

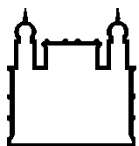
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Bases moleculares da deficiência de G6PD e sua
relação com o tratamento da hanseníase

Viviane da Conceição Silva

Rio de Janeiro

2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Viviane da Conceição Silva

Bases moleculares da deficiência de G6PD e sua relação com o tratamento da hanseníase

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Philip Noel Suffys

RIO DE JANEIRO

2017

Silva, Viviane da Conceição.

Bases moleculares da deficiência de G6PD e sua relação com o tratamento da hanseníase / Viviane da Conceição Silva. - Rio de Janeiro, 2017. 72 f.; il.

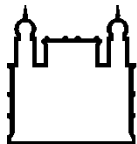
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientador: Philip Noel Suffys Noel Suffys.

Bibliografia: f. 51-58

1. Dapsona. 2. Hanseníase. 3. Deficiência de G6PD. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Viviane da Conceição Silva

Bases moleculares da deficiência de G6PD e sua relação com o tratamento da hanseníase

ORIENTADOR: Prof. Dr. Philip Noel Suffys

Aprovada em: 31/03/2017

EXAMINADORES:

Prof^a. Dra. Patrícia Cuervo Escobar- Presidente

Prof^a. Dra. Maria Eugênia Novinski Gallo- Membro

Prof. Dr. Antônio Basílio de Miranda- Membro

Prof^a. Dra. Cynthia Chester Cardoso- Suplente

Prof^a. Dra. Maria Helena Feres Saad - Suplente

Prof^a. Dra. Roberta Pinheiro Olmo- Revisora

Rio de Janeiro, 31 de março de 2017.

*Aos meus pais, Waldir e Vânia,
que nunca mediram esforços para que
este sonho se tornasse realidade.*

"Ao cientista, portanto, sobretudo ao cientista cristão, corresponde à atitude de interrogar-se sobre o futuro da humanidade e da Terra; de construir um mundo humano para todas as pessoas e não para um grupo ou uma classe de privilegiados"

(Papa Francisco)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me capacitado, iluminado e me dado força para chegar até aqui e a minha “mãezinha” Nossa Senhora das Graças pela sua interseção nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Waldir Oliveira da Silva e Vânia Lúcia da Conceição Silva, por todo apoio e incentivo nesta longa jornada que se iniciou há muitos anos atrás. Agradeço por acreditarem, apoiarem e viverem comigo esse sonho, sem vocês eu não conseguiria vencer mais esta etapa, essa vitória é nossa!

Ao Dr. Adalberto Rezende Santos, pela confiança e pelo exemplo profissional. Agradeço pelo acolhimento, pelas oportunidades que me proporcionou e pelas discussões científicas que contribuíram para minha formação.

Ao Dr. Philip Noel Suffys orientação e acolhida no laboratório agradeço por ter me ajudado a adquirir conhecimentos que foram essenciais para minha formação.

Aos meus familiares por todas as palavras de incentivo, em especial ao meu tio Marcos Antônio da Conceição por proporcionar os encontros semanais com a família que tornaram essa jornada mais leve.

Aos “los Piratas”, amigos que o NUPEM me deixou, Amanda Ferreira, Nathalia Beraldini e Victor Ferrão, que mesmo de longe não deixaram de se fazer presentes, pelos momentos de descontração e risadas principalmente na reta final deste trabalho onde tudo parecia perdido.

A Mimar Confecções, nas pessoas de Adair Lima, Marcele Gripp, e Terezinha Gripp pelo apoio financeiro.

Aos cidadãos “senzalences” Ana Carolina Withimam, Cecília Alvim, Eloah Aguiar, Ícaro Rodrigues e Maria Carolina Sisco por todos os momentos de risadas, lanches e esperas intermináveis pelo padeiro.

A minha “irmã” do coração Jéssica Ferreira e a minha “mãe” Amanda Brum por me aturarem nos momentos de desespero, responderem meus questionamentos a respeito da pesquisa, mesmo que estes viessem em momentos inoportunos. Obrigada pelas discussões científicas, pelos desabafos e também pelas conversas a respeito da vida. Obrigado Amanda pela correção do trabalho, não esqueci que estou te devendo um pudim!

A todos os integrantes do LABMAM em especial a Márcia Quinhones pelo auxílio nos experimentos. Agradeço por dividir comigo um pouco de sua vasta experiência profissional que sem dúvida contribui não só para a realização deste trabalho, mas para minha formação profissional.

Ao PROEP-CNPq/ Fiocruz e ao POM/ Fiocruz pelo financiamento do trabalho.

Lista de figuras

Figura 1.1: Distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase em 2015-5	
Figura 1.2: Distribuição dos novos casos por grupo de países-----	5
Figura 1.3: Esquema terapêutico de pacientes adultos multibacilares-----	9
Figura 1.4: Esquema terapêutico de pacientes adultos paucibacilares-----	10
Figura 1.5: Esquema terapêutico de crianças multibacilares-----	11
Figura 1.6: Esquema terapêutico de crianças paucibacilares-----	11
Figura 1.7: Ciclo das pentoses-----	19
Figura 1.8: Representação do gene G6PD-----	20
Figura 1.9: Distribuição da deficiência de G6PD-----	22
Figura 5.1: Frequência de pacientes multibacilares em relação ao gênero--	36
Figura 5.2: Eletroforese do produto de DNA extraído-----	36
Figura 5.3: Eletroforese do produto da digestão da enzima <i>Nla III</i> -----	37
Figura 5.4: Eletroforese do produto da digestão da enzima <i>FOK I</i> -----	38
Figura 5.5: Eletroforese do produto da digestão das enzimas <i>BspEI</i> , <i>MbolI</i> , <i>BstNI</i> e <i>NciI</i> -----	39
Figura 5.6: Eletroferograma do sequenciamento da mutação T968C-----	40
Figura 5.7: Frequência de anemia hemolítica-----	41
Figura 5.8: Frequência de mutações em <i>G6PD</i> -----	41
Figura 5.9: Frequência de deficiência de G6PD-----	42
Figura 5.10: Pacientes não caracterizados-----	42
Figura 5.11: Frequência das variantes estudadas por região-----	44

Lista de tabelas

Tabela 1.1: Tendências de detecção de novos casos de hanseníase nos últimos 10 anos-----	7
Tabela 1.2: Perfil epidemiológico de hanseníase em 2015-----	8
Tabela 1.3: Posologia do tratamento para pacientes com menos de 30kg-----	10
Tabela 1.4: Terapia alternativa para pacientes intolerantes a dapsona-----	12
Tabela 1.5: Esquema alternativo para pacientes impossibilitados de receber rifampicina-----	13
Tabela 1.6: Terapia alternativa para pacientes intolerantes a clofazimina---	13
Tabela 1.7: Classificação das variantes de G6PD segundo a WHO-----	21
Tabela 4.1: Dados demográficos das amostras arroladas no estudo-----	29
Tabela 4.2: Amostras analisadas por mutação estudadas-----	31
Tabela 4.3: Sequência de iniciadores utilizados na PCR-----	32
Tabela 4.4: Condições de amplificação dos éxons e temperaturas de anelamento dos iniciadores-----	32
Tabela 4.5: Enzimas de restrição utilizadas na digestão-----	33
Tabela 5.1: Distribuição geográfica da população de estudo-----	35
Tabela 5.2: Genotipagem da mutação G202A-----	38
Tabela 5.3: Genotipagem da mutação A376G-----	39
Tabela 5.4: Frequência das variantes encontradas na população de estudo-	43
Tabela 5.5: Comparação das frequências encontradas com dados da literatura-	44

Lista de Símbolos e abreviaturas

ADRs- Reações Adversas

Arg- Aminoácido arginina

Asn- Aminoácido asparagina

Asp- Aminoácido ácido aspártico

BB- Borderline-borderline

BL- Borderline-lepromatoso

BT- Borderline tuberculóide

CYP450- Citocromo P450

DDS- 4,4-diamino-difenil-sulfona

DDS-NOH- Dapsona hidroxilamina

EDTA- Ácido etilendiamino tetra-acético (do Inglês: Ethylenediamine tetraacetic acid)

G6PD- Glicose-6-fosfato desidrogenase

GSH- Glutathiona reduzida

GSSG- Glutathiona oxidada

GWAS- Estudos pangenômicos de associação (do Inglês: Genome Wide Association Study)

AH- Anemia hemolítica

IB- Índice bacteriológico

Leu- Aminoácido leucina

LL- Lepromatoso Lepromatoso

MADDS- monoacetildapsona

MADDS-NOH- Monoacetildapsona hidroxilamina

MB- Multibacilar

Met- Aminoácido Metionina

NADPH- nicotinamida adenina dinucleotídico fosfato

NAT2- N-acetiltransferase2

PAC- Programa de aceleração do crescimento

PB- Paucibacilar

Pb- Pares de base

PCR- Reação em cadeia da polimerase (do Inglês: Polymerase Chain Reaction)

Phe- Aminoácido fenilalanina

PQT- Poliquimioterapia

Pro- Aminoácido prolina

SNPs- Polimorfismo de Nucleotídeo Único (do Inglês: Single Nucleotide Polymorphisms)

SUS- Sistema único de saúde

TT- TuberculóideTuberculóide

Val- Aminoácido valina

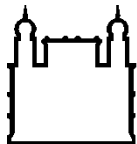
VNTR- Número variável de repetições em tandem (do inglês:variable number tandem repeat)

WHO- Organização mundial da saúde (do Inglês: World Health Organization)

Sumário

1- Introdução	1
1.1- A hanseníase	1
1.2- Agente etiológico	1
1.3- Clínica	2
1.4- Transmissão	3
1.5- Suscetibilidade genética	3
1.6- Epidemiologia	4
1.7- Diagnóstico	8
1.8- Tratamento	9
1.8.1- Tratamento alternativo	12
1.9- Metabolização e mecanismo de ação dos fármacos do esquema PQT/WHO	13
1.10- Metabolização da dapsona e as reações adversas	14
1.11- A ciência da farmacogenética	16
1.12- A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)- Atividade biológica-	18
1.12.1- Deficiência de G6PD	21
1.12.2- Diagnóstico da deficiência de G6PD	22
1.12.3- Variantes de G6PD	24
2- Justificativa	27
3- Objetivos	28
3.1- Objetivo principal	28
3.2- Objetivo específico	28
4- Metodologia	29
4.1- Delineamento do estudo	29
4.2- Tempo de duração do estudo	29
4.3- Local de estudo	29
4.4- Considerações éticas	29
4.5- Critérios de inclusão	30
4.6- Critérios de exclusão	30
4.7- Escolha das variantes genéticas	30

4.8-Extração de DNA genômico-----	31
4.9- Amplificação-----	31
4.10- Eletroforese em gel de agarose-----	33
4.11- Digestão dos produtos com enzimas de restrição-----	33
4.12- Sequenciamento automatizado-----	34
4.13- Análises estatísticas-----	34
5- Resultados-----	34
5.1- Caracterização da população de estudo-----	34
5.2- Extração de DNA -----	36
5.3- Genotipagem-----	36
5.4- Sequenciamento automático-----	40
5.5- Frequência das reações adversas da dapsona-----	40
5.6- Frequência da deficiência de G6PD-----	41
5.7- Frequência das variantes-----	43
6- Discussão-----	44
7- Limitações do estudo-----	50
8- Conclusões-----	50
9- Referências-----	51



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Bases moleculares da deficiência de G6PD e sua relação com o tratamento da hanseníase

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Viviane da Conceição Silva

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, com alto poder incapacitante e endêmica no Brasil. O tratamento se baseia em um esquema de poliquimioterapia (PQT/WHO), que envolve basicamente três fármacos: dapsona (DDS), rifampicina e clofazimina. Embora a implementação desta tenha possibilitado a cura da hanseníase, a ocorrência de reações adversas (ADRs) associadas à intolerância aos fármacos tem se tornado frequente. Dados da literatura indicam que DDS é responsável por cerca de 70% das ADRs identificadas durante o tratamento da hanseníase. Dentre as ADRs induzidas por DDS a anemia hemolítica (AH) merece destaque, pois acarreta sérios riscos principalmente em pessoas com deficiência da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD). A AH leva a hemólise prematura da hemácia e pode resultar em óbito do paciente. A G6PD é a enzima responsável por catalisar a primeira etapa do ciclo das pentoses, sendo esta crucial para a proteção das hemácias contra o processo oxidativo. Esta enzima é codificada pelo gene *G6PD* localizado no cromossomo X. Mutações pontuais (SNPs) nesse gene podem levar à deficiência na G6PD. Atualmente 180 variantes genéticas da G6PD já foram descritas. Contudo, somente 20 delas resultam na deficiência da atividade enzimática e estão associadas à AH. A variante Canton apresenta uma troca de um nucleotídeo G por um T na posição 1376, o que ocasiona uma baixa atividade enzimática (menos de 10%). A troca de um nucleotídeo A por G na posição 376 corresponde a variante A que não, que está relacionada à AH aguda. Já a variante Asahi, descoberta em meninos asiáticos, é resultado da troca de um nucleotídeo G por um A na posição 202. A troca do nucleotídeo C por T na posição 563 origina a variante Mediterrânea, a qual também confere menos de 10% da atividade enzimática residual associada à AH aguda. No caso dessa última variante, a atividade enzimática da G6PD chega a ser nula já nas hemácias jovens. No presente estudo, foram avaliados 537 pacientes portadores de hanseníase, oriundos de quatro macrorregiões brasileiras e que haviam sido tratados através da PQT/WHO. Os indivíduos selecionados foram avaliados para sete SNPs no gene *G6PD*. De acordo com os resultados, na população estudada, o número de pacientes do gênero feminino foi significativamente maior que do gênero masculino ($p=0,000001$). Além disso, a frequência maior de pacientes multibacilares na população do gênero feminino também foi observada. A variante A foi a mais frequente, sendo observada em 14,8% da população, seguida da variante A^{-202A/376G} observada em 4,8% e a variante Asahi em 3,9% da população estudada. 39% dos pacientes desenvolveram algum tipo de ADR associada à dapsona e destes 19% apresentaram AH. Dos pacientes que desenvolveram AH 31% apresentavam alguma mutação em *G6PD* sendo a variante A^{-202A/376G} a mais frequente nesse grupo. A variante A apresentou uma distribuição homogênea em três macrorregiões, todavia, não foi observada na região sul. Estudos posteriores devem ser realizados para avaliar a influência de cada mutação na ocorrência da AH medicamentosa. Esses resultados sugerem que a deficiência de G6PD tem uma tendência a agravar as ADRs atribuídas a DDS e que a variante A^{-202A/376G} é a mais severa nesse quesito.

Abstract

Leprosy is a chronic infectious disease with high incapacitating power and endemic in Brazil. The treatment is based on a multidrug therapy scheme (MDT/WHO) that involves basically three drugs: dapsone (DDS), rifampicin and clofazimine. Although the implementation of MDT / WHO has made possible to cure leprosy, the occurrence of adverse reactions (ADRs) associated with drug intolerance has become common. Data from the literature indicate that DDS accounts for about 70% of ADRs identified during leprosy treatment. Among the DDS-induced ADRs, hemolytic anemia (HA) deserves to be highlighted, as it makes serious risk, especially in people with deficiency of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). The HA leads to premature hemolysis and may result in death of the patient. G6PD is the enzyme responsible for catalyzing the first step of the pentoses cycle, being crucial for the protection of the red blood cells against the oxidative process. This enzyme is encoded by the *G6PD* gene located on X chromosome. Point mutations (SNPs) in this gene can lead G6PD deficiency. Nowadays, 180 genetic variants of G6PD have been described. However, only 20 of these Result in deficiency of enzymatic activity and are associated with HA. The Canton variant shows a nucleotide change from G to T at position 1376, which lead to a low of the enzymatic activity (less than 10%). The change of the nucleotide A by G at position 376 corresponds to variant A, that is not related to acute HA, but the Asahi variant, discovered in Asian boys results from the change of nucleotide G to A at position 202. The change of the nucleotide C to T at position 563 gives rise to the variant Mediterranean which also confers less than 10% of the residual enzyme activity associated with the acute HA. In the case of this last variant, the enzymatic activity of G6PD gets to be null already in young red blood cells. In the present study, were evaluated 537 leprosy patients from four Brazilian macro regions and already treated with MDT / WHO. The selected individuals were evaluated for seven SNPs in *G6PD* gene. According the results, in the studied population, the number of female patients was significantly higher than the male patients ($p = 0.000001$). Besides that a higher frequency of multibacillary within women was also seen. The A variant showed to be the most frequent being observed in 14.8% of the population, followed by the A-^{202A / 376G} variant, being observed in 4.8% and the Asahi variant in 3,9% of the studied population. Thirty nine per cent of the patients presented any type of ADR associated with DDS from which, 19% presented HA. From patients who developed HA, 31% presented any mutation in *G6PD* being the variant A-^{202A / 376G} the more frequent in this group. The variant A presented a homogeneous distribution among the three macro regions, however, not observed in the southern region. Further studies should be performed to assess the influence of each mutation on the occurrence of drug-induced HA. These results suggest that the G6PD deficiency has a tendency to get worse, the DDS-induced ADRs and that the variant A-^{202A / 376G} is the most important regarding this issue

1- Introdução

1.1- A hanseníase

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica, de evolução lenta e decorrente da infecção por *Mycobacterium leprae*, um parasito intracelular obrigatório, com tropismo pelos filetes nervosos periféricos, o que pode ocasionar lesões cutâneas e neuropatias periféricas. A doença é transmitida pelas vias aéreas superiores após contato prolongado com pacientes das formas multibacilares virgens de tratamento. As manifestações clínicas dessa enfermidade dependem do equilíbrio entre a multiplicação bacilar e a suscetibilidade específica e individual (genética e imunológica) do paciente, seja para a regressão espontânea ou para o agravamento progressivo (Harboe&Hastings, 1985). Os principais sinais e sintomas da doença são os dermatoneurológicos: lesões na pele e nos nervos periféricos, sobretudo nos olhos, mãos e pés, que podem ocasionar sérias incapacidades físicas e sociais (Coura *et al.*, 2005). A hanseníase é considerada como problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos. O diagnóstico na fase inicial da doença e o tratamento dos casos, com o objetivo de interromper a cadeia de transmissão, são ainda, na atualidade, os principais métodos usados em seu combate. O tratamento é capaz de devolver bem estar ao paciente e reduzir as incapacidades permanentes, sendo considerado estratégico para a eliminação da doença como problema de saúde pública, principalmente quando iniciado na fase precoce da doença.

