes dos cinco anos de idade.

A malária é um enorme problema de saúde pública e ocorre em mais de 100 países, afetando cerca de 3,3 bilhões de pessoas, metade da população mundial.

Estima-se que a forma mais mortal do parasita da malária (*Plasmodium falciparum*) causa 300 a 500 milhões de casos clínicos e aproximadamente um milhão de mortes por ano. Grosseiramente calculado corresponde a uma morte em cada trinta segundos. A malária é, no entanto, evitável e curável usando tratamentos extremamente eficazes e medidas de controlo.

Viajantes que vão para regiões onde há malária têm um risco maior de contrair malária e morrer de infeção, incluindo crianças e adultos. Todos os viajantes para países com um risco de malária podem contrair uma doença potencialmente mortal, por isso tomar atempadamente as devidas precauções e aconselhamento de viagem é essencial (Malaria Atlas Project).

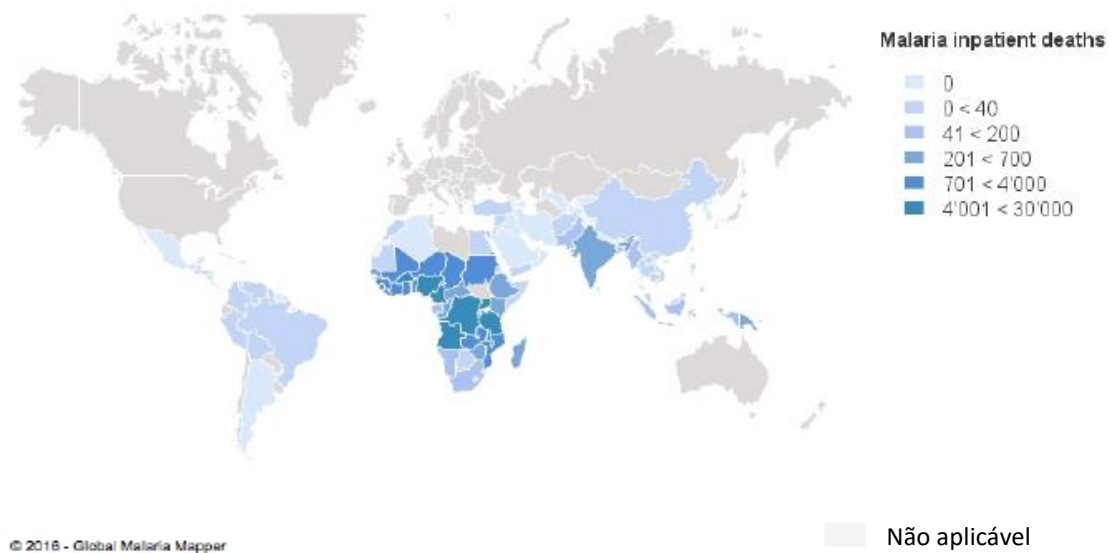


Figura 3.2 - Mortes por malária em pacientes internados (adaptado de Global Malaria Mapper).

