



**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**

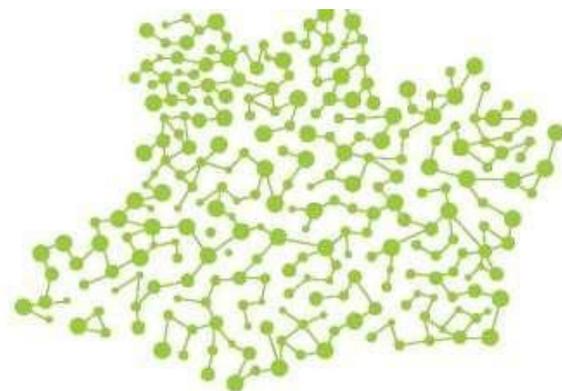


**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM  
CYP2C19, CYP2D6 E CYP3A4 NA RESPOSTA CLÍNICA DE PACIENTES  
COM MALÁRIA VIVAX TRATADOS COM PRIMAQUINA**

**JAIANA LARISSA DE MORAIS CARDOSO**

**MANAUS**

**2020**



**JAIANA LARISSA DE MORAIS CARDOSO**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM  
CYP2C19, CYP2D6 E CYP3A4 NA RESPOSTA CLÍNICA DE PACIENTES  
COM MALÁRIA VIVAX TRATADOS COM PRIMAQUINA**

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 Infeciosas*.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gisely Cardoso de Melo

**MANAUS**

**2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### **Características:**

**Conteúdo:** autor, título, local, Assunto, número de folhas, etc.

**Apresentação:** contida num retângulo de aproximadamente 12,5 x 7,5 cm.

**Localização:** verso da folha de rosto, impressa abaixo da metade inferior da página.

**Formatação:** iniciar 3 linhas da borda superior; 4 espaços da borda lateral esquerda (veja modelo abaixo)

Cardoso, Jaiana Larissa de Moraes

Avaliação da influência de polimorfismos genéticos em CYP2C19, CYP2D6 E CYP3A4 na resposta clínica de pacientes com malária vivax tratados com primaquina. Jaiana Larissa de Moraes Cardoso. - Manaus, 2020. Viii. 135f.

Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Medicina Tropical – Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas

Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2020.

Inclui bibliografia

Orientador(a): Gisely Cardoso de Melo

1. Malária. 2. Primaquina. 3. Farmacogenética.

I. Gisely Cardoso de Melo (Orient.).

III. Universidade do Estado do Amazonas.

IV. . Avaliação da influência de polimorfismos genéticos em CYP2C19, CYP2D6 E CYP3A4 na resposta clínica de pacientes com malária vivax tratados com primaquina.

**FOLHA DE JULGAMENTO****AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS  
GENÉTICOS EM CYP2C19, CYP2D6 E CYP3A4 NA RESPOSTA  
CLÍNICA DE PACIENTES COM MALÁRIA VIVAX TRATADOS  
COM PRIMAQUINA****JAIANA LARISSA DE MORAIS CARDOSO**

“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**

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Raimundo Nonato e Marlene, meus maiores incentivadores, que fazem de tudo para que eu sempre possa ir atrás dos meus objetivos.

Dedico também ao meu tio Antônio Carlos<sup>†</sup> que sempre foi um entusiasta da família e sempre acreditou muito na capacidade de todos nós.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me conduzir por um caminho cheio de desafios, mas também com grandes realizações e alegrias.

Aos meus pais Raimundo Nonato Cardoso e Marlene por todo o amor e dedicação. Agradeço por todos os valores e ensinamentos que eu recebo a cada dia. Agradeço por nunca terem medidos esforços para garantir que eu pudesse ir atrás dos meus sonhos e por priorizarem a educação acima de qualquer outra coisa. Vocês são meus maiores exemplos e maiores incentivadores.

Ao meu irmão Ítalo Bruno e a minha cunhada Ariene por todo o amor e por sempre acreditarem em mim e principalmente pelo presente maravilhoso que é minha sobrinha Maria Flor.

À minha orientadora Profa. Dra. Gisely Cardoso de Melo pela oportunidade que me foi dada de fazer o mestrado. Agradeço ainda por todo apoio, incentivo e ensinamentos que a senhora me deu ao longo desses anos. Obrigada!

À Yanka Salazar que foi meus braços direito e esquerdo nessa jornada. Sem a sua parceria tudo teria sido mais difícil. Fico muito feliz em ver você traçar sua própria jornada. Obrigada por tudo!

Ao meu grupo de pesquisa, em especial a Emanuelle Silva e Laila Rowena. As colaborações, incentivos, parceria e amizade de vocês tornaram esses anos muito mais prazerosos. Também agradeço de todo meu coração a Anne Almeida por toda sua generosidade em ensinar, por todos os conselhos e opiniões que me ajudaram a ir além. A todas, agradeço as contribuições dadas nesse projeto.

Ao Prof. Dr. Vanderson Sampaio por abrir as portas da pesquisa científica para mim. Agradeço todo o apoio e incentivo que recebi ao longo desse mestrado. Agradeço

ainda todos os ensinamentos e por fazer a análise estatística um pouco menos assustadora.

Aos amigos Bárbara Yole, Herbert Theury, Karolina Sabino e Rafaelle Calado que sempre me incentivaram e acreditaram em mim. Poder compartilhar as alegrias e frustrações com vocês sempre renova minhas forças para continuar a ir atrás dos meus sonhos.

Aos meus companheiros de turma com quem pude dividir o desafio desse mestrado. Acredito que tudo acontece no tempo certo que tem que acontecer. E tenho certeza de que Deus me deu o prazer de ter vocês como minha turma e como amigos. Vocês são pessoas especiais e tenho certeza de que terão um futuro cheio de realizações. Obrigada por serem a melhor turma que eu poderia escolher!

A todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas e aos funcionários da Gerência de Malária da FMT-HVD por todo o apoio nesses anos de mestrado.

À Universidade do Estado do Amazonas e à Fundação de Medicina Tropical dr. Heitor Vieira Dourado, pela infraestrutura cedida à execução deste trabalho.

A todos os participantes que aceitaram fazer parte desse estudo.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse projeto

## **DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),  
pelo financiamento da pesquisa.

**EPÍGRAFE**

“Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa. O senhor concedendo, eu digo: para pensar longe, sou cão mestre - o senhor solte em minha frente uma ideia ligeira, e eu rastreio essa por fundo de todos os matos, amém!”

**(Grande Sertão: Veredas – João Guimarães Rosa)**

## RESUMO

A biotransformação da primaquina ocorre por duas vias: a das enzimas do Citocromo P-450 (CYPs) e da Monoamina oxidase A (MAO-A), que podem ser influenciada por características genéticas. A influência das CYPs no sucesso da terapia antimalárica permanece incerto. Para investigar a associação de polimorfismos das CYP2D6, CYP2C19 e CYP3A4 e dos fenótipos de metabolização com a episódios de recorrência da infecção por malária, uma casuística de 311 indivíduos que foi acompanhada por 180 dias após o diagnóstico de malária e tratados com a combinação de cloroquina+primaquina foi realizada. Esses indivíduos foram divididos em dois grupos: com e sem recorrência. A genotipagem das CYP2D6, CYP2C19 e CYP3A4 foi feita usando ensaios Taqman PCR em tempo real. Os fenótipos das CYP2D6 e CYP2C19 foram preditos a partir do genótipo. As frequências dos alelos e fenótipos de função lenta e normal de todas as CYPs investigadas foram similares entre os dois grupos, com exceção do alelo CYP2D6\*2xN ( $p=0.047$ ) e do fenótipo CYP2D6 UM ( $p=0.057$ ) que foram mais frequentes em indivíduos sem recorrência. Apesar disso, as CYP2D6, CYP2C19 e CYP3A4 não tiveram associação com o aumento de risco de recorrência. Os polimorfismos das CYPs também não tiveram influência no clareamento de estágios sanguíneos do parasita nem com o tempo e o número de episódios de recorrência. Conclui-se que os resultados desse estudo sugerem que indivíduos com fenótipo CYP2D6 ultrarrápido são menos suscetíveis a falha terapêutica da primaquina e que estudos adicionais de farmacogenética e farmacocinética são necessários a fim de avaliar o efeito clínico da primaquina.

**Palavras Chaves:** Malária, primaquina e farmacogenética

## ABSTRACT

Biotransformation of primaquine occurs through two pathways: Monoamine oxidase (MAO-A) and cytochrome P-450 enzymes (CYPs), which can be influenced by genetic characteristics. The influence of the CYPs in the success of antimalarial therapy success remains uncertain. To investigate the association of CYP2D6, CYP 2C19 and CYP3A4 polymorphisms and phenotypes with malaria recurrence, a casuistry of 311 individuals were followed for 180 days after malaria *vivax* diagnose and chloroquine+ primaquine therapy and were separated in two groups, those with recurrence episodes and those without. Genotyping of CYP2D6, CYP 2C19 and CYP3A4 were performed using Taqman assay by real-time PCR. CYP2D6, CYP 2C19 phenotypes were inferred from the genotype. The frequencies of slow function and normal function alleles and phenotypes for all CYPs were similar between the groups, except for the CYP2D6\*2xN allele ( $p=0.047$ ) and the CYP2D6 UM phenotype ( $p=0.057$ ) that were more frequent in individuals without recurrence. Despite that, the CYP2D6, CYP2C19 and CYP3A4 had no association with increased risk of recurrence. CYPs polymorphisms had also no influence in the blood stage parasites clearance, neither in the time and number of recurrence episodes. These results suggest that individuals with CYP2D6 UM phenotype are less susceptible to primaquine failure and additional investigation of pharmacogenetics and pharmacokinetics are needed to evaluate the primaquine clinical effect.