1.2- Agente etiológico

Descrito por Armauer Hansen em 1873, o bacilo *M. leprae* foi o primeiro agente infeccioso a ser relacionado a uma doença específica. É um parasito intracelular obrigatório pertencente ao gênero *Mycobacterium* que infecta preferencialmente macrófagos da pele e as células de Schwann nos nervos periféricos (Nathet *al.*, 2015). Morfologicamente, o bacilo apresenta-se na forma de pequenos bastonetes com características de coloração gram-positiva e álcool-ácido resistência. Além disso, apresenta uma taxa de crescimento muito lenta (a mais lenta já descrita em um membro do gênero *Mycobacterium*), o que é um dos fatores responsáveis pelo longo período de

incubação da doença (período desde a infecção até o aparecimento das primeiras manifestações clínicas), que pode variar de 2 a 12 anos (Portaels *et al.*, 1988). O tropismo de *M. leprae* pela célula de Schwann causa o comprometimento, não apenas de terminações nervosas da pele, mas o acometimento dos troncos nervosos periféricos, que pode ocorrer de forma progressiva e silenciosa ou de modo agudo através das neurites (Garbino, 2007). Quando a doença não é tratada, a neuropatia periférica é progressiva e resulta em anestesia, amiotrofias, paralisias e intensos distúrbios autonômicos, que em conjunto promovem o surgimento das deformidades físicas nas mãos, nos pés e nos olhos.

1.3- Clínica

A apresentação clínica da hanseníase está diretamente ligada às características imunológicas e genéticas do paciente. A doença apresenta uma classificação espectral que, além destas características citadas anteriormente, leva também em consideração as alterações senso-motoras, as lesões cutâneas e a carga bacteriana. Assim, as chamadas formas clínicas da doença são agrupadas nas seguintes denominações, de acordo com Ridley & Jopling (1966): indeterminada (I), tuberculóide (TT), borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB), borderline-lepromatosa (BL) e lepromatosa (LL). Embora o histórico envolvendo a classificação da hanseníase seja grande, a classificação segundo Ridley & Jopling é a mais usada para fins de pesquisa. No entanto, como a identificação da forma clínica da doença é extremamente importante para determinar o tratamento, especificamente para esta finalidade, a Organização Mundial de Saúde (WHO- do inglês World Health Organization) propôs uma classificação operacional mais simples, na qual os pacientes são enquadrados de acordo com o número de lesões que apresentam em: paucibacilares (PB), aqueles com até cinco lesões cutâneas, e multibacilares (MB), aqueles com mais de cinco lesões cutâneas (WHO, 1982). Normalmente as formas I, TT e BT são denominadas de paucibacilares (PB) devido à ausência de bacilos nos testes de baciloscopia, e as formas BB, BL e LL são denominadas de multibacilares (MB).

1.4- Transmissão

Embora existam vários relatos de infecção por outras vias como penetração do bacilo através da pele, especialmente após tatuagens e outros traumatismos (Ghorpade, 2002; Brandsma *et al.*,2005) e por outras fontes, como animais infectados, considera-se que a mucosa nasal seja a porta de entrada mais importante para a infecção com *M. leprae*. Tendo em vista o longo período de incubação da hanseníase, o completo entendimento sobre sua transmissão é um capítulo ainda não totalmente elucidado. Assim, hoje é mundialmente aceito pelos hansenologistas que o bacilo de Hansen é transmitido predominantemente a partir das vias aéreas superiores de um paciente multibacilar não tratado para um indivíduo suscetível com quem mantém contato próximo. No entanto, vale à pena ressaltar que pacientes paucibacilares eventualmente podem apresentar uma carga bacilar alta o suficiente para viabilizar a transmissão (Martinez *et al.*, 2010). Contudo, o simples fato do indivíduo se infectar não significa que o mesmo irá progredir para a doença ativa.

1.5- Suscetibilidade genética

M. leprae é um microrganismo com alta infectividade e baixa patogenicidade, ou seja, muitas pessoas são infectadas, mas poucas desenvolvem a doença. Embora muitos genes candidatos para suscetibilidade à infecção por *M. leprae* estejam sendo estudados, ainda não se sabe muito sobre a predisposição genética para a ocorrência da doença.

Nas últimas décadas, com o sequenciamento do genoma humano, o avanço da genômica e de tecnologias robustas de sequenciamento, foi possível identificar uma série de polimorfismos genéticos com diferentes características e em diferentes genes. Desta forma, estudos de associação começaram a ser realizados com hanseníase; inicialmente relacionando os polimorfismos genéticos com os desfechos de suscetibilidade e proteção à ocorrência da doença ativa; posteriormente, outros desfechos como suscetibilidade e a ocorrência de reações hansênicas ligadas com a severidade da doença (Roy *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2000; 2002; Moraes *et al.*, 2004; Malhotra *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2010; Grant *et al.*, 2012). Todos estes estudos, no âmbito da imunogenética, foram desenvolvidos seguindo a

estratégia de genes candidatos, onde pequenas variações estruturais podem gerar alterações funcionais que interferem na defesa do organismo contra *M. leprae*. Com o avanço dos estudos ao longo dos anos, novos modelos como a avaliação de famílias e, mais recentemente, os estudos pangenômicos de associação ou GWAS (do inglês, Genome wide association study) têm permitido a identificação de genes supostamente relacionados ao desfecho de interesse (Marquet&Schurr, 2001).

A importância da genética, entretanto, continua a se evidenciar para desfechos não ligados ao adoecimento em si. A identificação de marcadores genéticos, principalmente os polimorfismos de base única (SNPs) em genes que codificam para enzimas envolvidas na biotransformação de fármacos e xenobióticos tem representado um campo altamente explorado (farmacogenética/genômica) e com aplicabilidade direta nas condutas terapêuticas empregadas para diferentes doenças (Matsumoto *et. al.*, 2014)**1.6**

1.6- Epidemiologia

De acordo com o boletim da WHO em 2015 foram detectados 210.758 casos novos de hanseníase no mundo, representando um coeficiente anual de detecção de 3,2 casos novos/100 mil habitantes (Figura 1.1). Neste cenário, a Índia figura mundialmente como o país com maior número absoluto de casos novos, 127.326, seguida pelo Brasil, que ocupou a segunda posição com 26.395 casos novos (WHO, 2016), sendo o país o primeiro da América Latina (Ministério da Saúde, 2015)(Figura 1.2).

Torna-se importante ressaltar que em 2007, o Ministério da Saúde do Brasil deixou de utilizar o coeficiente de prevalência pontual como indicador de monitoramento da hanseníase, substituindo-o pelos coeficientes de detecção de casos novos e detecção em menores de 15 anos (Ministério da Saúde, 2007). O coeficiente de detecção em menores de 15 anos é prioridade da política atual de controle da hanseníase no país, pois indica focos de infecção ativos e transmissão recente; desta forma, tornou-se uma das metas estabelecidas no Programa de Aceleração do Crescimento (PAC) (Ministério da Saúde, 2010).

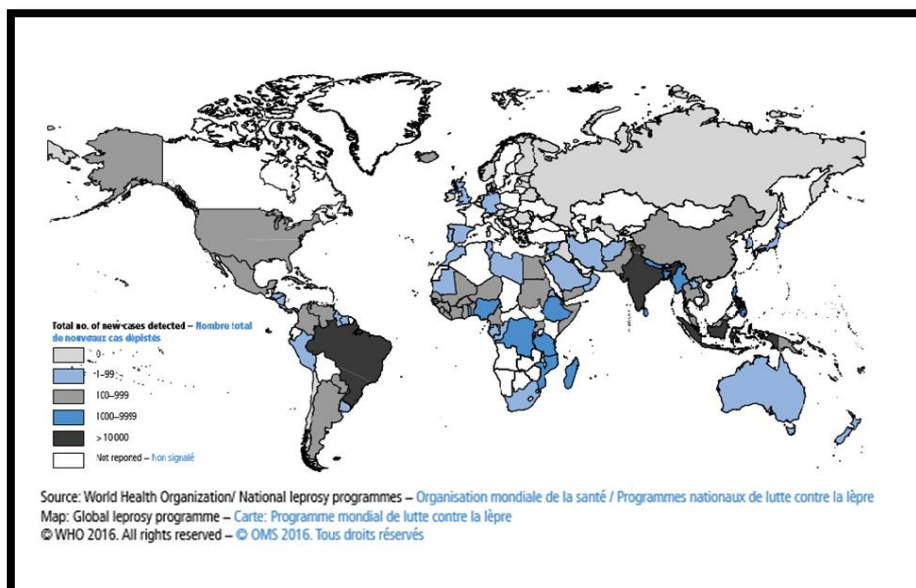


Figura 1.1: Distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase em 2015. Em preto estão áreas com mais de 10.000 novos casos. Em azul escuro estão áreas que tiveram entre 1.000 e 9.999 novos casos. Em cinza estão representadas as regiões que tiveram entre 100 e 999. As regiões em azul claro tiveram até 99 casos e as regiões brancas não apresentaram reportaram dados em 2015. **Fonte:** Weekly epidemiological record, WHO 2016

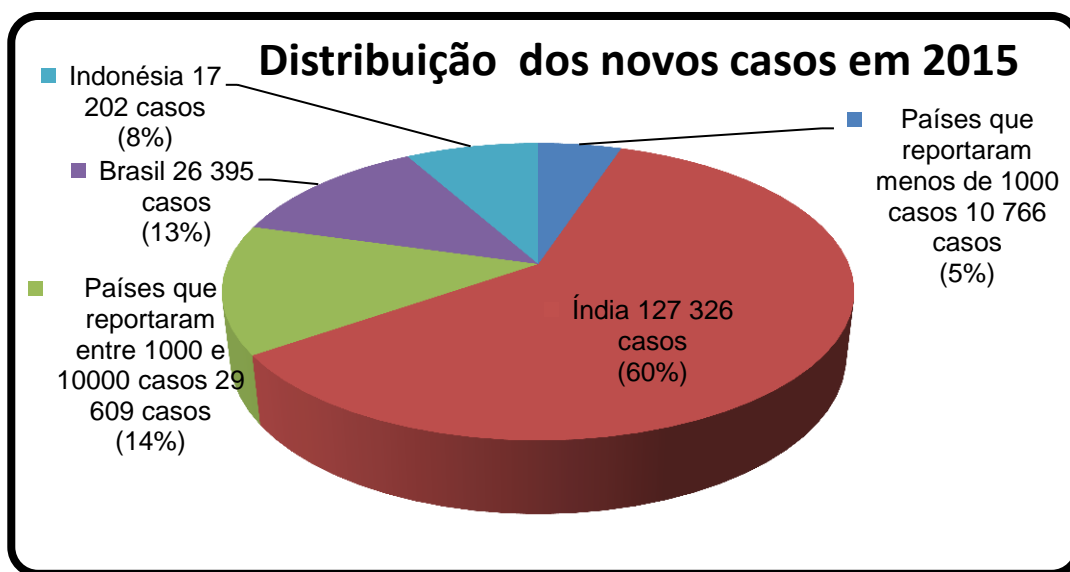


Figura 1.2: Distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase por países ou grupos de países. Índia e Brasil ocupam a primeira e segunda posição, respectivamente, somando 73% dos casos novos. Onze países reportaram entre 1000 e 10 000 casos e 92 reportaram menos de 1000 casos de hanseníase em 2015. **Fonte:** Adaptado de Weekly epidemiological record, WHO 2016

A realidade mostra, no entanto, que ao mesmo tempo em que os coeficientes de prevalência vêm diminuindo, as taxas de detecção, que indicam

a endemicidade, continuam elevadas em virtude da continuidade da transmissão da doença (12,1 por 100 mil habitantes em 2014), ou ainda pela detecção tardia dos casos em menores de 15 anos (1.793 novos casos em 2014) (Rodrigues *et al.*, 2015).

A WHO recolhe anualmente informações dos programas nacionais sobre a prevalência, novos casos detectados e conclusão do tratamento. Em 2015 foram avaliados o total de casos, os casos MB, os casos em mulheres, crianças e com incapacidades de grau dois em 136 países (28 países africanos, 23 países americanos, 20 países do oriente médio, 28 países europeus, 11 países asiáticos e 26 países da região do pacífico). A região asiática corresponde a 74% e a região americana a 14% desses novos casos. A Tabela 1.1 mostra a tendência da detecção desses novos casos nessas regiões nos últimos 10 anos.

A proporção de casos MB indica a presença de casos avançados e conseqüentemente a magnitude da infecção na comunidade. Dados da WHO indicam que, dos pacientes diagnosticados em 2015, 60,2% (n=126.783) são MB. A proporção de mulheres afetadas pela doença foi analisada para avaliar o acesso ao tratamento, uma vez que estas são as que mais procuram o serviço de saúde, e a possível discriminação de mulheres com hanseníase em alguns países. A porcentagem mundial de novos casos em mulheres foi de 38,8% (n=81.860). A detecção em crianças indica a continuidade da transmissão da doença dentro da comunidade. Esse número chegou a 8,9% (n=18.796). A porcentagem de novos casos com incapacidade grau dois foi de 6,7% (n=14.059). Este dado reflete a demora no diagnóstico da doença (Tabela 1.2).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2014, o Brasil apresentava o maior coeficiente de detecção entre os países endêmicos. Dentre os casos diagnosticados no ano, 45,4% ocorreram em mulheres, 7,5% em menores de 15 anos de idade e 6,5% foram diagnosticados tardiamente, com incapacidades físicas instaladas (WHO, 2015). Entre os estados brasileiros existem consideráveis diferenças nos coeficientes de detecção, sendo que no ano de 2015 variaram de 1,08 novos casos /100 mil hab no Rio Grande do Sul a 93 novos casos/100 mil hab. no Mato Grosso (Brasil, 2016a)

Tabela 1.1: Novos casos detectados nos últimos 10 anos em países com mais de 1000 casos por ano.

Região da OMS	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
África	34 480	34 468	29 814	28 395	25 345	20 213	20 599	20 911	18 597	20 004
América	47 612	42 135	41 891	40 474	37 740	36 832	36 178	33 084	33 789	28 806
Mediterrânea Oriental	3 261	4 091	3 938	4 029	4 080	4 357	4 235	1 680	2 342	2 167
Sudeste da Ásia	174 118	171 576	167 505	166 115	156 254	160 132	166 445	155 385	154 834	156 118
Pacífico Ocidental	6 190	5 863	5 859	5 243	5 055	5 092	5 400	4 596	4 337	3 645
Europa										18
Total	265 661	258 133	249 007	244 796	228 474	226 626	232 857	215 656	213 899	210 758

Fonte: Adaptado de Weekly epidemiological record, WHO 2016

Tabela 1.2: Perfil epidemiológico dos novos casos de hanseníase reportados em 2015 em países com mais de 100 novos casos.

Região da OMS	% de casos multibacilares	% de mulheres	% de crianças	% casos com grau 2 de incapacidade
África	Senegal: 94.76% Comores: 47.52%	Burkina Faso: 49.20% Senegal: 25.00%	Comores: 38.19% Niger: 0.79%	Burkina Faso: 31.02% Mali: 3.15%
América	Argentina: 91.03% Estados Unidos: 55.06%	Cuba: 48.79% Venezuela: 32.59%	Rep. Dominicana: 12.32% Argentina: 1.72%	Colômbia: 16.91% Venezuela: 2.90%
Mediterrânea Oriental	Egito: 90.74% Paquistão: 74.44%	Paquistão: 48.21% Sudão: 33.33%	Somália: 8.41% Sudão: 3.37%	Somália: 42.06% Egito: 7.72%
Sudeste da Ásia	Indonésia-84.55% Bangladesh-43.03%	Siri Lanka-49.92% Timor Leste-22.52%	Siri Lanka: 11.28% Myanmar: 3.83%	Myanmar: 13.61% Nepal: 4.33%
Pacífico Ocidental	Filipinas- 92.21% Kiribati- 27.78%	Kiribati 54.44% Micronésia 27.44%	Nova Guiné: 30.41% Vietnã: 2.81%	China 18.58% Micronésia: 1.83%

Fonte: Adaptado de Weekly epidemiological record, WHO 2016

1.7- Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente baseado no exame clínico, com a avaliação de sinais e de sintomas detectados na pele. Através dessa análise, busca-se a identificação de lesões ou áreas com alteração de sensibilidade e/ou comprometimento de nervos periféricos (sensitivos, motores e/ou autonômicos) como espessamento, perda de sensibilidade e força muscular (Ministério da Saúde, 2009). Além disso, exames laboratoriais complementares como a baciloscopia e o exame histopatológico realizado na biópsia cutânea da lesão suspeita ou do nervo acometido (Ministério da Saúde, 2002) também são realizados.

O exame histopatológico é útil no diagnóstico da hanseníase, na classificação das formas clínicas e na caracterização dos estados reacionais. Esse evidencia os bacilos e a morfologia do tecido de biópsias de pele e nervos sensitivos de pacientes, permitindo a identificação de características essenciais

das lesões hansênicas (Antunes *et al.*, 2012). O índice baciloscópico (IB) representa a escala logarítmica com avaliação quantitativa dos bacilos por campo e é um exame importante no diagnóstico, pois é de fácil execução e de baixo custo. Nas formas multibacilares, a baciloscopia geralmente é positiva, auxiliando o diagnóstico definitivo da doença. Nas formas paucibacilares ela é negativa, porém não exclui o diagnóstico da hanseníase, mas auxilia na escolha terapêutica adequada.

1.8- Tratamento

O tratamento da hanseníase se baseia em esquema de poliquimioterapia (PQT/WHO) de acordo com a classificação clínica do paciente (WHO, 1982). Atualmente, envolve a combinação de três fármacos, rifampicina, clofazimina e dapsona. A dapsona (4,4'-diamino-difenil-sulfona – DDS) produz um efeito bacteriostático contra o *M. leprae* enquanto a rifampicina e a combinação de dapsona com clofazimina produzem um efeito bactericida. O esquema da PQT/WHO para pacientes adultos multibacilares consiste de rifampicina 600mg/mês (dois comprimidos de 300mg) + clofazimina 300mg/mês (dose supervisionada) e 50mg/dia (autoadministradas) associadas à dapsona 100mg/mês (dose supervisionada) e 100mg/dia (autoadministradas) (Figura 1.3). O paciente recebe alta ao concluir 12 doses supervisionadas em até 18 meses. Na 12ª dose o paciente deve ser submetido a exame dermatológico e neurológico para então receber alta por cura.

