



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**

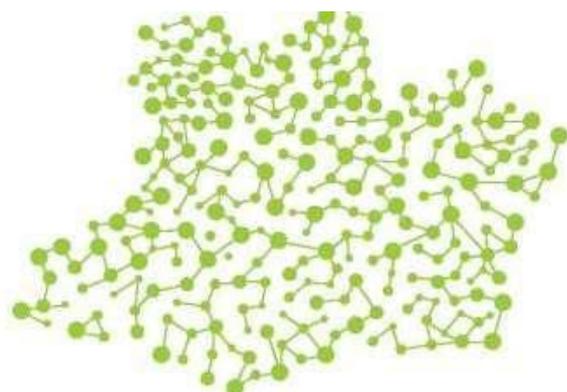


**FREQUÊNCIA DAS VARIANTES *1, *2, *3 E *17 DO CITOCROMO CYP2C19
ENTRE PORTADORES DE *Helicobacter pylori* ATENDIDOS EM MANAUS,
AMAZONAS, BRASIL**

EVERTON RICARDO DE ABREU NETTO

MANAUS

2020



EVERTON RICARDO DE ABREU NETTO

**FREQUÊNCIA DAS VARIANTES *1, *2, *3 E *17 DO CITOCROMO CYP2C19
ENTRE PORTADORES DE *Helicobacter pylori* ATENDIDOS EM MANAUS,
AMAZONAS, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção do grau de *Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas*.

Orientador: **Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira**

Co-orientador: **Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto**

Linha de pesquisa: Doenças infecciosas

MANAUS

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada de acordo com os dados oferecidos pelo(a) autor(a).

Netto, Everton Ricardo de Abreu
N476f Frequência das Variantes *1, *2, *3 e *17 do Citocromo CYP2C19
Entre Portadores de *Helicobacter pylori* Atendidos em Manaus,
Amazonas, Brasil / Everton Ricardo de Abreu Netto. 2020
71f.: il. Color; 31cm.

Orientador: Ferreira, Luiz Carlos de Lima
Co-orientador: Moura Neto, José Pereira de
Dissertação (Doenças Tropicais e Infecciosas - Mestrado) -
Universidade do Estado do Amazonas.

1. Polimorfismo. 2. Metabolizadores de Drogas. 3. *Helicobacter pylori*. 4. Inibidor de Bomba de Prótons. I. Ferreira, Luiz Carlos de Lima II. Universidade do Estado do Amazonas III. Título

FOLHA DE JULGAMENTO**FREQUÊNCIA DAS VARIANTES *1, *2, *3 E *17 DO CITOCROMO
CYP2C19 ENTRE PORTADORES DE *Helicobacter pylori*
ATENDIDOS EM MANAUS, AMAZONAS, BRASIL****EVERTON RICARDO DE ABREU NETTO**

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

Presidente

Membro

Membro

À Maria Aparecida, amor da minha vida, companheira, confidente, conselheira; que dividiu comigo as tristezas e alegrias, fracassos e sucessos, durante todos os momentos da criação dessa obra.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos. Tantos e tanto a agradecer. São muitas as emoções ao lembrar todos os momentos vivenciados até aqui.

Agradeço ao meu Deus, soberano, criador e mantenedor de todo o universo, por seu amor absoluto a uma criatura imperfeita e pecadora como eu; que me guiou, provou, preparou e capacitou para este momento tão especial. A Ele toda honra e glória!

Aos meus pais, que sempre me amaram, lançaram as bases do meu caráter e despertaram em mim a paixão pelo conhecimento.

À minha amada esposa, Maria Aparecida, meu presente de Deus, companheira de uma longa jornada, sempre presente na alegria e na tristeza, na saúde e na doença, nos bons e maus dias, que não só motivou-me mesmo nos momentos mais difíceis, como também contribuiu direta e indiretamente em todas as etapas deste trabalho, desde o projeto até a conclusão.

Às minhas filhas, Rebeca, Rafaela e Renata, que quando pequenas, frágeis e inocentes me ensinaram o que é o amor incondicional e puro, de alguém que acredita que o pai tudo sabe e tudo pode, e agora, já crescidas, conhecedoras de minhas limitações, não só foram pacientes com minhas diversas ausências e demoras como também contribuíram ativamente com suas habilidades diversas na execução desta obra.

Ao Dr. Luiz Ferreira, meu orientador, que acreditou em mim e aceitou o desafio de orientar-me nessa empreitada, ensinando, estimulando, questionando, levando-me além dos meus limites mas, principalmente, não deixando que eu desistisse no meio do caminho; não bastando isso, abriu-me as portas do laboratório de patologia e participou ativamente na análise dos exames histológicos.

Meus profundos agradecimentos ao Dr. José Neto, meu coorientador nesta empreitada, que não só somou seu conhecimento ímpar das técnicas de genotipagem como ofereceu sua amizade, e que colocou à disposição as instalações da FCF-UFAM para realização da pesquisa dos alelos, e foi além, contribuindo na coleta e análise dos dados.

À médica patologista Monique Freire, que também contribuiu ativamente nas diversas etapas de elaboração e execução do projeto, sempre propondo soluções e alternativas a cada percalço do caminho, indo muito além das análises histológicas.

Aos professores doutores Wuelton Monteiro, Vanderson Sampaio e Daniel Castro, que iluminaram meu caminho quanto ao desenho do estudo e análises estatísticas necessárias para enriquecimento do projeto.

A todos os professores do PPGMT que tive o privilégio de ser aluno nas disciplinas em que me inscrevi, que contribuíram sem exceção para meu crescimento não só como aluno, mas também como ser humano.

Aos meus colegas de curso, muitos com idade para serem meus filhos, que me receberam de braços abertos, e que também contribuíram com seus saberes para meu aprimoramento, mas principalmente que me deram sua amizade e compartilharam comigo um pouco de si próprios.

Às equipes da endoscopia, da patologia, do ambulatório, do laboratório de análises clínicas, do agendamento, que sem ganhar um centavo a mais pelo trabalho que tiveram, ainda assim no desempenho de suas funções contribuíram para a execução do projeto.

Às diretorias das instituições e gerências dos diversos departamentos envolvidos que, sem exceção, contribuíram ao ceder instalações e pessoal para a execução do projeto, mesmo sem existir financiamento específico para tal fim.

Às incansáveis Conceição Tufic e Altariza Freitas, sempre dispostas a esclarecer nossas dúvidas, bem como tendo carinho e paciência ao cobrar os relatórios, cartas, atualizações de currículo e demais trâmites legais necessários para o bom andamento do curso.

À Universidade do Estado do Amazonas e à Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, por proporcionarem esse programa de pós-graduação de tão alto nível.

A todos pacientes que aceitaram fazer parte do projeto, entregando confiadamente uma parte de suas vidas, de sua intimidade, de seus sonhos, fornecendo os dados colhidos sem os quais não haveria este estudo.

A você, que não teve seu nome, sua função ou departamento textualmente citados, mas que sabe que contribuiu para o sucesso deste trabalho, meus eternos agradecimentos.

Todos vocês sem exceção contribuíram para o sucesso deste projeto, um projeto realizado sem bolsa e sem financiamento específico, num país onde mesmo com esses auxílios a pesquisa se faz à custa de muito sangue, suor e lágrimas.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

(Isaac Newton)

RESUMO

O citocromo P450 é uma superfamília de hemoproteínas, ligada nos seres humanos a vias enzimáticas responsáveis pela metabolização de diversos substratos endógenos e exógenos. É altamente polimórfico, com variantes que podem ser neutras, causar perda ou ganho de função quando comparadas ao alelo selvagem. Para o presente estudo tem importância o citocromo 2C19 (CYP2C19), que conta com 32 variantes e 18 subvariantes já catalogadas, e cujas manifestações fenotípicas podem se dar como metabolizadores lentos, intermediários, rápidos e ultrarrápidos. O CYP2C19 é a principal enzima envolvida no metabolismo dos inibidores de bomba de prótons (IBPs). Os IBPs tem papel importante nos esquemas de tratamento para erradicação do *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), que é o fator de risco mais relevante para adenocarcinoma gástrico e linfoma MALT, e o principal agente etiológico da gastrite crônica e úlcera péptica. Um dos principais fatores para o insucesso de seu tratamento é o polimorfismo do CYP2C19. Além do gene original (*1), tem importância clínica dois polimorfismos que causam perda de função (*2 e *3) e outro que causa ganho de função (*17). Foi realizado um estudo observacional transversal, cujo objetivo foi estimar a frequência das variantes *1, *2, *3 e *17 do citocromo CYP2C19 entre portadores de *Helicobacter pylori* atendidos em Manaus. Dos 78 pacientes recrutados e que foram submetidos à endoscopia digestiva alta (EDA) com biópsia para estudo histopatológico e pesquisa de *H. pylori*, 50 pacientes *H. pylori* + foram selecionados. Desse grupo foi coletado sangue venoso periférico e realizada a genotipagem dos alelos *2, *3 e *17 do CYP2C19 através de qPCR. Desses 50 indivíduos, 22 são do sexo masculino e 28 do sexo feminino. Sua idade variou de 18 a 67 anos, com idade média de 40,24 anos. Eles foram classificados em grupos raciais por autodeclaração, baseados nas categorias do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE): 8 brancos, 39 pardos, 2 negros, e 1 indígena. A infecção por *H. pylori* foi classificada pelo sistema de cruzes, com 15 apresentando densidade bacteriana leve (+), 15 com moderada (++) e 20 com densidade acentuada (+++). A genotipagem do CYP2C19 mostrou uma frequência de 20% para o *2 (2% homozigotas e 18% heterozigotas), 10% para o *3 (2% homozigotas e 8% heterozigotas) e 30% para o *17 (4% homozigotas e 26% heterozigotas). Baseado no perfil fenotípico, os indivíduos foram classificados como metabolizadores lentos (10%), intermediários (2%), rápidos (58%) e ultrarrápidos (20%). Apesar da percentagem encontrada do alelo *3 ter sido maior que a esperada, a percentagem do alelo *17, um possível contribuidor para a falha na erradicação do *H. pylori*, foi significativa. A população parda de Manaus mostrou um padrão genotípico semelhante ao de populações caucasianas descritas em estudos prévios. Nossos resultados mostram que pequenas populações podem ter particularidades genéticas relevantes para os desfechos terapêuticos.

Palavras-chave: Polimorfismo; Metabolizadores de Drogas; *Helicobacter pylori*; Inibidor de Bomba de Prótons.

ABSTRACT

Cytochrome P450 is a superfamily of hemoproteins, linked in humans to enzymatic pathways responsible for the metabolization of various endogenous and exogenous substrates. It is highly polymorphic, with variants that can be neutral, cause loss or gain of function when compared to the wild allele. With importance for this study, the cytochrome 2C19 (CYP2C19) has 32 variants and 18 subvariants already cataloged, and its phenotypic manifestations can occur as poor, intermediate, extensive or ultra-rapid metabolizers. CYP2C19 is the main enzyme involved in the metabolism of proton pump inhibitors (PPIs). PPIs play an important role in treatment regimens for the eradication of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), which is the most relevant risk factor for gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma, and the main etiological agent of chronic gastritis and peptic ulcer. One of the main factors for the failure of its treatment is CYP2C19 polymorphism. In addition to the original gene (*1), two polymorphisms that cause loss of function (*2 and *3) and another that cause a gain of function (*17) are of clinical importance. A cross-sectional observational study was carried out, whose objective was to estimate the frequency of cytochrome CYP2C19 variants *1, *2, *3 and *17 among *Helicobacter pylori* patients treated in Manaus. Of the 78 patients recruited and who underwent upper digestive endoscopy with biopsy for histological study and *H. pylori* research, 50 *H. pylori* + patients were selected. From this group, peripheral venous blood was collected, and genotyping of the *2, *3, and *17 alleles of CYP2C19 was performed using qPCR. Of these 50 individuals, 22 are male and 28 female. Their age varied from 18 to 67 years old, with the mean age being 40.24 years old. They were classified into racial groups by self-declaration, based on the categories of the official Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE): 8 whites, 39 browns, 2 blacks, and 1 indigenous. The *H. pylori* infection was classified by the crosses system, with 15 presenting mild infection (+), 15 with moderate infection (++) and 20 with severe infection (+++). Genotyping of CYP2C19 showed a frequency of 20% for *2 (2% homozygotes and 18% heterozygotes), 10% for *3 (2% homozygotes, and 8% heterozygotes) and 30% for *17 (4% homozygotes and 26% heterozygotes). Based on the phenotypic profile, individuals were classified as poor (PM, 10%), intermediate (IM, 2%), extensive (EM, 58%), and ultra-rapid (UM, 20%) metabolizers. Although the percentage found of the *3 allele was higher than expected, the percentage of the *17 allele, a possible contributor to the failure to eradicate *H. pylori*, was significant. The brown population of Manaus showed a genotypic pattern similar to that of Caucasian populations described in previous studies. Our results show that small populations may have genetic particularities relevant to therapeutical outcomes.