**Keywords:** Malaria, primaquine and pharmacogenetics

## RESUMO LEIGO

A malária causada por *P. vivax* continua sendo um grande desafio de saúde devido a sua presença em várias regiões do mundo, capacidade de causar recaídas e infecção grave. A primaquina, medicamento usado para o tratamento da malária, precisa ser transformada para que possa exercer sua ação. A transformação do medicamento sofre grande variação na população, o que pode resultar em falha do tratamento. Nesse estudo foi mostrado que variações genéticas não estavam associadas com um maior risco de falha terapêutica, tampouco com o número de episódios de malária e com o tempo entre os episódios. No entanto, foi mostrado que indivíduos com algumas variações genéticas parecem ser menos suscetíveis a falha no tratamento e que novos estudos são necessários com o objetivo de esclarecer o efeito clínico da primaquina.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Incidência de malária por <i>Plasmodium vivax</i> no ano de 2017 .....	15
Figura 2 – Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> .....	16
Figura 3 – Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, 2019.....	21
Figura 4 – Antimaláricos e seus alvos de ação no ciclo biológico do parasita.....	23
Figura 5 – Metabólitos gerados pelas vias CYP2D6 e MAO-A.....	25
Figura 6 - Farmacocinética predita da primaquina no tratamento de malária vivax	<b>Erro!</b>
<b>Indicador não definido.</b>	
Figura 7 - Fluxograma da população elegível para cura radical com primaquina.....	27
Figura 8 - Resumo do escore de atividade do fenótipo CYP2D6.....	31

**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA**

- ASAQ – Artesunato amidaquina whintrop®/coasurcam™
- AS – Score de atividade (activity score)
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention
- CQ – Cloroquina
- CYP450 – Citocromo P450
- CYP2D6 – Enzima do citocromo P450
- CYP2C19 – Enzima do citocromo P450
- CYP3A4 – Enzima do citocromo P450
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- FMT-HVD – Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado
- G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase
- gIM – Metabolizador intermediário
- gNM – Metabolizador normal
- gNM-F – Metabolizador normal rápido
- gNM-S – Metabolizador normal lento
- gPM – Metabolizador fraco
- gUM – Metabolizador ultrarrápido
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia Estatística
- IPA – Índice parasitológico anual
- MAO – Enzima monoamina coxidase
- MS – Ministério da Saúde
- NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- PCR – Reação da cadeia da polimerase
- PQ – Primaquina
- SIVEP-Malária – Sistema Informatizado de Vigilância Epidemiológica Malária
- SNP – Polimorfismo de um único nucleotídeo (Single nucleotide polymorphism)

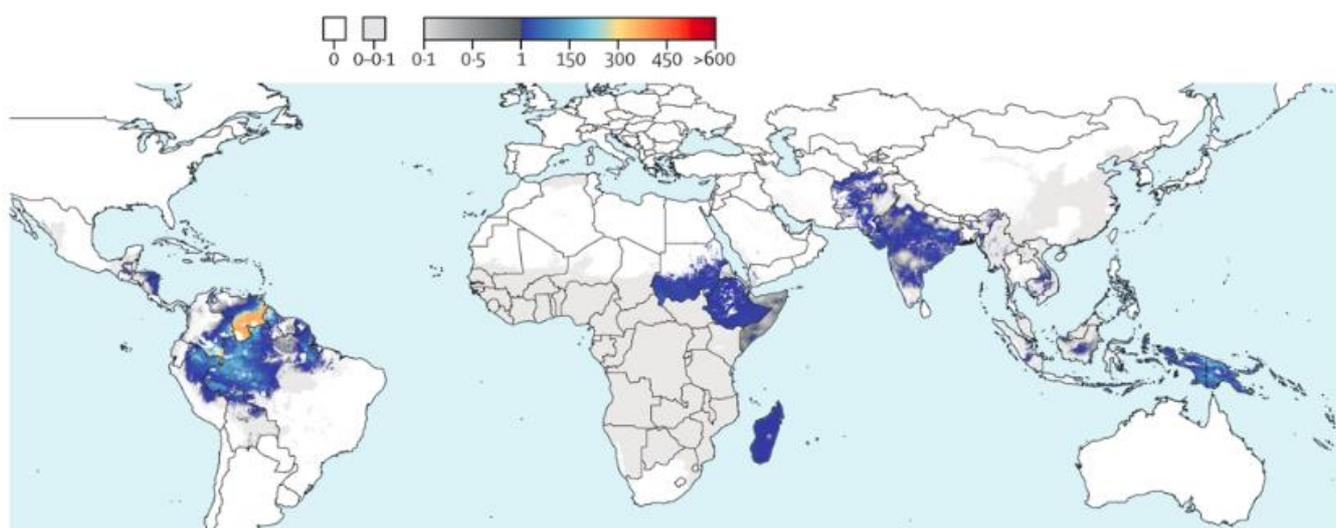
## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1 MALÁRIA .....	15
1.2 CICLO BIOLÓGICO DO <i>Plasmodium sp.</i> .....	16
1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO.....	18
1.4 <i>Plasmodium vivax</i> .....	20
1.4.1 Situação epidemiológica da malária vivax .....	20
1.4.2 Recaídas.....	21
1.4.3 Tratamento.....	22
1.5 CITOCROMO P450 E FARMACOGENÉTICA.....	27
1.5.1 CYP2C19.....	29
1.5.2 CYP2D6.....	30
1.5.3 CYP3A4 .....	33
1.6 JUSTIFICATIVA.....	34
2. OBJETIVOS .....	35
2.2 GERAL.....	35
2.3 ESPECÍFICOS.....	35
3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO – ARTIGO.....	36
4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS .....	63
5. CONCLUSÃO .....	64
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	66
7. ANEXOS E APÊNDICES .....	76
7.1. PROCEDIMENTO OPERACIONAI PADRÃO – POP EXTRAÇÃO DE DNA .....	78
7.2. PROCEDIMENTO OPERACIONAI PADRÃO – POP – GENOTIPAGEM.....	84
7.3. PROCEDIMENTO OPERACIONAI PADRÃO – POP – DETERMINAÇÃO DE HAPLÓTIPOS DO GENE CYP2D6.....	107
7.4. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA .....	122
7.5. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA .....	123
7.6. TERMO DE ESCLARECIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	128
7.7. TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	138

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 MALÁRIA

A malária é uma hemoparasitose infecciosa febril aguda responsável por doença e morte de crianças e adultos em países onde é endêmica (1). É transmitida quando o mosquito do gênero *Anopheles*, durante o repasto sanguíneo, infecta o hospedeiro humano com protozoários do gênero *Plasmodium*. Seis espécies de *Plasmodium* são conhecidas como causa da infecção: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi* e *P. simium* (1–3).



**Figura 1 – Incidência de malária por *Plasmodium vivax* no ano de 2017**

A incidência em casos por 1000 pessoas por ano é mostrada em um espectro de branco (zero incidência) a cinza escuro (1 caso/1000) e depois azul a vermelho (> 1 caso/1000 a > 600 casos/1000) para o ano de 2017.

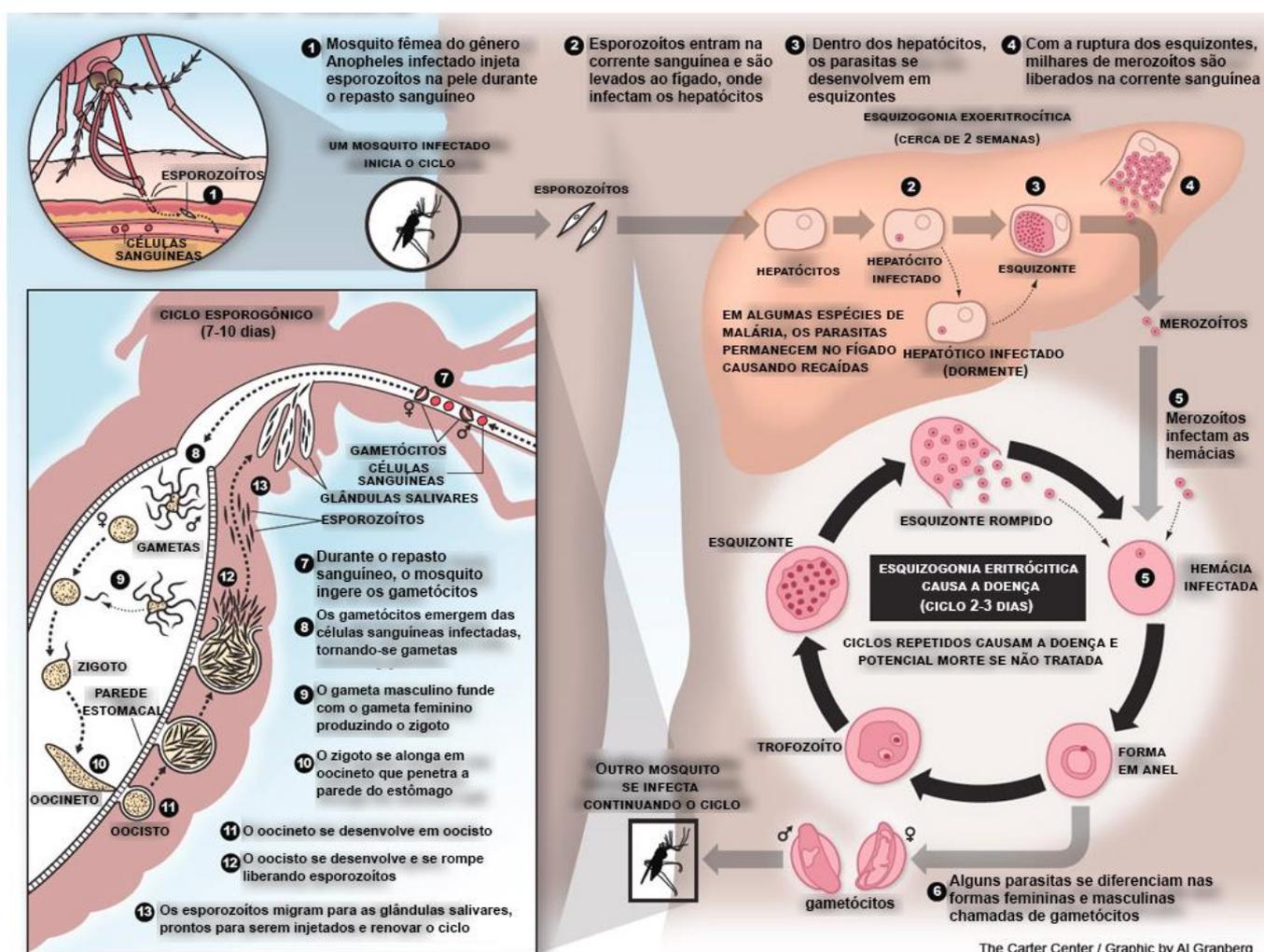
Fonte: Battle *et al*, 2019 (4)

Entre as espécies de *Plasmodium* que causam doença no homem, *P. falciparum* é o principal responsável pela morbidade e mortalidade da malária em todo o mundo (1). No entanto, a infecção causada pelo *P. vivax*, que inicialmente era considerada uma infecção não fatal, tem ganhado expressão devido a sua ampla distribuição geográfica e, também, a sua capacidade de causar malária grave e morte (1,5,6). Em 2018, *P. falciparum* apresentou maior frequência na África (99,7%), seguida pelo Mediterrâneo Oriental (71%), Pacífico Ocidental (65%) e Sudeste Asiático (50%). De todos os casos

estimados mundialmente para o mesmo ano, 3,3% foram causados por *P. vivax*. Nas Américas, onde cerca de 138 milhões de pessoas estão em risco da doença, *P. vivax* é o parasita predominante representando 79,5% dos casos de malária (1) (Figura 1).

## 1.2. CICLO BIOLÓGICO DO *Plasmodium sp.*

O ciclo biológico do parasita da malária envolve a infecção intermitente de humanos e mosquitos anofelinos. Nos seres humanos ocorre a fase assexuada, onde os parasitas crescem e se multiplicam primeiro nas células do fígado (esquizogonia exoeritrocítica) e depois nos eritrócitos (esquizogonia eritrocítica). Já no mosquito ocorre a reprodução sexuada do parasito, o ciclo esporogônico (7) (Figura 2).



**Figura 2 – Ciclo biológico de *Plasmodium*.**

Fonte: Adaptado de The Carter Center (8)

Durante o repasto sanguíneo, o mosquito anofelino fêmea infectado por malária inocula esporozoítos no hospedeiro humano. Os esporozoítos caem na circulação sanguínea, rapidamente infectam as células do fígado e amadurecem em esquizontes, que se rompem e liberam merozoítos. Os merozoítos então infectam os eritrócitos. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns parasitos se desenvolvem e continuam o ciclo, enquanto outros se transformam em hipnozoítos, forma de latência do parasito. Esses hipnozoítos são capazes de persistir no fígado e, podem ser ativados após semanas, meses ou até mesmo anos da infecção inicial, causando novo episódio de malária (7,9).