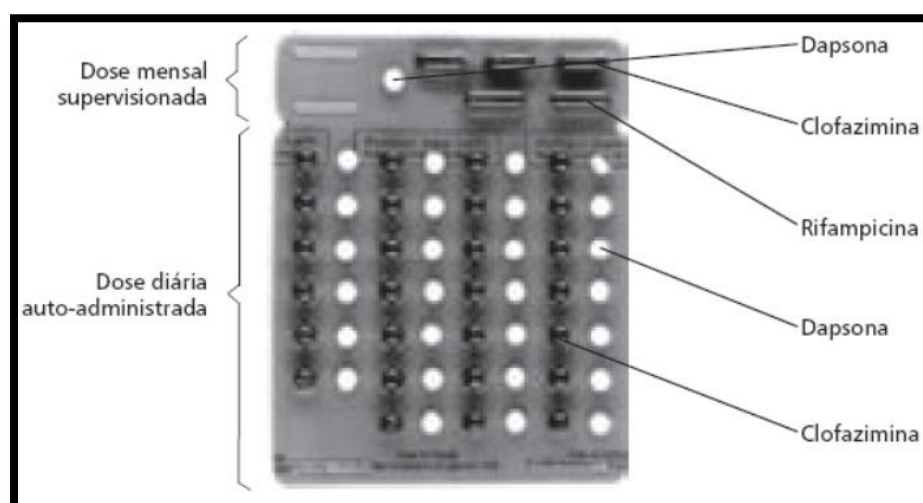


Figura 1.3: Cartela com os medicamentos utilizados no esquema terapêutico de pacientes adultos portadores da forma multibacilar.

Para pacientes adultos paucibacilares, o tratamento consiste de rifampicina 600mg/mês (dose supervisionada) associada à dapsona 100mg/dia (autoadministrada) e 100mg/mês (dose supervisionada) (WHO, 1982b). A duração do tratamento para pacientes paucibacilares é de seis doses supervisionadas administradas em até nove meses. Após este período o paciente deve ser submetido a exames dermatológicos e neurológicos para receber alta por cura (Figura 1.4).

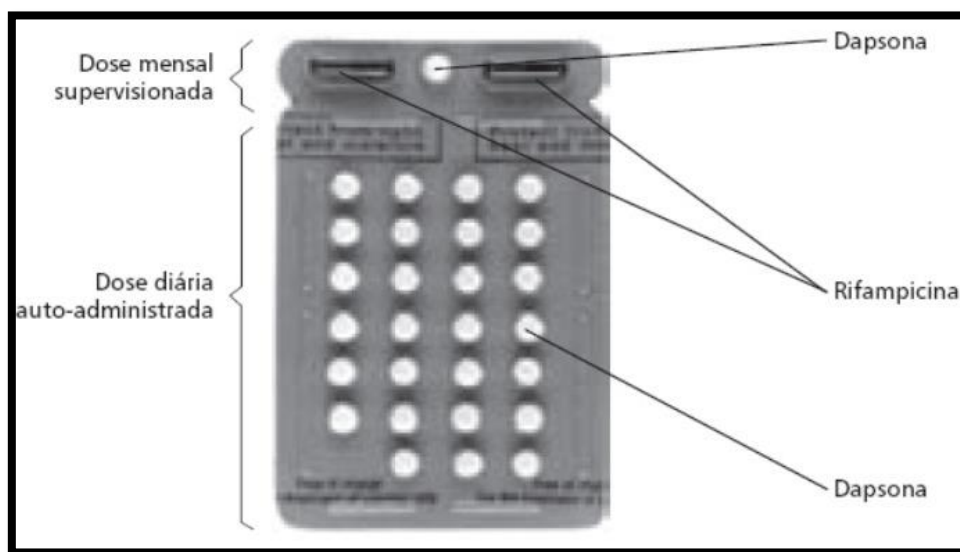


Figura 1.4: Cartela com os medicamentos utilizados no esquema terapêutico de pacientes adultos portadores da forma paucibacilar.

Em crianças ou adultos com peso inferior a 30 kg, as doses dos medicamentos devem ser ajustadas de acordo com o peso conforme indicado na Tabela 1.3.

Tabela 1.3: Tabela com indicação das doses dos fármacos utilizados no tratamento da hanseníase para pacientes com menos de 30 kg.

DOSE MENSAL	DOSE DIÁRIA
Rifampicina (RFM) - 10 a 20mg/kg	-
Dapsona (DDS) - 1,5mg/kg	Dapsona (DDS) - 1,5mg/kg
Clofazimina (CFZ) - 5mg/kg	Clofazimina (CFZ) - 1mg/kg

Nos casos de crianças MB, o tratamento consiste em rifampicina 450mg/mês (dose supervisionada) + dapsona 50mg/mês (dose supervisionada)

e 50mg/dia (autoadministrada) + clofazimina 150mg/mês (dose supervisionada) e 50mg em dias alternados (Figura1.5).

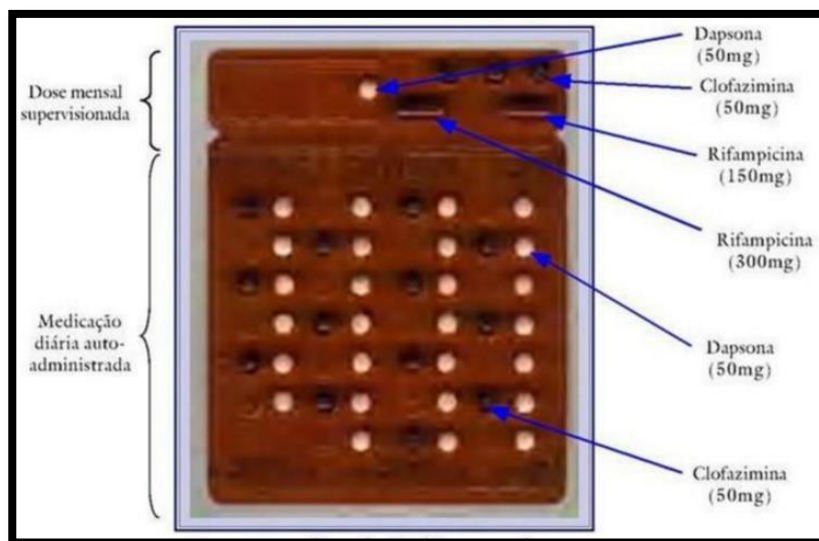


Figura 1.5 Cartela com os fármacos utilizados no esquema terapêutico de crianças portadoras da forma multibacilar.

Para casos de crianças PB, são administradas seis doses compostas de rifampicina 450mg/mês (dose supervisionada) + dapsona 50mg/mês (dose supervisionada) e 50mg/dia autoadministrada (Figura 1.6).

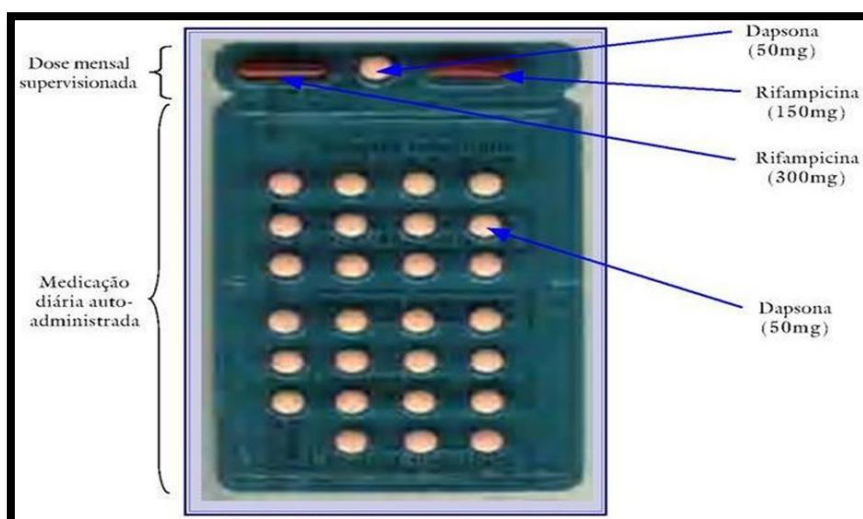


Figura 1.6: Cartela com os fármacos utilizados no esquema terapêutico de crianças portadoras da forma paucibacilar.

Como já mencionado, não existe um critério de cura atribuído ao tratamento da hanseníase. Desta forma, o paciente que completa o tratamento

recebe alta por cura e sai do registro de casos ativos de hanseníase, não sendo mais considerado um caso mesmo que ainda permaneça com alguma seqüela da doença. Todavia pacientes MB ainda apresentam bacilos (não viáveis) no organismo que são eliminados lentamente.

1.8.1-Tratamento alternativo

Esquemas terapêuticos alternativos são utilizados quando o paciente é impossibilitado de fazer uso de algum componente da PQT/WHO seja por causa das ADRs, de outras doenças, ou porque está infectado por cepas de *M.leprae* resistentes a rifampicina ou a dapsona. As Tabelas 1.4, 1.5 e 1.6 mostram os esquemas terapêuticos alternativos para pacientes impossibilitados de receber dapsona, rifampicina e clofazimina respectivamente (Ministério da Saúde, 2009).

Os esquemas alternativos são disponibilizados apenas nos serviços de referência municipais, regionais, estaduais ou nacionais. Já os critérios de alta bem como a duração do tratamento seguem o mesmo padrão utilizado para o tratamento convencional.

Tabela 1.4: Esquema terapêutico para pacientes impossibilitados de receber dapsona.

Classificação		Paucibacilares
Medicamento		
Rifampicina		Dose mensal de 600mg
Clofazimina		Dose mensal de 300mg e doses diárias de 50mg
Classificação		Multibacilares
Medicamento		
Rifampicina		Dose mensal de 600mg
Clofazimina		Dose mensal de 300mg e doses diárias de 50mg
Ofloxacina		Dose mensal de 400mg e doses diárias de 400mg
Ou		ou
Minociclina		Dose mensal de 100mg e doses diárias de 100mg

Tabela 1.5: Esquema terapêutico para pacientes impossibilitados de receber rifampicina.

Classificação	Paucibacilares
Medicamento	
Dapsona	Dose mensal de 100mg e doses diárias de 100mg
Ofloxacina	Dose mensal de 400mg
Ou	Ou
Minociclina	Dose mensal de 100mg e doses diárias de 100mg

Classificação	Multibacilares
Medicamento	
Dapsona	Dose mensal de 100mg e doses diárias de 100mg
Clofazimina	Dose mensal de 300mg e doses diárias de 50mg
Ofloxacina	Dose mensal de 400mg e doses diárias de 400mg
Ou	Ou
Minociclina	Dose mensal de 100mg e doses diárias de 100mg

Tabela 1.6: Esquema terapêutico para pacientes impossibilitados de receber clofazimina

Classificação	Multibacilares
Medicamento	
Dapsona	Dose mensal de 100mg e doses diárias de 100mg
Rifampicina	Dose mensal de 600mg
Ofloxacina	Dose mensal de 400mg e doses diárias de 400mg
Ou	Ou
Minociclina	Dose mensal de 100mg e doses diárias de 100mg

1.9- Metabolização e mecanismo de ação dos fármacos do esquema PQT/WHO

A dapsona administrada por via oral é quase que completamente absorvida pelo organismo através da metabolização pela enzima N-acetiltransferase2 (NAT2) e por enzimas do complexo citocromo P450 (CYP). O mecanismo de ação da dapsona consiste na competição com o ácido paraminobenzóico, o que impede a formação do ácido fólico da bactéria. Apesar de ser considerado um fármaco seguro nas dosagens indicadas pela WHO, diversos efeitos colaterais têm sido atribuídos a dapsona, sendo um dos mais comuns a anemia hemolítica. A doença é agravada em pacientes que possuem deficiência na enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD).

A rifampicina é um fármaco semissintético, derivado do piperazínico da Rifampicina SV extraída do *Streptomyces mediterranei*, de amplo espectro e considerado o mais importante da terapia anti-hansênica. O fármaco é rapidamente absorvido e seu mecanismo de ação consiste na inibição da RNA polimerase dependente de DNA de *M. leprae*. Apesar de ser considerado um medicamento seguro pela WHO diversos autores relatam efeitos colaterais atribuídos a rifampicina, tais como: erupções cutâneas, hepatite entre outros (Girling, 1977). Na maioria dos casos estes feitos ocorrem quando o fármaco é administrado de maneira intermitente.

A clofazimina (Lampren, B663) foi originalmente sintetizada em 1954. Seu mecanismo de ação não é muito bem conhecido, porém acredita-se que interaja diretamente com o DNA bacteriano (Jopling, 1985). O fármaco é mais ativo quando administrada diariamente e quase não apresenta efeitos colaterais (WHO, 2003). Trata-se de um corante rimino-fenazínico administrado em doses de 50mg diárias e 300mg mensais supervisionadas apenas para os pacientes portadores da forma MB. A clofazimina apresenta ação bacteriostática e anti-inflamatória. Ainda não se tem registros de resistência à clofazimina e dentre os efeitos colaterais destaca-se a coloração cinza-azulado que ela provoca na pele.

1.10- Metabolização da Dapsona e as reações adversas

A combinação medicamentosa da PQT/WHO normalmente é eficaz no tratamento da hanseníase, contudo, a ocorrência de reações adversas (ADRs) induzida por fármacos tem se tornado muito frequente, sendo a dapsona a principal responsável (70,7%) (Jopling 1983; 1985). A dapsona foi o primeiro quimioterápico a ser utilizado no tratamento da hanseníase. Até os dias atuais é um dos componentes do esquema de tratamento em virtude de seu baixo custo e eficácia, pois a dose diária de 100mg proporciona níveis séricos 500 vezes superiores à concentração inibitória mínima (Baohong *et al.*, 1996). Em relação aos efeitos colaterais, embora todos os três fármacos utilizados no tratamento da hanseníase induzam algum tipo de reação adversa, as ADRs mais comumente atribuídas a dapsona são: anemia hemolítica, meta-hemoglobinemia, eritrodermia, síndrome de hipersensibilidade à dapsona, fotodermatite, agranulocitose, hepatite e neuropatia periférica, as quais

precisam ser monitoradas e tratadas, muitas vezes com interrupção do uso da dapsona e adoção de esquemas alternativos.

O uso cada vez mais intenso da dapsona seja em esquema de monoterapia ou no regime de poliquimioterapia, não somente no tratamento da hanseníase, mas também no tratamento de outras doenças como malária, policondrite, lúpus eritromatoso entre outras aumentou a preocupação no que se refere a sua associação à ocorrência de reações adversas. Na hanseníase, mais especificamente, dentre as ADRs induzidas pela dapsona, a anemia hemolítica (AH) merece destaque, pois acarreta sérios efeitos, principalmente em crianças, idosos e pessoas com deficiência da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD). A Anemia Hemolítica Hereditária compreende um grupo de distúrbios nos quais as hemácias de seus portadores apresentam um fenômeno conhecido como “hemólise”, que acarreta o rompimento prematuro destas, ocorrendo assim, um quadro de anemia. A hemácia atua carregando o oxigênio, que é o principal combustível para os órgãos e tecidos, através da hemoglobina, que é uma proteína rica em ferro. O oxigênio é captado pela hemoglobina quando ela passa pelos pulmões e é distribuído para diferentes órgãos e tecidos no corpo. Quando a quantidade de hemoglobina está baixa, há ocorrência da anemia.

No caso das Anemias Hemolíticas Hereditárias, as hemácias são destruídas (hemolisadas), já que estruturalmente apresentam capacidade de funcionamento inadequada. Embora existam três tipos de Anemias Hemolíticas Hereditárias: a) Esferocitose, b) Eliptocitose e c) Deficiência de G6PD, no presente estudo iremos focar na deficiência de G6PD.

Os principais mecanismos de metabolização da dapsona são a acetilação e a hidroxilação, mediados pela enzima N-acetiltransferase2 (NAT2) e pelas enzimas do citocromo P450, respectivamente. A acetilação ocorre no fígado e na mucosa jejunal. Neste processo um grupamento amino da dapsona é acetilado formando o monoacetildapsona (MADDS). O processo de desacetilação da MADDS também pode ocorrer, o que gera (ou forma) DDS. Existe um equilíbrio entre os processos de acetilação e de desacetilação que é alcançado após algumas horas de administração oral de DDS (Gelber *et al.*, 1971). Estudos genéticos já demonstraram que existe uma variação interindividual na velocidade de acetilação da dapsona, com a excreção do

fármaco e seus metabólitos tóxicos do organismo, produzidos no processo de metabolização. Assim, o fenótipo de acetilação, caracterizado a partir dos genótipos de *NAT2* está diretamente relacionado com a resposta terapêutica do paciente tratado com esquemas contendo dapsona (Guo *et al.*, 1996; Bluhm *et al.*, 1999).

No processo de hidroxilação, compostos como a dapsona hidroxilamina (DDS-NOH) e monoacetildapsona-hidroxilamina (MADDS-NOH), formados durante a participação destas enzimas na metabolização da dapsona, são apontados como responsáveis pelas ADRs hematológicas. Esses metabólitos são altamente oxidantes e podem levar a alterações estruturais na membrana dos eritrócitos. Os pacientes portadores de deficiência no gene G6PD são mais suscetíveis a este tipo de ADR, pois nestes o sistema de defesa contra o *stress* (estresse) oxidativo é bastante reduzido.

Deps e colaboradores (2007), demonstraram em estudo realizado no estado do Espírito Santo, que aproximadamente 44% dos pacientes submetidos à PQT para o tratamento da hanseníase apresentaram ADRs atribuídas a dapsona. Deste total, 54% tiveram que interromper o uso do fármaco (Deps *et al.*, 2007). Dados mais alarmantes, entretanto, foram reportados por Goulart e colaboradores em 2002. Neste estudo, realizado no estado de Minas Gerais, os autores mostraram que o percentual de ADRs atribuídas a dapsona pode chegar a 80%, sendo que 18,8% destes pacientes tiveram anemia hemolítica. (Goulart *et al.*, 2002).

1.11- A ciência da Farmacogenética

Muitos pacientes não respondem da maneira esperada ao tratamento com determinados medicamentos, o que ocasiona desfechos desfavoráveis como ADRs. As ADRs são causas comuns de hospitalização, geram um alto custo para a sociedade e prejuízos sócio econômicos e emocionais para o paciente. Dentre os custos estão as despesas com o tratamento da doença causada pelas ADRs e as despesas para evitar que esses efeitos colaterais ocorram durante a administração do fármaco (Neto *et al.*, 2006). A ocorrência de ADRs graves e fatais tem sido extensivamente analisada em pacientes hospitalizados. Uma meta-análise com aproximadamente 40 estudos

prospectivos em hospitais dos Estados Unidos da América (EUA) sugere que 6-7% dos pacientes internados sofrem de ADRs graves, sendo que 0,32% apresentam ADRs fatais (Hugét *al.*, 2003). Isso resulta em aproximadamente 100.000 mortes por ano nos EUA e um custo anual de mais de 100 bilhões de dólares para a sociedade norte-americana. Este valor está associado ao maior tempo de hospitalização do paciente, o que conseqüentemente resulta numa redução da produtividade do indivíduo. Além disso, foi estimado que as ADRs são responsáveis por mais de 7% das internações nos hospitais do Reino Unido e 13% das admissões em clínicas médicas na Suécia. Esses números demonstram que as ADRs constituem um problema ainda maior do que se pensava no contexto da quimioterapia e do desenvolvimento de novos fármacos.