Keywords: Polymorphism; drug metabolizers; *Helicobacter pylori*; Proton Pump Inhibitor.

RESUMO LEIGO

O citocromo P450 é uma família de enzimas responsável pelo processamento de diversas substâncias, como alimentos e medicamentos que usamos. Um grupo de medicamentos, chamado de inibidores de bombas de prótons (IBPs), é processado por uma enzima dessa família conhecida como CYP2C19. Os IBPs são importantes no tratamento para a destruição do *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), uma bactéria que pode causar gastrites, úlceras e cânceres no estômago. As pessoas podem ter essa enzima alterada, e quando isso acontece o tratamento pode não dar certo. Por isso foi feito este estudo, para descobrir qual a chance das pessoas que moram em Manaus terem essa enzima alterada. O estudo foi feito com 50 pessoas, 22 homens e 28 mulheres, de 18 a 67 anos de idade. De acordo com a declaração dessas pessoas, eram 8 brancos, 39 morenos, 2 negros, e 1 indígena. Testes genéticos foram feitos para saber o tipo da enzima CYP2C19 que essas pessoas possuem, e assim foi descoberto que 10% deles tem uma enzima que funciona bem pouco, 2% tem uma enzima que funciona um pouco menos, 58% tem a enzima normal e 20% deles tem uma enzima que funciona mais que a normal. O número de pessoas que tem a enzima que funciona menos foi maior do que o esperado, mas foi encontrado também um grande número de pessoas com enzimas que funcionam mais que o normal, o que pode fazer com que o tratamento para destruir o *H. pylori* não funcione. Apesar da maioria das pessoas desse estudo ser morenas, os resultados foram parecidos com outros estudos feitos com pessoas brancas. Os resultados desse estudo mostram que pequenos grupos de pessoas podem ter características diferentes das esperadas, o que pode ser importante na escolha do melhor tratamento para muitas doenças.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Nomenclatura do CYP450

Figure 1. Most frequent endoscopic findings

Figure 2. Distribution of histological findings of gastric biopsies with inflammation in recruited patients

LISTA DE TABELAS

Table 1. Frequency of analyzed variants

Table 2. Distribution of allele's frequencies according to ethnicity, the intensity of gastritis and quantity of *H. pylori*

Table 3. Distribution of the genotypic findings according to the expected phenotypes

Supplementary Table 1. Ethnic distribution accordingly to gender

Supplementary Table 2. Complaints reported by patients according to gender

Supplementary Table 3. Complaints reported according to the bacillary density found

Supplementary Table 4. The different endoscopic and histological diagnostics

Supplementary Table 5. Histological findings and *H. pylori*

Supplementary Table 6. qPCR results by subject and ethnicity

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação dos P450s humanos baseada nas classes de substratos

Quadro 2. Variantes da CYP2C19 com interesse clínico

Quadro 3. Diferentes manifestações fenotípicas das variantes do CYP2C19

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

CYP2C19 – citocromo P450 2C19

DNA – *deoxyribonucleic acid*– ácido desoxirribonucleico

EDA – endoscopia digestiva alta

EDTA – *ethylenediamine tetraacetic acid*– ácido etilendiamino tetra-acético

EM – *extensive metabolizers* – metabolizadores rápidos

H. pylori – *Helicobacter pylori*

IM – *intermediate metabolizers* – metabolizadores intermediários

IBP – inibidor de bomba de prótons

MALT – *mucosa associated lymphoid tissue*– tecido linfoide associado à mucosa

PCR – *polimerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase

PM – *poor metabolizers* – metabolizadores lentos

UM – *ultra-rapid metabolizers* – metabolizadores ultrarrápidos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos históricos e características	1
1.2	Nomenclatura	1
1.3	Polimorfismo	3
1.4	CYP2C19	3
1.4.1	Variantes alélicas	3
1.4.2	Manifestações fenotípicas	4
1.5	Genotipagem	4
1.5.1	PCR em tempo real	5
1.6	Relevância	5
2	OBJETIVOS	6
2.1	Objetivo geral	6
2.2	Objetivos específicos	6
3	PRODUTO DA DISSERTAÇÃO	7
3.1	Manuscrito redigido conforme normas da revista <i>Asian Pacific Journal of Cancer Prevention</i> , utilizando o arquivo Template_APJCP.docx:	7
4	LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS	33
5	CONCLUSÃO	34
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
7	ANEXOS E APÊNDICES	38
7.1	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	38
7.2	FICHA DE COLETA DE DADOS	42
7.3	ANÁLISE MOLECULAR	44

7.3.1	Procedimento Operacional Padrão para Coleta e Preparação das Amostras.....	44
7.3.2	Extração do DNA Genômico.....	44
7.3.3	Genotipagem	46
7.4	PARECER ÉTICO CEP.....	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos históricos e características

O citocromo P450 é um pigmento celular da classe das hemoproteínas, que tem sido pesquisado ao redor do mundo há mais de 55 anos, com diversos cientistas dedicando suas vidas a essas pesquisas. O sucesso dessas pesquisas tem contribuído em diversos campos do saber, como medicina, agricultura e biotecnologia (1), sendo que até o presente momento temos 48990 artigos publicados (<http://webtools.mf.uni-lj.si/public/medsum.html>, em 10/02/2020).

O P450 foi identificado pela primeira vez em 1958 por Garfinkel nos microsossomos de porcos (2), e por Klingenberg nos microsossomos de ratos (3), porém foi apenas em 1962 que Omura e Sato (4) demonstraram que ele absorve a luz em 450 nm, característica essa que acabou sendo utilizada para a denominação dessa classe de proteínas.

Em 1965, Cooper e cols. (5) comprovaram a função enzimática do citocromo P450, sendo que apenas em 2010 Omura evidenciou a existência de três diferentes sistemas enzimáticos ligados ao P450 (6). Entre 1967 e 1969, Alvares e cols.(7), Hildebrandt e cols. (8) e Sladek e Mannering (9) sugeriram a existência de múltiplos P450s. Finalmente, em 2004, Nelson e cols. descreveram 57 genes da superfamília P450 humana (10), e em 2005 Guengerich (11) os dividiu de acordo com os diferentes tipos de substrato em que eles atuam, quais sejam esteroides, xenobióticos, ácidos graxos, eicosanoides e vitaminas. Se por um lado o número de genes do P450 no organismo humano já é conhecido, ainda existem várias subfamílias com substrato desconhecido (Quadro 1).

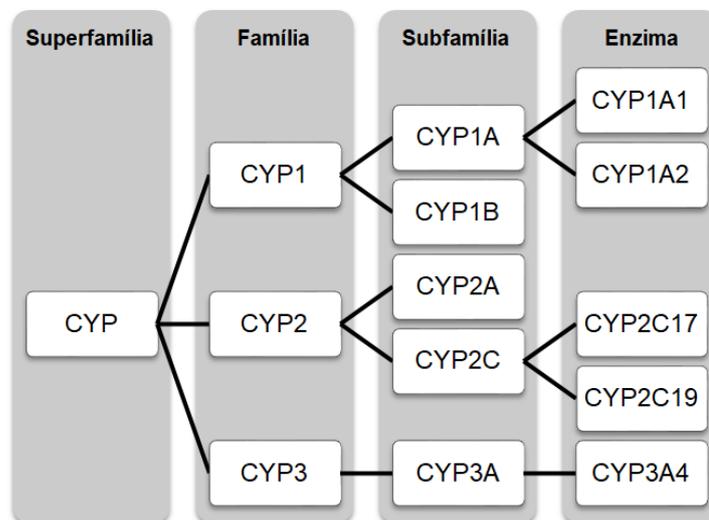
1.2 Nomenclatura

O sistema de nomenclatura utilizado pela comunidade científica internacional para os P450s foi proposto por Nebert e cols. em 1987 (12), como resultado dos esforços do *Committee on Standardized Nomenclature of the P450 Genes*, para acabar com a grande diversidade de nomenclaturas até então presente. Esse sistema é mantido desde 1995 por Nelson (13). Utiliza o símbolo “CYP” para citocromo P450, que abrange toda a superfamília de proteínas P450. A superfamília é dividida em famílias, cujos membros são proteínas que compartilham ao menos 40% dos aminoácidos, e são designadas por números (CYP1, CYP2, CYP3, etc.). As famílias são divididas em subfamílias, cujos membros compartilham ao menos 55% dos aminoácidos, e são identificadas por letras (CYP1A, CYP1B, CYP2A, etc.). Finalmente as subfamílias são compostas por proteínas individuais, identificadas por um número específico (CYP1A1, CYP1A2, etc.) (Figura 1).

Quadro 1. Classificação dos P450s humanos baseada nas classes de substratos

Esteroides	Xenobióticos	Ácidos graxos	Eicosanoides	Vitaminas	Desconhecido
1B1	1A1	2J2	4F2	2R1	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	24A1	2S1
7B1	2A6	4B1	4F8	26A1	2U1
8B1	2A13	4F12	5A1	26B1	2W1
11A1	2B6	-	8A1	26C1	3A43
11B1	2C8	-	-	27B1	4A22
17A1	2C18	-	-	-	4F11
19A1	2C19	-	-	-	4F22
21A2	2D6	-	-	-	4V2
27A1	2E1	-	-	-	4X1
39A1	2F1	-	-	-	4Z1
46A1	3A4	-	-	-	20A1
51A1	3A5	-	-	-	27C1
-	3A7	-	-	-	-

Fonte: Guengerich, 2005

**Figura 1.** Nomenclatura do CYP450

1.3 Polimorfismo

Desde a descoberta de indivíduos com erros inatos de metabolismo, suspeitou-se da existência de diferenças no P450 desses indivíduos, quando comparados à população geral, que ocasionaria perda de função. Porém, apenas com o advento da tecnologia de DNA recombinante é que passou a ser possível caracterizar essas variações (14). A essas diferenças dá-se o nome de polimorfismo, que é definido como uma variação do alelo original, que necessita estar presente em ao menos 1% da população (abaixo de 1% é considerado como mutação) (15), e que é transmitida como uma herança mendeliana (16).

Os polimorfismos podem ocorrer por variação de um único nucleotídeo, microdeleção ou microinserção. Essas variações podem ser neutras, causar perda ou causar ganho de função, quando comparadas ao alelo selvagem (17). A repetição desses polimorfismos em múltiplos genomas faz com que a variante possa ser catalogada na *Human CYP Allele Nomenclature Database*. Isso é realizado de acordo com um sistema de nomenclatura padrão de alelos estabelecido pela *Human Genome Nomenclature Society*, os “alelos estrela” (*). A nova variante também recebe um número de identificação único (rs). Essa base de dados tem sido catalogada e revisada por uma comunidade online de pesquisadores, e desde 2017 está disponível para consulta em www.pharmvar.org, onde estão publicados mais de 660 alelos, variantes de 29 genes da superfamília P450.

Por serem transmitidas como herança mendeliana, essas variantes podem ocorrer em cada indivíduo de forma homocigota ou heterocigota (16), e uma vez que ocorrem em locais diferentes dos genes, os indivíduos podem apresentar mais de uma variante ao mesmo tempo (18).

1.4 CYP2C19

Para o presente estudo, é de particular interesse a enzima CYP2C19, que é responsável pela metabolização de diversos xenobióticos, dentre os quais os inibidores de bomba de prótons (IBPs). Os IBPs desempenham importante função no tratamento para erradicação do *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), bactéria prevalente em 44,3% da população mundial (19), e que é reconhecida como o fator de risco mais relevante para o adenocarcinoma gástrico e linfoma MALT, e o principal agente etiológico da gastrite crônica e da úlcera péptica (20,21). O interesse pela CYP2C19 deve-se ao fato de estar havendo um crescente aumento de falha terapêutica na erradicação do *H. pylori* a nível mundial. Esse aumento está ocasionando uma busca por novos tratamentos, além de formas de melhorar o sucesso dos tratamentos existentes.

1.4.1 Variantes alélicas

A CYP2C19 tem catalogados até o momento 32 variantes e dentro delas mais 18 subvariantes, sendo que de interesse clínico temos as variantes *2 (rs4244285) e a *3 (rs4986893), que causam perda de função, e a variante *17 (rs12248580), que causa ganho de função (Quadro 2) (22).