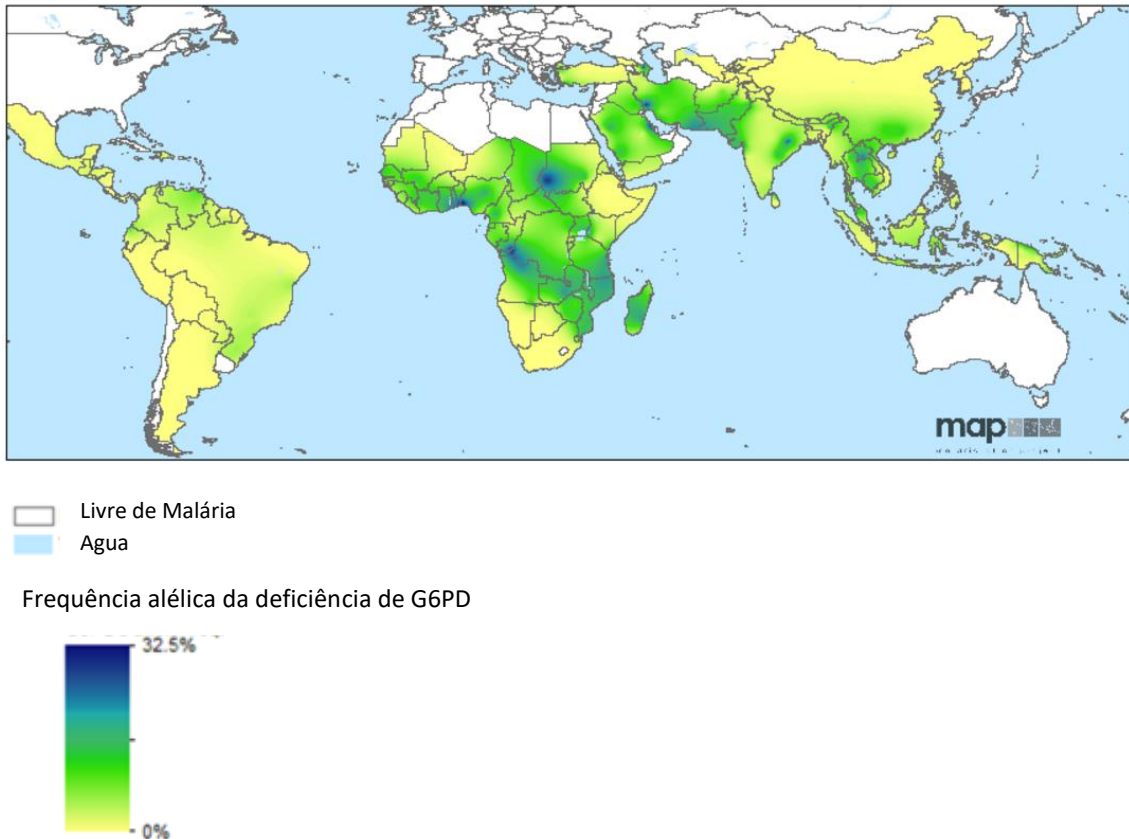


Figura 3.3 – Previsão, através da mediana, da frequência alélica da deficiência de G6PD no mapa global em 2010 (adaptado de Malaria Atlas Project).

A distribuição geográfica da deficiência de G6PD é instrutiva. Frequências tão altas como 25% ocorrem na África tropical, em parte do Médio Oriente e sul da Ásia, áreas onde a malária é mais prevalente. Além de tais observações epidemiológicas, estudos mostram que o crescimento do parasita causador da malária, *Plasmodium falciparum*, é inibido em eritrócitos deficientes em G6PD. O parasita é muito sensível ao dano oxidativo e morre por um nível de *stress* oxidativo tolerável ao hospedeiro humano deficiente em G6PD. Já que a vantagem da resistência à malária equilibra a desvantagem da baixa resistência ao dano oxidativo, a seleção natural mantém o genótipo deficiente em G6PD em populações humanas onde a malária é prevalente. Apenas em condições insuportáveis de *stress* oxidativo, causado por fármacos, herbicidas ou divicina, a deficiência de G6PD causa problemas médicos graves.

3.6.2. Populações em Risco

Se queremos saber quantas pessoas estão em risco de malária e em que áreas, precisamos saber onde está o risco de malária e onde as pessoas vivem.

O risco da malária pode mudar de alto para baixo, ou vice-versa, dentro de uma distância relativamente curta, por isso precisamos ser capazes de mapear onde as pessoas vivem dentro dessas mesmas distâncias curtas. Os dados de censos nacionais têm de ser publicados em grande escala para fornecerem os detalhes que se precisam. Portanto, são utilizadas fórmulas matemáticas para calcular a distribuição contínua da população dentro de uma área. Estas fórmulas têm em conta as localizações das características da terra suscetíveis de afetar a distribuição da população, como densidade populacional, classe social, uso da terra ou estradas (Malaria Atlas Project).

3.7. Diagnóstico da deficiência de G6PD

A deficiência de G6PD pode ser diagnosticada realizando-se um simples exame de sangue para verificar os níveis de enzima G6PD. Este exame é feito por uma análise quantitativa espectrofotométrica ou, mais frequentemente, por um teste rápido de fluorescência, detectando-se a geração de NADPH a partir de NADP⁺. O teste é positivo se a amostra de sangue não fluorescer sob luz ultravioleta. O NADPH formado pela reação catalisada pelo enzima reduz direta ou indiretamente agentes cromogénicos ou fluorogénicos, o que resulta numa alteração de absorvância ou fluorescência que é proporcional à atividade da G6PD (figura 3.2). Existem numerosos kits comerciais de deteção de atividade da G6PD, tanto quantitativos como qualitativos, baseados nestas reações (Frank, 2005).