Dentro dos eritrócitos, os trofozoítos em estágio de anel amadurecem em esquizontes, que se rompem liberando merozoítos, os quais por sua vez, invadem novos eritrócitos e dão continuidade ao ciclo. A esquizogonia eritrocítica repete-se a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*. Os parasitos sanguíneos são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença. Durante o ciclo eritrocitário, alguns parasitos se diferenciam em gametócitos, forma sexuada e infectante para o mosquito. Durante um novo repasto sanguíneo, o mosquito ingere os gametócitos machos (microgametócitos) e fêmeas (macrogametócitos) (7,9).

*P. vivax* possui a característica de invadir estritamente os reticulócitos, células jovens da linha eritrocítica, indicando a presença de um mecanismo de identificação desse tipo celular (7). A invasão de eritrócitos pelos merozoítos depende da interação entre moléculas ligantes dos parasitos e receptores específicos no eritrócito. O receptor Duffy tem sido apontado como um determinante para a invasão dos reticulócitos por *P. vivax* (10). Esta preferência seletiva na invasão de glóbulos vermelhos é um fator importante que limita o crescimento de *P. vivax in vitro* e *in vivo* (11) .

O início do ciclo esporogônico dá-se pela ingestão de gametócitos pelo mosquito, mas a presença de gametócitos no sangue periférico não necessariamente resulta em infecção do mosquito. Após a ingestão, a chance de infecção depende de fatores como a maturidade do gametócito, a

concentração de formas masculina e feminina e a resposta imune do hospedeiro (12). Caso a infecção seja bem-sucedida, a reprodução sexuada do parasita ocorrerá no mosquito.

No estômago do mosquito, os microgametas penetram os macrogametas gerando zigotos. Os zigotos se desenvolvem no lúmen do intestino médio do mosquito em oocinetos móveis que invadem a parede do intestino médio do mosquito, onde se desenvolvem em oocistos. Os oocistos crescem, rompem e liberam esporozoítos que se dirigem às glândulas salivares do mosquito. A inoculação dos esporozoítos em um novo hospedeiro humano dá continuidade ao ciclo biológico do *Plasmodium sp.* O desenvolvimento bem-sucedido do parasita da malária no mosquito leva cerca de 10 a 18 dias (9,13–15)

### 1.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO

O período de incubação da malária pode variar de 7 a 30 dias, no entanto, pode acontecer após meses em condições especiais, no caso de *P. vivax* (13).

Os sintomas iniciais de malária são inespecíficos e similares aos de diferentes doenças infecciosas, como dengue, leptospirose, hepatite viral ou sepsis bacteriana. O quadro clínico da malária pode ser leve, moderado ou grave, dependendo da espécie de parasitas, do tempo da doença, da idade do paciente, do seu status imune e constituição nutricional (5,13).

A gravidade dos sintomas varia de assintomático a sintomas graves, podendo evoluir para morte. Os sintomas incluem calafrios, febre, sudorese, cefaleia, mialgia, náuseas, vômitos, cansaço, fadiga, desconforto abdominal e dores musculares e articulares. Em crianças pequenas, a malária também pode se apresentar com letargia, desnutrição e tosse (13,16).

Se não tratada precocemente, a malária pode evoluir para malária grave. Essa evolução pode levar dias, mas também pode ocorrer dentro de

algumas horas. A infecção pode afetar múltiplos órgãos e resultar em alteração da consciência, anemia grave, edema pulmonar, falha renal, lesão renal grave, coma e morte (13,16,17). A anemia, uma das principais complicações da malária, se não tratada pode levar a morte pessoas de grupos vulneráveis, como crianças e grávidas (1,18)

De modo geral, a malária é uma doença curável se diagnosticada e tratada rápida e corretamente. Em áreas endêmicas, deve-se suspeitar de malária sempre que algum paciente apresentar histórico de febre ou temperatura igual ou superior a 37,5°C sem outra causa óbvia. Em áreas de baixa endemicidade, as equipes de saúde devem estar treinadas para identificar pacientes que tiveram possibilidade de exposição ao parasita, como por exemplo, pacientes que viajaram para áreas endêmicas (17).

Atualmente, a OMS recomenda a testagem de todo os casos de suspeita de malária, visando o tratamento adequado. A microscopia e os testes rápidos imunocromatográficos são os dois métodos recomendados para o diagnóstico da malária, que se baseia na identificação do parasita na amostra sanguínea (17,19). Além desses, os exames moleculares, como a PCR (reação em cadeia da polimerase), também têm sido utilizados no diagnóstico (9,16,19).

O método mais utilizado, considerado padrão de referência, é a gota espessa que permite a detecção do parasito em amostras sanguíneas, além da diferenciação da espécie, do estágio sanguíneo e da densidade parasitária. É um método simples e barato, mas que exige qualidade no preparo da lâmina, profissional treinado e equipamento apropriado (9,13,16,19).

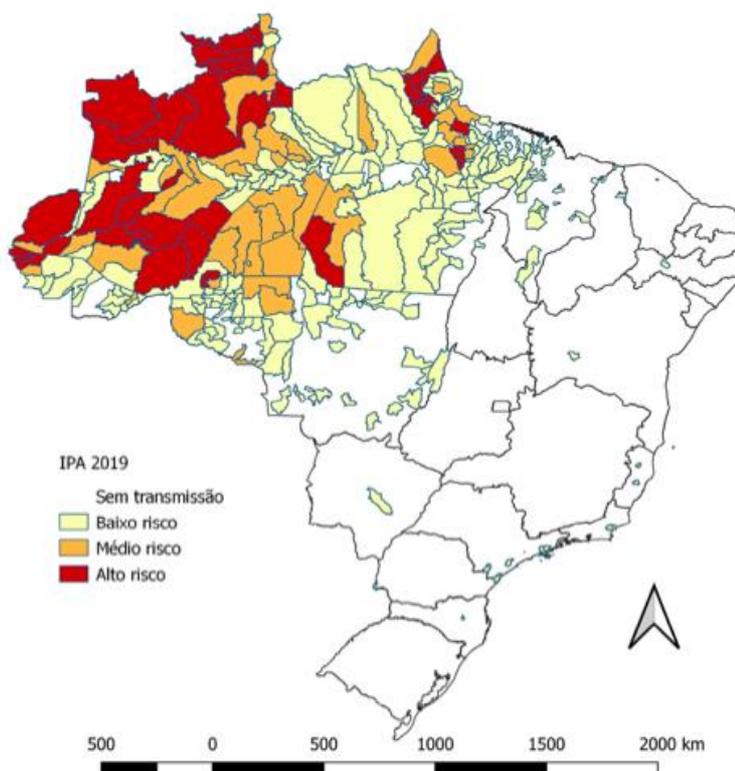
Os testes rápidos imunocromatográficos são uma alternativa à microscopia, principalmente em áreas remotas, onde não existe estrutura compatível, e em áreas de baixa transmissão onde nem sempre existe profissional treinado para a identificação do parasita (9,20). Os testes rápidos baseiam-se na detecção de antígenos dos parasitos por anticorpos monoclonais, que são revelados por método imunocromatográfico (13). São

testes rápidos e de fácil execução. No entanto são mais caros, não detectam infecções mistas (de mais de uma espécie de *Plasmodium sp*), além de identificarem apenas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* e não serem capazes de quantificar a parasitemia (13,19). Os testes rápidos apresentam menor sensibilidade do que a microscopia e, por isso, recomenda-se a confirmação do resultado positivos (16).

Testes moleculares para detecção de parasitemia têm sido utilizados devido sua alta sensibilidade e especificidade, sendo capazes de identificar parasitas em baixas concentrações (9,21). Exames de PCR são capazes de identificar as diferentes espécies de *Plasmodium sp* (20). Embora sejam úteis na identificação das espécies, o tempo longo para análise impede que a PCR seja utilizada no diagnóstico da malária aguda (9,16,20)

#### 1.4. *Plasmodium vivax*

##### 1.4.1. Situação epidemiológica da malária vivax



### **Figura 3 – Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, 2019**

Fonte: Ministério da Saúde, Brasil (22)

Em 2018, *P. vivax* foi responsável por cerca de 7.5 milhões de casos de malária em todo o mundo. Embora o Sudoeste Asiático seja a região mais acometida, na região das Américas, *P. vivax* foi responsável pelo maior percentual de casos em relação às demais espécies, sendo o Brasil, o 2º país em número de casos (1).

No Brasil, dados preliminares de 2019, demonstram que foram registrados 155.638 casos e 27 óbitos. *P. vivax* foi o agente etiológico em mais de 90% dos casos (24). As áreas endêmicas localizam-se na Região da Amazônia Legal, com graus de risco expressos em valores do IPA: *baixo* (0,1 a 9,9) *médio* (10,0 a 49,9) e *alto* (maior ou igual a 50,0) (23) (Figura 3). Em 2019, na Amazônia Legal, foram registrados 155.103 casos de malária. Destes, 36,6% ocorreram no Amazonas. Em Manaus, capital do Estado, foram notificados 4.678 casos (22).

#### **1.4.2. Recaídas**

*P. vivax* apresenta características que o distinguem do *P. falciparum*, tais como o desenvolvimento em temperaturas mais baixas durante a esporogonia, a preferência pela invasão de reticulócitos e a capacidade dos gametócitos de *P. vivax* se desenvolverem precocemente, sendo observados na circulação periférica antes ou no início dos sintomas clínicos (7,24). Contudo, a diferença fundamental entre as duas espécies é a capacidade do *P. vivax* permanecer latente no fígado para causar recaídas (25).

De modo geral, o tempo de incubação da maior parte das cepas é curto, mas o tempo de recaída sofre grande variabilidade. As cepas de zonas temperadas e subtropicais exibem longos períodos de latência, de seis a dez meses. São elas as cepas St. Elizabeth, Madagascar e McCoy. Já as cepas tropicais apresentam latência curta, de três a seis semanas, e são

denominadas cepas Chesson (26–28). Apesar dessa divisão, evidências demonstram a presença de diferentes tipos de cepa em uma mesma região (29). Períodos mais curtos de recaída, menos de 90 dias, são observados no sudeste Asiático, na Melanésia e América do Sul. As regiões da América Central, norte da África e do Mediterrâneo apresentam períodos de recaídas entre 3 e 5 meses. Já os países da América do Norte, norte Europeu e Asiático exibem períodos longos de recaída, variando de 6 a 10 meses (26).

O mecanismo de regulação da ativação de hipnozoítos é desconhecido. No entanto, tem sido proposto que as recaídas podem ser desencadeadas por outras doenças infecciosas e por picadas de mosquitos (30,31). Acreditava-se, inicialmente, que as populações de parasitas emergentes durante recaídas seriam idênticas às aquelas encontradas no episódio primário. No entanto, análises de genotipagem revelaram que os parasitas presentes em episódios primários e de recaída são, com frequência, geneticamente distintos, ocorrendo, assim, a ativação de hipnozoítos heterólogos (32,33). Foi sugerido que populações residentes em regiões endêmicas possuem um reservatório de hipnozoítos decorrente de infecções anteriores. Essa teoria é apoiada pela observação de que recaídas homólogas ocorrem em indivíduos não expostos anteriormente ao parasita (18,34).