Amplas evidências suportam o conceito de que variações genéticas inter-étnicas podem influenciar, pelo menos em parte, na variabilidade da resposta (farmacológica ou toxicológica) aos fármacos, na suscetibilidade a algumas doenças, na incidência de efeitos adversos e nas interações medicamentosas. Em alguns casos, fatores genéticos são responsáveis por 20-40% da variação interindividual de resposta aos fármacos (Ingelman-Sundberg, 2001).

A ocorrência de mutações é um processo recorrente na evolução, podendo ocorrer de maneira natural através de erros no processo de replicação do DNA. Mutações na sequência de DNA que ocorrem com frequências igual ou superior a 1% e são passadas para a geração subsequente são chamadas de polimorfismos. Dentre os três principais tipos de polimorfismos estão VNTRs (do Inglês: *Variable Number of Tandem Repeats*), Indels (inserções/deleções de bases) e SNPs (do Inglês: *Single Nucleotide Polymorphisms*). Estes últimos são os mais amplamente estudados pela farmacogenética (Crettolet *al.*, 2010).

Os polimorfismos presentes nos genes que codificam para enzimas metabolizadoras de fármacos desempenham um papel fundamental no desfecho final das mesmas, principalmente em relação à má absorção, à biotransformação ou ainda à excreção. A ciência da farmacogenética visa otimizar a eficácia do tratamento, combinando as informações genéticas do indivíduo com a sua possível resposta ao uso de um determinado fármaco. Desta forma, é possível compreender as alterações na eficácia do tratamento,

as interações fármaco-fármaco e o risco relativo de ADRs. Essa ciência analisa polimorfismos genéticos, principalmente em genes que codificam para receptores, transportadores e metabolizadores de fármacos, com o objetivo de identificar pacientes ou grupos de pacientes em populações para os quais poderiam ser feitos ajustes no tratamento com o intuito de melhorar a segurança e a eficácia do mesmo.

1.12- A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) – Atividade Biológica

A G6PD é uma enzima citoplasmática, expressa em todos os tecidos e essencial à sobrevivência das células, pois impede o estresse oxidativo. É responsável por catalisar a primeira etapa do ciclo das pentoses (produzindo NADPH) que é uma das vias alternativas no processo de obtenção de energia pela célula e crucial para a proteção das hemácias contra o processo oxidativo (Figura 1.7). A oxidação pode lesar estruturas vitais nos glóbulos vermelhos, como a hemoglobina. A transformação da hemoglobina da forma reduzida para a forma oxidada gera obstáculos na circulação e no transporte de oxigênio, além de facilitar a fragmentação da célula nesse processo. Fosfato de nicotinamida adenínico reduzido (NADPH) é um doador de elétrons (co-factor) para muitas reações biossintéticas e o responsável pela manutenção do equilíbrio intracelular, entre a glutathiona reduzida (GSH) e a glutathiona oxidada (GSSG), permitindo a detoxificação das células. Este ciclo é de crucial importância para o eritrócito. Os glóbulos vermelhos contêm concentrações relativamente altas de GSH, que atua como um agente redutor intracelular protegendo a célula contra os danos das substâncias oxidativas, tais como: radicais de oxigênio e o peróxido de hidrogênio. Estas substâncias são formadas no interior dos eritrócitos como consequência das reações de oxidação da hemoglobina, podendo também ser produzidas através de fatores exógenos como: fármacos e infecções (Gladeret *al.*, 2010).

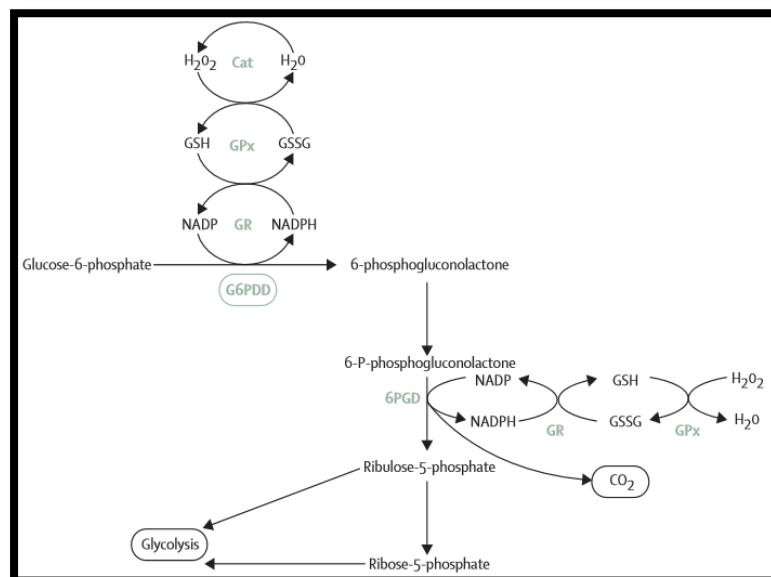


Figura 1.7: Ciclo das pentoses. Nesta via ocorre a produção de NADPH através da ação da G6PD. O NADPH servirá de doador de elétrons para a regeneração da glutatona reduzida que é responsável em proteger a célula do stress oxidativo. **Fonte:** Cappellini & Fiorelli, 2008

O gene da G6PD clonado em 1986 está localizado na região telomérica do braço longo do cromossomo X (banda Xq28). Possui 13 éxons (que codificam um total de 515 aminoácidos) e 12 introns, distribuídos por cerca de 20Kb de DNA genômico (Cappellini&Fiorelli, 2008). A clonagem e o sequenciamento do gene humano permitiram a identificação de mais de 140 mutações, sobretudo pontuais, das quais muitas resultam na deficiência da enzima (Figura. 1.8). Todavia, extensas mutações deletérias no gene *G6PD* ou de mutações que provoquem alteração na matriz de leitura (frameshift mutations) (Vulliamy *et al.*, 1998) não foram identificadas, o que sugere que a ausência completa de G6PD pode ser letal.

As hemácias não realizam o ciclo de Krebs, portanto se a G6PD for deficiente haverá um comprometimento na obtenção de NADPH. Desta forma, a integridade celular será perturbada, o que pode ocasionar a anemia hemolítica não esferocítica e o aumento dos níveis de meta-hemoglobina.

Os sintomas da deficiência aparecem devido à ruptura das hemácias, que é induzida pela presença de agentes oxidantes que podem ser endógenos ou exógenos. Atualmente 180 variantes genéticas da G6PD (Minucci *et al.*, 2012) que se diferenciam por suas características cinéticas, mobilidade eletroforética e especificidade de substrato já foram descritas. Contudo, metade destas variantes é imperceptível clinicamente porque a atividade enzimática é normal ou pouco deficiente. Cerca de 20 destas têm como efeito a atividade

enzimática deficiente e estão associadas à anemia hemolítica não esferocítica crônica constitucional e o restante, mesmo com a baixa atividade enzimática, está associada à hemólise quando a pessoa que a possui é exposta aos fatores que desencadeiam esse processo, como por exemplo determinados fármacos.

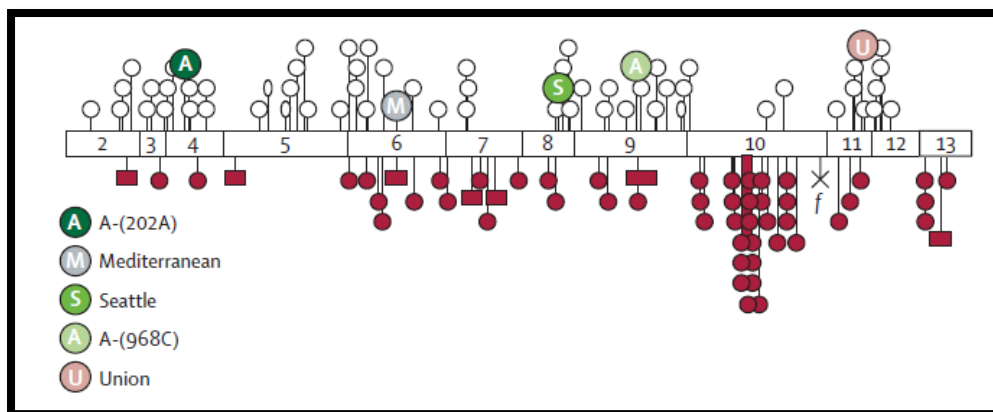


Figura: 1.8: Representação do gene G6PD com suas principais mutações. Os círculos vermelhos representam mutações esporádicas que originam variantes de classe I (severas). Círculos em branco representam mutações que ocasionam varias das classes II e III. As elipses representam mutações que originam variantes classe IV. Os quadrados vermelhos representam pequenas deleções. *f* representa uma mutação no sitio de splicing. **Fonte:** Cappellini & Fiorelli, 2008

A WHO classifica as variantes enzimáticas em cinco classes distintas baseadas na manifestação clínica individual e no nível de atividade enzimática medida nas hemácias. As variantes agrupadas na classe I são as que apresentam o fenótipo mais severo, tendo a anemia hemolítica não esferocítica crônica, ou seja, apresentam quadro de hemólise sem interferência de nenhum fator externo ou interno. Normalmente as variantes dessa classe apresentam menos de 10% da atividade enzimática normal, no entanto, estas são mais raras e ocorrem em frequências muito baixas ao redor do mundo. As variantes agrupadas na classe II têm menos de 10 % da atividade enzimática, porém não estão associadas com a anemia hemolítica não esferocítica crônica (CNSHA). As variantes de classe III têm entre 10 e 60 % da atividade enzimática e também não estão relacionadas com a CNSHA (Tabela 1.7). Apesar das variantes de classe II e III muitas vezes serem assintomáticas elas são importantes clinicamente, uma vez que seus portadores podem desenvolver a anemia hemolítica aguda induzida por fármacos como, por exemplo, primaquine e dapsona. As variantes de classe IV apresentam atividade enzimática normal, superior a 60% e as de classe V apresentam uma atividade

superior à atividade normal, porém esse fenótipo só foi descrito uma vez (Relling *et al.*,2014).

Tabela 1.7:Classificação das variantes de G6PD segundo a WHO de acordo com o fenótipo e os níveis de atividade enzimática

Classe da WHO	Atividade Enzimática	Fenótipo	Exemplos de variantes
I	Deficiência Severa	Anemia hemolítica não esferocítica crônica	Volendam (C514T) A- ^{542T/376G} , Mediterrânea
II	<10%- deficiência severa	Risco de anemia hemolítica aguda	(C563T), Canton (G1376T)
III	10-60% deficiência moderada	Risco de anemia hemolítica aguda	A (A376G), Asahi (G202A), A- ^{202A/376G} , A- ^{680T/376G} , A- ^{968C/376G}
IV	60-150% atividade normal	Sem manifestações clínicas	São Borja (G337A)
V	>150% atividade aprimorada	-	Hektoen

1.12.1- Deficiência de G6PD

A deficiência de G6PD foi descoberta na década de 50, quando alguns soldados americanos desenvolveram anemia hemolítica aguda ao serem tratados com primaquine (8-amino-6-metometoxquinoline), um fármaco antimalárico (Carson *et al.*, 1956). Trata-se da enzimopatia mais comum nos humanos, estima-se que cerca de 400 milhões de pessoas em todo o mundo são portadoras de, pelo menos, uma mutação responsável pela reduzida atividade enzimática (Hedrick, 2011). Na África subsaariana existem três variantes que apresentam frequências polimórficas: G6PD B, G6PD A, G6PD A- (Galiano *et al.*, 1990; May *et al.*, 2000), dentre as quais a variante G6PD A- é a mais comum e está relacionada com as manifestações esporádicas de anemia hemolítica (May *et al.*, 2000;). A prevalência desta enzimopatia varia entre 5% a 25% em áreas de elevada endemicidade como a África, o Oriente Médio, a Ásia, o Mediterrâneo e a Papua Nova Guiné; incidências entre 0,5% e 6,9% foram descritas nas Américas do Norte e do Sul, respectivamente (Figura 1.9).

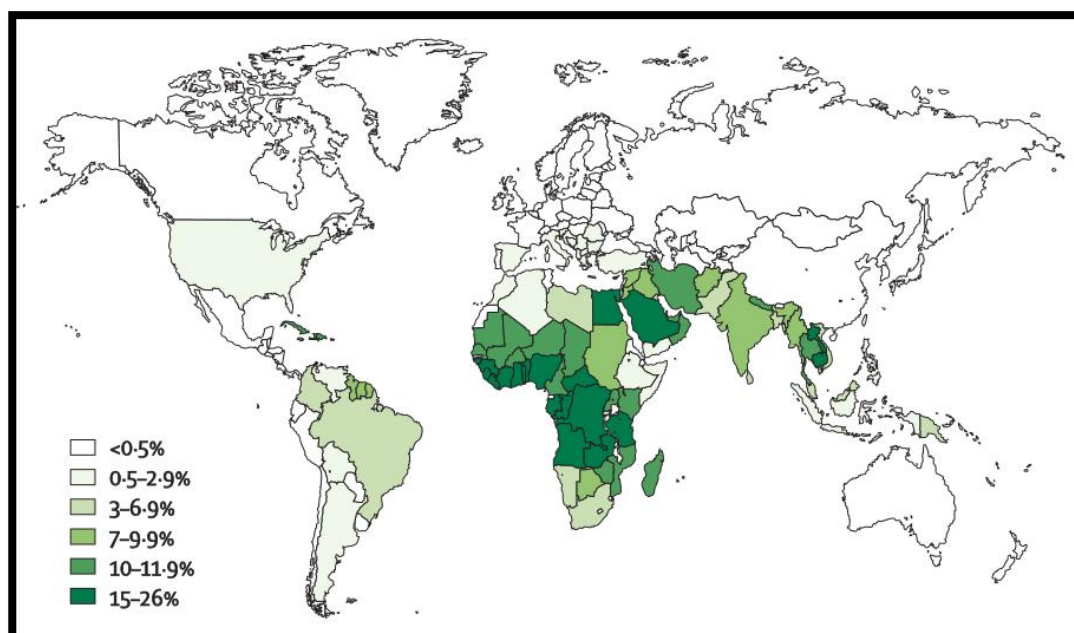


Figura 1.9: Distribuição geográfica da deficiência de G6PD ao redor do mundo. **Fonte:** Cappellini & Fiorelli, 2008

Essa enzimopatia é causada por mutações no gene *G6PD*, localizado no cromossomo X. A expressão fenotípica é mais frequente em homens hemizigotos e mulheres homocigotas e têm padrão de herança recessiva ligado ao sexo. Para que ocorra a expressão total dos seus efeitos adversos, a mutação nos cromossomos não deve ser antagonizada por um cromossomo X normal, por isso o homem expressa com maior intensidade a deficiência por ser sempre hemizigoto. Na mulher, a expressão da doença também pode ocorrer desde que os dois cromossomos apresentem genes com mutação.

1.12.2- Diagnóstico de deficiência de G6PD

Rotineiramente o diagnóstico da deficiência de G6PD é realizado através de testes recomendados pela OMS, baseados principalmente na geração de NADPH a partir de NADP^+ (Betke *et al.*, 1979; WHO,1989). Basicamente existem os testes semiquantitativos e quantitativos. Os testes semiquantitativos normalmente são testes de triagem realizados em áreas com altas frequências de deficiência em G6PD e endemismo de malária. São testes rápidos, de fácil execução e baixo custo que determinam indiretamente a concentração de

NADPH, através dos níveis de metahemoglobina produzida depois da oxidação do NADPH, ou a estabilidade do GSH. O teste quantitativo é realizado através do ensaio de espectrofotometria no qual a absorvância de uma mistura contendo glicose-6-fosfato e NADP^+ é medida em um comprimento de onda de 340nm e assim se mensura a razão da geração de NADPH. Embora a metodologia da espectrofotometria seja bastante eficiente, alguns problemas podem ocorrer no diagnóstico quando o teste é realizado após episódio de hemólise aguda, em alta contagem de reticulócitos no sangue, em neonatos, e em mulheres que sejam heterozigotas.

O conhecimento da mutação específica do gene *G6PD* é importante para melhor descrever os fenótipos clínicos. Para isso, existem diversas metodologias de diagnósticos moleculares dentre elas a análise do fragmento de restrição (RFLP). O RFLP pode ser acoplado à reação da polimerase em cadeia (PCR) e assim ser um método rápido, válido e confiável de diagnóstico.

Os testes para deficiência em G6PD são recomendados quando ao ser exposto a fármacos oxidantes o paciente desenvolve quadro de hemólise aguda ou quando essa é disparada por infecções ou ingestão de fava. Além disso, o teste também é recomendado para neonatos que desenvolvem um quadro prolongado de icterícia neonatal, e membros de famílias que apresentam casos recorrentes de icterícia, esplenomegalia ou colelitíase. O diagnóstico pode ser feito através da triagem neonatal ampliada (teste do pezinho ampliado), que ainda não é disponível no sistema único de saúde brasileiro (SUS), ou em qualquer etapa da vida do indivíduo.

Uma vez que os indivíduos do sexo masculino são hemizigotos eles só podem ter dois fenótipos para G6PD, ou seja, ou serão deficientes ou terão a expressão normal do gene com enzimas saudáveis. Entretanto, no que diz respeito aos indivíduos do sexo feminino o mesmo não pode ser dito. Mulheres possuem duas cópias do gene *G6PD*, uma em cada cromossomo X, assim sendo elas podem ser homozigotas selvagens, apresentando um fenótipo saudável para G6PD, homozigotas mutantes, com fenótipo de deficiência em G6PD, ou ainda serem heterozigotas com um alelo mutante e um alelo selvagem o que gera o fenótipo variável. Devido à inativação aleatória de um dos cromossomos X (em cada uma das células um dos cromossomos é

inativado, porém células diferentes podem desativar cromossomos diferentes) as mulheres heterozigotas são um mosaico de G6PD mutantes e G6PD selvagem.

1.11.3- Variantes de G6PD

Embora *G6PD* seja um gene bastante polimórfico produzindo enzimas com diversos níveis de atividades enzimáticas, existem algumas variantes que são estudadas com maior frequência, pois são aquelas encontradas em maior abundância em determinadas populações. A distribuição dessas variantes varia de acordo com a região geográfica e com o grupo étnico estudado. Assim, populações mistas podem apresentar diversidade também no que diz respeito à deficiência de G6PD. A seguir uma breve descrição das variantes avaliadas nesta dissertação.