Quadro 2. Variantes da CYP2C19 com interesse clínico

Gene (polimorfismo)	Ref. SNP ID	Consequência	Frequência (%) entre caucasianos ^a e afro-americanos ^b	
CYP2C19*1 (Selvagem)	-	Normal	69,6	80,2
CYP2C19*2 (Pro227Pro)	rs 4244285	Perda de função	14,9	22,2
CYP2C19*3 (Trp212Ter)	rs 4986893	Perda de função	0,7	0
CYP2C19*17 (-806C>T)	rs 12248560	Ganho de função	20,2	17,9

^a Calculado a partir de dados de 2.856 alelos obtidos de cinco populações distintas: americana, britânica, hispana, turca e italiana.

^b Calculado a partir de dados de 682 alelos obtidos de duas populações distintas: afro-americana e etíope.

^c Quando o nível de qualquer variante não foi determinado, a frequência residual foi estimada como *1.

Adaptado de Yamazaki, 2014.

1.4.2 Manifestações fenotípicas

Os diferentes alelos podem se manifestar fenotipicamente na forma de metabolizadores lentos (PM – *poor metabolizers*), metabolizadores intermediários (IM – *intermediate metabolizers*), metabolizadores rápidos (EM – *extensive metabolizers*) ou metabolizadores ultrarrápidos (UM – *ultra-rapid metabolizers*), conforme resultado das diferentes combinações que podem ocorrer (Quadro 3) (17).

Quadro 3. Diferentes manifestações fenotípicas das variantes do CYP2C19

Manifestação Fenotípica	Genótipos		
Metabolizador Lento (PM)	*2/*2	*2/*3	*3/*3
Metabolizador Intermediário (IM)	*1/*2	*1/*3	
Metabolizador Rápido (EM)	*1/*1		
Metabolizador Ultrarrápido (UM)	*17/*17	*1/*17	
Incerta	*2/*17	*3/*17	*2/*3/*17

Adaptado de Samer e cols., 2013

1.5 Genotipagem

É um processo realizado através de técnicas laboratoriais de biologia molecular para analisar e descrever o DNA em partes ou em seu todo. Pode ser utilizada para pesquisar o genótipo de um indivíduo em busca de um gene ou um erro específico em um gene. Essa informação obtida pode então ser comparada com a sequência de outros indivíduos ou com uma sequência de referência (15).

Um grande passo nessa direção foi o sequenciamento de DNA desenvolvido por Sanger em 1977 (23), que ao sequenciar centenas de bases de uma só vez permitiu a identificação de diversos genes. Outra técnica que merece destaque é reação em cadeia da polimerase (PCR), desenvolvida por Mullis em 1984 (24), que tornou possível o sequenciamento de DNA em larga escala. Usando essas duas técnicas como base, o Projeto Genoma Humano (25), pôde mapear o genoma humano, abrindo assim as portas da ciência para inúmeras possibilidades de pesquisas, com descobertas relevantes para a humanidade.

1.5.1 PCR em tempo real

Desde a publicação da técnica do PCR, diversos pesquisadores buscaram simplificar e aprimorá-la, com o intuito de aumentar sua qualidade, baixar os custos e ser o menos operador-dependente possível (26,27) até que, em 1992, Higuchi e cols. (28) descreveram uma nova técnica que seria a primeira homogênea, ao poder ser realizada em tubo fechado, sem necessidade de manipulações intermediárias. Além disso, ao permitir monitoração das reações em tempo real, essa nova técnica possibilitou a automação do processo, facilitando sua universalização. Surgia o PCR quantitativo em tempo real (qPCR), técnica utilizada no presente estudo.

O qPCR permite a detecção da sequência alvo mesmo com pequenas quantidades de DNA disponíveis, e usa sondas específicas que, uma vez ligando-se ao alvo, vão emitir um sinal fluorescente, que é então detectado pelo equipamento, evidenciando a presença da sequência alvo na amostra em análise (29). Para nosso estudo foram utilizadas sondas comerciais desenvolvidas especificamente para detecção da presença dos SNPs *2 (rs 4244285), *3 (rs 4986893) e *17 (rs 12248560).

1.6 Relevância

Uma vez que algumas variantes da CYP2C19 podem interferir na forma como ela metaboliza os IBPs, é de vital importância para a epidemiologia do *H. pylori* conhecermos o perfil genotípico e fenotípico de nossa população, para que possamos customizar a dosagem das drogas atualmente em uso, otimizando assim os resultados do tratamento instituído sem necessitar de grandes investimentos, enquanto em outras frentes de pesquisa são procurados novos esquemas terapêuticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estimar a frequência das variantes *1, *2, *3 e *17 do citocromo CYP2C19 entre portadores de *Helicobacter pylori* atendidos em Manaus.

2.2 Objetivos específicos

1. Descrever as características endoscópicas das gastrites por *Helicobacter pylori*.
2. Descrever as características morfológicas das gastrites por *Helicobacter pylori*.
3. Relacionar os achados histológicos e a quantidade de *Helicobacter pylori*.
4. Relacionar os achados histológicos das gastrites com as variantes.
5. Relacionar os achados da quantidade de *Helicobacter pylori* com as variantes.
6. Descrever as características sócio-demográficas do grupo estudado.

3 PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

3.1 Manuscrito redigido conforme normas da revista *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, utilizando o arquivo *Template_APJCP.docx*:

Title:

Frequency of the Variants *1, *2, *3, and *17 of CYP2C19 Cytochrome Among *Helicobacter pylori* Carriers From Manaus, Amazonas, Brazil

Authors:

Everton Ricardo de Abreu Netto^{1,2}, Rebeca Linhares de Abreu Netto³, Monique Freire Santana^{4,5}, José Pereira de Moura Neto⁶, Luiz Carlos de Lima Ferreira⁴.

Affiliations:

- 1) Serviço de Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva, Hospital Adventista de Manaus, Manaus, Brazil.
- 2) Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil.
- 3) Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil.
- 4) Departamento de Patologia, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil.
- 5) Departamento de Ensino e Pesquisa, Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas, Manaus, Brazil.
- 6) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil.

Running title:

CYP2C19 variants among *H. pylori* carriers

Corresponding Author:

Everton Ricardo de Abreu Netto

Address: Departamento de Gastroenterologia, Hospital Adventista de Manaus, 139 Governador Danilo Areosa Ave, Distrito Industrial, Manaus - AM, Brazil, CEP 69075-351.

Phone: +55-92-2123-1425

E-mail: enetto@uea.edu.br

Statement Conflict of Interest:

The authors have no conflicts of interest.

Abstract

Objective: The objective of the present study was to estimate the frequency of CYP2C19 cytochrome variants *1, *2, *3, and *17 among *Helicobacter pylori* carriers attended at Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) from Manaus - AM.

Methods: From 78 recruited individuals who underwent upper gastrointestinal endoscopy with biopsy and histological test, 50 found positive for *H. pylori* were selected. In this group, peripheral blood was collected, and CYP2C19 *2, *3, and *17 alleles were genotyped by qPCR.

Result: A total of 50 individuals *H. pylori* + were selected, 22 male and 28 female. Their age varied from 18 to 67 years old, with the mean age being 40.24 years old. Racial groups were classified by self-declaration, based on the official *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística* (IBGE) categories: 16% (8) white, 78% (39) brown, 4% (2) black, and 2% (1) indigenous. The *H. pylori* infection was classified by the crosses system, with 30% (15) being mild infection (+), 30% (15) moderate infection (++), and 40% (20) severe infection (+++). CYP2C19 genotypes results showed a frequency of 2% homozygote and 18% heterozygote for *2, 2% homozygote and 8% heterozygote for *3, and 4% homozygote and 13% heterozygote for *17. Based on the phenotypic profiles, the individuals were classified as poor metabolizers (PM, 10%), intermediate metabolizers (IM, 2%), extensive metabolizers (EM, 58%), and ultra-rapid metabolizers (UM, 20%).

Conclusion: Even though the percentage of the allele *3 found was higher than expected, the percentage of the allele *17, a possible contributor for *H. pylori* eradication failure, was significant. The brown population from Manaus showed a genotypic pattern closer to the Caucasian populations described in previous studies. Our results show that small populations may have genetic particularities relevant to therapeutical outcomes.

Keywords: Polymorphism; drug metabolizers; *Helicobacter pylori*; Proton Pump Inhibitor.

Introduction

Cytochrome P450 (CYP, P450) is a hemoprotein-class cellular pigment that has been researched around the world for over 55 years, with several scientists devoting their lives to these researches. The success obtained in the researches has contributed to several fields of knowledge, such as medicine, agriculture and biotechnology (Yamazaki, 2014), and there are 48,990 articles published to date (<http://webtools.mf.uni-lj.si/public/medsum.html>, on 02/10/2020).

Since the discovery of individuals with inborn errors of metabolism, it has been suspected that these individuals differ in P450 when compared to the general population, which would lead to loss of function. However, only with the advent of recombinant DNA technology has it become possible to characterize these variations (White et al., 1984). These differences are called polymorphism, which is defined as a variation of the original cytochrome, which needs to be present in at least 1% of individuals in a population, and which is transmitted as a Mendelian inheritance (Kallow, 1962 in: Yamazaki, 2014).

Polymorphisms may occur by single nucleotide variation, microdeletion or microinsertion. These variations may be neutral, cause loss or gain of function when compared to the wild allele (Samer et al., 2013). The variants are cataloged in the Human CYP Allele Nomenclature Database, according to a standard allele nomenclature system established by the Human Genome Nomenclature Society, the "star alleles" (*). Each variant also receives a unique identification number (rs). This database has been cataloged and reviewed by an online community of researchers, and since 2017 is available for consultation at www.pharmvar.org, where more than 660 alleles, variants of 29 P450 superfamily genes, are published.

Of particular interest to the present study is the enzyme CYP2C19, which has so far cataloged 32 variants and 18 sub variants within them, and of clinical interest are variants *2 (Pro227Pro, rs4244285) and *3 (Trp212Ter, rs4986893), which cause loss of function, and variant *17 (-806C>T, rs12248580), which causes gain of function (Lee, 2013). CYP2C19 is responsible for the metabolization of various xenobiotics, including proton pump inhibitors (PPIs).

PPIs play an important role in the treatment for eradication of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), a bacterium prevalent in 44.3% of the world population (Zamani et al., 2018), that is recognized as the most relevant risk factor for gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma, and the main etiological agent of chronic gastritis and peptic ulcer (Malfertheiner et al., 2017; Coelho et al., 2018). The interest in CYP2C19 is because there is a growing increase in therapeutic failure in the eradication of *H. pylori* worldwide. This increase is leading to the search for new treatments and ways to improve the success of existing ones.

Since CYP2C19 variants interfere with the way it metabolizes PPIs, it is vitally important for *H. pylori* epidemiology to know the genotypic and phenotypic profile of our population so that we can customize the dosage of drugs currently in use, optimizing thus the results of the treatment instituted without requiring large investments, while in other research fronts new therapeutic schemes are sought.

Materials and methods

Study model

An observational cross-sectional study was performed. Participants were selected without distinction of gender, color, health status, class or social group, respecting the inclusion and non-inclusion criteria among patients referred to the Serviço de

Endoscopia Digestiva da FMT-HVD for upper GI endoscopy with *H. pylori* research as requested by a physician.

Sampling plan

Between August 2018 and May 2019, 78 individuals underwent upper GI endoscopy with biopsy and histological test. From these, 50 individuals positive for *H. pylori* were selected. In this group, molecular techniques were performed to search CYP2C19 *2, *3, and *17 genotypes by qPCR.

Including criteria

Adults of both genders, aged between 18 and 70 years old, *H. pylori* carriers, with the presence of infection confirmed by histological examination of antral and gastric body mucosa fragments, signing of the Informed Consent Form (ICF) after duly clarified about the study objectives were included.

Non-including criteria

Patients submitted to previous treatment for *H. pylori*; with previous gastric surgery; immunosuppressed; which had used antimicrobials within 30 days before performing upper endoscopy; in use of anticoagulants (to prevent gastric biopsies), or non-*H. pylori* carriers, with the absence of infection confirmed by histological examination of antral and gastric body mucosa fragments, were not included.

Clinical Procedures

Patients referred for upper endoscopy with gastric biopsy were submitted to a previous interview, where they were invited to participate in the study. After being properly instructed, the individuals who agreed to participate in the study signed the ICF and had their procedure scheduled.

During the endoscopic procedure, four biopsy fragments were collected, one at large and one at small antral curvature, one at large and one at small curvature of the

gastric body, for histological analysis with *H. pylori* research. Upon delivery of the biopsy report and therapeutic approach, five (5.0) cc of peripheral blood was collected from the patients and stored for later analysis of the CYP2C19.

Upon completion of patient recruitment, previously stored peripheral blood samples were subjected to real-time PCR (qPCR) research of *2, *3, and *17 alleles.