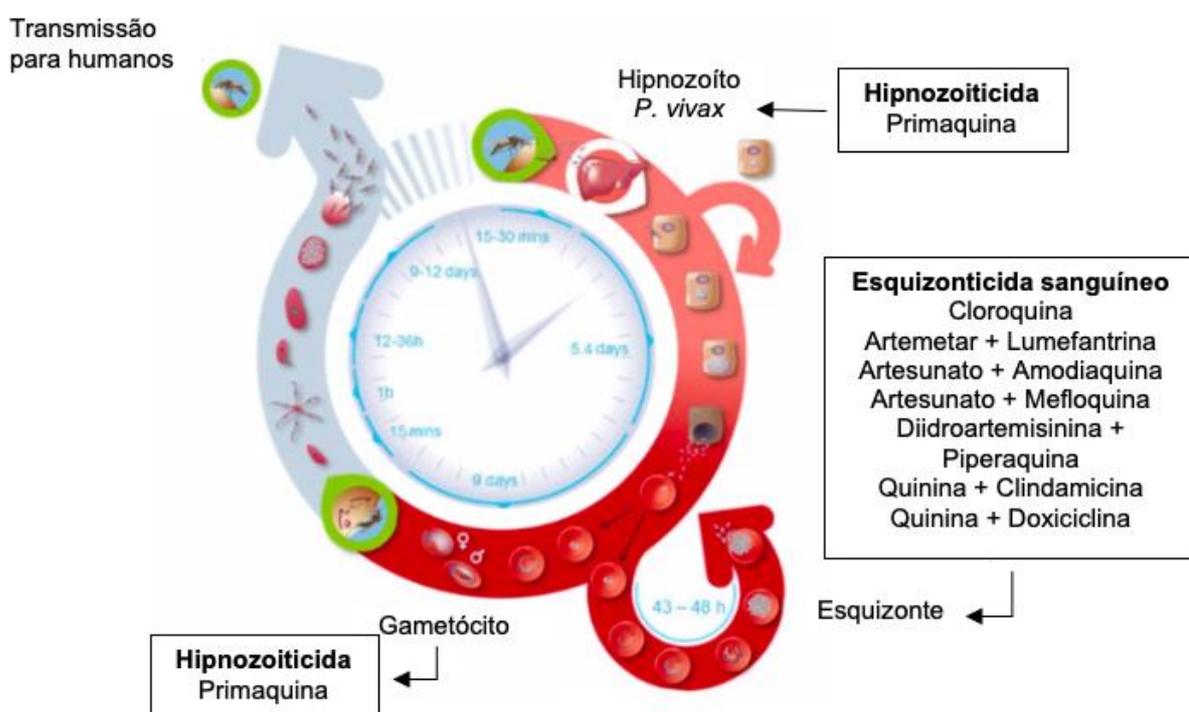
### 1.4.3. Tratamento

O tratamento da malária visa atingir o parasito em postos-chave de seu ciclo evolutivo: (i) interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção; (ii) destruição de formas latentes do parasito das espécies *P. vivax*, evitando assim as recaídas tardias; (iii) interrupção da transmissão do parasito, pelo uso de drogas que impedem o desenvolvimento de formas sexuadas dos parasitos (13).

Os medicamentos antimaláricos podem ser divididos pelo seu alvo de ação no ciclo biológico do parasito em: esquizonticidas teciduais ou hipnozoiticidas (cura radical do *P. vivax*), esquizonticidas sanguíneos

(promovem a cura clínica), gametocitocidas (bloqueiam a transmissão) e esporonticidas (impedem a infecção pelos esporozoítos) (35) (Figura 4).

O objetivo do tratamento da malária causada pelo *P. vivax* é a eliminação das formas sanguíneas e hepáticas, prevenindo assim a recorrência da doença. Uma infecção recorrente ocorre quando há detecção de novo episódio de parasitemia após uma infecção prévia. A recorrência pode ocorrer por: reinfecção, por uma nova picada do mosquito; recrudescência, devido o reaparecimento de parasitas por falha terapêutica; e recaída, por reativação do hipnozoítos. De modo geral, é difícil fazer a distinção dos tipos de recorrência em áreas endêmicas (26,28,36).



**Figura 4 – Antimaláricos e seus alvos de ação no ciclo biológico do parasita**

Fonte: Adaptado de Delves *et al*, 2012 (37)

A OMS recomenda que o tratamento de malária vivax seja feita com a associação da cloroquina (CQ) ou derivados da artemisinina com a primaquina (PQ) (17). O esquema terapêutico recomendado consiste na administração de cloroquina por 3 dias (10mg base/kg no 1º e no 2º dia e 5mg/kg no 3º dia) combinada com primaquina por 7 dias (0,5mg/kg/dia) (17).

#### 1.4.3.1. Primaquina

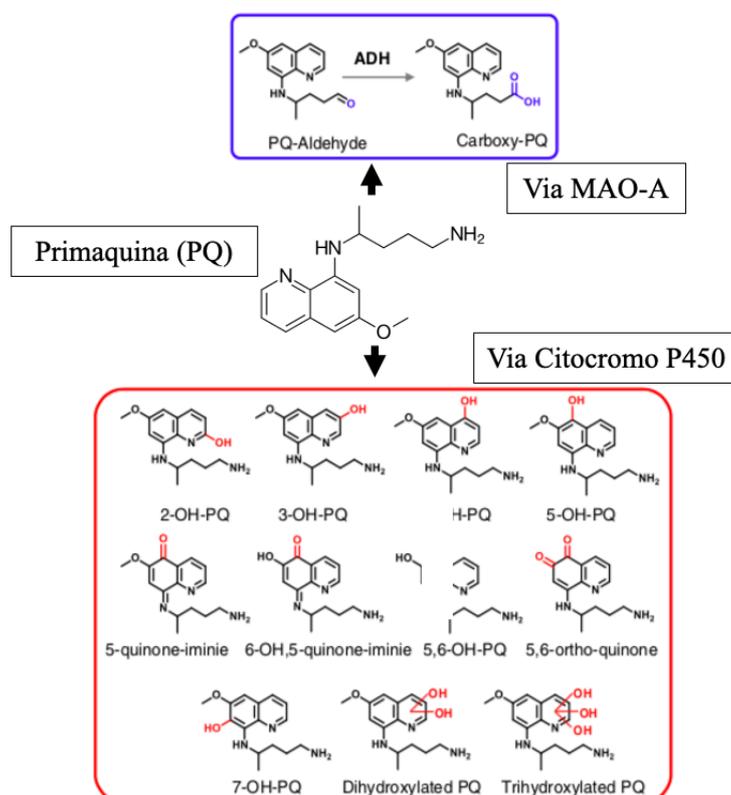
A primaquina foi desenvolvida, na década de 1940, pelo Exército Americano durante a Segunda Guerra Mundial como medida de controle da malária nas tropas atuantes na região do Pacífico (38,39). É indicada para a cura radical da malária por *P. vivax* e por *P. ovale*, redução da transmissão de malária por *P. falciparum* e como uma alternativa para a profilaxia primária contra todas as espécies de malária (13,17,40).

A PQ pertence à classe das 8-aminoquinolina, cujo mecanismo de ação não é totalmente compreendido. No entanto, foi proposto que a hidroxilação da PQ dá origem a metabólitos instáveis que são responsáveis tanto pela sua eficácia como pela sua toxicidade hemolítica. As reações de oxidação-redução geradas por seus metabólitos formam espécies reativas de oxigênio que resultam em estresse oxidativo e dano celular (38).

Rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, a PQ atinge picos de concentração em 1- 4 h, com biodisponibilidade de 96% e meia-vida de eliminação de 4-6h (17,41). Por ser biologicamente inativa, necessita ser biotransformada em metabólito ativo para exercer seu efeito antimalárico (42).

A biotransformação passa por duas vias principais: a via monoamina oxidase (MAO-A) e a via citocromo P-450 (Figura 5) (38). A via da MAO-A gera derivados de aldeídos, como a carboxiprimaquina, metabólito predominante, porém inerte (17,43). A biotransformação mediada pelas enzimas do citocromo P-450 é atribuída às enzimas CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 (43). Pybus *et. al.* (2012) demonstraram que a MAO-A e a CYP2D6 são responsáveis por cerca de 93% dos metabólitos de PQ e que, embora somente traços de metabólitos oxidados e dimetilados sejam gerados por CYP3A4 e CYP2C19, estas enzimas não devem ser desconsideradas como fonte de metabólitos do medicamento (43). O papel das CYP3A4 e CYP2C19 no metabolismo da PQ também foi observado em outros estudos (44,45).

A compreensão da biotransformação é primordial para determinação da eficácia e toxicidade da PQ. Estudo recente que analisou as diferentes vias metabólicas foi capaz de identificar 35 metabólitos, entre eles, a produção de metabólitos hidroxilados e da 5,6-ortoquinona após a incubação da CYP2D6 com a PQ (46). A 5,6-ortoquinona, metabólito estável produto da oxidação-redução da 5-hidroxiprimaquina (5-HPQ), é usado para mensurar a presença desse metabólito instável que tem sido apontado como responsável tanto pelo efeito terapêutico quanto pela toxicidade atribuída à PQ (38,46). No entanto, apesar de metabólitos hidroxilados serem apontados como responsáveis pelo efeito terapêutico, até o momento, a nenhum metabólito é atribuída a eficácia e/ou toxicidade do medicamento (46).



**Figura 5 – Metabólitos gerados pelas vias CYP2D6 e MAO-A**

Fonte: Adaptado de Marcsisin *et al*, 2016 (38)

A PQ é geralmente bem tolerada, porém, pode causar desconforto gastrointestinal relacionado à dose, levando a dor abdominal, náusea e vômito (18). Leucopenia, metahemoglobinemia com cianose e granulocitopenia