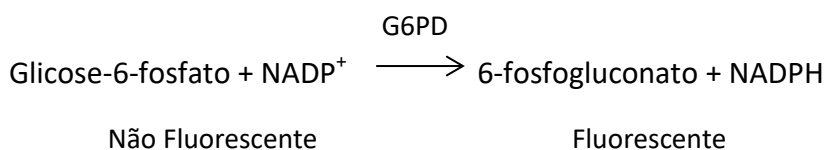


Figura 3.4 – Princípio do teste da atividade da G6PD (adaptado de Keohane et al., 2016).

Em doentes com hemólise aguda, o teste para a deficiência de G6PD pode ser falsamente negativo porque os eritrócitos mais velhos com uma maior deficiência enzimática sofreram hemólise. Os eritrócitos e reticulócitos jovens têm atividade enzimática normal ou quase normal. As mulheres heterozigotas podem ser difíceis de diagnosticar devido ao mosaicismo do cromossoma X levando a uma deficiência parcial que não será detetada de forma fiável com testes de triagem (Frank, 2005).

Os testes baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) detetam mutações específicas e são usados para triagem populacional, estudos familiares ou diagnóstico pré-natal (Frank, 2005).

Outros testes diagnósticos que podem ser feitos incluem hemograma completo, teste de hemoglobina sérica e contagem de reticulócitos. Todos estes testes medem a quantidade de eritrócitos no corpo (Herndon, 2016). Podem realizar-se mais testes como medição do nível de bilirrubina, hemoglobina no sangue, hemoglobina na urina, nível de haptoglobina, teste da lactato desidrogenase (LDH), teste de redução da metahemoglobina e contagem de reticulócitos (Medline).

Porque a deficiência de G6PD pertence a um grupo de anemias hemolíticas congénitas, o seu diagnóstico deve ser considerado em crianças com história familiar de icterícia, anemia, esplenomegalia ou colelitíase, especialmente nas crianças de ascendência mediterrânica ou africana (Frank, 2005).

Os testes devem ser realizados em crianças e adultos (especialmente homens de ascendência africana, mediterrânica ou asiática) com uma reação hemolítica aguda causada por infeção, exposição a um fármaco oxidativo conhecido ou ingestão de favas (Frank, 2005).

A triagem neonatal para deficiência de G6PD não é realizada rotineiramente nos Estados Unidos, embora seja feita em países com alta prevalência da doença. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a triagem de todos os recém-nascidos em populações com uma prevalência de 3 a 5 por cento ou mais nos homens (Frank, 2005).

3.8. Tratamento

O tratamento para a deficiência de G6PD consiste em remover o fator desencadeador dos sintomas. Se a condição foi desencadeada por uma infecção, então a infecção subjacente é tratada em conformidade. Os medicamentos que possam originar a destruição dos eritrócitos também são descontinuados. Nestes casos, a maioria das pessoas pode recuperar da condição por conta própria. Contudo, uma vez que a deficiência de G6PD origina anemia hemolítica, pode ser necessário um tratamento mais agressivo. Esse tratamento inclui oxigenoterapia e uma transfusão de sangue para repor os níveis de oxigênio e eritrócitos (Herndon, 2016).

O principal tratamento para a deficiência de G6PD é a prevenção de agentes que causam *stress* oxidativo. Raramente a anemia pode ser suficientemente grave para justificar uma transfusão de sangue. A esplenectomia, isto é, o procedimento cirúrgico que consiste na remoção do baço ou parte dele, geralmente não é recomendada. O ácido fólico e o ferro são potencialmente úteis na situação de hemólise, embora a deficiência de G6PD seja geralmente assintomática e a hemólise associada seja geralmente de curta duração. Antioxidantes como a vitamina E e o selênio não têm benefício comprovado para o tratamento da deficiência de G6PD (Frank, 2005).

3.9. Doação de sangue

É recomendada a implementação de políticas para a avaliação dos candidatos a doadores, as quais devem ser desenvolvidas pelos serviços de transfusão de sangue em regiões onde existe uma alta incidência de enzimopatias e defeitos hereditários da membrana dos eritrócitos.

O sangue de indivíduos com deficiência de G6PD com uma história de hemólise é inadequado para transfusão, tendo em conta que a hemólise pode ser precipitada se o beneficiário desenvolver uma doença infecciosa ou ingerir um fármaco oxidativo ou favas. Os indivíduos com deficiência de G6PD ou defeitos hereditários da membrana

dos eritrócitos com uma história de hemólise têm de optar por adiar permanentemente a doação de sangue.

Os indivíduos com deficiência de G6PD ou outros defeitos hereditários da membrana dos eritrócitos sem história de hemólise podem doar sangue. No entanto, o sangue não é adequado para transfusão intra-uterina, transfusão neonatal ou para doentes com deficiência de G6PD (OMS, 2012).