Histological analysis

The specimens for histological analysis were placed in 10% buffer formalin solution and routinely processed. The hematoxylin and eosin stain and Warthin-Starry stain were used for the identification of *H. pylori*. The quantification of chronic inflammation, the activity of gastritis, and *H. pylori* was done according to the updated Sydney classification (Dixon et al., 1996), Mild (1+), Moderate (2+) and Severe (3+).

Genotyping

SNPs genotyping was conducted using TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) on a QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The probes used were: CYP2C19*2 (Pro227Pro) rs4244285; CYP2C19*3 (Trp212Ter) rs4986893; CYP2C19*17 (-806C>T) rs12248560. The genotypic frequencies for polymorphisms were analyzed according to the expected by Hardy-Weinberg equilibrium.

Samples in which none of the three alleles were found were considered type *1 (wild), whereas the other alleles described in the literature have a statistically non-significant occurrence among the general population (Samer et al., 2013; Zhou et al., 2017).

Ethical issues

The present study is part of a larger ongoing project entitled "*Helicobacter pylori* Eradication Rate Among CYP2C19 Cytochrome *1, *2, *3 and *17 Variant Carriers Attended In Manaus, Amazonas, Brazil", which was submitted for evaluation by the FMT-HVD Research Ethics Committee, approved under number CAAE 87246218.4.0000.0005.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed in Stata SE™ 13 software (StataCorp, USA). P-values <0.05 were considered significant. The analysis of qualitative or categorical variables of three or more groups was performed by the non-parametric Chi-square test (x2), corrected by the Mantel-Haenszel and Yates tests.

Results

Of the 50 volunteers selected, 22 were males (44%) and 28 females (56%). The age of the volunteers ranged from 18 to 67 years old with a mean age of 41.55±15.60 years old to males and 39.21±13.37 to females.

About ethnicity, the participants were classified by self-declaration, based on the official IBGE categories, where 8 (16%) declared themselves white, 39 (78%) brown, 2 (4%) black, 1 (2%) indigenous and none declared yellow (Supplementary Table 1).

The main complaint that led patients to seek medical attention was epigastric pain in 29 cases (58%), followed by dyspepsia in 10 cases (20%) and heartburn in 5 cases (10%). This distribution remained unchanged when the reasons were stratified by gender (Supplementary Table 2), but when the main complaints were analyzed, it was observed that 80% of dyspepsia complaints occurred among men, while 65.5% of epigastric pain complaints occurred among women (p = 0.149).

When correlating the patients' clinics with the *H. pylori* bacillary density found in the histological studies, it is observed that the reasons did not interfere with the distribution of cases ($p=0.642$) (Supplementary Table 3).

The most frequent endoscopic findings were mild enanthematous pangastritis (12 cases, 24%), followed by moderate enanthematous exudative pangastritis (10 cases, 20%), and mild antral enanthematous gastritis (8 cases, 16%) (Figure 1).

The histological findings of gastric biopsies with inflammation were severe chronic superficial gastritis, with 27 cases (54%), moderate chronic superficial gastritis, with 21 cases (42%), and mild chronic superficial gastritis, with 2 cases (4%) (Figure 2).

The *H. pylori* bacillary density found in the histological studies was 20 severe cases (40%), 15 moderate cases (30%), and 15 mild cases (30%).

Supplementary Table 4 presents the different endoscopic and histological diagnoses found in all volunteers.

When analyzing the distribution of the histological findings according to the *H. pylori* bacillary density found, was observed a significant association among the severity of the inflammation of the mucosa and the infection ($p=0.009$) (Supplementary Table 5).

The results of the search for CYP2C19 variants *2, *3 and *17 among the volunteers of the present study are at the Supplementary Table 6, displayed for each individual, correlated with their ethnicity.

Analyzing the variants *2, *3, and *17 found among the participants, the frequencies observed were shown in Table 1.

Correlating the frequencies of the alleles found with the ethnicity of the individuals, with the intensity of the gastritis described in the histological studies and with the quantity of *H. pylori* seen in these histological studies, we obtained p-values ranging from 0.164 (*2 and histological studies) to 0.955 (*3 and ethnicity) (Table 2).

Classifying genotypic findings according to the possible phenotypic expressions, we found 5 PMs (10%), 1 IM (2%), 29 EMs (58%) and 10 UMs (20%) (Table 3).

Discussion

This monocentric study analyzed a convenience sample of 50 patients with dyspeptic symptoms attended in Manaus who were found infected by *H. pylori*, to determine the frequency of CYP2C19 *1, *2, *3 and *17 among them.

Boyanova and Mitov (2010) found a prevalence of 20-50% failure in the different first-line treatment regimens for *H. pylori*. One of the causes of this crescent failure is the CYP2C19 polymorphism (Kuo et al., 2012). Knowing the metabolic profile of the patients infected with *H. pylori* can be important information in choosing the most appropriate therapeutic regimen, thus increasing the chance of successful eradication.

While *2 and *3 alleles cause loss of function, with slower metabolism of PPIs compared to wild allele (*1), allele *17 causes a gain of function, accelerating PPI metabolism and decreasing their effectiveness to maintain an optimal intragastric pH for antibiotic action. Therefore, poor and intermediate metabolizers when compared to extensive metabolizers are expected to have equal or greater rates of treatment success, while ultra-rapid metabolizers may have a higher failure rate.

In a review article, Lee (2013) found ten studies performed among whites, with the presence of the allele *2 ranging from 11.4-20.8% of the subjects studied, the allele *3 between 0.0-0.8% (not determined in 5 studies), and the allele *17 between 15.4-27.2% (not determined in 2 studies). He found 6 studies performed among blacks, with the allele *2 present in 11.0-25.0% (determined in 4 studies), allele *3 present in 0.0-0.8% (in the same 4 studies), and the allele *17 in 17.9-21.0% of subjects tested

(determined in 2 studies). He also found 14 studies conducted among Asians, where 12.0-37.5% of individuals presented allele *2 (13 studies), 0.0-12.8% presented allele *3 (same 13 studies), and allele *17 was found in 0.5 -4.4% of subjects (6 studies). No brown population is described.

In our study group, 20% of individuals presented allele *2, 10% allele *3, and 30% allele *17. In this group, 16% declared themselves white, 78% brown, 4% black, 2% indigenous, and no one Asian.

When comparing these data with Lee's findings, we observe that the highest percentage of a finding of the allele *2 was 37.5% among Asians, 25% among blacks, and 20.8% among whites, bringing our group's profile closer to the whites studied by Lee.

The allele *17 was the least researched, finding up to 4.4% of presence among Asians, 21% of blacks, and 27.2% of whites studied. Comparing to our 30% finding, once again our group has a profile closer to the white population.

The *3 allele was present in 12.8% among Asians, but in only 0.8% of black and white individuals, what brings the results of this study closer to Asians. When comparing this finding with that of some Brazilian studies, we see that Suarez-Kurtz et al. (2010) studied 1034 subjects divided into whites, browns, and blacks, and found only one subject with the allele *3 (0.05%). Santos et al. (2011) studied 1212 subjects divided into indigenous, white, brown and black, and found no carrier of the allele *3. Kohlrausch (2014) searched in 179 subjects from the South Brazilian population for alleles *2 and *3, and found no allele *3 too.

However, Vargens et al. (2012) reported the finding of 11.5% of allele *3 carriers in a group of 50 Brazilians with >50% indigenous ancestry, a number closer to Lee's findings among some Asian populations, as Japanese and Korean. Although 78% of

the individuals in the current study declared themselves brown and only 2% indigenous, we could observe characteristic features of indigenous people in many of these individuals, which historically are descendants of the miscegenation occurred between natives and immigrants, leading us to believe that many of them may have indigenous ancestors in their families. This brings us to wonder if there may be any relation between the high frequency of the allele *3 found in this study with the probable indigenous inheritance of these individuals.

Even though the percentage of the allele *3 found was higher than expected, we found a significant percentage of the allele *17, responsible for the fast metabolization of the PPIs, possibly contributing to a higher failure rate in the eradication of *H. pylori*.

When correlating the inflammation of gastritis with the *H. pylori* density found in the histological exams, we see a directly proportional association ($p = 0.009$), that is, the greater the amount of *H. pylori* present, the greater the inflammation. On the other hand, when correlating the different alleles of the subjects with the *H. pylori* density found or the inflammation of gastritis, no significant association was found.

The present study shows us that small populations may have genetic particularities when compared to bigger ones. It confirms the findings of a systematic review recently published by Petrović (2020), which includes national wide studies from only 20 to more than 40.000 individuals. This revision shows that there is no homogeneous distribution of alleles among the population of different European countries, and these variations may influence the results of the therapies.

Therefore, special attention must be driven to the brown population from Amazonas, where we observed a tendency to a genotypic pattern closer to the Caucasian

populations than African and African-american populations described in previous studies (Lee, 2013).

The small sample size of this study was the main limitation. However, our findings were able to detect the polymorphic variants for the first time in the amazon population, and the relationship with *H. pylori* density and the severity of the histologic properties of the gastritis.

The studied group showed 20% of the patients with allele *2, 10% with allele *3, and 30% of the patients with allele *17. Five individuals (10%) are poor metabolizers, 1 (2%) intermediate metabolizer, 29 (58%) rapid metabolizers, and 10 (20%) ultra-rapid metabolizers. The results obtained shall not be extrapolated to the general population, but may be used as a reference in clinical decision. Further studies with larger sample sizes are required to answer the influence of these polymorphic variants in the pharmacogenetic treatment response.

References

1. Boyanova L, Mitov I. Geographic map and evolution of primary *Helicobacter pylori* resistance to antibacterial agents (2010). *Expert Rev Anti Infect Ther*, **8(1)**, 59-70.
2. Coelho LGV, Marinho JR, Genta R, et al. IVth Brazilian consensus conference on *Helicobacter pylori* infection (2018). *Arq Gastroenterol*, **55**, 97-121.
3. Dixon MF, Genta RM, Yardley, JH, et al. Classification and Grading of Gastritis. The Updated Sydney System (1996). *Am J Surg Pathol*, **20(10)**, 1161-81.
4. Kohlrausch FB, Carracedo Á, Hutz MH. Characterization of CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4 and CYP3A5 polymorphisms in South Brazilians (2014). *Mol Biol Rep*, **41**, 1453-60.
5. Kuo CH, Kuo FC, Hu HM, et al. The Optimal First-Line Therapy of *Helicobacter pylori* Infection in Year 2012 (2012). *Gastroenterol Res Pract*, **2012**, 1-8.
6. Lee SJ. Clinical application of CYP2C19 pharmacogenetics toward more personalized medicine (2013). *Frontiers in Genetics*, **3**, 1-7.
7. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report (2017). *Gut*, **66**, 6-30.
8. Petrović J, Pešić V, Lauschke VM. Frequencies of clinically important CYP2C19 and CYP2D6 alleles are graded across Europe (2020). *Eur J Hum Genet*, **28**, 88-94.
9. Samer CF, Lorenzini KI, Rollason V, Daali Y, Desmeules JA. Applications of CYP450 Testing in the Clinical Setting (2013). *Mol Diagn Ther*, **17**, 165-84.
10. Santos PCJL, Soares RAG, Santos DBG, et al. CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population (2011). *BMC Med Genet*, **12**, 1-7.
11. Suarez-Kurtz G, Genro J, De Moraes M, et al. Global pharmacogenomics: Impact of population diversity on the distribution of polymorphisms in the CYP2C cluster among Brazilians (2012). *Pharmacogenomics J*, **12**, 267-76.

12. Vargens DD, Petzl-Erler ML, Suarez-Kurtz G. Distribution of CYP2C Polymorphisms in an Amerindian Population of Brazil (2012). *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **110**, 396-400.
13. White PC, New MI, Dupont B. HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation (1984). *Proc Natl Acad Sci USA*, **18**, 7505-9.
14. Yamazaki H. *Fifty Years of Cytochrome P450 Research* (2014). Springer Japan, 1-409.
15. Zamani M, Ebrahimitabar F, Zamani V, et al. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection (2018). *Aliment Pharmacol Ther*, 1-9.
16. Zhou Y, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Worldwide Distribution of Cytochrome P450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects (2017). *Clin Pharmacol Ther*, **102(4)**, 688–700.

Acknowledgements

This study was supported by the Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, and the Faculdade de Ciências Farmacêuticas of the Universidade Federal do Amazonas.

Funding Statement

Parts of this study were sponsored by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) – Processo: 1094/2013-FAPEAM.