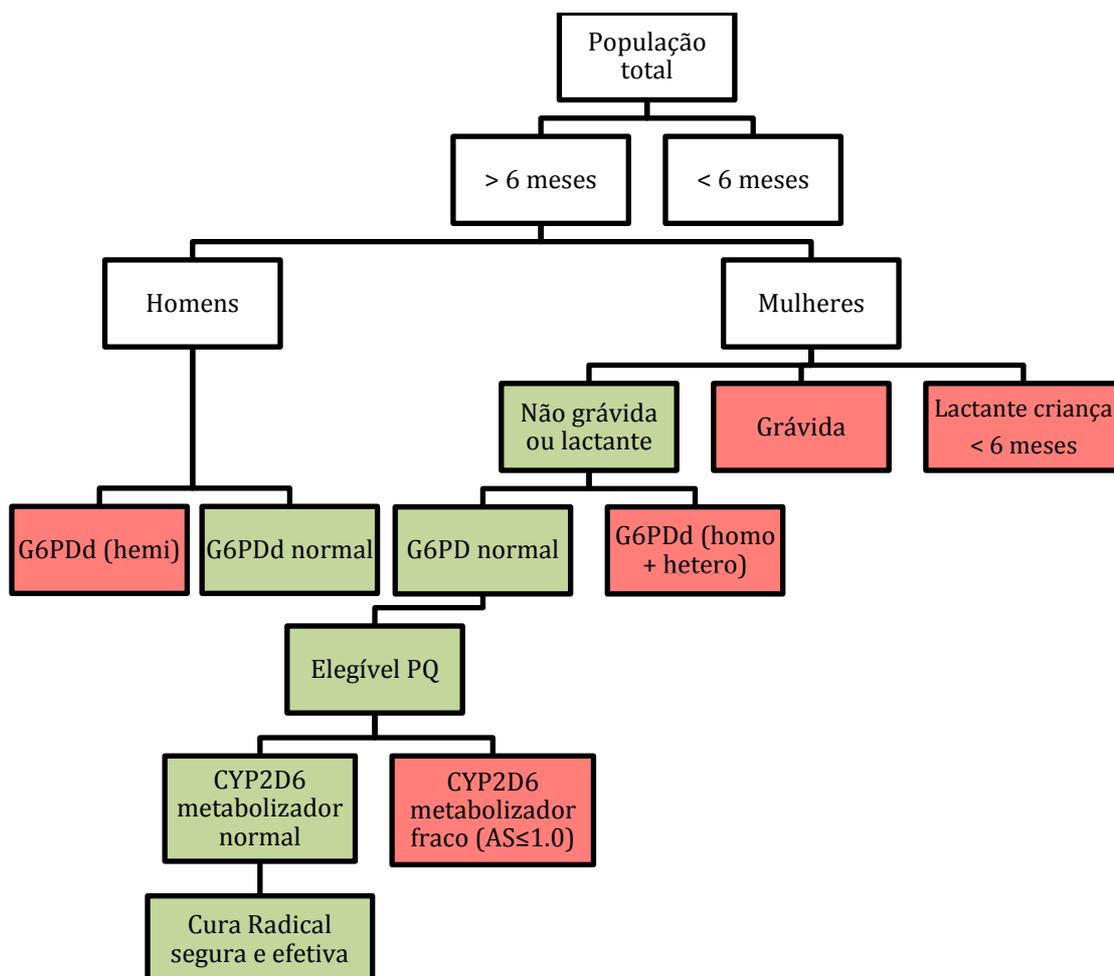
também podem ocorrer. O efeito adverso mais importante é a hemólise em pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDd) (17).

Em indivíduos deficientes de G6PD, os eritrócitos têm capacidade reduzida de defesa contra o estresse oxidativo causado por alguns medicamentos, incluindo a PQ, e se tornam vulneráveis à hemólise. São conhecidas cerca de 180 variantes genéticas de G6PD, no entanto, nem todas são clinicamente significantes (47,48). O grau de hemólise depende do grau de deficiência, da dose e da duração da exposição (49). A variante africana G6PD A- possui atividade enzimática residual de cerca de 5-10% dos níveis normais e a toxicidade da PQ nesses indivíduos é relativamente leve e autolimitada. Enquanto que a variante G6PD Mediterrânea apresenta atividade enzimática <1% e pode ocasionar anemia hemolítica aguda após tratamento com PQ. Já a G6PD Mahidol apresenta sensibilidade intermediária entre as variantes mencionadas (48). As Américas apresentam a menor frequência de indivíduos com deficiência de G6PD entre as regiões endêmicas para malária (50). No Brasil, há o predomínio da variante G6PD A-, apesar de existirem registros da identificação de outras variantes (48).

Na terapia com PQ em indivíduos com variantes menos graves, a hemólise começa no primeiro ou segundo dia após a dose inicial. No entanto, se a terapia não for descontinuada, há uma tendência da concentração de hemoglobina voltar a níveis normais e a crescer devido à introdução de reticulócitos na corrente sanguínea. Em indivíduos com a variante mais grave, no entanto, isso não ocorre e a continuação da terapia pode levar a anemia grave (18). No Brasil, existem registros de mortes relacionadas ao uso de PQ em pacientes com deficiência de G6PD (51,52).

A PQ é contraindicada em pacientes com hipersensibilidade conhecida à PQ ou a compostos relacionados e em pacientes com deficiência grave de G6PD ou deficiência grave de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) metemoglobina redutase (17). A PQ atravessa a placenta e pode causar hemólise em fetos com deficiência de G6PD, e por isso, não é recomendada para uso durante a gravidez. Além disso, a menos que o status G6PD do bebê

seja conhecido, a amamentação também não é recomendada pela incerteza da excreção de PQ pelo leite materno. Caso a PQ seja prescrita para a mãe, o bebê precisa ser acompanhado. O uso de PQ em crianças menores de seis meses também não é recomendado devido à falta de dados sobre sua total segurança (Figura 7) (17,18,53).



**Figura 6 - Fluxograma da população elegível para cura radical com primaquina**

Boxes vermelho indicam exclusão, enquanto boxes verdes indicam elegibilidade para utilização da primaquina. AS – score de atividade; G6PDd – G6PD deficiente; hemi – hemizigoto; hetero – heterozigoto; homo – homozigoto; PQ – primaquina.

Fonte: Adaptado de Baird *et al*, 2018 (54)

### 1.5. CITOCROMO P450 E FARMACOGENÉTICA

A biotransformação de fármacos envolve enzimas metabolizadoras que realizam reações de oxidação/redução (fase I) e de conjugação/hidrólise (fase

II). As reações de fase I, que em geral são responsáveis pela inativação de fármacos, podem também resultar em ativação de um pró-fármaco em metabólito ativo. Já as reações de fase II favorecem a eliminação de fármacos e a inativação de metabólitos potencialmente tóxicos (55). As reações de oxidação de fase I são realizadas em grande parte pelas enzimas da classe citocromo P450 (CYP). A monoamina oxidase é outra enzima importante nesse tipo de reação (56).

As enzimas CYP integram uma superfamília de enzimas encontradas principalmente no fígado e que estão envolvidas no metabolismo de compostos endógenos e exógenos (55). De todas as enzimas conhecidas dessa superfamília, as mais ativas no metabolismo de fármacos pertencem as subfamílias 1, 2 e 3, em especial as CYP3A4/5, CYP2C9, CYP2D6, CYP2C19, CYP1A2, CYP2C8 e CYP2B6 (57,58). Existe grande variabilidade nos níveis de expressão de cada CYP, intra e interindividualmente, que são influenciados por fatores ambientais, como as interações de indução e inibição entre fármacos; fatores biológicos, incluindo sexo e idade; e fatores genéticos, como a presença de polimorfismos (55,57).

Polimorfismo é uma variação na sequência do DNA que está presente a uma frequência alélica igual ou superior a 1% em determinada população (55). Variações nos genes do CYP450 podem afetar a função das enzimas modificando o metabolismo de fármacos, levando a variações no fenótipo clínico. São associados à variação fenotípica alguns tipos de variantes genéticas, como por exemplo, polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) e a variação no número de cópias (CNV) (55). A maior parte dos SNPs não são funcionalmente relevantes, isto é, não são capazes de influenciar na atividade enzimática. Por outro lado, algumas dessas variantes genéticas podem ajudar a prever a resposta de um indivíduo a certos medicamentos, a suscetibilidade a fatores ambientais, como toxinas, e o risco de desenvolver doenças específicas (55,57,59).

Os fenótipos resultantes das variações genéticas em CYP são classificados como metabolizadores ultrarrápidos, extensos, intermediários e

fracos. Metabolizadores ultrarrápidos (UM) são aqueles com variação no número de cópias do gene de um mesmo alelo, enquanto metabolizadores intermediários (IM) e fracos (PM) possuem um ou dois alelos com atividade diminuída ou nula. São metabolizadores extensivos (EM) ou normais indivíduos que possuem pelo menos um alelo com atividade normal da enzima CYP (59,60).

### 1.5.1. CYP2C19

O gene do citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 19 (CYP2C19) pertence à classe do citocromo P450. A enzima CYP2C19 tem papel importante no metabolismo de um grande número de fármacos como antidepressivos, inibidores da bomba de prótons, entre outros. Esta enzima é expressa predominantemente no fígado e em menor escala no intestino (61).

Algumas variações alélicas da CYP2C19 apresentam importância clínica em razão da influência que exercem na atividade enzimática. A CYP2C19 é altamente polimórfica e são conhecidas mais de 30 variações alélicas estrela (\*) (62). O alelo não funcional CYP2C19\*2 é o mais comumente relacionado à atividade enzimática nula, sendo a variante mais frequente em todo o mundo e apresentando frequência de 12,5% no Brasil (62,63). O alelo CYP2C19\*3, também de função nula, apresenta maior frequência na Ásia (45) e na Oceania (62), enquanto no Brasil a frequência desse alelo é quase nula (63). Além desses, o alelo CYP2C19\*17, com considerável frequência no Brasil (16,5%) e no mundo, está relacionado com o aumento na função enzimática (61–63).

O clopidogrel, um antiagregante plaquetário, é biotransformado pela CYP2C19 e a presença de polimorfismos dessa enzima foi associada a baixas concentrações do metabólito ativo (64,65). Outro medicamento biotransformado pela CYP2C19 é o proguanil, usado em associação com atovaquona no tratamento da malária (17,66). Taphar *et al* encontraram associação entre fenótipos PM e diminuição nas concentrações de cicloguanil, metabólito ativo do proguanil (67). Essa CYP também tem papel na biotransformação da PQ (43). Estudo recente realizado na Malásia associou o

alelo CYP2C19\*2 com a diminuição da biotransformação de PQ em carboxiprimaquina (45).

### 1.5.2. CYP2D6

O gene CYP2D6 está localizado no Chr22q13.1 próximo a dois pseudogenes não funcionais, CYP2D7 e CYP2D8 (68). A enzima CYP2D6 está relacionada com a biotransformação de cerca de 25% de todos os fármacos clinicamente em uso, entre eles antidepressivos, beta-bloqueadores, neurolépticos, antiarrítmicos, antieméticos, anti-histamínicos e antivirais (68,69).

A enzima, diferente de outras CYPs, não sofre influência por fatores ambientais e por indução enzimática (57,69). No entanto, é fortemente influenciada por fatores genéticos, sendo considerada a CYP mais polimórfica (69). Atualmente, são conhecidas mais de 100 variantes da CYP2D6 e seu polimorfismo afeta a farmacocinética de cerca de 50% dos fármacos que são substratos dela (62,69). As variantes genéticas de CYP2D6 dão origem a alelos com atividade nula, reduzida, normal ou aumentada, levando a variações na atividade enzimática (59,62). Entre as variantes mais importantes estão CYP2D6\*2 (atividade normal), CYP2D6\*4 e CYP2D6\*5 (atividade nula), e CYP2D6\*10, CYP2D6\*17 e CYP2D6\*41 (atividade reduzida) (68,69).

Gaedigk *et.al* (2007) desenvolveram um sistema capaz de traduzir o genótipo de um indivíduo em atividade predita de CYP2D6. O sistema baseia-se na atribuição de valores de atividade para cada alelo de acordo com a sua função enzimática e na soma da atividade de cada alelo resultando em um escore de atividade (AS) da enzima. Sendo assim, os alelos receberam os valores 0 para não funcionais, 0,5 para função reduzida, 1,0 para funcionais e 2,0 para alelos de função aumentada. A partir desses valores, a combinação dos alelos permite que o fenótipo do indivíduo seja predito a partir do genótipo em metabolizadores fracos, intermediários, normais e ultrarrápidos, com valores de AS iguais a 0,0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 ou >2,0 (68,70). Segundo ensaio

clínico realizado por Baird *et.al* (2018) , indivíduos com AS  $\leq 1,0$  são considerados metabolizadores fracos da PQ (Figura 8) (54,71).