Conclusão

Muito se aprendeu acerca da deficiência de G6PD e os seus efeitos ao longo dos anos, mas como em todos os campos da ciência, ainda há muito por aprender.

A deficiência de G6PD está diretamente relacionada com o *stress* oxidativo causado por diferentes elementos exógenos como fármacos e certos alimentos. Como tal, é importante proceder à realização de testes de diagnóstico de forma a se determinar se a pessoa possui deficiência do enzima G6PD, para que não exista ocorrência de fenómenos hemolíticos graves. Na ocorrência de fenómenos hemolíticos graves pode ser necessária uma transfusão de sangue ou oxigenoterapia.

A deficiência do enzima G6PD encontra-se associada a zonas que são endémicas em malária, uma vez que esta deficiência confere resistência à malária. Logo, será nessas zonas que ocorre maior prevalência da deficiência.

A hemólise relacionada com a deficiência de G6PD induzida por fármacos foi relatada após a terapêutica com uma gama de medicamentos contra a malária, incluindo a primaquina, azul de metileno e o fármaco diaminodifenilsulfona (dapsona). A hemólise pode ser desencadeada por infeções e por fármacos com propriedades oxidativas como o ácido acetilsalicílico, a vitamina K, antibióticos, além de antimaláricos.

O gene G6PD é provavelmente o locus mais polimórfico em seres humanos, com mais de 400 variantes alélicas conhecidas. Desta forma, existem inúmeras variantes que estão associadas a diferentes graus de atividade do enzima.

No futuro poderão surgir alguns tratamentos inovadores como uma possível terapia genética ou medicamentos que conduzam à eliminação de radicais livres com o objetivo de combater os problemas associados à deficiência de G6PD.

Referências Bibliográficas

- Allahverdiyev A M, Bagirova M, Elcicek S et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Malaria: A Method to Detect Primaquine-Induced Hemolysis in vitro. In: Ed: Rosa Angela Canuto. Dehydrogenases, Edition: 1, Chapter: 4, Publisher: Intech, 2012; 65-90
- Barcia-Vieitez R e Ramos-Martínez J I. The regulation of the oxidative phase of the pentose phosphate pathway: New answers to old problems, IUBMB Life. 2014; 66(11): 775-779
- Beutler E. G6PD Deficiency, Blood. 1994; 84:3613-3636
- Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective Early history. Blood. 2008; 111(1): 16-24
- Birben E, Sahiner U M, Sackesen C et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. WAO Journal. 2012; 5: 9-19
- Campos L S. Entender a Bioquímica, Escolar Editora, 4ª edição. 2005
- Cherepnalkovski A P, Krzelj V, Zafirovska-ivanovska B, et al. Evaluation of Neonatal Laboratory Parameters Hemolytic Jaundice: Clinical and Laboratory Parameters. Macedonian Journal of Medical Sciences. 2015; 3(4): 694- 698
- Cherepnalkovski A P, Marusic E, Piperkova K, et al. Influence of the inherited glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on the appearance of neonatal hyperbilirubinemia in southern Croatia. Acta Informatica Medica. 2015; 23(5): 264 – 267
- Dore M P, Marras G, Rocchi C, et al. G6PD deficiency does not enhance susceptibility for acquiring Helicobacter pylori infection in Sardinian patients. PLoS ONE. 2016; 11(7): 1-8
- Frank J E. Diagnosis and Management of G6PD Deficiency. *American Family Physician*. 2005; 72(7):1277-1282
- Glader B. Diagnosis and management of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. 2016. Consultado em 8 de janeiro 2017 em <http://www.uptodate.com/contents/diagnosis-and-management-of-glucose-6-phosphate-dehydrogenase-deficiency>
- Global Malaria Mapper. Consultado em 12 de dezembro de 2016 em <http://www.worldmaliareport.org/home>
- Gomes O, Biléu M C, Borges L et al. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase – a propósito de um caso clínico. Amato Lusitano – Revista de saúde. 2013; 31-35