Variante negróide ou A (rs1050829)

Ocorre em indivíduos negros, italianos, judeus, árabes, gregos, orientais e persas. Juntamente com a variante mediterrânea, a variante negróide ou A está comumente associada à deficiência de G6PD. Mesmo que a atividade enzimática dos indivíduos portadores dessa variante seja de 8% a 20% menor do que de uma enzima normal, o risco de hemólise fatal é pequeno. Isso se deve ao fato de que as hemácias perdem a atividade enzimática conforme vão envelhecendo, desta forma, as hemácias mais jovens ainda apresentam atividade suficiente para evitar o efeito hemolítico medicamentoso.

Esta variante corresponde à troca do nucleotídeo adenina (A) para uma guanina (G) na posição 376. Essa mutação resulta na mudança do aminoácido asparagina (Asn) para o aminoácido ácido aspárgico (Asp) na posição 126 da proteína. Esta mutação não está relacionada com a anemia hemolítica (classe III-IV), pois mantém a termo estabilidade e os níveis de atividade enzimática normais. Sua frequência em populações da África Subsaariana é de 0.1 a 0.34.

Haplótipos A⁻

Os haplótipos A⁻ são a combinação da mutação A→G na posição 376 com um segundo SNP. Neste caso, verificou-se que a enzima inicialmente descrita como G6PD A⁻ pode ser dada por três haplótipos diferentes: A^{-202A/376G},

A^{-680T/376G} e A^{-968C/376G}. De acordo com a classificação da OMS as enzimas G6PD A⁻ pertencem a classe III, ou seja, possuem níveis de atividade enzimática entre 10 e 60% do considerado normal e são suscetíveis a anemia hemolítica induzidas por fármacos.

Estas enzimas são mais fáceis de serem encontradas em tetrâmeros do que a G6PD A e a G6PD B (selvagem), o que pode explicar o fato de serem rapidamente inativadas (Babalola *et al.*, 1976). A interação sinérgica das duas mutações próximas entre si no espaço da estrutura tridimensional da enzima provoca o dobramento inadequado da enzima, o que compromete a estabilidade e resulta em uma menor atividade (Gomez *et al.*, 2000).

Variante G6PD A^{-202A/376G}(rs1050828)

Também chamada de Distrito Federal, Matera e Bética, este haplótipo é encontrado em diversos lugares do mundo. Trata-se de uma mutação, com troca de uma guanina por uma adenina na posição 202, o que resulta na alteração do aminoácido metionina (Met) pelo aminoácido valina (Val) na posição 68 da proteína juntamente com uma mutação ocasionada pela variante A. Este haplótipo é encontrado em frequências superiores a 0.24 em populações africanas.

Variante G6PD A^{-680T/376G}(rs 137852328)

Consiste na alteração de uma guanina por uma timina (T) na posição 680, o que resulta na troca de um aminoácido arginina (Arg) pelo aminoácido leucina (Leu) na posição na posição 227 da proteína combinada com a variante A.

Variante G6PD A^{-968C/376G}(rs 76723693)

Trata-se da alteração de uma timina por uma citosina na posição 680, o que resulta na troca do aminoácido leucina pelo aminoácido prolina (Pro) na posição 323 da proteína combinada coma variante A.

Variante Santa Maria (rs5030872)

É caracterizada pela combinação da variante A com a mutação A→T na posição 542, com alteração do aminoácido ácido aspérgico para o aminoácido

valina na posição 181 da proteína. Embora seja uma combinação da Variante A com um segundo SNP, a variante Santa Maria não é considerada um haplótipo do tipo A⁻, pois mesmo causando deficiência de G6PD essa alteração não altera a carga da proteína, que mantém suas propriedades eletroforéticas idênticas as de G6PD A (Beutler *et al.*, 1991; Saenz *et al.*, 1984).

Variante Asahi (rs 1050828)

Essa mutação foi originalmente descrita em meninos japoneses que desenvolveram icterícia, anemia e que tinham sido previamente diagnosticados com icterícia neonatal. Essa variante corresponde à mutação A→G na posição 202, com alteração do aminoácido valina para o aminoácido metionina na posição 68 da proteína (Beutler *et al.*, 2002). Segundo a WHO, esta variante pertence à classe III. Análises de sequenciamento mostraram que uma deleção de um único par de bases no íntron cinco pode interferir no risco de hemólise (Hirono *et al.*, 2002).

Variante Mediterrânea (rs 5030868)

Essa variante consiste na alteração do nucleotídeo C→T na posição 563, o que ocasiona a mudança do aminoácido serina (Ser) para o aminoácido fenilalanina (Phe) na posição 188 da proteína. A proteína derivada desta variante possui menos de 10% da atividade enzimática, tal característica relaciona essa variante com a anemia hemolítica medicamentosa e a enquadra na classe II, segundo a WHO. Com base nas regiões do planeta em que ocorre, esta variante também pode ser denominada de Dallas, Sassari, Panamá entre outros (Vulliamy *et al.*, 1988).

Variante Canton (rs72554665)

A variante canton foi descrita pela primeira vez em 1966. Caracteriza-se pela alteração G→T na posição 1376, que resulta na mudança do aminoácido arginina para o aminoácido leucina na posição 459 da proteína. Assim como a variante mediterrânea, essa variante também recebe outros nomes como: Taiwan-Hakka e Gifu-like. Trata-se de uma variante de classe II que está associada com AH, desta forma, encontram-se reduzidas à atividade enzimática (em níveis próximos a 10%) e termo estabilidade. Esta variante é

comumente encontrada na China, onde estudos mostraram uma frequência de 2% em homens e 0,9% em mulheres, e no Sudeste da Ásia (Iwai *et al.*, 2001).

2- Justificativa

A variabilidade interindividual de resposta a fármacos é um grande problema na prática clínica e pode ocasionar falhas no tratamento ou a ocorrência de ADRs em pacientes (individualmente ou em grupos) (Meyer *et al.*, 2002; Lazarou *et al.*, 1998). Estudos realizados nos EUA mostraram que 6-7% dos pacientes internados no país sofrem de ADRs, sendo que 0,32% têm alguma ADR fatal, o que resulta em 100.000 mortes por ano (Hug *et al.*, 2003). O gasto com o tratamento dos pacientes que sofrem ADRS, incluindo internações e redução de sua produtividade, foi estimado em 100 bilhões de dólares nos EUA (Marshall *et al.*, 1997).

A genotipagem preditiva de genes candidatos pode ser benéfica em 10-20% dos pacientes tratados através da terapia com fármacos, pois pode prevenir a ocorrência de ADRs através da administração posológica correta para cada indivíduo. Isso certamente poderá melhorar o desfecho terapêutico em relação à eficácia e a segurança numa fração significativa de pacientes (Sundberg *et al.*, 2001). A frequência dos principais polimorfismos de *G6PD* pode variar de acordo com a etnia juntamente com o padrão de resposta aos fármacos. Assim, tendo em vista a miscigenação da população brasileira, resultante da participação de diferentes grupos étnicos em sua colonização, a realização de um estudo de diversidade genética torna-se de grande relevância.

Sendo os testes rotineiros para a identificação da deficiência de *G6PD* baseados na quantificação de NADPH e derivados, não avaliando a variabilidade genética presente e mostrando apenas a atividade enzimática (enzima ativa ou inativa), torna-se necessário a identificação destas tendo em vista que as mesmas possuem diferentes níveis de atividade e com isso podem resultar na ocorrência de ADRs induzidas por diferentes xenobióticos, inclusive fármacos (DDS).

O estudo da frequência destas variantes se torna relevante a partir do momento em que o Brasil é o segundo país em número de casos de

hanseníase no mundo, sendo endêmico para a doença. Além disso, o esquema terapêutico da doença é padrão, tanto na posologia quanto na combinação dos fármacos, para todo o território nacional. Em sua composição é utilizada a dapsona, que é sabidamente um fármaco indutor de anemia hemolítica podendo ser agravada em pacientes deficientes para a enzima G6PD.

O mapeamento das variantes encontradas em diferentes regiões geográficas do Brasil poderá contribuir para o melhor entendimento acerca da influência das mesmas separadamente no tratamento adequado ao paciente de hanseníase, com o objetivo de evitar ADRs ao serem tratados com esquemas terapêuticos contendo dapsona.

3- Objetivos

3.1- Objetivo principal

Identificar e descrever a frequência das variantes do gene *G6PD* (G202A, A376G, A542T, C563T, G680T, T968C e G1376T) que estão presentes nos pacientes hansenianos de quatro macrorregiões do Brasil tratados com esquema terapêutico contendo dapsona.

3.2- Objetivos específicos

- Descrever as variantes presentes nas populações de estudo;
- Identificar os haplótipos com papel funcional definido com relação à atividade da enzima G6PD;
- Determinar a frequência dos *SNPs* mais estudados do gene *G6PD* em amostras de pacientes hansenianos provenientes de quatro macrorregiões brasileiras;
- Mapear a distribuição das variantes alélicas ao longo das quatro macrorregiões geográficas através da genotipagem.

4- Metodologia

4.1- Delineamento do Estudo

Estudo retrospectivo descritivo observacional, que visa avaliar a prevalência das variantes mais estudadas do gene *G6PD* através da análise de amostras de pacientes hansenianos oriundos de 4 macrorregiões brasileiras (Norte, Nordeste, Sul e Sudeste) tratados com esquema terapêutico contendo dapsona.

4.2- Tempo de duração do Estudo

O presente estudo teve duração de dois anos.

4.3- Local de Estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias/ Instituto Oswaldo Cruz - IOC/ Fiocruz (LABMAM), situado em Manguinhos - Rio de Janeiro/RJ com amostras coletadas em diferentes Instituições situadas em diferentes estados brasileiros, mais especificamente, as amostras foram coletadas de três municípios da região sudeste (Rio de Janeiro/RJ, Campos dos Goytacazes/RJ e Vitória/ES), um município da região sul (Curitiba/PR), quatro municípios da região norte (Palmas/TO, Gurupi/TO, Rio Branco/AC e Porto Velho/ RO) e dois municípios da região nordeste (Recife/PE e Natal/RN) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Dados demográficos das amostras arroladas no estudo por

Região	Número de amostras	Mulheres	Homens	Faixa etária
Sul	10	4	6	30-57
Sudeste	298	188	110	18-90
Norte	181	116	65	18-72
Nordeste	48	27	21	18-69
Total	537	335	202	18-90

4.4- Considerações Éticas

As amostras utilizadas foram provenientes de um projeto maior realizado no LABMAM no período de 2013-2015. Nessa primeira abordagem, outros

genes de interesse farmacogenético foram estudados. O protocolo para obtenção e processamento das amostras foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fiocruz com o número 449/08, tendo todos pacientes assinado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.5- Critérios de inclusão

Neste estudo foram incluídos portadores e/ou ex-portadores de hanseníase que estavam ou estiveram sob tratamento utilizando esquema terapêutico padrão, contendo dapsona, que estavam ou utilizaram regimes alternativos e que apresentaram ou não ADRs, diagnosticadas clínica ou laboratorialmente, atribuídas a dapsona. Foram incluídos pacientes de ambos os gêneros e maiores de 18 anos.

4.6- Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes de hanseníase infectados com HIV, pacientes menores de 18 anos e pacientes que apresentam problemas de alcoolismo ou com histórico de hepatites virais B e C.

4.7- Escolha das variantes genéticas

As variantes genéticas de G6PD analisadas neste projeto foram escolhidas com base no conhecimento prévio das frequências observadas mundialmente e na importância clínica das mesmas de acordo com a classificação da OMS. Paralelamente, a falta de dados referente à incidência das mesmas no Brasil também foi critério para a seleção.

Sete diferentes polimorfismos foram avaliados individualmente ou sob a forma de haplótipo. O número de amostras avaliadas para cada variante nos diferentes estados divergiu devido a alguns problemas na genotipagem (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Número amostral estudado para cada variante de acordo com o estado de origem.

Estado/Região	N*	G202A	A376G	A542T	C563T	G680T	T968C	G1376T
RO	61	61	56	58	59	56	59	57
AC	48	48	44	44	43	46	48	47
TO	72	72	68	72	70	38	72	71
Norte	181	181	168	174	172	140	179	175
PE	21	21	18	20	16	21	21	20
RN	27	27	24	18	19	23	27	26
Nordeste	48	48	42	38	35	44	48	46
ES	69	69	68	68	67	65	69	64
RJ	229	229	222	197	105	205	221	201
Sudeste	298	298	290	265	172	270	289	265
PR	10	10	9	8	10	10	10	10
Sul	10	10	9	8	10	10	10	10
Total	537	537	509	485	389	464	526	496

*Número de total de indivíduos por estado

4.8- Extração de DNA Genômico

Foram coletados 1,5mL de sangue periférico de cada paciente apto a participar do estudo, em tubo com *vaccuntainer* contendo EDTA ou tampão citrato como anticoagulante. Após agitação por inversão o mesmo foi congelado a -20°C até o momento da extração de DNA.

O DNA genômico foi extraído a partir de 200µL de sangue periférico congelado, utilizando o *Kit* comercial “*QUIAamp DNA blood*®” (Quiagen), seguindo as orientações do fabricante. Resumidamente, um tampão de lise foi adicionado ao sangue e esta mistura foi submetida à centrifugação para precipitação dos núcleos e mitocôndrias das células. Posteriormente, foi adicionado um tampão de desnaturação que contém um sal caotrópico (Guanidina hidrocloreto) e proteases. A solução formada foi passada através de uma coluna de sílica onde o DNA ficou retido, sendo posteriormente lavado duas vezes por centrifugação utilizando os tampões de lavagem “*Buffer AW1*” e “*Buffer AW2*”. A eluição do DNA ocorreu por centrifugação utilizando tampão com baixo sal (10mM Tris-Cl pH 9,0; 0,5mM EDTA). O material foi armazenado a -20°C até o momento de ser utilizado

4.9- Amplificação

Uma vez realizada a extração do DNA genômico iniciou-se a amplificação dos diferentes éxons que continham as possíveis mutações. Cada

éxon foi amplificado separadamente utilizando iniciadores descritos na literatura (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Sequência de iniciadores utilizados na amplificação de cada variante.

Mutação	Iniciador	Fragmento (pb)	Referência
G202A	5'GTGGCTGTTCCGGGATGGCCTTCTG 3'GTTTGTCTCACTCGGGAAGAAGTTC	109	Beutler e col. 1989
A376G	5'TGGCCAGTACGATGATGCAG 3'TGGCGGAGAAGATGGACCGG	90	Beutler e col. 1989
A542T	5'ACTCCCCGAAGAGGGGT 5'AGGAGATGTGGTTGGACATCCGG	131	Nafae col. 1994
C563T	5'-CATCATCGTGGAGAAGC 5'-CACCATCTCCTTGCCCA	127	Hirono e col. 1989
G680T	5'ACATGTGGCCCCTGCACCAC 3'GTCCCACCGTCTCGGTCAGTG	242	Beutler e col. 1989
T968C	5'TCCCTGCACCCCAACTCAAC 3'CGGGTCGTTCCGTCTTGACC	282	Beutler e col. 1989
G1376T	5'ACGTGAAGCTCCCTGACGC3' 5'GTGAAAATACGCCAGGCCTTA3'	214	Huang e col. 1996

Para todas as mutações utilizou-se o *kit* para PCR KAPA2G Fast HotStart Ready Mix em um volume final de 25µL [contendo 1,5mM MgCl₂, 0.2mM de DNTPs, 0.5 U de KAPA2G Fast HotStart DNA polimerase e aproximadamente 50ng do DNA alvo, variando apenas a concentração dos iniciadores conforme descrito na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Concentração dos e temperaturas de anelamento dos iniciadores para cada sistema.

Mutação	Éxon	Conc. dos iniciadores	Temp. de anelamento
G202A	5	25µM	63°C
A376G	6	25µM	63°C
A542T	7	15µM	61°C
C563T	7	15µM	62°C
G680T	8	25µM	69°C
T968C	10	25µM	66°C
G1376T	13	15 µM	63°C

As condições de amplificação foram similares para todos os éxons, com variação apenas da temperatura de anelamento conforme descrito na Tabela 4.3. O programa utilizado consistia em uma desnaturação inicial de 3 minutos a 95°C, com 30 ciclos de 95°C por 15 segundos, 61-69 por 15 segundos e 72°C por 1 segundo, com uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

4.10- Eletroforese em gel de agarose

Todos os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 2%. Após a eletroforese, o material foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz UV em um transiluminador.

4.11- Digestão dos produtos com enzimas de restrição

Após a amplificação e análise em gel de agarose, os produtos de PCR foram submetidos à digestão com enzimas de restrição (RFLP, do Inglês: *Restriction Fragment Length Polymorphism*) descritas na literatura (Tabela 4.5). Resumidamente, 5µL do produto amplificado foram digeridos com 2 unidades da enzima correspondente a 37°C por 2 horas e 30 minutos. Ao final do tempo de digestão a reação foi interrompida com adição do tampão de aplicação (Loading Buffer 5X), contendo azul de bromofenol, xilenocianol e glicerol. A identificação dos genótipos foi realizada através da análise dos perfis de digestão após a eletroforese em gel de poliacrilamida 15%.

Tabela 4.5: Enzimas de restrição utilizadas para cada mutação

Mutação	Enzima de restrição	Tamanho do fragmento (pb)	Sítio da enzima	Referências
G202A	<i>Nla III</i>	63,46	5'CATG↓ 3'↓GTAC	Beutler e col. 1989
A376G	<i>Fok I</i>	58,32	5'GGATG(N) ₉ ↓ 3'CCTAC(N) ₁₃ ↓	Beutler e col. 1989
A542T	<i>BspEI</i>	108, 23	5'T↓CCGGA 3'AGGCC↓T	Nafae col. 1994
C563T	<i>MbolI</i>	54,73	5'GAAGA(N) ₈ ↓ 3'CTTCT(N) ₇ ↓	Vives-Corronse col. 1990
G680T	<i>BstNI</i>	213,29, 98,115,29	5'CCW↓GG 3'GGW↓CC	Beutler e col. 1989
T968C	<i>NciI</i>	162,120	5'CC↓SGG 3'GGS↓CC	Beutler e col. 1989
G1376T	<i>Afl II</i>	194,20	5'C↓TTAAG 3'GAATT↓C	Huang e col. 1996

4.12- Sequenciamento automatizado

Com o objetivo de confirmar os resultados da genotipagem obtidos através da PCR/RFLP realizou-se o sequenciamento automatizado (padrão ouro) de 5% das amostras para cada mutação estudada. Para isso, os produtos da PCR das amostras escolhidas randomicamente foram purificados utilizando o kit ChargeSwitch® PCR Clean-Up (Invitrogen) que é capaz de eliminar de maneira eficiente sais, iniciadores, DNTPs e outros reagentes que não ácidos nucleicos.

Uma vez purificadas, as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento utilizando o kit “ABI PRISM® Big Dye® Terminator v3.1” (PE Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram analisadas no sequenciador de 96 capilares “ABI PRISM® 3730 XL DNA Analyzer”(Applied Biosystems), situado no Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática da FIOCRUZ/ Plataforma PDTIS.