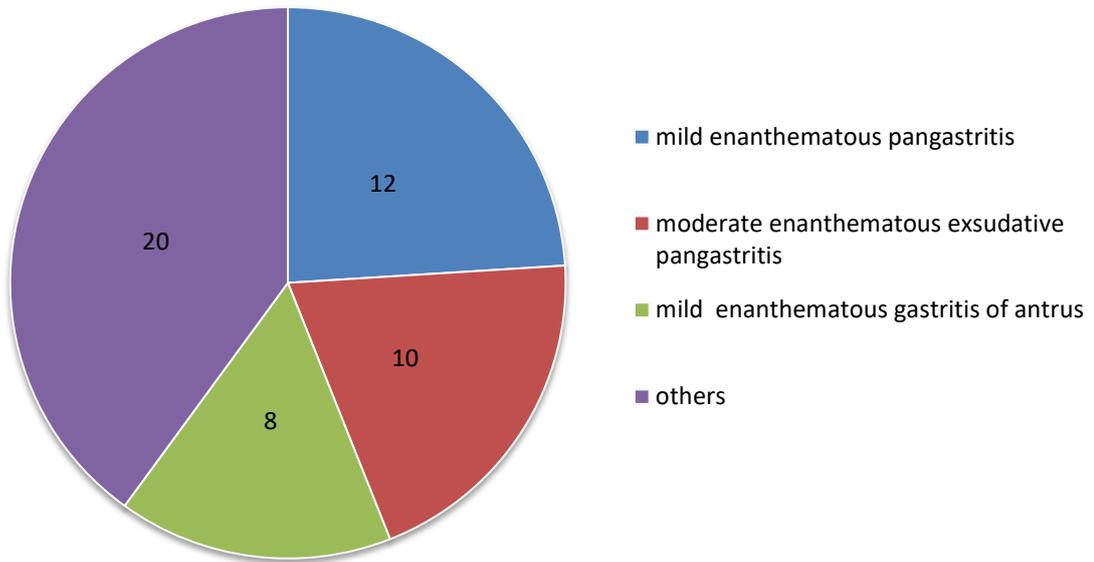


Figure 1. Most frequent endoscopic findings

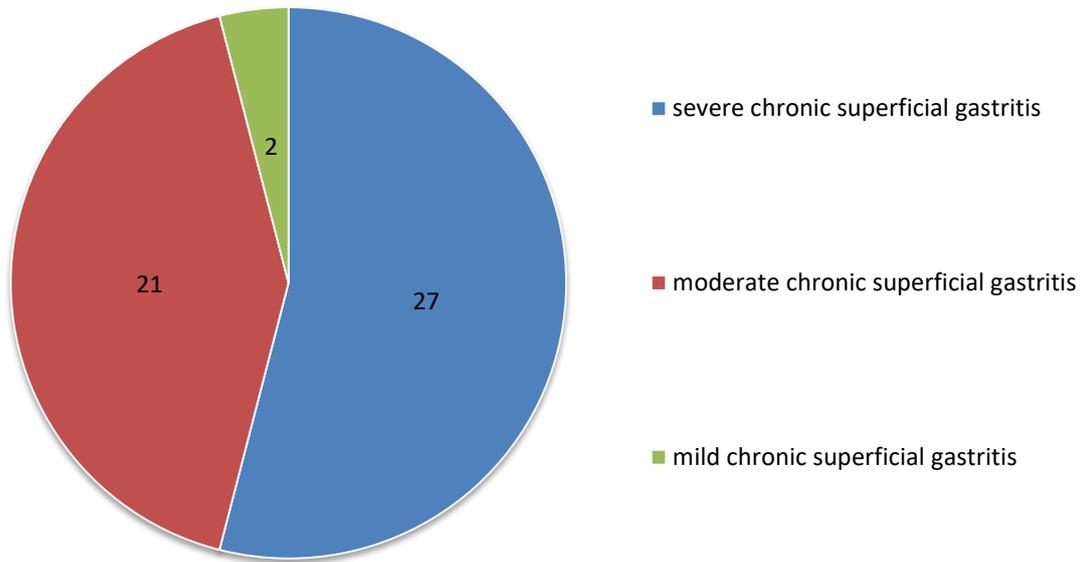


Figure 2. Distribution of histological findings of gastric biopsies with inflammation in recruited patients

Table 1. Frequency of analyzed variants according to the genotype

CYP2C19			
	*2	*3	*17
Genotype	n (%)	n (%)	n (%)
Homozygote	1 (2.0%)	1 (2.0%)	2 (4.0%)
Heterozygote	9 (18.0%)	4 (8.0%)	13 (26.0%)
Absent	40 (80.0%)	45 (90.0%)	35 (70.0%)
Total	50 (100.0%)	50 (100.0%)	50 (100.0%)

n = number of subjects.

29 subjects have none of the variants.

Table 2. Distribution of allele's frequencies according to ethnicity, the intensity of gastritis and quantity of *H. pylori*

		Alleles														
		*2					*3					*17				
		Hm (%)	Ht (%)	Ab (%)	Total (%)	p	Hm (%)	Ht (%)	Ab (%)	Total (%)	p	Hm (%)	Ht (%)	Ab (%)	Total (%)	p
Ethnicity	Wh	-	1 (2%)	7 (14%)	8 (16%)	p = 0.913	-	-	8 (16%)	8 (16%)	p = 0.955	-	4 (8%)	4 (8%)	8 (16%)	p = 0.286
	Br	1 (2%)	7 (14%)	31 (62%)	39 (78%)		1 (2%)	4 (8%)	34 (68%)	39 (78%)		2 (4%)	7 (14%)	30 (60%)	39 (78%)	
	Bl	-	1 (2%)	1 (2%)	2 (4%)		-	-	2 (4%)	2 (4%)		-	1 (2%)	1 (2%)	2 (4%)	
	In	-	-	1 (2%)	1 (2%)		-	-	1 (2%)	1 (2%)		-	1 (2%)	-	1 (2%)	
	Total	1 (2%)	9 (18%)	40 (80%)	50 (100%)		1 (2%)	4 (8%)	45 (90%)	50 (100%)		2 (4%)	13 (26%)	35 (70%)	50 (100%)	
Intensity of gastritis	+++	-	8 (16%)	19 (38%)	27 (54%)	p = 0.164	-	4 (8%)	23 (46%)	27 (54%)	p = 0.293	2 (4%)	7 (14%)	18 (36%)	27 (54%)	p = 0.652
	++	1 (2%)	1 (2%)	19 (38%)	21 (42%)		1 (2%)	-	20 (40%)	21 (42%)		-	5 (10%)	16 (32%)	21 (42%)	
	+	-	-	2 (4%)	2 (4%)		-	-	2 (4%)	2 (4%)		-	1 (2%)	1 (2%)	2 (4%)	
	Total	1 (2%)	9 (18%)	40 (80%)	50 (100%)		1 (2%)	4 (8%)	45 (90%)	50 (100%)		2 (4%)	13 (26%)	35 (70%)	50 (100%)	
Bacillary density	+++	-	3 (6%)	12 (24%)	15 (30%)	p = 0.628	-	1 (2%)	14 (28%)	15 (30%)	p = 0.499	1 (2%)	4 (8%)	10 (20%)	15 (30%)	p = 0.913
	++	1 (2%)	2 (4%)	12 (24%)	15 (30%)		1 (2%)	2 (4%)	12 (24%)	15 (30%)		-	4 (8%)	11 (22%)	15 (30%)	
	+	-	4 (8%)	16 (32%)	20 (40%)		-	1 (2%)	19 (38%)	20 (40%)		1 (2%)	5 (10%)	14 (28%)	20 (40%)	
	Total	1 (2%)	9 (18%)	40 (80%)	50 (100%)		1 (2%)	4 (8%)	45 (90%)	50 (100%)		2 (4%)	13 (26%)	35 (70%)	50 (100%)	

Hm = homozygote, Ht = heterozygote, Ab = absent.

Wh = white, Br = brown, Bl = black, In = indigenous.

+++ = severe, ++ = moderate, + = mild.

Table 3. Distribution of the genotypic findings according to the expected phenotypes

Phenotype	Genotypes			Total
PM	*2/*2	*2/*3	*3/*3	5 (10%)
	1 (2%)	3 (6%)	1 (2%)	
IM	*1/*2	*1/*3		1 (2%)
	1 (2%)	-		
EM	*1/*1			29 (58%)
	29 (58%)			
UM	*17/*17	*1/*17		10 (20%)
	2 (4%)	8 (16%)		
Uncertain	*2/*17	*3/*17	*2/*3/*17	5 (10%)
	4 (8%)	-	1 (2%)	
PM = poor metabolizer, IM = intermediate metabolizer, EM = extensive metabolizer, UM = ultra-rapid metabolizer.				50 (100%)

Supplementary Table 1. Ethnic distribution accordingly to gender

Gender	Ethnicity				Total n (%)
	White n (%)	Brown n (%)	Black n (%)	Indigenous n (%)	
Male	3 (6%)	16 (32%)	2 (4%)	1 (2%)	22 (44%)
Female	5 (10%)	23 (46%)	-	-	28 (56%)
Total	8 (16%)	39 (78%)	2 (4%)	1 (2%)	50 (100%)

n = number of subjects

Supplementary Table 2. Complaints reported by patients according to gender

	Male	Female	Total	
Complaint	n (%)	n (%)	n (%)	p-value
Epigastric pain	10 (34.5%)	19 (65.5%)	29 (100.0%)	0.149
Dyspepsia	8 (80.0%)	2 (20.0%)	10 (100.0%)	
Heartburn	2 (40.0%)	3 (60.0%)	5 (100.0%)	
Dysphagia	-	1 (100.0%)	1 (100.0%)	
Fullness	-	1 (100.0%)	1 (100.0%)	
Globus	-	1 (100.0%)	1 (100.0%)	
Reflux	1 (100.0%)	-	1 (100.0%)	
Relative with gastric cancer	-	1 (100.0%)	1 (100.0%)	
Vomiting	1 (100.0%)	-	1 (100.0%)	
Total	22 (44.0%)	28 (56.0%)	50 (100.0%)	

n = number of subjects

Supplementary Table 3. Complaints reported according to the bacillary density found

Complaint	<i>H. pylori</i> quantity*				p-value
	Mild	Moderate	Severe	Total	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Epigastric pain	8 (53.3%)	9 (60.0%)	12 (60.0%)	29 (58.0%)	0.642
Dyspepsia	2 (13.3%)	4 (26.6%)	4 (20.0%)	10 (22.0%)	
Heartburn	2 (13.3%)	1 (6.7%)	2 (10.0%)	5 (10.0%)	
Dysphagia	-	-	1 (5.0%)	1 (2.0%)	
Fullness	-	1 (6.7%)	-	1 (2.0%)	
Globus	1 (6.7%)	-	-	1 (2.0%)	
Reflux	1 (6.7%)	-	-	1 (2.0%)	
Relative with gastric cancer	1 (6.7%)	-	-	1 (2.0%)	
Vomiting	-	-	1 (5.0%)	1 (2.0%)	
Total	15 (100.0%)	15 (100.0%)	20 (100.0%)	50 (100.0%)	

* Mild = +, Moderate = ++, Severe = +++.
n = number of subjects.

Supplementary Table 4. The different endoscopic and histological diagnostics

Diagnostic*		Histological			Total	p-value
Endoscopic	A	B	C			
1	8 (67%)	3 (25%)	1 (8%)	12 (100%)	0.949	
2	5 (50%)	5 (50%)	-	10 (100%)		
3	4 (50%)	4 (50%)	-	8 (100%)		
4	3 (50%)	2 (33%)	1 (17%)	6 (100%)		
5	2 (50%)	2 (50%)	-	4 (100%)		
6	2 (67%)	1 (33%)	-	3 (100%)		
7	1 (100%)	-	-	1 (100%)		
8	-	1 (100%)	-	1 (100%)		
9	-	1 (100%)	-	1 (100%)		
10	-	1 (100%)	-	1 (100%)		
11	1 (100%)	-	-	1 (100%)		
12	1 (100%)	-	-	1 (100%)		
13	-	1 (100%)	-	1 (100%)		
Total	27 (54%)	21 (42%)	2 (4%)	50 (100%)		
* Endoscopic diagnostics						
1	Mild enanthematous pangastritis					
2	Moderate enanthematous exudative pangastritis					
3	Mild enanthematous gastritis of antrum					
4	Moderate enanthematous pangastritis					
5	Mild enanthematous exudative pangastritis					
6	None					
7	Mild exudative gastritis of antrum					
8	Mild enanthematous gastritis of corpus					
9	Mild raised erosive gastritis of antrum					
10	Mild flat erosive gastritis of antrum					
11	Severe nodular gastritis of antrum					
12	Moderate nodular gastritis of antrum					
13	Severe raised erosive pangastritis					
Histological diagnostics						
A	Severe chronic superficial gastritis					
B	Moderate chronic superficial gastritis					
C	Mild chronic superficial gastritis					

Supplementary Table 5. Histological findings and *H. pylori*

H. pylori* quantity

	Severe	Moderate	Mild	Total	p-value
Histology**	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
1	15 (56%)	4 (15%)	8 (30%)	27 (100.0%)	0.009
2	5 (24%)	11 (52%)	5 (24%)	21 (100.0%)	
3	-	-	2 (100%)	2 (100.0%)	
Total	20 (40%)	15 (30%)	15 (30%)	50 (100.0%)	

* Severe = +++, Moderate = ++, Mild = +.