A frequência alélica de CYP2D6 varia amplamente na população. O alelo selvagem CYP2D6\*1, que confere atividade enzimática normal, é predominante em todo o mundo. Entre as variantes alélicas, prevalece os alelos CYP2D6\*17 entre africanos, CYP2D6\*2 entre europeus e americanos e CYP2D6\*10 no leste asiático (72). O fenótipo mais comum é o de metabolizador normal. Metabolizadores ultrarrápidos são encontrados principalmente na Oceania, metabolizadores fracos na Europa e metabolizadores intermediários na África (72). No Brasil, o alelo CYP2D6\*1 é frequente em cerca de 38% da população, seguido dos alelos CYP2D6\*2 (21,5%), CYP2D6\*4 (9,4%), CYP2D6\*17 (5,6%) e CYP2D6\*41 (5,5%) (73). Prevalece no país o fenótipo de metabolizador normal (83,5%). Metabolizadores intermediários, ultrarrápidos e fracos representam 7,1%, 3,7% e 2,5%, respectivamente (73).

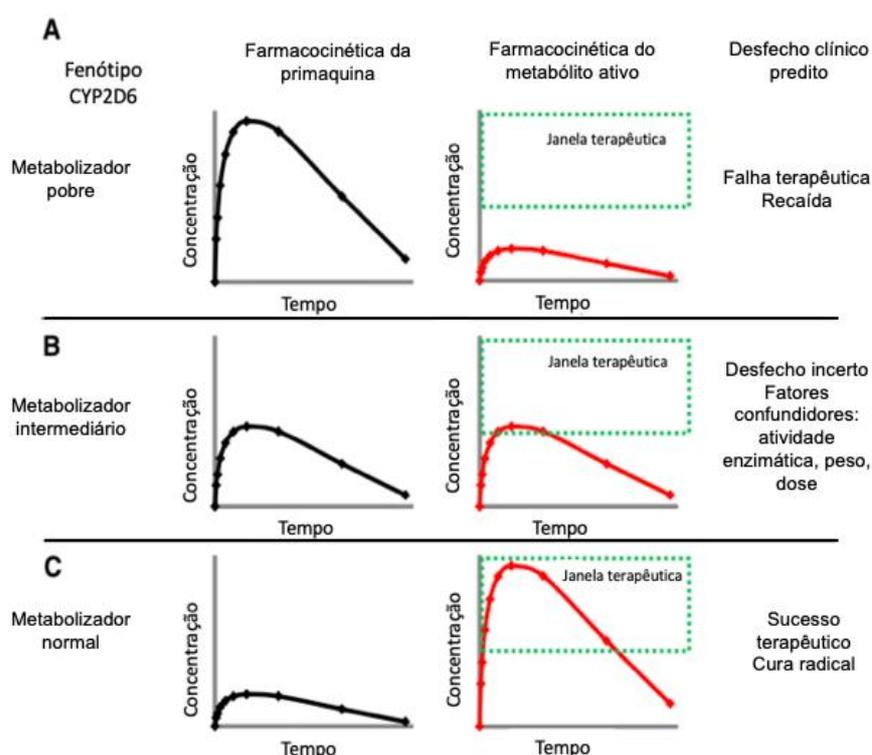
			Alelo 1				
			Aumentada	Normal	Intermediária	Intermediária	Não funcional
Score de atividade (AS)			2,0	1,0	0,5	0,25	0,0
Alelo 2	Aumentada	2,0	4,0	3,0	2,5	2,25	2,0
	Normal	1,0	3,0	2,0	1,5	1,25	1,0
	Intermediária	0,5	2,5	1,5	1,0	0,75	0,5
	Intermediária	0,25	2,25	1,25	0,75	0,5	0,25
	Não funcional	0,0	2,0	1,0	0,5	0,25	0,0

**Figura 7 - Resumo do escore de atividade do fenótipo CYP2D6**

\*Os escores de atividade para cada alelo componente no genótipo (alelo 1 e alelo 2) somam-se para fornecer os escores de atividade do genótipo. Fenótipos com AS  $\leq 1,0$  (em vermelho) são considerados metabolizadores fracos da primaquina. O gradiente de cor representou o espectro de pontuações de atividade de muito baixa a muito alta.

Fonte: Adaptado de Baird *et al*, 2018 (54) e atualizado de Caudle *et. al.*, 2020 (74)

Bennet *et al*, 2013 reportaram falha terapêutica da PQ no tratamento do *P. vivax* atribuída à presença de polimorfismo em CYP2D6, resultando em diminuição da biotransformação do fármaco e, conseqüentemente, baixos níveis de metabólito ativo (75). A dependência da CYP2D6 na eficácia da PQ também foi demonstrada em experimento com modelo animal, onde a ausência de CYP2D6 e o uso de paroxetina, um inibidor da CYP2D6, foram capazes de reduzir a produção de metabólitos fenólicos gerados por essa via (76). Baird *et al*, 2018 evidenciaram que a atividade diminuída de CYP2D6 estava associada a um risco elevado de falha terapêutica, sugerindo a relação da CYP2D6 com a biotransformação da PQ e do aumento do risco de recaída (71). A relação entre a falha terapêutica da PQ e a presença de polimorfismo de CYP2D6 também foi reportada no Brasil (77,78).



**Figura 8 - Farmacocinética predita da primaquina no tratamento de malária vivax**

Fonte: Adaptado de Marcsisin *et al*, 2016 (38)

De acordo com as variações alélicas do gene da CYP2D6, é possível prever o fenótipo farmacocinético e a resposta a drogas metabolizadas por essa via. O fenótipo de CYP2D6 é classificado em metabolizador fraco,

intermediário, normal e ultrarrápido (Figura 6). A concentração de PQ varia de acordo com o fenótipo, sendo maior em metabolizadores fracos que não são capazes de metabolizar amplamente o medicamento e que, conseqüentemente, terão maior risco de falha terapêutica devido a concentração subterapêutica do metabólito ativo. Em metabolizadores normais as concentrações do metabólito ativo atingem a janela terapêutica resultando em sucesso da terapia. Em metabolizadores intermediários, a concentração de metabólito fica entre o observado em metabolizadores normais e fracos, sendo o desfecho clínico difícil de ser predito devido à existência de fatores confundidores. Já em metabolizadores ultrarrápidos a resposta clínica ainda precisa ser determinada (38).

### **1.5.3. CYP3A4**

As enzimas da subfamília CYP3A, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 e CYP3A43, são responsáveis pelo metabolismo de um grande número de fármacos de diferentes categorias terapêuticas, como os imunossupressores ciclosporinas A e tacrolimo, antibióticos macrolídeos como eritromicina, benzodiazepínicos, inibidores da HMG-CoA redutase como sinvastatina e atorvastatina, anestésicos e muitos outros. Além disso, atuam no metabolismo de várias substâncias endógenas (57,79).

A CYP3A4 é enzima CYP3A dominante no fígado e contribui em média de 15-30% para o pool microsomal do P450 (80). Essa enzima é influenciada tanto por fatores ambientais quanto por fatores genéticos. Mais de 30 alelos são conhecidos, no entanto, apesar de polimorfismos genéticos terem sido propostos como determinantes do fenótipo do CYP3A4, não há até então uma relação genótipo-fenótipo clara para essa enzima (57,62).

A variante CYP3A4\*1B foi o primeiro polimorfismo identificado de CYP3A4 (81). A frequência alélica de CYP3A4\*1B varia amplamente na população: 76% em Guiné Bissau (82), 6,58% no México (83), 3,6% entre americanos brancos e nula entre americanos de origem chinesa (84). No Brasil a frequência varia de 10% entre brancos e 38% entre negros (85).

O significado funcional dessa variante tem sido amplamente estudado. A associação entre CYP3A4\*1B e o câncer de próstata foi identificada, mostrando um maior risco desse tipo de câncer entre populações africanas (86). Além disso, foi sugerido o ajuste de dose de tacrolimo em pacientes portadores de CYP3A4\*1B (87,88). Diferentemente, não foi detectado efeito dessa variante no metabolismo do midazolam (89). Ademais, a presença desse polimorfismo não foi suficiente para determinar doses individualizadas de ciclosporina visando ao sucesso terapêutico sem efeitos adversos (90). Embora muitos estudos busquem associar esse polimorfismo ao metabolismo de fármacos ou à suscetibilidade a doenças, o efeito dessa variante permanece controverso (57,79).

#### 1.6. JUSTIFICATIVA

Muitos fatores podem afetar a resposta do indivíduo aos medicamentos, incluindo gênero, idade, dieta e as características genéticas. O conhecimento dessas características individuais é fundamental no sucesso das terapias farmacológicas.

A PQ, o único medicamento hipnozoitocida aprovado no Brasil, é biotransformada em parte pelas enzimas do citocromo P450 e a presença de polimorfismos dessas enzimas é capaz de alterar a resposta clínica de pacientes com malária, levando inclusive à falha terapêutica. Quando se combina o metabolismo ineficiente da PQ com a população excluída da terapia por motivos de segurança, estima-se que quase um terço da população que vive em regiões de risco de infecção por *P. vivax* é incapaz de receber uma terapia preventiva segura e eficaz.

Sendo assim, conhecimento da variabilidade genética e a influência das CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 na resposta clínica de pacientes com malária causada pelo *P. vivax* se torna de grande importância por conta da ampla incidência da infecção e da observação de variantes polimórficas dessas CYPs na população local.

## 2. OBJETIVOS

### 2.2. GERAL

- Avaliar a influência de polimorfismos genéticos em CYP2D6, CYP3A4, CYP2C19 na resposta clínica de pacientes com malária vivax tratados com primaquina.

### 2.3. ESPECÍFICOS

- Investigar a frequência de polimorfismos dos genes CYP2D6, CYP3A4 e CYP2C19.
- Determinar a influência dos fenótipos na resposta clínica dos pacientes com diagnóstico de infecção por *Plasmodium vivax* tratados com primaquina.
- Determinar a influência dos fenótipos no tempo e no número de recorrências
- Estudar a associação dos fenótipos com o tempo de clareamento de gametocitemia.

### 3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO – ARTIGO

#### **Influence of *CYP2D6*, *CYP3A4* and *CYP2C19* genotypes on recurrence of *Plasmodium vivax***

Jaiana L. M. Cardoso<sup>a,b\*</sup>, Yanka E. A. R. Salazar<sup>a\*</sup>, Anne C. G. Almeida<sup>a,b</sup>, Laila R. A. Barbosa<sup>a,b</sup>, Emanuelle L. Silva<sup>a</sup>, Maria Gabriela Almeida Rodrigues<sup>a,b</sup>, Fernanda Rodrigues-Soares<sup>c</sup>, Vanderson S. Sampaio<sup>a,b</sup>, André M. Siqueira<sup>d</sup>, Marcus V. G. Lacerda<sup>a,b,e</sup>, Wuelton M. Monteiro<sup>a,b</sup>, Gisely C. Melo<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema. Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil.

<sup>b</sup>Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical. Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.