4.13- Análise estatística

As frequências alélicas e genotípicas foram estimadas pelo método de contagem gênica e serão dadas com um intervalo de confiança de 95%. As mesmas foram testadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg usando o teste do χ^2 considerando o valor de 5% ($p < 0.05$) como limiar de significância estatística entre os valores esperados e observados. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software EPI info™.

5- Resultados

5.1- Caracterização da população de estudo

O presente estudo foi desenvolvido como subprojeto de uma avaliação realizada em nível nacional acerca da variabilidade de genes de interesse farmacogenético associados à metabolização da dapsona e com histórico de associação com efeitos adversos. Naquele estudo, cujo modelo epidemiológico era um estudo do tipo caso-controle, todos os indivíduos arrolados eram pacientes diferindo somente em relação à presença (casos $n=223$) ou ausência (controles $n=314$) do desfecho estudado (ocorrência de ADRs). Os dados de diagnóstico com forma clínica não foram disponibilizados para os controles, assim, como nosso interesse maior foi descrever a distribuição das variantes

genéticas encontradas em nível de frequências, utilizamos as amostras a despeito da falta destas informações.

Ao todo foram arroladas 537 amostras de pacientes com hanseníase pertencentes a todas as formas do espectro clínico da doença, que para fins de tratamento foram agrupados em paucibacilares (n=126) e multibacilares (n=97). As amostras foram procedentes de 10 municípios pertencentes a oito estados diferentes (Rondônia, Acre, Tocantins, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Paraná) de quatro macrorregiões brasileiras (Norte, Nordeste, Sul e Sudeste). A Tabela 5.1 demonstra a distribuição das amostras por estado e região, bem como o gênero do paciente.

Tabela 5.1: Distribuição geográfica e gênero das amostras arroladas no estudo

Estado/ Região	N	Mulher	Homem	P valor
RO	61	29	32	0,87
AC	48	36	12	0,007*
TO	72	51	21	0,005*
Norte	181	116	65	0,001*
PE	21	14	7	0,28
RN	27	13	14	1,0
Nordeste	48	27	21	0,5
ES	69	44	25	0,75
RJ	229	144	85	0,001*
Sudeste	298	188	110	0,0002*
PR	10	4	6	0,7
Sul	10	4	6	0,7
Total	537	335	202	< 0,001*

*valores de p significativos para a diferença entre o número de pacientes femininos e masculinos.

Podemos observar que, neste estudo, o número de pacientes do gênero masculino foi significativamente menor do que o feminino nas regiões norte ($p=0,001$) e sudeste ($p<0,001$). Em total, foram arrolados mais pacientes com a forma MB do que com a forma PB. (Figura 5.1).

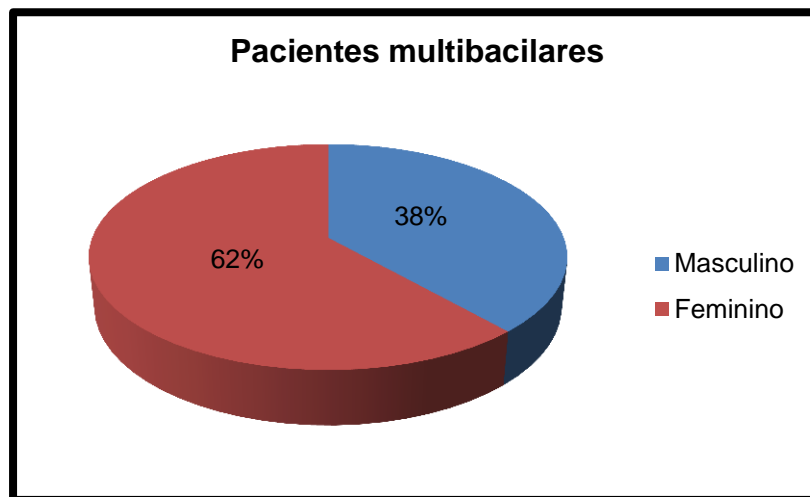


Figura 5.1: Distribuição de pacientes da forma multibacilar em relação ao gênero.

5.2- Extração de DNA

O isolamento do DNA foi realizado a partir de alíquotas de 200µL de sangue periférico, através de kit comercial seguindo a orientação do fabricante. Tanto o rendimento (quantidade mensurada por espectrometria ótica) quanto à qualidade (integridade avaliada por eletroforese em gel de agarose) dos DNAs obtidos foram satisfatórios (Figura5.2).

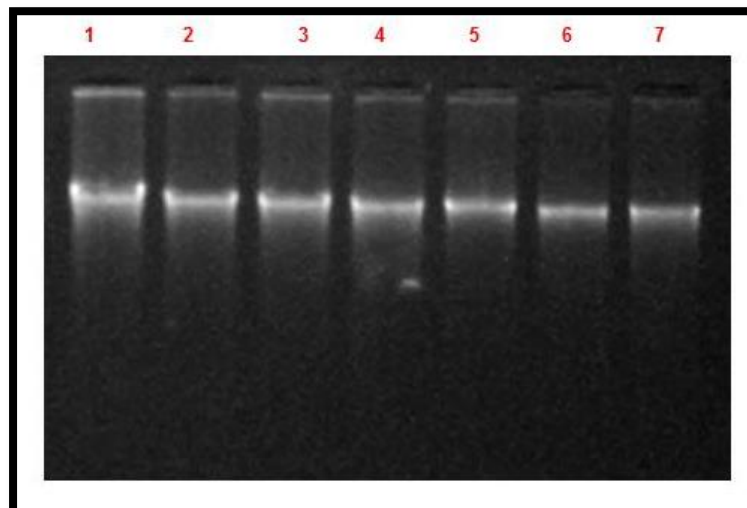


Figura 5.2: Eletroforese em gel de agarose 1.5% contendo DNA genômico extraído de sangue periférico de sete diferentes amostras. Poços 1-7 amostras pacientes oriundo da cidade de Recife (PE).

5.3- Genotipagem

A genotipagem das diferentes variantes genéticas do gene *G6PD* foi realizada através da técnica de PCR\RFLP, que consiste na amplificação do fragmento de interesse e posterior clivagem com enzima de restrição. Para

cada polimorfismo avaliado foi utilizada uma enzima diferente para a genotipagem, conforme descrito na Tabela 4.5.

Tendo em vista as dificuldades inerentes a cada sistema de amplificação e genotipagem, o número amostral divergiu para cada variante analisada.

Para a mutação G202A foram analisadas 537 amostras (202 homens e 335 mulheres). Os três perfis eletroforéticos correspondentes aos três possíveis genótipos desta mutação foram observados na população avaliada e estão representados na Figura 5.3.

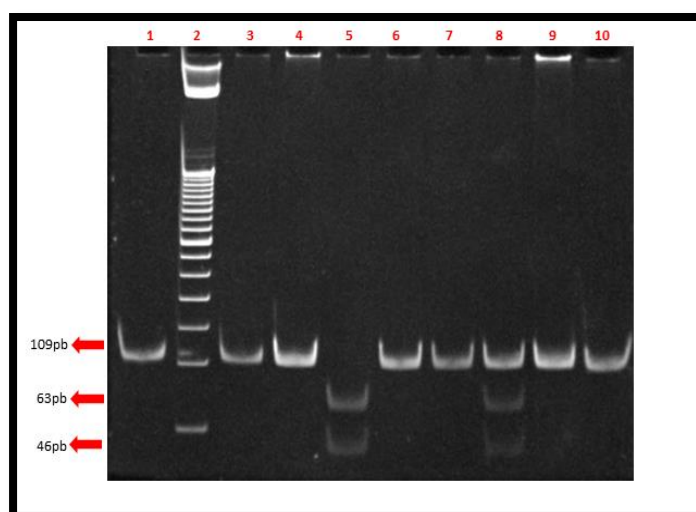


Figura 5.3: Gel de poliácridamida 15% com o produto da digestão com a enzima de restrição *Nla III*. Poços 1,3,4,6,7,9 e 10 amostras com o genótipo selvagem, poço 5, genótipo homozigoto mutante e poço 8, genótipo heterozigoto. Poço 2 DNA leader de

Do total de amostras genotipadas para esta variante (n=537) o alelo 202A foi observado em 49 (9,1%) pacientes na população de estudo. A tabela 5.2 mostra a distribuição dos genótipos de acordo com as regiões estudadas. Podemos observar que esta mutação não foi encontrada nas regiões sul e nordeste do Brasil.

Para a mutação A376G foram analisadas 509 amostras (94,7%) do total, sendo 179 do gênero masculino e 330 do gênero feminino. Nessa análise observou-se a presença dos três genótipos possíveis (Figura 5.4), todavia houve a predominância do genótipo selvagem.

Tabela 5.2: Distribuição da mutação G202A nas diferentes localidades de estudo

Estado/ Região	N	Selvagens	Homozigoto mutante	Heterozigoto	Hemizigoto	Total
RO	61	58	-	1	2	3
AC	48	43	-	5	-	5
TO	72	39	-	5	1	6
Norte	181	140	-	11	3	14
PE	21	21	-	-	-	-
RN	27	27	-	-	-	-
Nordeste	48	48	-	-	-	-
ES	69	58	1	7	3	11
RJ	229	204	1	17	6	24
Sudeste	298	262	2	24	9	35
PR	10	10	-	-	-	-
Sul	10	10	-	-	-	-
Total	537	460	2	35	12	49

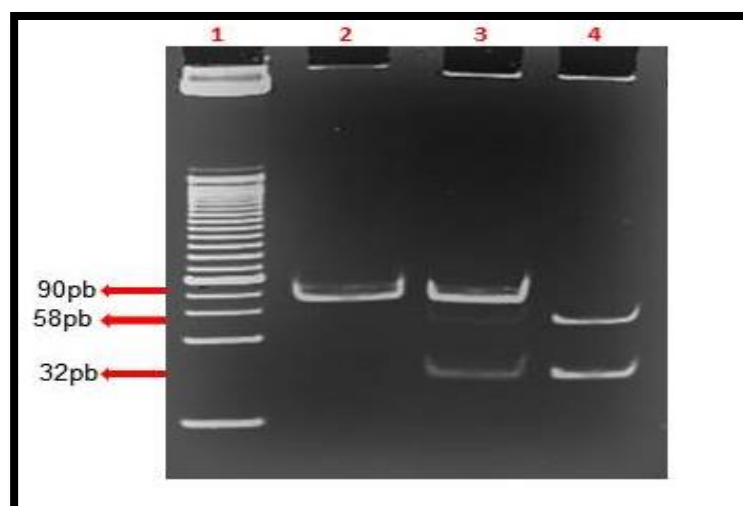


Figura 5.4: Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) contendo o perfil da digestão com a enzima *Fok I*. Posso 1: marcador de peso molecular (DNA ladder) de 25pb, posso 2, representação do genótipo selvagem; poço 3: genótipo heterozigoto e poço 4: genótipo homozigoto.

Do total de amostras genotipadas para esta variante (n= 509), o alelo 376G foi observado em 93 (18,2%) pacientes na população de estudo. A distribuição das amostras de acordo com o genótipo nas diferentes regiões é demonstrada na Tabela 5.3. Esta variante só não foi encontrada nas amostras da região sul do Brasil.

Tabela 5.3: Distribuição da variante A376G para as diferentes regiões

Estado/ Região	N	Selvagem	Homozigoto	Heterozigoto	Hemizigoto	Total
RO	56	49	-	7	-	7
AC	44	31	-	13	-	13
TO	68	63	-	4	1	5
Norte	168	143	-	24	1	25
PE	18	11	-	7	-	7
RN	24	22	-	2	-	2
Nordeste	42	33	-	9	-	9
ES	68	56	1	7	4	12
RJ	222	173	8	31	10	47
Sudeste	290	232	9	36	14	59
PR	9	9	-	-	-	-
Sul	9	9	-	-	-	-
Total	509	417	9	69	15	93

Para as mutações A542T, C563T, G680T, T968C e G1376T foram analisadas respectivamente 470, 380, 462, 513 e 496 amostras, porém não foram encontradas mutações nestas posições. Todas as amostras avaliadas demonstraram o genótipo selvagem, conforme mostrado na Figura 5.5.

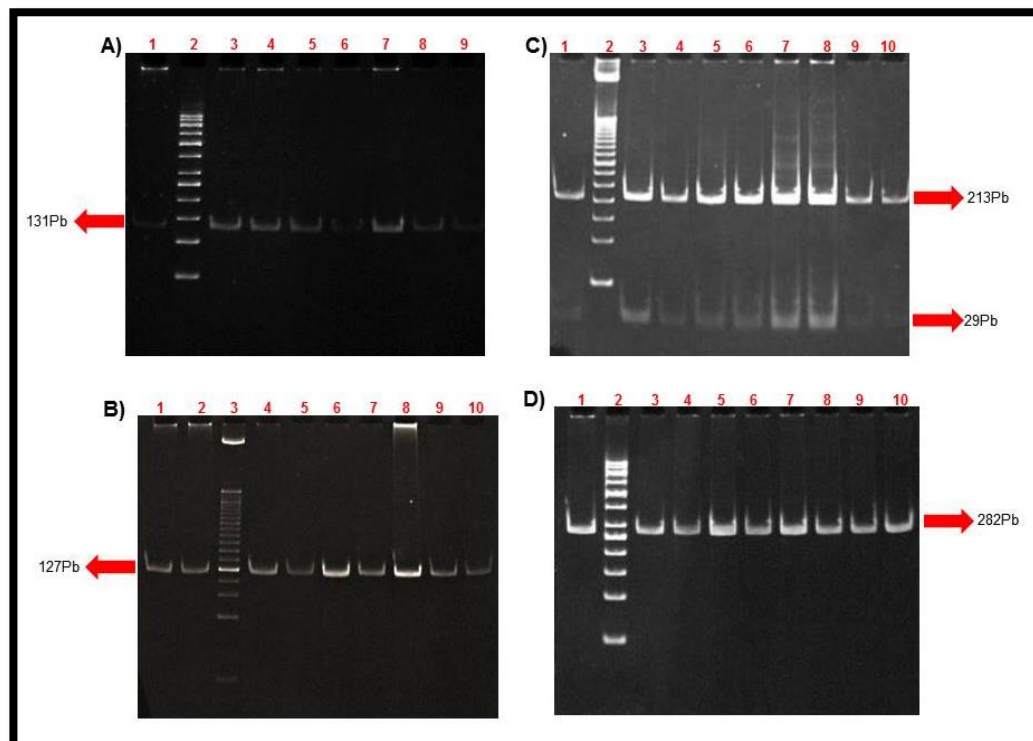


Figura 5.5 : Géis de poliacrilamida 15% contendo os produtos da digestão para as variantes A542T (A), C563T (B), G680T (C) e T968C (D), utilizando as enzimas *BspEI*, *MbolI*, *BstNI* e *NciI*, respectivamente. Todas as amostras aqui apresentada demonstram o genótipo selvagem.

5.4- Sequenciamento automático

Ao final da genotipagem, para o controle de qualidade da técnica utilizada no estudo, o sequenciamento automático (considerado como padrão ouro para a genotipagem) foi empregado para avaliar 5% (n=26) das amostras para cada variante. Os resultados obtidos com PCR/RFLP foram confirmados em 100% das amostras testadas. A Figura 5.6 mostra o eletroferograma de uma amostra genotipada como sendo do tipo selvagem para o SNP na posição 968, confirmado pela técnica de sequenciamento.

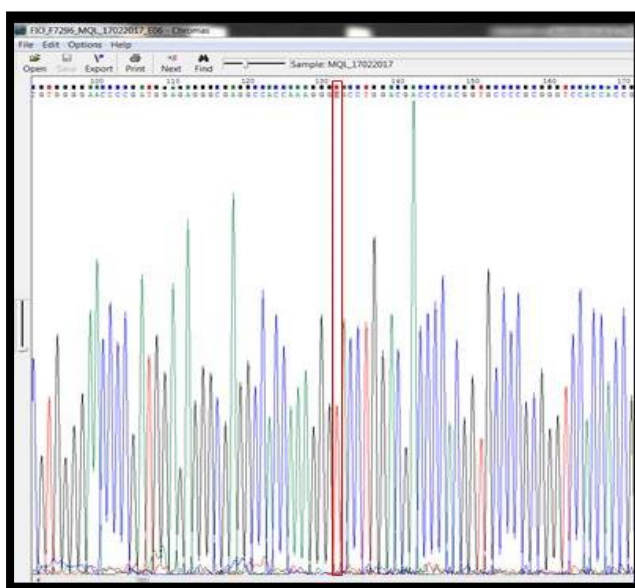


Figura 5.6: Eletroferograma do sequenciamento do fragmento do éxon 10 que demonstra o nucleotídeo T na posição 968. Nesse caso a amostra avaliada apresenta o genótipo selvagem.

5.5- Frequência das reações adversas a Dapsona

De acordo com a análise dos dados em relação à ocorrência de ADRs induzidas pela DDS, do total da amostragem de 537 pacientes arrolados, 207 (39%), desenvolveram algum tipo de ADR. Destes, 39 (19%) apresentaram anemia hemolítica (Figura 5.7).

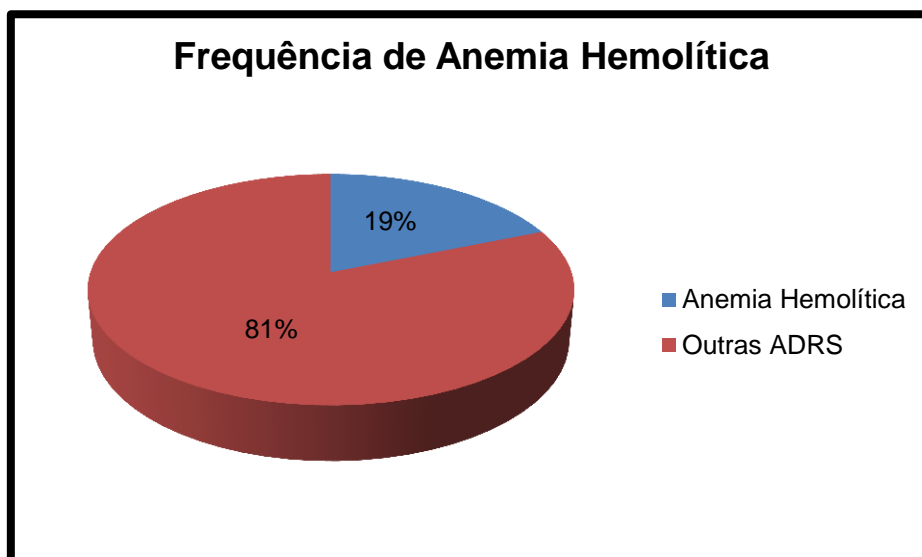


Figura 5.7: Representação gráfica da frequência de anemia hemolítica em pacientes que desenvolveram ADRs induzidas pela dapsona.