** 1 = severe chronic superficial gastritis, 2 = moderate chronic superficial gastritis, 3 = mild chronic superficial gastritis.

Supplementary Table 6. qPCR results by subject and ethnicity

Subject	Ethnicity	CYP2C19			Subject	Ethnicity	CYP2C19		
		*2	*3	*17			*2	*3	*17
1	Br	Ht	Ht	-	41	Br	-	-	Ho
2	Br	-	-	Ht	42	Br	-	-	-
3	Br	-	-	-	43	Wh	-	-	-
4	Br	Ht	Ht	-	44	Wh	-	-	Ht
5	Br	-	-	-	45	Br	-	-	-
6	Br	-	-	-	46	Br	-	-	-
7	Bl	Ht	-	Ht	48	Br	-	-	Ht
12	Br	-	-	-	49	Br	-	-	-
13	Br	-	-	Ht	50	Br	-	-	-
14	Br	Ht	Ht	-	52	Wh	-	-	-
15	Br	-	-	-	54	Br	-	-	-
16	Br	Ht	-	-	58	Wh	-	-	Ht
17	Wh	-	-	Ht	59	Bl	-	-	-
19	Br	-	-	-	60	Br	-	-	-
20	Br	-	-	-	61	Br	-	-	-
21	Br	-	-	-	62	Br	-	Ho	-
22	Br	-	-	-	63	Br	-	-	-
24	Br	-	-	-	64	Br	Ho	-	-
27	Br	-	-	-	71	Br	-	-	-
29	Br	Ht	-	Ht	72	Br	-	-	-
32	Br	Ht	Ht	Ht	73	Br	-	-	Ht
35	Wh	-	-	-	75	In	-	-	Ht
36	Wh	-	-	-	76	Br	-	-	-
39	Br	-	-	-	77	Br	-	-	Ho
40	Br	Ht	-	Ht	78	Wh	Ht	-	Ht

Wh = white, Br = brown, Bl = black, In = indigenous.

Ht = heterozygote, Ho = homozygote.

4 LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

O pequeno tamanho amostral deste estudo foi a principal limitação, mas há que ser lembrado que o teorema central do limite garante que com um n próximo a 30 as médias amostrais tendem a apresentar uma distribuição normal (30), e que em estudos com humanos a tolerância estatística é ampla, devido à amplitude do que é considerado como normal em uma população, fazendo com que as amostras possam ser bem menores que em estudos onde a tolerância é pequena (31). Um artigo de revisão publicado no início de 2020 por Petrović e cols. (32) mostra isso de forma prática ao elencar 79 estudos realizados em países europeus, com amostras que variaram de 44.448 indivíduos em um estudo na Estônia a outro realizado na Lituânia com apenas 20 indivíduos.

Outra limitação deste estudo é a obtenção dos sujeitos da pesquisa através de uma amostra de conveniência, porém nem sempre esse procedimento é prejudicial (30), podendo inclusive favorecer o estudo quando bem conduzido.

O fato de ser um estudo transversal também pode ser considerado uma limitação, pois dificulta o estabelecimento de relações causa-efeito ao não se poder afirmar em que sequência no tempo surgiu cada variável observada (33), porém quando uma das variáveis é inata, essa limitação inexistente.

Apesar das limitações, nossos achados foram capazes de detectar pela primeira vez na população amazônica a presença de variantes polimórficas influentes, e sua relação com a quantidade de *H. pylori* e a intensidade das propriedades histológicas da gastrite.

5 CONCLUSÃO

- 1- **Frequência das variantes *1, *2, *3 e *17 do citocromo CYP2C19 entre portadores de *Helicobacter pylori* atendidos em Manaus:** Em uma amostra de 50 indivíduos, foram encontrados 10 portadores (20%) do alelo *2, 5 portadores (10%) do alelo *3 e 15 portadores (30%) do alelo *17. Vinte e nove indivíduos (58%) não apresentaram nenhuma das variantes estudadas. Segundo a manifestação fenotípica esperada para esse grupo, são 5 metabolizadores lentos (10%), 1 metabolizador intermediário (2%), 29 metabolizadores rápidos (58%) e 10 metabolizadores ultrarrápidos (20%).
- 2- **Características endoscópicas das gastrites por *Helicobacter pylori*:** Foram encontrados 12 casos de pangastrite enantematosa leve (24%), 10 de pangastrite enantêmato-exsudativa moderada (20%), 8 de gastrite enantematosa antral leve (16%), 6 de pangastrite enantematosa moderada (12%), 4 casos de pangastrite enantêmato-exsudativa leve (8%), 3 indivíduos normais (6%), e demais diagnósticos com 1 caso (2%) cada: gastrite exsudativa antral leve, gastrite enantematosa de corpo leve, gastrite erosiva elevada antral leve, gastrite erosiva plana antral leve, gastrite nodular antral acentuada, gastrite nodular antral moderada, e pangastrite erosiva elevada acentuada.
- 3- **Características morfológicas das gastrites por *Helicobacter pylori*:** Os achados histológicos entre os indivíduos estudados foram gastrite crônica superficial acentuada (27 casos, 54%), gastrite crônica superficial moderada (21 casos, 42%) e gastrite crônica superficial leve (2 casos, 4%).
- 4- **Relação entre achados histológicos e a quantidade de *Helicobacter pylori*:** Foi encontrada associação significativa ($p=0,009$), onde quanto maior a quantidade de *H. pylori* presente, maior o grau de inflamação da mucosa biopsiada.
- 5- **Relação entre os achados histológicos das gastrites e a quantidade de *Helicobacter pylori* com as variantes:** Não foi encontrada nenhuma associação significativa entre os alelos e os achados histológicos ou a quantidade de *H. pylori* encontrados nas amostras biopsiadas.
- 6- **Características sócio-demográficas do grupo estudado:** O grupo foi composto por 22 indivíduos (44%) do sexo masculino, com idade variando de 19 a 67 anos, média de $41,55 \pm 15,60$, e 28 indivíduos do sexo feminino (56%), com idade entre 18 e 65 anos, média de $39,21 \pm 13,37$. Quanto à cor, 8 deles se autodeclararam brancos (16%), 39 morenos (78%), 2 negros (4%), e 1 se autodeclarou indígena (2%).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yamazaki H. Fifty Years of Cytochrome P450 Research. Fifty Years of Cytochrome P450 Research. Springer Japan; 2014. 1-409 p.
2. Garfinkel D. Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. Arch Biochem Biophys. 1958;77(2):493–509.
3. Klingenberg M. Pigments of Rat Liver Microsomes. Vol. 75, Archives of Biochemistry and Biophysics. 1958.
4. Omura T, Sato R. A new cytochrome in liver microsomes. J Biol Chem. 1962 Apr;237:1375–6.
5. Cooper DY, Levin S, Narasimhulu S, Rosenthal O, Estabrook RW. Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. Science (80-). 1965;147(3656):400–2.
6. Omura T. Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. Vol. 147, Journal of Biochemistry. 2010. p. 297–306.
7. Alvares AP, Schilling G, Levin W, Kuntzman R. STUDIES ON THE INDUCTION OF CO-BINDING PIGMENTS IN LIVER MICROSOMES BY PHENOBARBITAL AND 3-METHYLCHOIANTHRENE *. Biochem Biophys Res Commun. 1967;29(4):521–6.
8. Hildebrandt A, Remmer H, Estabrook RW. CYTOCHROME P-450 OF LIVER MICROSOMES - ONE PIGMENT OR MANY*. Biochem Biophys Res Commun. 1968;30(6):607–12.
9. Sladek NE, Mannering GJ. Induction of Drug Metabolism II. Qualitative Differences in the Microsomal N-Demethylating Systems Stimulated by Polycyclic Hydrocarbons and by Phenobarbital. Mol Pharmacol [Internet]. 1969;5(2):186–99. Available from: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/5/2/186>
10. Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SMG, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. Pharmacogenetics [Internet]. 2004;14(1):1–18. Available from: <http://132.192.64.52/p450.html>.
11. Guengerich RP. Human Cytochrome P450 Enzymes. In: Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, 3e, edited by Paul R Ortiz de Montellano. 2005. p. 377–530.
12. Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, et al. The P450 Gene Superfamily: Recommended Nomenclature. DNA. 2009 Mar 25;6(1):1–11.
13. Nelson DR. The Cytochrome P450 Homepage. Hum Genomics [Internet]. 2009 Oct;4(1):59–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19951895>

14. White PC, New MI, Dupont BO. HLA-linked congenital adrenal hiperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984 Nov;81:7505–9.
15. Stuber F. Human genotyping. *Crit Care Med*. 2005;33(12 (Suppl.)):S453–6.
16. Mahgoub A, Dring LG, Idle JR, Lancaster R, Smith RL. POLYMORPHIC HYDROXYLATION OF DEBRISOQUINE IN MAN. *Lancet*. 1977;310(8038):584–6.
17. Samer CF, Lorenzini KI, Rollason V, Daali Y, Desmeules JA. Applications of CYP450 Testing in the Clinical Setting. *Mol Diagnosis Ther*. 2013;17:165–84.
18. Cornean CI, Cosgarea M, Cătană A, Mogoantă CA, Necula V, Maniu AA. Do we know enough about the genetic involvement in laryngeal cancer susceptibility and prognostic outcome? *Rom J Morphol Embryol* [Internet]. 2019;60(2):353–67. Available from: <http://www.rjme.ro/>
19. Zamani M, Ebrahimitabar F, Zamani V, Miller WH, Alizadeh-Navaei R, Shokri-Shirvani J, et al. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2018 Feb 12 [cited 2018 Feb 16];1–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/apt.14561>
20. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon A. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut* [Internet]. 2017;66:6–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/>
21. Coelho LGV, Marinho JR, Genta R, Ribeiro LT, Passos M do CF, Zaterka S, et al. IVth Brazilian consensus conference on *Helicobacter pylori* infection. *Arq Gastroenterol* [Internet]. 2018 [cited 2018 Apr 25]; Available from: <http://www.scielo.br/pdf/ag/2018nahead/1678-4219-ag-s0004-2803-20180000020.pdf>
22. Lee SJ. Clinical application of CYP2C19 pharmacogenetics toward more personalized medicine. *Front Genet*. 2013;3(318):1–7.
23. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). Vol. 74, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977.
24. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51:263–73.
25. Lander S, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* [Internet]. 2001;409:860–921. Available from: www.nature.com
26. Chehab FF, Kant YW. Detection of specific DNA sequences by fluorescence amplification: A color complementation assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(23):9178–82.

27. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' - 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(16):7276–80.
28. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Bio/Technology*. 1992;10(4):413–7.
29. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006 Apr;27(2–3):95–125.
30. Mourão Júnior CA. QUESTÕES EM BIOESTATÍSTICA: O TAMANHO DA AMOSTRA. *Rev Interdiscip Estud Exp*. 2009;1(1):26–8.
31. Weyne GR de S. Determinação do tamanho da amostra em pesquisas experimentais na área de saúde. *Arq Med ABC*. 2004;29(2):87–90.
32. Petrović J, Pešić V, Lauschke VM. Frequencies of clinically important CYP2C19 and CYP2D6 alleles are graded across Europe. *Eur J Hum Genet*. 2020 Jan 1;28:88–94.
33. Bastos JLD, Duquia RP. Um dos delineamentos mais empregados em epidemiologia: estudo transversal. *Sci Med (Porto Alegre)*. 2007;14(4):229–32.

7 ANEXOS E APÊNDICES

7.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você / seu familiar procurou o Serviço de Endoscopia Digestiva da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado para ser submetido a uma endoscopia digestiva alta com biópsia, solicitada por seu médico assistente.

Assim sendo eu, Everton Ricardo de Abreu Netto, pesquisador da FMT-HVD, estou convidando você / seu familiar a participar de um estudo chamado “Taxa de Erradicação do *Helicobacter pylori* Entre Portadores das Variantes *1, *2, *3 e *17 do Citocromo CYP2C19 Atendidos em Manaus, Amazonas, Brasil”.