- Grácio D. Papel do H₂O₂ na Resistência Adquirida ao Cancro: alterações na Organização das Biomembranas. Tese de Mestrado em Bioquímica. Universidade de Lisboa. 2011
- Halpern M J et al. Bioquímica, Lidel - edições técnicas. 1997
- Halpern M J, Freire A, Quintas A. Bioquímica Organização Molecular da Vida, Lidel - edições técnicas. 2008
- Hernández-Pérez D, Girón C, Ruiz-Rodríguez S. Case Report Dental Considerations in Children with Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency (Favism): A Review of the Literature and Case Report. Case Reports in Dentistry. 2015; 3-6
- Herndon J. G6PD Deficiency. 2016._Consultado em 3 de dezembro de 2016 em <http://www.healthline.com/health/glucose-6-phosphate-dehydrogenase-deficiency#Overview1>
- Hisar O, Yanik T, Goncharova R et al. Effects of diludine supplementation on growth performance, liver antioxidant enzyme activities and muscular trace elements of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles at a low water temperature. Aquaculture Nutrition. 2012; 18(2): 211–219
- Hoffbrand A V, Moss P A H, Pettit J E. Fundamentos em Hematologia, Artmed, 5ª edição. 2008
- Huang Y C, Chang T K, Fu Y C et al. C for colored urine: acute hemolysis induced by high-dose ascorbic acid. Clin Toxicol (Phila). 2014; 52:984
- Keohane E, Smith L, Walenga J. Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications. 5ª edição. ELSEVIER. 2016; 24: 387
- Kotaka M L et al. Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP+ binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 2005; 61:5:495-504
- Li Q, Yang F, Liu R et al. Prevalence and Molecular Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency at the China-Myanmar Border. PLoS One. 2015; 10(7): e0134593
- Lu S C. Regulation of glutathione synthesis. Mol Aspects Med. 2009; 30(1-2): 42–59
- Luzzatto L. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: from genotype to phenotype, The Hematology Journal. 2006; 91: 10: 1303- 1306
- Malheiros S. Regulação do metabolismo celular – um resumo. Revista brasileira de ensino de bioquímica e biologia molecular 2006. Artigo D.

- Manganelli G et al. Discussion on pharmacogenetic interaction in G6PD deficiency and methods to identify potential hemolytic drugs. *Cardiovascular & hematological disorders drug targets*. 2010; 10: 143-150
- MAP (Malaria Atlas Project). Consultado em 10 de dezembro de 2016 em <http://www.map.ox.ac.uk/map/>
- Maurya, P. K., Kumar, P. e Chandra, P. Biomarkers of oxidative stress in erythrocytes as a function of human age. *World journal of methodology*. 2015; 5(4): 216 – 222
- Medline Plus. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Consultado em 3 de dezembro de 2016 em <https://medlineplus.gov/ency/article/000528.htm>
- Minucci A, Giardina B, Zuppi C et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase laboratory assay: How, when, and why? *IUBMB Life*. 2009; 61(1): 27–34
- Nelson D e Cox M. 2014. Glicólise, gliconeogénese e a via das pentoses-fosfato in *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Artmed. 6ª edição. New York. 2014; 14: 576
- OMIM. Glucose-6-phosphate dehydrogenase; G6PD. 2013. Consultado em 3 de janeiro de 2017 em <http://omim.org/entry/305900>
- OMS. Blood donor selection – Guidelines on assessing donor suitability for blood donation. Consultado em: http://www.who.int/bloodsafety/publications/guide_selection_assessing_suitability.pdf?ua=1 Publicado em 2012. Consultado em 12 de novembro 2016
- Perinoto A, Costa C, Duarte G, et al. Prevalência da deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase em uma população adulta. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*. 2013; 11(1): 127-134
- Poirot E, Vittinghoff E, Ishengoma D, et al. Risks of Hemolysis in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficient Infants Exposed to Chlorproguanil-Dapsone, Mefloquine and Sulfadoxine-Pyrimethamine as Part of Intermittent Presumptive Treatment of Malaria in Infants. *PLoS One*. 2015; 10(11): e0142414
- Rees DC, Kelsey H, Richards JD. Acute haemolysis induced by high dose ascorbic acid in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *BMJ*. 1993; 306:841-842
- Shan F, Yang R, Ji T, et al. Vitamin C Inhibits Aggravated Eryptosis by Hydrogen Peroxide in Glucose-6-Phosphated Dehydrogenase Deficiency. *Cell Physiol Biochem*. 2016; 39:1453-1462
- Stanton R C. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and Cell Survival. *IUBMB Life*. 2012; 64(5): 362–369

Stover N A, Dixon T A, Cavalcanti A R O. Multiple Independent Fusions of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase with Enzymes in the Pentose Phosphate Pathway. 2011; PLoS ONE, 6(8): e22269

Zitka O, Skalickova S, Gumulec J et al. Redox status expressed as GSH: GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology letters*. 2012; 4: 1247-1253.