5.6- Frequência da deficiência de G6PD

Devido à localização do gene *G6PD* no cromossomo X, para determinação da frequência de deficiência baseada na genotipagem das variantes genéticas, consideramos apenas os pacientes femininos portadores do genótipo homozigoto e os pacientes masculinos.

Dos pacientes estudados, 142 (26,4%) apresentavam mutação em uma ou duas posições do gene caracterizando as variantes Asahi, A e A^{-202A/376G} (Figura 5.8). Destes, 38 (27%), apresentaram deficiência em G6PD (Figura 5.9), equivalente a (7%) do total de pacientes arrolados no estudo.

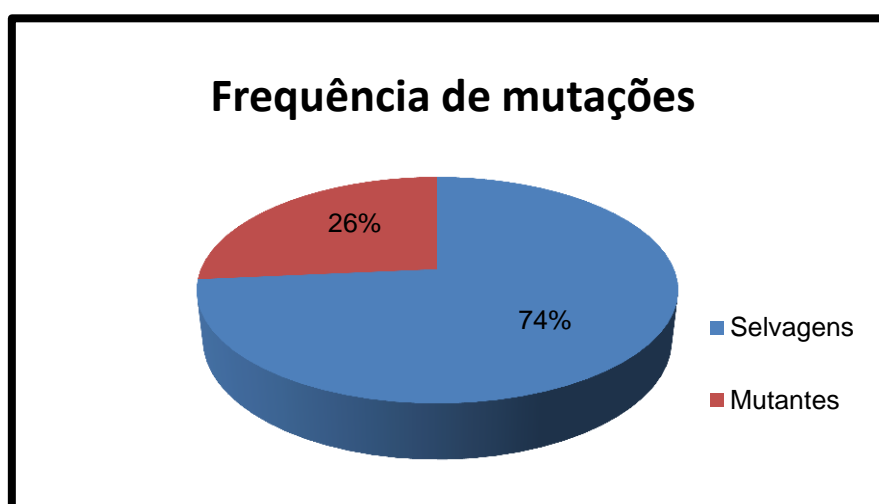


Figura 5.8: Frequência das mutações do gene *G6PD* no total de pacientes arrolados no estudo

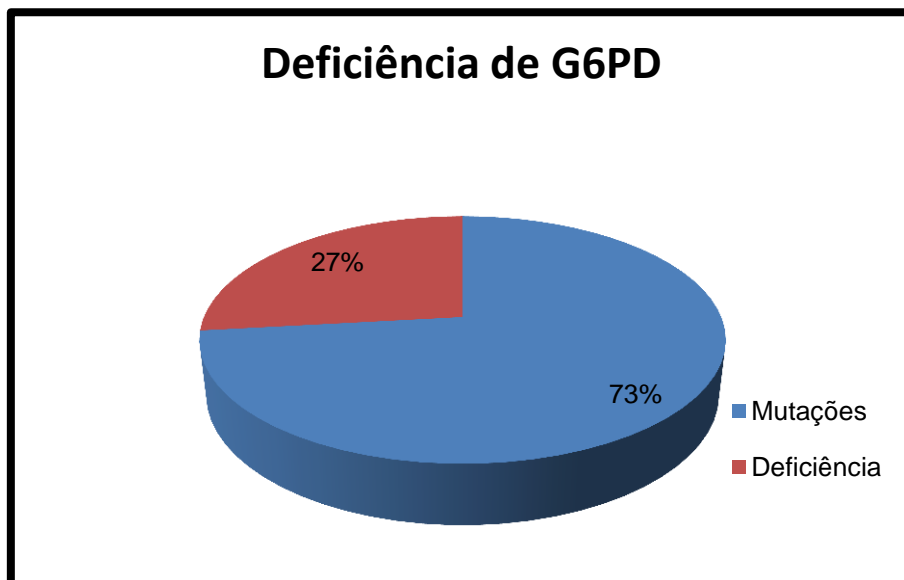


Figura 5.9: Frequência de pacientes que apresentaram mutações e são deficientes para G6PD. Aqui foram excluídas as mulheres com genótipo heterozigoto.

Os pacientes femininos heterozigotos (n=104) não puderam ser considerados quanto à deficiência de G6PD. Portanto, 16% da população deixou de ser caracterizado (Figura 5.10).

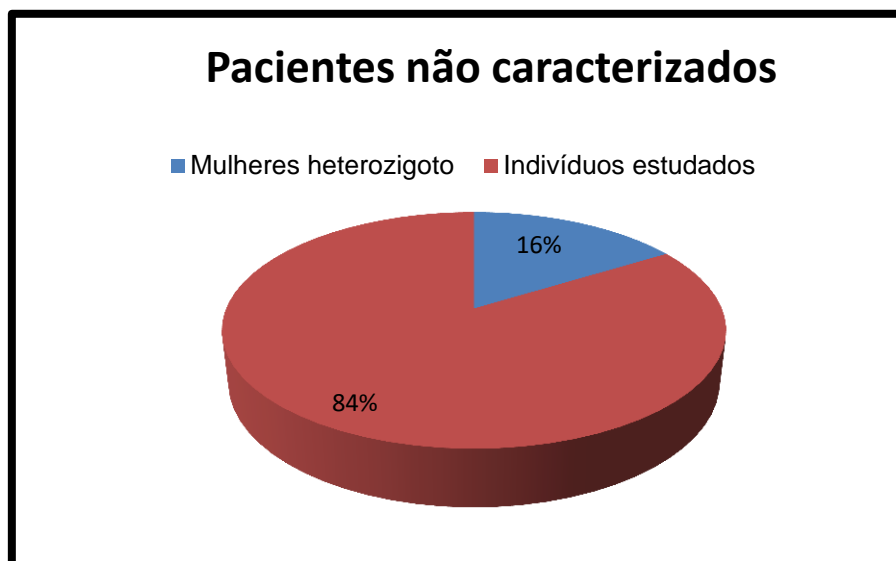


Figura 5.10: Pacientes femininos heterozigotos que não puderam ser caracterizados quanto à deficiência de G6PD

Dos pacientes que desenvolveram anemia hemolítica (n=39) 12 (31%) apresentavam alguma mutação no gene *G6PD*. Destes sete (18%) eram pacientes do gênero feminino heterozigotos para uma das duas mutações e 5 (13%) eram deficientes. A variante mais frequente nos deficientes foi a A⁻_{202A/376G} com 3 pacientes (60%) seguida da Asahi com 40% (n=2).

5.7- Frequências das variantes

Os SNPs observados neste estudo caracterizam as variantes Asahi (G202A) e A (A376G), porém estes também podem ser combinados gerando o haplótipo A^{-202A/376G}. Nessa avaliação esse haplótipo foi observado em 26 pacientes (4,8%) do total de amostras testados, sendo observado uma vez em Rondônia, duas vezes no Tocantins, cinco vezes no Acre, quatro vezes no Espírito Santo e 14 vezes no Rio de Janeiro. Ao analisar a frequência dessas variantes, foi possível observar que a variante mais frequente em todas as regiões foi a variante A, tendo o haplótipo A^{-202A/376G} uma distribuição mais homogênea do que a variante Asahi (Tabela 5.4) (Figura 5.11).

Tabela 5.4: Frequência das variantes encontradas por região estudada.

Estado/ Região	Asahi N (%)	A N (%)	A^{-202A/376G} N (%)
RO	1 (1,6)	6 (10,7)	1 (1,6)
AC	-	8 (18,1)	5 (10,4)
TO	4 (5,5)	10 (14,7)	2 (2,7)
Norte	5 (2,7)	24 (13,4)	8 (4,4)
PE	-	7 (38,8)	-
RN	-	2 (8,3)	-
Nordeste	-	9 (18,75)	-
ES	7 (10,1)	8 (11,7)	4 (5,7)
RJ	9 (3,9)	38 (17,0)	14 (6,1)
Sudeste	16 (5,3)	46 (15,6)	18 (6,0)
PR	-	-	-
Sul	-	-	-
Total	21 (3,9)	79 (14,8)	26 (4,8)

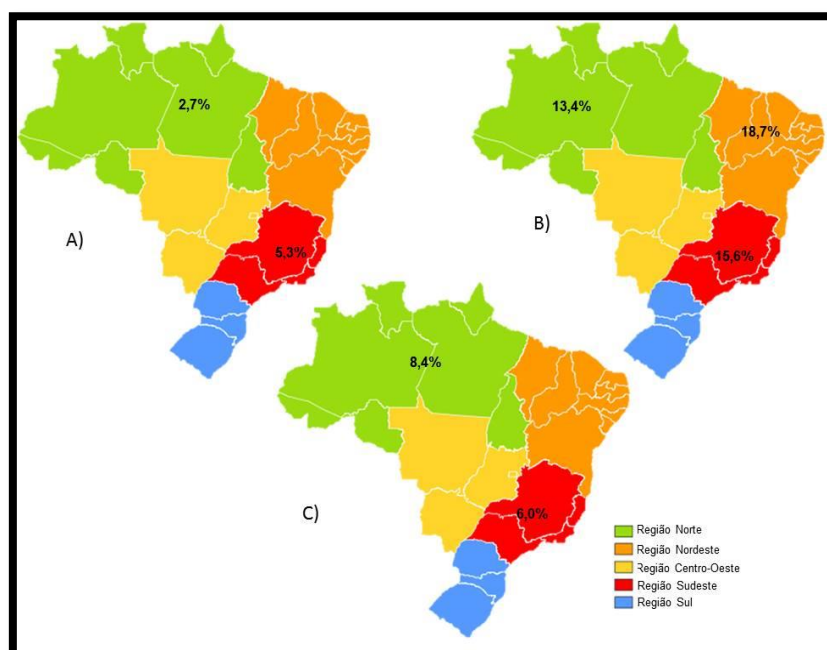


Figura 5.11: Os mapas mostram as frequências das variantes Asahi (mapa A), A^{-202A/376G} (mapa B) e do haplótipo A^{-202A/376G} (mapa C) encontradas no estudo de acordo com a região de origem das amostras.

A Tabela 5.6 demonstra uma comparação entre as frequências das variantes observadas em nosso estudo e dados da literatura para a população brasileira.

Tabela 5.6: Dados da literatura a respeito da frequência de algumas variantes abordadas no estudo.

Região	Variante	Literatura (%)	Encontradas (%)	Referência
Nordeste	G6PD A	3	18,7	Moura-Neto <i>et al.</i> , 2008
	Asahi	3	-	
Norte	A ^{202A/376G}	81.8	-	Hamelet <i>et al.</i> , 2002
	A ^{968C/376G}	7.1	-	
	A ^{542T/376G}	2.2	-	
Sul	A ^{202A/376G}	94.4	-	Castro <i>et al.</i> , 2007
	Mediterrânea	0.6	-	
Sudeste	A ^{202A/376G}	18.6	6,0	Belisário <i>et al.</i> , 2016

6- Discussão

De modo geral, o número de mulheres arroladas para o estudo foi superior ao número de homens, o que diverge das tendências epidemiológicas, as quais o número de pacientes do sexo masculino tende a ser superior ao de mulheres. Esse fato era justificado anteriormente pela crença de que os homens estariam mais expostos à doença do que as mulheres. Todavia,

atualmente, com a constante inserção das mulheres no mercado de trabalho esta possibilidade se tornou muito remota. Uma das possibilidades aceita atualmente e a de que as mulheres se cuidam melhor que os homens, e assim, procuram mais o serviço de saúde do que os homens, o que aumenta o número de casos diagnosticados entre indivíduos desse gênero.

Embora não se tenha informações sob a forma clínica de todos os pacientes arrolados neste estudo, observamos que o número de pacientes multibacilares foi superior ao número de pacientes paucibacilares. Sendo o Brasil um país endêmico para a doença estes resultados são esperados e demonstra que o bacilo continua sendo transmitido na nossa população uma vez que o mesmo é transmitido por pacientes multibacilares virgens de tratamento.

Rotineiramente o diagnóstico de deficiência em G6PD é realizado através do teste do pezinho ampliado, que não está disponível no Sistema Único de Saúde (SUS). Normalmente, em caso de necessidade, este teste é requisitado, porém, o mesmo só revela se a enzima está ou não ativa, não sendo possível identificar qual variante genética está presente. Este tipo de teste, por ser quantitativo, pode não ser eficiente na identificação das fêmeas heterozigotas, que podem apresentar enzimas ativas ou inativas. Essa população especificamente pode ter ADRs tão graves como as de mulheres homozigotas ou homens hemizigotos para a deficiência (Pamba *et al.*, 2012).

Outro problema em relação a este tipo de teste diagnóstico é a impossibilidade de identificar o tipo de variante genética. Dependendo da variante, pode haver ou não interferência na atividade enzimática durante toda a vida do eritrócito ou somente na fase mais madura do mesmo e isto está diretamente associado ao desfecho de AH.

Embora os alelos 202A e 376G tenham sido observados em um total de 142 amostras (49 e 97 respectivamente), nem todos os portadores puderam ser considerados deficientes para a enzima G6PD. Devido à inativação aleatória do cromossomo X, fêmeas heterozigotas são um mosaico de G6PD saudáveis e G6PD deficientes. Assim, torna-se impossível determinar o fenótipo apenas por métodos moleculares nestes casos para determinar o

fenótipo destas pacientes seria necessário realizar previamente os testes preconizados pela WHO.

Neste trabalho, um total de 104 pacientes (16%) foram heterozigotas para uma das duas mutações observadas e por isso deixaram de ser caracterizadas quanto à deficiência de G6PD. Contudo, numa análise preliminar de associação dos polimorfismos encontrados neste grupo de pacientes excluídos com a ocorrência de anemia hemolítica verificamos que sete por cento (7%) destas pacientes desenvolveram AH ao serem tratadas com esquemas terapêuticos contendo dapsona, o que sugere que estas sejam também deficientes para G6PD, neste caso, o que nos daria uma frequência de 8,3% de deficientes no total da população. Estes achados, embora preliminares tendo em vista o número reduzido de amostras avaliadas, sugerem que pacientes do gênero feminino com genótipo heterozigoto devem ser submetidas ao teste quantitativo paralelamente ao teste genético para evitar que as mesmas sejam subestimadas em relação à deficiência de G6PD.

Dados da literatura relatam uma frequência de deficiência de G6PD variando entre três e nove por cento (Cappellini&Fiorelli, 2008). Os dados encontrados nesse estudo corroboram com o já descrito uma vez que a frequência de deficientes foi de 7 % do total da população estudada quando não consideramos os pacientes femininos heterozigotos, se controlarmos estas pela ocorrência de AH, como descrito anteriormente, esta frequência sobe para 8,3% no total.

A WHO classifica as variantes de G6PD em cinco classes, de acordo com a atividade da mesma nos eritrócitos e com as manifestações clínicas de indivíduos portadores destas variantes. Nesta classificação as variantes de classe II seriam mais severas do que as de classe III. No entanto estudos realizados em crianças portadoras de variantes de classe III mostraram que 98% dos meninos desenvolveram AH (Pamba *et. al.*,2012). Assim, esta divisão entre as duas classes pode não ser clinicamente útil e ao invés disso deve ser utilizados três classes de fenótipos, sendo as variantes de classe II e de classe III agrupadas em uma única classe.

Estudos de associação vêm sendo realizados com o objetivo de relacionar à ocorrência de AH medicamentosa a deficiência de G6PD. Em sua

maioria estas pesquisas são realizadas em áreas com endemismo de malária já que sabidamente os medicamentos utilizados em seu tratamento (primaquine e dapsona) são indutores de AH (Poirot *et al.*, 2015) Entretanto, não encontramos relato de estudo semelhante realizado em pacientes de hanseníase sendo este portanto um estudo pioneiro.

Hoje, a utilização de marcadores genéticos em genes de interesse farmacogenético já são utilizados para nortear modificações na conduta terapêutica de várias doenças visando, através de um tratamento personalizado, aumentar a segurança e eficácia dos medicamentos. Como exemplo destes, a presença do alelo HLA-B*5701 (Hughes *et al.*, 2004) no tratamento da infecção pelo HIV já é utilizado de rotina. O teste do impacto deste kit preventivo no modelo de doença HIV foi devidamente avaliado em três países diferentes com significativa redução de ADRs nos três países. Em relação a doenças infecciosas, a genotipagem do gene *NAT2*, cujo fenótipo de acetilação lenta está associado a ocorrência de hepatite/hepatotoxicidade induzida pela isoniazida também já é utilizado de rotina no Japão. Embora o foco deste trabalho seja avaliar as frequências das mutações do gene *G6PD* nos pacientes de hanseníase de quatro macrorregiões brasileiras uma análise preliminar assim, como demonstrado em outros estudos já citados, sugere que existe uma tendência dos pacientes deficientes de *G6PD* desenvolvam AH ao serem tratados com dapsona. Assim, este trabalho pode servir como base para outros estudos que tenham por objetivo esclarecer a influência de cada variante na ocorrência de AH induzida por fármacos bem como estabelecer metodologias para a genotipagem preditiva das mutações relacionadas com o desfecho de AH.

Assim como os dados a respeito da frequência da deficiência de *G6PD* os dados referentes às frequências de ADRs induzidas pela dapsona e de AH corroboram o já descrito na literatura. Dos fármacos utilizadas no tratamento da hanseníase a dapsona é a principal indutora de ADRs, podendo representar até 70% dos relatos (Goulart *et al.*, 2001). Em nosso estudo 39% dos pacientes tiveram ADRs que foram atribuídas à fármacos um número bem próximo ao já descrito na literatura a na população brasileira (Deeps *et al.*, 2007). Estudos prévios de nosso laboratório mostraram que, assim como já foi descrito, as ADRs hematológicas são as mais frequentes e que dentro dessas a AH é a

segunda mais frequente. Em nosso trabalho encontramos que 19% dos pacientes com ADRs apresentaram AH mais uma vez corroborando com dados da literatura (Goulart *et al.*, 2001).

Neste estudo observamos que dos pacientes que desenvolveram AH 31% apresentavam alguma mutação no gene G6PD. Este dado sugere que a deficiência pode agravar o desfecho de AH que já é descrito para a dapsona. Destes pacientes sete (16%) eram mulheres heterozigotas sugerindo que as mesmas não podem ser desconsideradas no que se refere ao desfecho de ADR. Cinco pacientes (13%) eram seguramente deficientes e nestes a variante mais frequente foi a A-^{202A/376G} com 60% dos pacientes seguida da variante Asahi com 40% não sendo observada a variante A neste grupo que também corrobora com a literatura que coloca essa variante como não associada ao desfecho de AH.