- a) Hoje em dia, está reconhecido o papel da bactéria chamada *Helicobacter pylori* como causa de úlceras no estômago e duodeno, além de gastrite, câncer do estômago e outras doenças. Ela é uma bactéria presente em grande parte da população mundial, e seu tratamento nem sempre tem sucesso. Dentre os vários fatores que contribuem para a falha no tratamento, existem algumas variações nas células das pessoas que podem causar alterações na forma como cada corpo humano modifica e elimina os medicamentos usados para o tratamento. Por essa razão, foi criada esta pesquisa, cujo objetivo é avaliar a chance de haver alguma dessas variações na população de Manaus e arredores, e com isso ser resistente aos medicamentos mais utilizados no Brasil para tratamento do *Helicobacter pylori*;
- b) Caso você aceite participar da pesquisa, os fragmentos de biópsia que serão retirados durante a endoscopia digestiva alta solicitada pelo seu médico serão utilizados para avaliar a presença ou não do *Helicobacter pylori* no seu estômago / de seu familiar. Sendo confirmada a presença da bactéria, será colhida uma amostra de sangue para avaliar como o seu fígado modifica e elimina os medicamentos usados para o seu tratamento / de seu familiar;
- c) É possível que, devido à natureza do exame solicitado pelo seu médico assistente, durante a participação na pesquisa você / seu familiar experimente algum desconforto, principalmente relacionado à punção de uma de suas veias que será utilizada para injetar o sedativo que o fará dormir, e ao spray anestésico utilizado em sua garganta para bloquear o reflexo de tosse e vômito durante a passagem do endoscópio que será utilizado para realizar seu exame;
- d) Alguns riscos relacionados ao exame de endoscopia digestiva com biópsia podem ser: necessidade de mais de uma punção venosa; irritação no local da punção; reação alérgica a alguma das medicações utilizadas na sedação ou ao spray anestésico; sangramento do local da biópsia; perfuração da parede do órgão pela passagem do endoscópio; você estará sendo monitorado durante todo o

procedimento para evitar esses problemas e para que, caso algo aconteça, você possa ser devidamente tratado;

e) Caso seja confirmada a presença do *H. pylori* em seu estômago, você deverá realizar o tratamento para essa infecção conforme recomendado pelo IV Consenso Brasileiro sobre *Helicobacter pylori*, e posteriormente será submetido a nova endoscopia digestiva alta com biópsia para controle da cura. Estando confirmada a cura, você / seu familiar não necessitará mais retornar à FMT-HVD;

f) Caso não haja sucesso no tratamento, você deverá usar os medicamentos recomendados pelo IV Consenso Brasileiro sobre *Helicobacter pylori* para retratamento, e novamente será submetido a uma endoscopia digestiva alta com biópsia para controle da cura. Estando confirmada a cura, você / seu familiar não necessitará mais retornar à FMT-HVD. Caso não haja sucesso também no retratamento, você será encaminhado para acompanhamento ambulatorial durante o tempo que for necessário.

g) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: obter mais informações sobre o perfil metabólico da população de Manaus e arredores, e como os diferentes perfis influenciam no tratamento atualmente utilizado, que permitam ajudar na escolha da melhor opção de tratamento para esses diferentes perfis existentes entre os membros de nossa comunidade. Caso você aceite participar da pesquisa, você será submetido gratuitamente ao exame de endoscopia digestiva alta com biópsia, e caso apresente a bactéria em seu estômago, você será acompanhado durante todo o tratamento, bem como será submetido a novos exames, também gratuitamente, para confirmar o sucesso do seu tratamento;

h) O pesquisador Everton Ricardo de Abreu Netto, médico endoscopista responsável por este estudo, estará disponível para esclarecer dúvidas que você / seu familiar possa ter e dar as informações que queira antes, durante ou depois de encerrado o estudo, bastando procurar o Serviço de Endoscopia Digestiva da FMT-HVD pessoalmente às sextas-feiras das 8 às 12hs, ou através do telefone (92)99476-7979 de segunda à sexta-feira das 8 às 18hs, ou ainda através do e-mail eran.mdt17@uea.edu.br;

i) O Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-HVD, coordenadora Dra. Marilaine Martins, telefone (92) 2127-3572, e-mail: cep@fmt.am.gov.br, também está disponível para contato de segunda à sexta-feira das 8 às 14hs;

j) A sua participação neste estudo é voluntária e se você / seu familiar não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e retirar o seu consentimento. Essa decisão não prejudicará de forma alguma a realização do seu exame;

k) As informações relacionadas a este estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas e serão utilizadas na publicação de trabalhos científicos. No

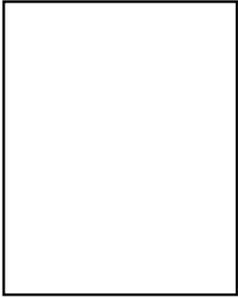
entanto, garantimos que a sua identidade / de seu familiar será preservada e mantida em segredo;

l) Pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames laboratoriais do sangue e das biópsias) não são de sua responsabilidade. Caso você / seu familiar tenha algum gasto devido à participação no estudo além daqueles normalmente existentes para a realização do exame solicitado pelo seu médico assistente, você tem a garantia de receber ressarcimento, bastando procurar o pesquisador Everton Ricardo de Abreu Netto no Serviço de Endoscopia Digestiva da FMT-HVD pessoalmente às sextas-feiras das 8 às 12hs, ou através do telefone (92)99476-7979 de segunda à sexta-feira das 8 às 18hs, ou ainda através do e-mail eran.mdt17@uea.edu.br;

m) Você / seu familiar tem a garantia de que se houverem problemas decorrentes do estudo como dor ou irritação no local da punção, sangramento digestivo ou perfuração do estômago, eles serão assistidos, tratados e acompanhados na FMT-HVD pelo pesquisador Everton Ricardo de Abreu Netto, sem qualquer custo para você / seu familiar, durante todo o tempo que for necessário. Da mesma forma, terão garantido o direito à indenização caso ocorra algum dano permanente devido à participação nesse estudo;

n) Os materiais (amostra de sangue e fragmentos de biópsia do estômago) coletados de você / seu familiar serão utilizados exclusivamente para atender aos objetivos desta pesquisa e, caso haja sobra, serão devidamente eliminados ao final do estudo.

Eu, _____, li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. Eu recebi explicação sobre os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem necessitar justificar minha decisão. Eu fui informado de que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema dos relacionados no item “m)”. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós. Sendo assim, eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.



Assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal / impressão digital

Manaus, ____ de _____ de _____

Assinatura da testemunha

Manaus, ____ de _____ de _____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste indivíduo ou de seu representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do Pesquisador

Manaus, ____ de _____ de _____

7.2 FICHA DE COLETA DE DADOS

Número: _____ Data da entrevista inicial: ___/___/2018

Nome: _____

Data de nascimento: ___/___/___ Idade: ___ anos Sexo: () M () F

Endereço: _____

Bairro: _____ CEP: _____ - _____

Celular: (___) _____ - _____ Residencial: (___) _____ - _____

MOTIVO DA SOLICITAÇÃO: _____

- CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

() Idade entre 18 e 70 anos () Assinou o TCLE

- CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO:

() Tratamento prévio para *H. pylori*

() Cirurgia gástrica prévia

() Imunodeprimido

() Uso de anticoagulantes impedindo a realização das biópsias

() Uso de antimicrobianos nos 30 dias anteriores à EDA (data: ___/___/2018)

Entrevistador(a): _____

- PRIMEIRA ENDOSCOPIA – realizada em: ___/___/2018

Examinador(a): _____

Diagnóstico: _____

Histopatológico: _____

H. pylori: (..) negativo – alta do estudo em ___/___/2018

() positivo (cruzes: ____/IV)

Data da prescrição inicial: ___/___/2018

Data do término do tratamento inicial: ___/___/2018

- SEGUNDA ENDOSCOPIA – realizada em: ___/___/2018

Examinador(a): _____

Diagnóstico: _____

Histopatológico: _____

H. pylori: (..) negativo – alta do estudo em ___/___/2018

() positivo (cruzes: ____/IV)

Data da prescrição do retratamento: ___/___/2018

Data do término do retratamento: ___/___/2018

- TERCEIRA ENDOSCOPIA – realizada em: ___/___/2018

Examinador(a): _____

Diagnóstico: _____

Histopatológico: _____

H. pylori: (..) negativo – alta do estudo em ___/___/2018

() positivo (cruzes: ____/IV) – alta do estudo em ___/___/2018*

*encaminhado(a) para acompanhamento ambulatorial.

7.3 ANÁLISE MOLECULAR

7.3.1 Procedimento Operacional Padrão para Coleta e Preparação das Amostras

1. Coletar 1 tubo de sangue com anticoagulante EDTA;
2. Ligar a centrífuga e incubadora ambas a 37°C;
3. Identificar:
 - 1 tubo com EDTA: Polimorfismos de enzimas
 - 1 tubo sem anticoagulante: BIOQUÍMICA
4. Separar 1 ml de sangue total para extração de DNA sem conservante.
5. Separar 1 ml de sangue total para reserva futura.
6. Separar soro por 10 min a 3500 rpm. Reservar o soro para perfis bioquímicos (fosfatase alcalina, gama GT, bilirrubinas totais e frações, ácido úrico, creatinina, ureia, perfil lipídico completo, glicose).

7.3.2 Extração do DNA Genômico

O DNA genômico será extraído a partir de 300µL de sangue, utilizando o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit, conforme protocolo do fabricante. Após a extração, o DNA será armazenado a -20°C até o momento das análises moleculares.

Reagentes:

REAGENTES PARA AS ETAPAS DE EXTRAÇÃO	ARMAZENAMENTO
Isopropanol	Temp. ambiente
Etanol 70%	Temp. ambiente
Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)	Temp. ambiente

Obtenção de Sangue Total:

Obter 300-400µL de sangue total, em tubo microcentrífuga estéril de 1,5 ml identificado contendo 15 µL de EDTA.

Procedimentos para extração do DNA a partir de tubo, conforme protocolo de extração retirado da “bula” do Wizard® Genomic DNA Purification Kit:

Obs: Antes de dar início ao procedimento homogeneizar bem o tubo com sangue até ter certeza que está completamente homogeneizado.

1. Adicione 900µL de solução CellLysis. Inverta o tubo 5 a 6 vezes para misturar o sangue e a solução de lise.
2. Incube por 10 minutos à temperatura ambiente, homogeneizando por inversão duas a três vezes.
3. Centrifugue entre 13.000 e 16.000 x g por 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Descarte o sobrenadante.
5. Agite o tubo vigorosamente no vortex. Ressuspenda completamente as células brancas.
6. Adicione 300 µL de solução NucleiLysis. Pipete a mistura 5-6 vezes para lisar as células brancas.
7. OPCIONAL: Adicione 1,5 µL de solução RNAase ao lisado nuclear e misture as amostras invertendo o tubo 2-5 vezes. Incube a mistura a 37°C por 15 minutos e esfrie a temperatura ambiente.
8. Adicione 100µL de solução ProteinPrecipitation ao lisado nuclear e homogeneíze vigorosamente no vórtex de 10-20 segundos.
9. Centrifugue o tubo entre 13.000-16.000 x g por três minutos à temperatura ambiente.
10. Transfira o sobrenadante para um tubo limpo de 1,5mL contendo 300µL de isopropanol a temperatura ambiente.
11. Gentilmente misture a solução por inversão até que as brancas cadeias de DNA formem uma cadeia visível.
12. Centrifugue entre 13.000-16.000 x g por um minuto à temperatura ambiente.
13. Decante o sobrenadante e adicione uma amostra de um volume de etanol a 70% à temperatura ambiente. Gentilmente inverta o tubo algumas vezes para lavar o precipitado de DNA e os lados do microtubo.
14. Centrifugue como na etapa 11.
15. Cuidadosamente aspire o etanol. Inverta o tubo em um papel absorvente limpo e seque ao ar o precipitado por 10 a 15 minutos.

16. Adicione 100µL da solução DNA rehydration ao tubo e reidrate o DNA incubando à 65°C por uma hora. Periodicamente homogeneíze gentilmente a solução. Alternativamente reidrate o DNA incubando a solução overnight à temperatura ambiente.

17. Armazene o DNA entre 2-8°C.

7.3.3 Genotipagem

Para genotipagem dos alelos do gene CYP2C19, utilizaremos a técnica de PCR em tempo real (qPCR).

A determinação dos SNPs pela técnica qPCR será realizada com o sistema TaqMan® e analisados através da plataforma *AppliedBiosystemsQuantStudio 3* (AppliedBiosystems).

A reação de amplificação será realizada para um volume final de 10uL/reação, contendo 5uL de 2x TaqMan Universal Master Mix, 0,2uL de 20x SNP GenotypingAssay, 2,8uL de água esterilizada, com 2 ul de DNA da amostra.