<sup>c</sup> Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Departamento de Patologia, Genética e Evolução, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

<sup>d</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Presidência da Fiocruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. Av Brasil 4365, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Fiocruz. Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ – Brasil.

<sup>e</sup>Instituto Leônidas & Maria Deane. Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, Amazonas, Brazil.

Running Head: **Primaquine CYPs on recurrence of *P. vivax***

**Corresponding author:** Gisely Cardoso de Melo, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado. Avenida Pedro Teixeira, N° 25, Dom Pedro. CEP: 69040-000. Manaus, Amazonas, Brazil. Email: cardosogisely@gmail.com

\*These authors contributed equally

## ABSTRACT

Biotransformation of primaquine occurs through two pathways: cytochrome P-450 enzymes (CYPs) and Monoamine oxidase A (MAO-A), which can be influenced by genetic characteristics. The influence of the CYPs in the success of antimalarial therapy remains uncertain. To investigate the association of *CYP2D6*, *CYP 2C19* and *CYP3A4* polymorphisms and phenotypes with malaria recurrence, a casuistry of 311 individuals were followed for 180 days after malaria *vivax* diagnose and chloroquine+ primaquine therapy. They were separated in two groups, those with recurrence episodes and those without. Genotyping of *CYP2D6*, *CYP 2C19* and *CYP3A4* were performed using Taqman assay by real-time PCR. *CYP2D6* and *CYP2C19* phenotypes were predicted from the genotype. The frequencies of slow function and normal function alleles and phenotypes for all CYPs were similar between the groups, except for the *CYP2D6*\*2xN allele ( $p=0.047$ ) and the *CYP2D6* UM phenotype ( $p=0.057$ ) that were more frequent in individuals without recurrence. Despite that, the *CYP2D6*, *CYP2C19* and *CYP3A4* genotypes had no association with increased risk of recurrence. CYPs polymorphisms had also no influence in the blood stage parasites clearance, neither in the time and number of recurrence episodes. In conclusion, these results suggest that individuals with *CYP2D6* UM phenotype are less susceptible to primaquine failure and additional investigation of pharmacogenetics and pharmacokinetics are needed to evaluate the CYPs influence in primaquine clinical effect.

## INTRODUCTION

Malaria is a globally distributed infectious disease. In 2018, 228 million cases and 405 thousand deaths from malaria were reported worldwide (1). In Brazil there were approximately 217,000 cases and 44 deaths, of these, 77.7%

were caused by *Plasmodium vivax* (1). *P. vivax* has characteristics that are an obstacle for its elimination, such as its ability to remain latent in the liver in the form of hypnozoites that can cause relapses when reactivated (2). Furthermore, malaria recurrence can occur by reinfection, due to a new mosquito bite or even by recrudescence, due to therapeutic failure, leading to the reappearance of parasites (3–5).

Primaquine (PQ), an hypnozoitocidal drug, needs to be biotransformed into an active metabolite to exert its antimalarial effect (6). Biotransformation occurs through two main pathways: the cytochrome P-450 and the monoamine oxidase (MAO-A) (7). Biotransformation mediated by CYPs is attributed to the enzymes CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 (8). The MAO-A pathway generates aldehyde derivatives, such as carboxyprimaquine, a predominant but inert metabolite (8,9).

The human host genetics contribution to the results of antimalarial treatment has been demonstrated in recent studies. Bennet et al. reported therapeutic failure of PQ in the treatment of vivax malaria attributed to the presence of polymorphism in *CYP2D6*, resulting in decreased biotransformation of the drug and, consequently, low levels of active metabolite (10). Baird et al. showed that decreased CYP2D6 activity was associated with an increased risk of therapeutic failure, suggesting the relation between CYP2D6 with PQ biotransformation and an increased risk of relapse (11). The relation between therapeutic failure of PQ and the presence of *CYP2D6* polymorphism has also been reported in Brazil (12,13). The most important genetic variants of *CYP2D6* are *CYP2D6\*2* (normal activity allele), *CYP2D6\*4* and *CYP2D6\*5* (null activity allele), *CYP2D6\*10*, *CYP2D6\*17* and *CYP2D6\*41* (reduced activity allele) (14–16).

Pybus et al. demonstrated that MAO-A and CYP2D6 are responsible for about 93% of PQ metabolites and, even though only traces levels of oxidated and dimethylated metabolites are generated by CYP3A4 and CYP2C19, these enzymes should not be disregarded as a source of metabolites of the drug (8). Ariffin et al. associated the presence of the *CYP2C19\*2* allele with the decrease in PQ biotransformation into carboxyprimaquine (17). This null activity allele has also been related to the decrease in biotransformation of other antimalarial drugs (9,18,19). Although CYP3A4 has a role in the biotransformation of PQ

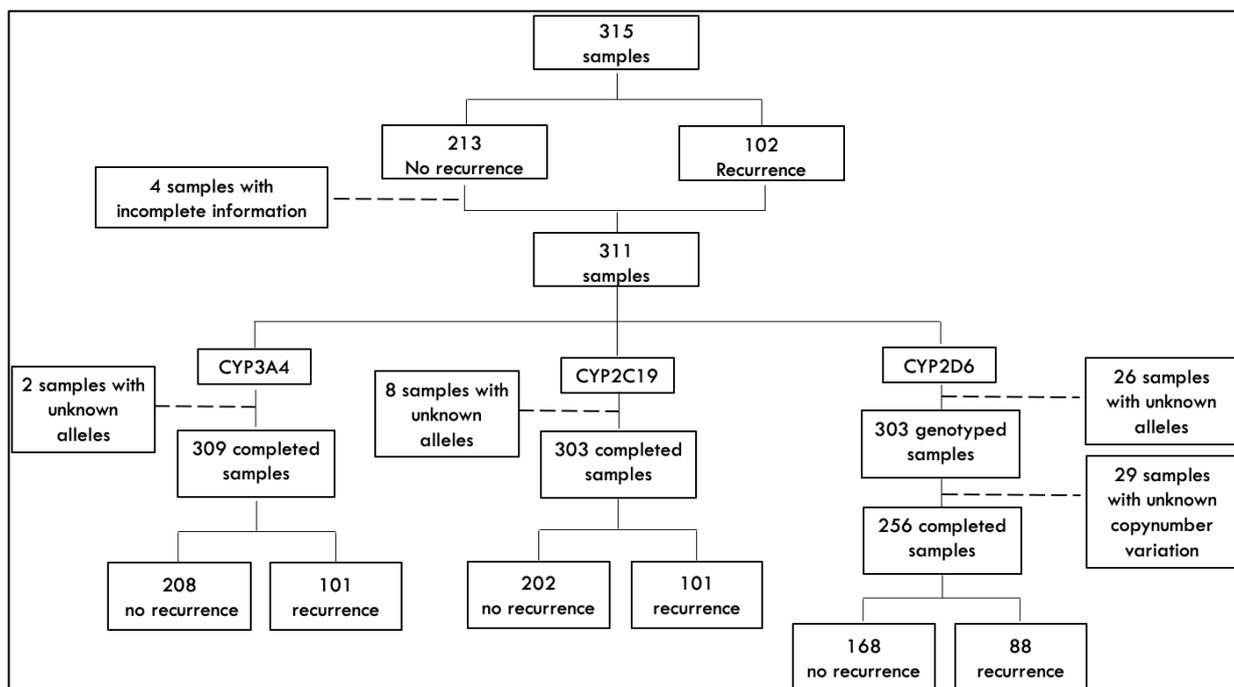
and genetic polymorphisms have been proposed as determinants of its phenotype, there is no clear genotype-phenotype association for this enzyme and the effect of its variants remains controversial (8,20–22).

Polymorphic variants of *CYP2C19*, *CYP2D6* and *CYP3A4* have been widely reported in local population as well as incidence of *P. vivax* malaria infection. Genetic variability of these CYPs are likely to have impact on the clinical response of patients. This reason, this study aimed to investigate the frequency of genotypes and phenotypes of *CYP2D6*, *CYP3A4* and *CYP2C19* and explore the association with recurrence of *P. vivax* from the Brazilian Amazon. Also, to determinate the influence of the alleles at the time of recurrence, number of recurrence episodes and clearance of asexual parasitemia and gametocyte.

## **RESULTS**

### **Population study**

A total of 311 patients diagnosed with *P. vivax* malaria were selected for the study, of which 102 with recurrence and 209 without recurrence were included. Of all 311 patients recruited for the study, 256 samples were genotyped for *CYP2D6*, 309 samples for *CYP3A4* and 303 samples for *CYP2C19*. Genotyping of the 3 CYPs was achieved for 249 samples (Figure 1).



**Figure 1** - Flowchart of processed samples.

The baseline characteristics of the participants are shown in Table 1. Between the two groups, sex distribution was similar. The mean age for patients with recurrence and without recurrence was 40 and 36.7, respectively ( $p=0.036$ ). For malaria recurrence episodes, 80.4% had only 1 recurrence episode, which occurred between 61-120 days (56.9%) after the initial malaria episode, with mean time of 85.5 days (3.60 CI 95% 78.4-92.6).

**Table 1** - Baseline characteristics of individuals involved in this study.

		<b>Total (311)</b>	<b>Recurrence (102)</b>	<b>No recurrence (209)</b>	<b>p value</b>
<b>Age</b>		37.8 (0.89; 36.1–39.5)	40 (1.36; 37.4–42.7)	36.7 (1.12; 34.5–38.9)	0.036
<b>Gender</b>	Men	210 (67.5)	72 (72.5)	136 (65.1)	0.186
	Women	101 (32.5)	28 (27.5)	72 (34.9)	
<b>Malaria recurrence episodes</b>	1	-	82 (80.4)	-	-
	2	-	18 (17.6)	-	
	3	-	1 (1.0)	-	
	4	-	1 (1.0)	-	
<b>Time to first recurrence (days)</b>	<60	-	24 (23.5)	-	-
	61-120	-	58 (56.9)	-	
	121-180	-	20 (19.6)	-	
<b>Parasite clearance day</b>	1	9 (6.5)	2 (4.2)	7 (7.7)	0.159
	2	86 (61.9)	32 (72.9)	51 (56.0)	
	3	29 (20.8)	9 (18.7)	20 (22.0)	
	7	15 (10.8)	2 (4.2)	13 (14.3)	
<b>Gametocyte clearance day</b>	1	24 (17.3)	8 (16.7)	16 (17.6)	0.452
	2	83 (59.7)	32 (66.7)	51 (56.0)	
	3	24 (17.3)	7 (14.6)	17 (18.7)	
	7	8 (5.7)	1 (2.1)	7 (7.7)	

\*n (%) or mean ( $\pm$  standard deviation; IC 95%)

Most patients had the asexual parasitemia and gametocytemia clearance at the D2. The clearance of asexual parasitemia at D1, D3 and D7 was similar between patients with and without recurrence ( $p>0.05$ ). At D2, the clearance occurred in 72,9% with recurrence and 56.0% without recurrence ( $p=0.05$ ). For gametocyte clearance, there was no significant difference between the groups according the clearance day ( $p>0.05$ ).

#### **Allele frequencies of *CYP2D6*, *CYP2C19* and *CYP3A4* and predicted *CYP2D6* and *CYP2C19* phenotypes**

The allele frequency distribution of *CYP2D6*, *CYP2C19* and *CYP3A4* and of predicted *CYP2D6* and *CYP2C19* phenotypes are presented in Table 2 for all patients included.