A frequência das variantes genéticas do gene *G6PD* varia em função do grupo étnico e da região geográfica. Sendo a população brasileira a mais miscigenada em todo mundo, era de se esperar uma variação na presença e na distribuição destas variantes. Algumas mutações que já haviam sido descritas na população brasileira, embora tenham sido também investigadas em nossa avaliação não foram encontradas. Este fato pode ser explicado pelo enviesamento destes estudos. Nestes casos antes da genotipagem é feito uma triagem, através de testes quantitativos, para verificar a deficiência de G6PD. Só então é realizada a genotipagem molecular nos pacientes G6PD negativos. Tendo estas variantes uma frequência relativamente baixa é de se esperar que o enviesamento aumente consideravelmente a probabilidades destas serem encontradas.

Embora não apresentem diferenças significativas com relação às demais regiões abordadas, às frequências relativamente baixas das variantes do gene *G6PD* na região norte (Asahi 2,7%, A 13,4% e A-^{202A/376G} 8,4%) podem estar relacionadas com a ancestralidade (ameríndios) dos povos daquela região. Estudos realizados anteriormente já demonstraram que populações indígenas têm a tendência de apresentarem a variante G6PD B (selvagem) (Weimer *et al.*, 1993) .

Em estudo realizado por Weimer e colaboradores (1993), a variante mediterrânea (C563T) foi encontrada com uma frequência de 0.6% na população do sul do país, porém não foi encontrada em outras regiões. Em nosso estudo não encontramos a variante mediterrânea. Possivelmente devido a baixa frequência desta mutação em conjunto com o nosso n amostral reduzido nesta população.

Dados da literatura a respeito das frequências das variantes no Brasil demonstram que a variante $A^{202A/376G}$ é observada com maior frequência. Todavia, os dados do presente estudo mostraram que a variante $A^{202A/376G}$ é mais frequente apenas na região norte (4.4%), não sendo observada em duas das regiões estudadas (sul e nordeste). Desta forma, a variante A acaba sendo a mais frequente na nossa população de estudo (14,8%). Este resultado está relacionado à ausência da mutação G202A nas populações estudadas nas regiões nordeste e sul e, portanto não havendo a combinação da mesma com a mutação A376G para formação da variante $A^{202A/376G}$.

Um estudo realizado com neonatos em Salvador (BA) mostrou que a variante $A^{202A/376G}$ é a mais frequente nessa população (81,8%) (Moura-Neto *et al.*, 2008). No entanto, em nosso estudo essa variante não foi observada na região nordeste. Uma das possibilidades para explica essa diferença pode estar relacionada ao fato de que no presente estudo amostras da Bahia não foram avaliadas, o que corrobora com o fato de haver diferença na distribuição das variantes de acordo com a região geográfica.

Embora as variantes $A^{968C/376G}$ e $A^{542T/376G}$ já tenham sido descritas na população brasileira (Hamelet *et al.*, 2002), mais especificamente em pacientes de Belém (PA), as mesmas não foram observadas em nosso estudo. Uma das explicações poderia ser porque em nossa análise não foram avaliadas amostras dessa localidade. Além disso, embora o estado do Pará esteja localizado na região norte e por isso tenha característica parental dos ameríndios, sua população possui uma contribuição significativa de negros (16%) e caucasianos (49%) (Santos & Guerreiro, 1995) o que pode influenciar no aparecimento destes alelos.

7- Limitações do estudo

Por ser este projeto a ramificação de um estudo maior que analisou outros genes de interesse farmacogenético, a seleção das amostras foi feita com o objetivo de estabelecer grupos de pacientes que possuíam desfechos definidos de tratamento. Todavia, por ter sido feita uma seleção retrospectiva, os desfechos de interesse variaram de acordo a região/estado e por este motivo a amostragem avaliada não é representativa da população regional na região sul.

A dificuldade para aquisição de insumos, o tempo necessário para importação e entrega dos mesmos também foi fator limitante deste estudo, uma vez que foram realizados diferentes sistemas de genotipagem os quais demandavam um processo de padronização.

A qualidade dos dados referentes a caracterização clínica dos pacientes variou de acordo com a origem das amostras. O instrumento utilizado para coleta de dados clínicos apresentou falhas gerando perda de informações a cerca da forma clinica e da ADR de alguns pacientes.

8- Conclusões

Embora não se tenha nenhum estudo que correlacione a ocorrência de anemia hemolítica com a deficiência de G6PD no tratamento da hanseníase os dados apresentados neste trabalho com relação às frequências de ADRs atribuídas dapsona, a frequência de AH e a frequência de deficiência de G6PD corroboram com o descrito na literatura.

Nossos dados sugerem que a deficiência de G6PD pode estar relacionada com o agravamento de reações adversas a dapsona, mais precisamente a anemia hemolítica. Isto porque 30% dos pacientes que tiveram anemia hemolítica possuíam alguma mutação no gene G6PD. Além disso, nossos dados também sugerem que mesmo os pacientes portadores do genótipo heterozigoto podem ter as ADRs agravadas quando submetidas ao tratamento com DDS. Nestes casos além do teste molecular devem ser realizados testes quantitativos preconizados pela WHO para verificar a atividade enzimática. De acordo com estes resultados não recomendamos o uso de DDS a pacientes que são seguramente deficientes e nem aos portadores do genótipo heterozigoto.

O desenvolvimento de metodologias de genotipagem preditiva para este gene, portanto traria benefícios não somente para o pacientes que teriam uma maior segurança em seu tratamento diminuindo o risco de desenvolver ADRs, mas também para os cofres públicos que reduziram os gastos com o tratamento destas além de manter a produtividade do paciente. Assim, estas metodologias seriam de grande valia, pois além de prevenir a ocorrência de ADRs também melhora o desfecho terapêutico em relação à segurança e eficácia do procedimento para o paciente.

Novos estudos devem ser realizados para avaliar a influência de cada mutação na ocorrência de AH bem como desenvolver metodologias moleculares a fim de se realizar a genotipagem preditiva a ser utilizada pelo sistema de saúde garantindo uma redução no custo do tratamento, e maior segurança para o paciente.

Juntos estes resultados sugerem que não apenas a deficiência de G6PD tem uma tendência de agravar as ADRs atribuídas a dapsona como também a variante A-^{202A/376G} seria a mais severa neste quesito.

A aplicação da genotipagem poderá contribuir, no futuro, como instrumento de farmacovigilância no tratamento da hanseníase, e também como uma medida preditiva permitindo uma melhor compreensão e prevenção dos efeitos adversos, diminuição da eficácia ou quaisquer problemas relacionados, os quais podem aumentar a morbidade, a mortalidade e/ou os custos do tratamento.

9- Referências

1. Babalola AO, Beetlestone JG, Luzzatto L. Genetic variants of human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase: kinetic and thermodynamic parameters of variants A, B, and A- in relation to quaternary structure. *J BiolChem.*; 251:2993–3002, 1976
2. Baohong Ji., Evelyne G. Perrani., Corinne Petinom and Jacques H. Grosset. 1996. Bactericidal Activities of Combinations of New Drugs against *Mycobacterium leprae* in Nude Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 393–399, 1996

3. Beutler E, Kuhl W, Vives-Corrons JL, Prchal JT. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase A-. *Blood*, 74: 2550–55, 1989.
4. Beutler E, Vulliamy TJ. Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood Cells Mol Dis*, 28:93–103, 2002.
5. Brandsma JW, Yoder L, MacDonald M. Leprosy acquired by inoculation from a knee injury. *Lepr Rev*, 76: 175–79, 2005.
6. Belisário AR, Rodrigues Sales R, Evelin Toledo N, Velloso-Rodrigues C, Maria Silva C, BoratoViana M. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Brazilian children with sickle cell anemia is not associated with clinical ischemic stroke or high-risk transcranial Doppler. *Pediatr Blood Cancer*. Epub ahead of 3, 2016.
7. Bluhm RE, Adedoyin A, McCarver DG, Branch RA. Development of dapsone toxicity in patients with inflammatory dermatoses: activity of acetylation and hydroxylation of dapsone as risk factors. *Clin Pharmacol Ther*. 65(6):598–605, 1999.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 3.125 de 7 de outubro de 2010. Aprova as diretrizes para vigilância, atenção e controle da hanseníase. Diário Oficial da União 15 out 2010. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt3125_07_10_2010.html
9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portal da Saúde [homepage internet]. Situação Epidemiológica – Dados. 2016a. [acesso em 12 jul 2016]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/705-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/hanseniaze/11298situacaoepidemiologica-dados>
10. Brasil. Ministério da Saúde. Vigilância em Saúde: dengue, esquistossomose, hanseníase, malária, tracoma e tuberculose. Cadernos de Atenção Básica, n. 21. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.
11. Cappellini MD & Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*. 371(9606): 64-74, 2008.

12. Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, et al. TNF -308 GNA single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: A genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J Infect Dis*, 204:1256-1263, 2010
13. Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE, Alving AS. Enzymatic deficiency in primaquine sensitive erythrocytes. *Science*, 124:484-5, 1956.
14. Castro SM, Weber R, Matte U, Giugliani R. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in patients from the southern Brazilian city of Porto Alegre, RS. *Genet Mol Biol* 30: 10-13, 2007
15. Coura JR et al. Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos. In: *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara- Koogan, 2005.
16. Crettol S, Petrovic N, Murray M. Pharmacogenetics of phase I and phase II drug metabolism. *Curr Pharm Des*, 16(2):204-19, 2010.
17. DEPS, P. D.; NASSER, S.; GUERRA, P.; SIMON, M.; BIRSHNER, R.C.; RODRIGUES L. Adverse effects from Multi-drug therapy in leprosy: a Brazilian study. *Lepr Ver*, 78:216-222, 2007.
18. Garbino JA. O paciente com suspeita de hanseníase primariamente neural. *Hansen Int*, 32 (2):203-206, 2007.
19. Gelber R, Peters JH, Gordon GR, Glazko AJ, Levy L. The polymorphic acetylation of dapsone in man. *Clin Pharmacol Ther*. 12(2):225, 1971.-
20. Ghorpade A. Inoculation (tattoo) leprosy: a report of 31 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 16: 494-499, 2002
21. Girling DJ. Adverse reactions to rifampicin in antituberculosis regimens. *J Antimicrob Chemother*, 3: 115-132, 1977.
22. Gomez-Gallego F, Garrido-Pertierra A, Bautista JM. Structural defects underlying protein dysfunction in human glucose-6-phosphate dehydrogenase A(-) deficiency. *J Biol Chem*, 275:9256-9262, 2000.
23. GOULART, I.M.B.; ARBEX, G.L.; CARNEIRO. M.H.; RODRIGUES, M.S.; GADIA, R. Efeitos adversos da poliquimioterapia em pacientes com hanseníase: um levantamento de cinco anos em um Centro de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. *Revista da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical* ,35:453-460, 2002.

24. Guo R, Thormann W, Lauterberg B. Relationship between high incidence of adverse dapsone reactions and slow acetylate phenotype or low plasma/lymphocyte glutathione level. *Chin Med J*;109(12):933–6, 1996.
25. Grant AV, Alter A, Huong NT, Orlova M, Thuc NV, Ba NN, Thai VH, et al. Crohn's Disease Susceptibility Genes are Associated With Leprosy in the Vietnamese Population. *JID*, 206:1763–7, 2012.
26. Hamel, A.R., Cabral, I.R., Sales, T.S., Costa, F.F., Olalla Saad, S.T. Molecular heterogeneity of G6PD deficiency in an Amazonian population and description of four new variants. *Blood Cells Mol Dis*.2002;28:399–406.
27. Harboe, M., Hastings, R.C., et al. (1985). The Immunology of Leprosy. In: Hastings, R.C., et al., *Leprosy*, Churchill Livingstone, New York, 53-86.
28. Hedrick PW. Population genetics of malaria resistance in humans. *Heredity (Edinb)*,107(6):602, 2011.
29. Hirono A, Kuhl W, Gelbart T, Forman L, Fairbank VF, Beutler E. Identification of the binding domain for NADP⁺ of human glucose-6-phosphate dehydrogenase by sequence analysis of mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 10 015–17, 1989.
30. Huang CS, Hung KL, Huang MJ, Li YC, Liu TH, Tang TK. Neonatal jaundice and molecular mutations in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient newborn infants. *Am J Hematol*, 51:19–25, 1996
31. Hug H, Bagatto D, Dannecker R, Schindler R, Horlacher O, Gut J. ADRIS-The adverse drug reactions information scheme. *Clin Neuropharmacol*,13:276-772, 2003
32. Hughes DA, Vilar FJ, Ward CC, Alfirevic A, Park BK, Pirmohamed M. Cost-effectiveness analysis of HLA B*5701 genotyping in preventing abacavir hypersensitivity. *Pharmacogenetics*, 14:335-34, 2004
33. Ingelman-Sundberg. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *J Intern Med*, 250: 186±200, 2001

34. Iwai K, Hirono A, Matsuoka H, Kawamoto F, Horie T, Lin K, et al. Distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Southeast Asia. *Hum Genet*, 108:445–449, 2001.
35. Jopling WH. Side effects of antileprosy drugs in common use. *Leprosy Review*, 54:261-270, 1983.
36. Jopling WH. References to “side-effects of antileprosy drugs in common use”. *Leprosy Review*, 56:61-70, 1985.
37. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA*, 279:1200–1205, 1998.
38. Lucio Luzzatto and Ulrich Bienzle. Red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase status and pyruvate kinase activity in a Nigerian population. *Tropical Medicine and International Health* volume 5 no 2 pp 119–123 february, 2000.
39. Malhotra D, Darvishi K, Sood S, Sharma S, Grover C, et al. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Human genetics*, 118:295-300, 2005.
40. Marshall A. Getting the right drug into the right patient. *Nat Biotechnol*, 15: 1249±52, 1997.
41. Martinez TS, Figueira MM, Costa AV, Gonçalves MA, Goulart LR, Goulart IM. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clin Microbiol Infect*, 7(11):1653-8, 2010.
42. Matsumoto T, Ohno M, and Azuma J. Future of pharmacogenetics-based therapy for tuberculosis. *Pharmacogenomics*, Vol. 15, No. 5 , Pages 601-607, 2014.
43. MD Cappellini, G Fiorelli. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*, 371: 64–74, 2008
44. Meyer UA, Gut J. Genomics and the prediction of xenobiotic toxicity. *Toxicology* 181–182:463–466, 2002.
45. Ministério da Saúde (BR). Diário Oficial da União. Portaria Conjunta N 125, de 26 de março de 2009. Define ações de controle da hanseníase.
46. Ministério da Saúde (BR). Guia de controle da hanseníase. Brasília, DF: 3 edição; 2002.

47. Ministério da Saúde. Boletim da Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Doenças Endêmicas. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. Brasília. 2015.
48. Ministério da Saúde. Boletim da Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Doenças Endêmicas. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. Brasília. 2007.
49. Minucci, A., Moradkhani, K., Hwang, M.J., Zuppi, C., Giardina, B. & Capoluongo, E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the “old” and update of the new mutations. *Blood Cells Mol, Dis.* 48, 154–165, 2012.
50. Monteiro W M, Val F FA, Siqueira M A, Franca G P, Sampaio V S, Melo G C, Almeida, A C G, Brito M A M, Peixoto H M, Fuller D, Bassat Q, Romero G A S, Oliveira M R F, Lacerda M V G . G6PD deficiency in Latin America: systematic review on prevalence and variants *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 109(5): 553-568, 2014.*
51. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborcht PR, Pachecho AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev, 77(3):189-202, 2006.*
52. Moura LTR, Fernandes TRMO, Bastos LDM, Luna ICF, Machado LB. Hanseníase em menores de 15 anos na cidade de Juazeiro-BA. *Hansen. Int, 37(1): 45-50, 2012.*
53. Nath I, Saini C, Valluri VL. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. *Clinics in Dermatology, 33(1):90–8, 2015*
54. Neto J P M, Dourado M V, Reis M G, Gonçalves M S. A novel c.197T → A variant among Brazilian neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Genetics and Molecular Biology, 31, 1, 33-35, 2008.*
55. NETO, E.; JÚNIOR, M.; PUCCINELLI, M.; SATO, E. Dapsona no tratamento do lúpus eritematoso sistêmico com manifestações cutâneas, relato de dois casos e uma breve revisão de literatura. *Revista Sinopse de Reumatologia Edição: A 8 N, p 72-81, 2006.*
56. Pamba A, Richardson ND, Carter N, Duparc S, Premji Z, Tiono AB, Luzzatto L: Clinical spectrum and severity of hemolytic anemia in glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient children receiving dapsone. *Blood, 120: 4123-4133, 2012.*

57. 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. Gatton ML, ed. *PLoS ONE*. 10(11), 2015
58. Portaels F, Fissette K, De Ridder K, Macedo PM, De Muynck A, Silva MT. Effects of freezing and thawing on the viability and the ultrastructure of in vivo grown mycobacteria. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 56(4):580–7, 1988.
59. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 34(3): 255-73, 1966.
60. Roy S, McGuier W, Mascie-Taylor CGN, Saha B, Hazra SK, Hill AVS, et al. Tumor necrosis Factor Promoter Polymorphism and Susceptibility to Lepromatous Leprosy. *JID*, 176:530-533, 1997.
61. Santos AR, Almeida AS, Suffys PN, et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism (TNF2) seems to protect against development of severe forms of leprosy in a pilot study in Brazilian patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 68(3):325–327, 2000.
62. Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LMM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TWJ, Ottenhoff THM, Sampaio EP, Sarno EN. Role of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-10 Promoter Gene Polymorphisms in Leprosy. *JID*, 186:1687-1691, 2002.
63. Santos, S. E. B., and Guerreiro, J. F. The indigenous contribution for the formation of the population of the Brazilian Amazon region. *Rev. Brasil. Genet*, 18: 311–315, 1995.
64. Sundberg M I. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *Journal of Internal Medicine*, 250:186-200, 2001.
65. Vulliamy TJ, Kaeda JS, Ait-Chafa D, et al. Clinical and haematological consequences of recurrent G6PD mutations and single new mutation causing chronic non spherocytic haemolytic anaemia. *Br J Haematol*, 101: 670–75, 1998.

66. Weimer TA, Salzano FM, Westwood B, Beutler E. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants from Brazil. *Hum Biol*, 65: 41-47, 1993.
67. WHO (World Health Organization). Chemotherapy of leprosy for control programmes. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 675: 1-33, 1982.
68. WHO (World Health Organization). Global leprosy update, 2015: time for action accountability and inclusion. *Wkly Epidemiol Rec*. 91: 405-420, 2016.
69. WHO. The Final Push Strategy to Eliminate Leprosy as a Public Health Problem. 2003. http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CPE_CEE_200337.pdf. Accessed in May, 2007
70. World Health Organization. Study Group on Chemotherapy of leprosy for control programmes. *Technical Report Series. No. 675*. Geneva; 1982.