A tecnologia se baseia na medição da fluorescência durante as ciclagens, emitidas através de sondas específicas para cada genótipo. A quantidade de fluorescência emitida é proporcional à quantidade do produto da PCR e permite a monitorização da reação. A curva de PCR resultante é usada para definir a fase exponencial da reação, que é condição prévia para o cálculo do número de cópias produzidas.

Quadro 1. Sondas utilizadas para determinação dos SNP

Gene (polimorfismo)	Ref. SNP ID
CYP2C19*2 (Pro227Pro)	rs 4244285
CYP2C19*3 Trp212Ter	rs 4986893
CYP2C19*17 (-806C>T)	rs 12248560

7.4 PARECER ÉTICO CEP

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: TAXA DE ERRADICAÇÃO DO *Helicobacter pylori* ENTRE PORTADORES DAS VARIANTES *1, *2, *3 E *17 DO CITOCROMO CYP2C19 ATENDIDOS EM MANAUS, AMAZONAS, BRASIL

Pesquisador: EVERTON RICARDO DE ABREU NETTO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 87246218.4.0000.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

Patrocinador Principal: Universidade Federal do Amazonas - UFAM
Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.677.158

Apresentação do Projeto:

Helicobacter pylori é o fator de risco mais relevante para adenocarcinoma gástrico e linfoma MALT, e o principal agente etiológico da gastrite crônica e úlcera péptica. O insucesso crescente de seu tratamento deve-se principalmente a resistência aos antibióticos, baixa adesão ao tratamento, acidez gástrica elevada, alta carga bacteriana e polimorfismo do citocromo P450 2C19. O papel dos inibidores de bomba de próton deve ser considerado na escolha do tratamento mais adequado. A principal enzima envolvida no metabolismo dos IBPs é o CYP2C19, e suas variações genéticas influenciam o efeito destes. Além do gene original (*1), estão bem descritos dois polimorfismos que causam perda de função (*2 e *3) e outro que causa ganho de função (*17). Apesar de um estudo comparando as taxas de erradicação do *H. pylori* entre as variantes *1, *2 e *17 do CYP2C19 não ter encontrado diferença na proporção de portadores da variante *17 entre erradicados e não erradicados, a literatura recomenda um aumento de 100 a 200% na dose do omeprazol ou esomeprazol para assegurar a erradicação do *H. pylori* entre seus portadores.

Trata-se de do protocolo referente ao Projeto de Pesquisa Intitulado " TAXA DE ERRADICAÇÃO DO *Helicobacter pylori* ENTRE PORTADORES DAS VARIANTES *1, *2, *3 E *17 DO CITOCROMO CYP2C19

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.677.158

ATENDIDOS EM MANAUS, AMAZONAS, BRASIL", sendo um estudo de caso-controle observacional, prospectivo, cujo pesquisador responsável é Everton Ricardo de Abreu Neto, e outros pesquisadores: Rebeca Linhares de Abreu Netto, Monique Freire dos Reis, José Pereira de Moura Neto, Luiz Carlos de Lima Ferreira e Vanderson de Souza Sampaio.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Estudar a taxa de erradicação do *Helicobacter pylori* entre portadores das variantes *1, *2, *3 e *17 do citocromo CYP2C19 em uma amostra da população de Manaus.

Objetivo Secundário: • Estimar a frequência do *Helicobacter pylori* nessa amostra da população. • Estimar a frequência das variantes *1, *2, *3 e *17 do citocromo CYP2C19 nessa amostra da população. • Avaliar a associação entre a variante *17 do citocromo CYP2C19 e a falha terapêutica na erradicação do *Helicobacter pylori*. • Descrever as alterações histopatológicas das biópsias gástricas endoscópicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos aos sujeitos da pesquisa são: necessidade de mais de uma punção venosa; irritação no local da punção, reação alérgica a alguma das medicações utilizadas na sedação ou ao spray anestésico, sangramento do local da biópsia, perfuração da parede do órgão pela passagem do endoscópio.

Benefícios: Os benefícios esperados com essa pesquisa são: ao obter mais informações sobre o perfil do CYP2C19 da população de Manaus e arredores, e como as diferentes variantes do CYP2C19 influenciam no tratamento atualmente utilizado para erradicação do *H. pylori*, ajudar na escolha da melhor opção de tratamento para os portadores dessas diferentes variantes existentes entre os membros de nossa comunidade, e mesmo a nível mundial, auxiliando assim a aumentar o índice de sucesso do tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta é relevante e dentro do contexto, é plenamente factível, portanto, devidamente instruído, está apto para análise.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.677.158

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

ermo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE); 6. Cronograma de execução previsto para iniciar a pesquisa em 04/05/2018 e término 29/03/2019, e 7. orçamento de R\$ 181.480,00 mencionado no Projeto gerado na Plataforma Brasil, R\$ 182.480,00 informado no Projeto Detalhado. Os exames de endoscopia digestiva alta com biópsia, os estudos histopatológicos e os exames laboratoriais são realizados rotineiramente na FMT-HVD, com recursos próprios da Fundação, mediante repasse do Sistema Único de Saúde. Os exames de qPCR serão realizados no Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular (LAEBM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM, com recursos próprios do laboratório. A folha de rosto da CONEP está devidamente preenchida e assinada. No protocolo há necessidade de inclusão de documento indispensável para a execução da pesquisa (Anuência da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM). O TCLE, apresenta-se em linguagem acessível para o entendimento, porém necessita de readequações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

PENDÊNCIAS/SOLICITAÇÕES visando atender ao que dispõe a Resolução nº 466/2012, CNS/MS e suas complementares.

PENDÊNCIA 1. No Projeto Detalhado, item 3.2 Plano amostral, foi mencionado " Será realizada uma análise de amostra de conveniência de 32 casos, com um número de 3 controles por caso, perfazendo um total de 96 controles.", e essa mesma informação consta no item desenho, do projeto gerado na Plataforma Brasil (projeto PB), entretanto, ainda no projeto PB, itens Tamanho da amostra no Brasil, Países de recrutamento foi informada que: " N° de participantes da pesquisa, 256, sendo Hp negativo 128 e Hp positivo 128", e no item Resumo do Projeto PB, a amostra é 128 adultos. Solicita-se readequação da informação sobre amostra do estudo.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: R: readequação realizada nos itens resumo e desenho do projeto PB, e no item 3.2 do projeto detalhado, conforme solicitado.

ANÁLISE: Verificou-se que o pesquisador atendeu conforme a solicitação. PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 2. No projeto gerado na Plataforma Brasil, item Apoio Financeiro foi mencionada a

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.677.158

Universidade Federal do Amazonas - UFAM, e também no projeto detalhado, item 6 Financiamento "Os exames de qPCR serão realizados no Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular (LAEBM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM, com recursos próprios do laboratório. No item "8" Viabilidade de Execução e Conclusão foi informado "A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM conta com um laboratório de diagnóstico molecular, todos devidamente equipados e com equipes treinadas em todas as técnicas necessárias para a execução do projeto.", mas, não foi identificada a anuência da UFAM junto ao protocolo em análise. Solicita-se a inclusão da anuência da UFAM.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: R: inclusão da anuência realizada conforme solicitado.

ANÁLISE: O pesquisador atendeu conforme a solicitação. Diante disso, PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 3. No projeto gerado na PB, item Orçamento Financeiro foi informado "R\$ 181.480,00", mas no Projeto Detalhado, item "5" Orçamento foi mencionado " R\$ 182.000,00". Solicita-se correção da informação sobre o valor do orçamento.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: R: valores checados, R\$182.480,00 em ambos locais.

ANÁLISE: Observou-se que o pesquisador atendeu conforme a solicitação. PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 4. No Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram mencionadas palavras "genéticas" e "metaboliza". Solicita-se informar o significado das duas palavras em questão para que o participante da pesquisa tenha melhor entendimento.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: R: o texto do item "a", que continha as palavras supracitadas, foi reformulado.

ANÁLISE: Verificou-se que o pesquisador atendeu a solicitação. Diante disso, PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 5. Ainda no TCLE, item "h", foi informado o local no qual o participante da pesquisa encontre o pesquisador responsável em caso de necessidade, mas, não informa os dias e os

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.677.158

horários. Solicita-se a inclusão dos dias e dos horários disponíveis para que o participante tenha acesso caso seja necessário.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: R: inclusão realizada conforme solicitado.

ANÁLISE: O pesquisador atendeu a solicitação. PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 6. No TCLE, item "i" foi mencionado "coordenadora Dra. Maria Paula Mourão" e "durante horário comercial". Solicita-se correção para "coordenadora Dra. Marilaine Martins, e ainda informar os dias e os horários de atendimento no CEP.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: R: correções realizadas conforme solicitado.

ANÁLISE: A solicitação foi atendida pelo pesquisador. PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 7. Ainda no TCLE, item "l" foi informado o seguinte "... Caso você / seu familiar tenha algum gasto devido à participação no estudo além daqueles normalmente existentes para a realização do exame solicitado pelo seu médico assistente, você tem a garantia de receber ressarcimento;". Solicita-se esclarecer o responsável pelo ressarcimento, caso seja necessário.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: R: esclarecimento realizado conforme solicitado.

ANÁLISE: No TCLE o pesquisador esclarece o seguinte " Caso você / seu familiar tenha algum gasto devido à participação no estudo além daqueles normalmente existentes para a realização do exame solicitado pelo seu médico assistente, você tem a garantia de receber ressarcimento, bastando procurar o pesquisador Everton Ricardo de Abreu Netto no Serviço de Endoscopia Digestiva da FMT-HVD pessoalmente às sextas-feiras das 8 às 12hs, ou através do telefone (92)99476-7979 de segunda à sexta-feira das 8 às 18hs, ou ainda através do e-mail eran.mdt17@uea.edu.br;". Diante disso, PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 8. No TCLE não consta espaço para a impressão datiloscópica. Solicita-se a inclusão do espaço para a impressão datiloscópica no documento em questão.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.677.158

RESPOSTA DO PESQUISADOR: R: inclusão do espaço realizada conforme solicitado.

ANÁLISE: Verificou-se que o pesquisador atendeu conforme a solicitação. PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 9. No TCLE, no rodapé, consta informações sobre o Comitê de Ética em Pesquisa. Solicita-se a exclusão das informações das três páginas, considerando que foram mencionadas no item "i".

RESPOSTA DO PESQUISADOR: R: exclusão realizada conforme solicitado.

ANÁLISE: O pesquisador atendeu conforme a solicitação. PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 10. No projeto gerado na PB, item Cronograma de Execução, foi informado que a pesquisa seria iniciada em 04/05/2018. Solicita-se readequação da informação considerando que o protocolo ainda encontra-se em análise no CEP, e que o estudo só poderá ter início após a sua aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: R: informação readequada no item Cronograma de Execução (PB), conforme solicitado.

ANÁLISE: Observou-se que o pesquisador atendeu de acordo com a solicitação. Sendo assim, PENDÊNCIA ATENDIDA.

Diante do exposto, sugere-se que o protocolo da pesquisa seja APROVADO.

S. M. J. É o parecer.

Considerações Finais a critério do CEP:

1. O Protocolo está APROVADO, a contar desta data o(a) pesquisador(a) deverá apresentar relatórios semestrais/final que permitam ao CEP/FMT-HVD acompanhar o desenvolvimento e a conclusão do projeto conforme estabelece o item X.1.3.b, da Resolução CNS nº 466/2012.

2. Nos casos de submissão de Emendas (modificações) ao protocolo, devem ser apresentadas de

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

**FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"**



Continuação do Parecer: 2.677.158

forma clara e sucinta, identificando-se, por cor, negrito ou sublinhado, a parte do documento a ser modificada, além de apresentar o resumo das alterações, juntamente com a(s) justificativa(s), é necessário destacá-las no decorrer do texto (item 2.2.H.1, da Norma Operacional CNS nº 001 de 2013).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1105224.pdf	14/05/2018 14:51:48		Aceito
Outros	FOLHA_RESPOSTA.pdf	14/05/2018 14:49:20	EVERTON RICARDO DE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CYP2C19_Revisado_CEP.pdf	14/05/2018 14:47:40	EVERTON RICARDO DE ABREU NETTO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CYP2C19_Projeto_Revisado_VI.pdf	14/05/2018 14:47:19	EVERTON RICARDO DE ABREU NETTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_DAM_CYP2C19.pdf	13/05/2018 20:21:10	EVERTON RICARDO DE ABREU NETTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_FCF_CYP2C19.pdf	13/05/2018 18:43:46	EVERTON RICARDO DE ABREU NETTO	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto_CYP2C19.pdf	09/04/2018 18:36:17	EVERTON RICARDO DE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 25 de Maio de 2018

Assinado por:
Maria das Graças Gomes Saraiva
(Coordenador)

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.677.158

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br