**Table 2** - Allele frequency of *CYP2D6*, *CYP2C19* and *CYP3A4* and predicted *CYP2D6* and *CYP2C19* phenotypes.

Gene	Allele	Total		Recurrence		No recurrence		p value
		frequency	n	frequency	n	frequency	n	
<i>CYP2D6</i>	<b>*1</b>	234	0.376	77	0.377	154	0.368	0.827
	<b>*2</b>	191	0.307	63	0.308	128	0.306	0.947
	<b>*4</b>	55	0.088	22	0.108	33	0.079	0.233
	<b>*5</b>	37	0.059	12	0.059	25	0.060	0.961
	<b>*9</b>	6	0.010	1	0.005	5	0.012	0.398
	<b>*10</b>	14	0.022	7	0.034	7	0.017	0.166
	<b>*17</b>	13	0.021	3	0.015	10	0.024	0.451
	<b>*29</b>	7	0.013	2	0.010	5	0.012	0.811
	<b>*35</b>	6	0.009	2	0.010	4	0.009	0.978
	<b>*39</b>	14	0.022	7	0.035	7	0.017	0.166
	<b>*41</b>	16	0.026	4	0.019	12	0.029	0.501
	<b>*1x</b>	3	0.005	-	-	3	0.007	0.225
	<b>*2x</b>	8	0.013	-	-	8	0.019	0.047
<b>ND</b>	21	0.034	4	0.019	17	0.041	0.172	
Predicted phenotype <i>CYP2D6</i>	<b>PM</b>	5	0.019	2	0.023	3	0.018	0.789
	<b>IM</b>	71	0.277	26	0.295	45	0.268	0.639

	<b>NM</b>	164	0.641	58	0.660	106	0.632	0.656
	<b>UM</b>	16	0.062	2	0.023	14	0.083	0.057
<i>CYP2C19</i>	<b>*1</b>	544	0.875	182	0.892	362	0.866	0.356
	<b>*2</b>	62	0.100	20	0.098	42	0.105	0.924
	<b>ND</b>	16	0.026	2	0.010	14	0.033	0.080
Predicted phenotype <i>CYP2C19</i>	<b>PM</b>	5	0.016	2	0.020	3	0.015	0.750
	<b>IM</b>	52	0.172	4	0.158	44	0.178	0.667
	<b>NM</b>	246	0.812	83	0.822	163	0.807	0.755
<i>CYP3A4</i>	<b>*1</b>	527	0.847	172	0.843	355	0.849	0.970
	<b>*1B</b>	91	0.146	30	0.147	61	0.146	0.841
	<b>ND</b>	4	0.006	2	0.098	2	0.048	0.462

\*PM – poor metabolizer; IM – intermediate metabolizer; NM – normal metabolizer; UM – ultrarapid metabolizer; ND: Not determined

The star allele frequencies of *CYP2D6*, *CYP2C19* and *CYP3A4* were similar between the groups of study ( $p>0.05$ ). The proportions of *CYP2D6* null function alleles (\*4 and \*5), decreased function alleles (\*9, \*10, \*17, \*29 and \*41) and normal function alleles (\*1, \*2, \*35 and \*39) were similar between the groups ( $p>0.05$ ). *CYP2D6* ultrarapid alleles (\*1xN and \*2xN) were observed only in patients without recurrence ( $p=0.018$ , data not shown). *CYP2C19*\*2 null function allele was present in 9.8% and 10.5% of the patients with and without recurrence, respectively ( $p=0.924$ ). The *CYP3A4* \*1B mutated allele had similar frequency in both groups ( $p=0.841$ ) (Table 2).

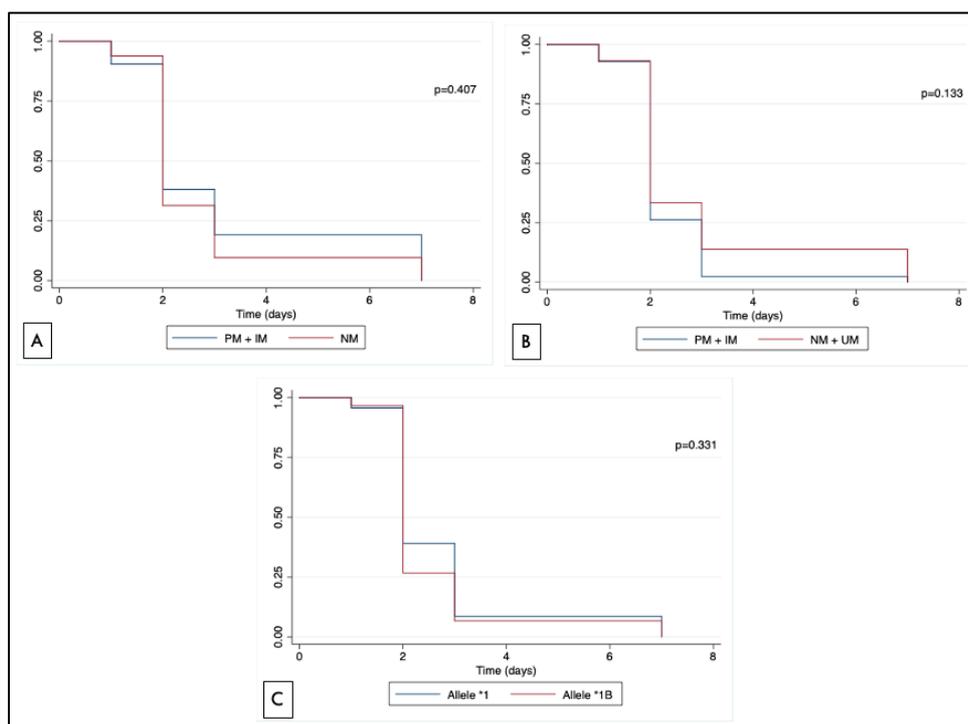
The predicted *CYP2D6* phenotype frequency was not different between the groups ( $p=0.372$ ). The most frequent phenotype in both groups was the normal metabolizer phenotype ( $p=0.656$ ). The ultrarapid phenotype was observed in patients with recurrence and without recurrence, 2.3% and 8.3% respectively ( $p=0.057$ ) (Table 2).

The frequency of predicted *CYP2C19* phenotype was similar in both groups ( $p=0.873$ ). The normal phenotype frequency was 82.2% with recurrence and 80.7% without recurrence ( $p=0.755$ ).

### Predicted CYP2D6 and CYP2C19 phenotypes and CYP3A4 mutated allele versus asexual parasitemia clearance and gametocytemia clearance

The predicted CYP2D6 phenotype did not present different distribution of frequencies between the days of asexual parasite elimination ( $p=0.066$ ). However, even with no statistical significance, it was observed that asexual parasitemia clearance occurred earlier in individuals with ultrarapid metabolizer phenotype ( $p=0.108$ ). There was no difference in the asexual parasitemia clearance according to predicted CYP2C19 phenotype and mutated allele of *CYP3A4* ( $p>0.05$ ) (Table 3).

Kaplan-Meier's analysis of the time to asexual parasitemia clearance was not significant for the predicted CYP2D6 and CYP2C19 phenotype and the presence of mutated allele of *CYP3A4* ( $p>0.05$ ) (Figure 2).



**Figure 2** - Kaplan–Meier curve for malaria parasite clearance time between individuals with normal and reduced predicted CYP2D6 and CYP2C19 activity phenotype and normal and mutated CYP3A4 allele. A – CYP2D6 phenotype; B – CYP2C19 phenotype; C – CYP3A4 allele; PM – poor metabolizer; IM – intermediate metabolizer; NM – normal metabolizer; UM – ultrarapid metabolizer

No association was found between gametocytes clearance and predicted CYP2D6 and CYP2C19 phenotype and the presence of mutated allele of *CYP3A4* ( $p=0.576$ ,  $p=0.676$  and  $p=0.535$ , respectively) (Figure 3 and Table 4).

**Table 9** - Predicted phenotype of CYP2D6, CYP2C19 and CYP3A4 allele x parasite clearance day

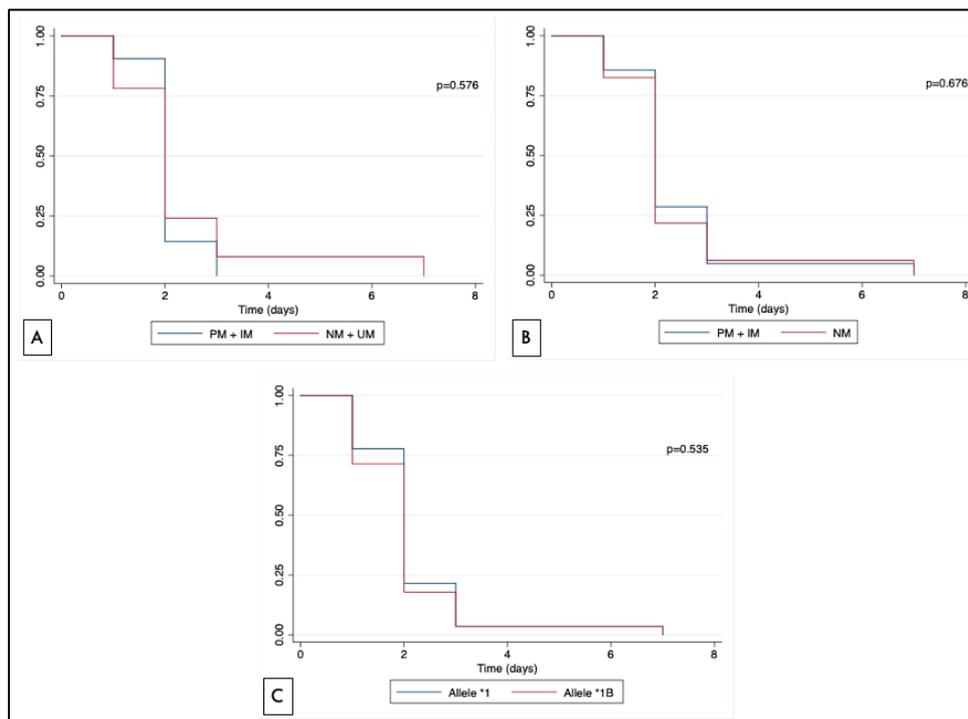
Gene		Parasite clearance day								p value
		Day 1		Day 2		Day 3		Day 7		
		n	frequency	n	frequency	n	frequency	n	frequency	
Predicted phenotype CYP2D6	<b>PM</b>	1	0.025	2	0.500	0	0	1	0.250	0.285
	<b>IM</b>	2	0.053	26	0.684	10	0.263	0	0	0.080
	<b>NM</b>	5	0.059	51	0.600	17	0.200	12	0.141	0.193
	<b>UM</b>	1	0.500	1	0.500	0	0	0	0	0.108
	<b>Total</b>	9	0.070	80	0.620	27	0.209	13	0.101	0.066
Predicted phenotype CYP2C19	<b>PM</b>	0	0	1	0	0	0	0	0	0.886
	<b>IM</b>	2	0.100	10	0.500	4	0.200	4	0.200	0.457
	<b>NM</b>	7	0.061	72	0.626	25	0.217	11	0.096	0.546
	<b>Total</b>	9	0.066	83	0.610	29	0.213	15	0.110	0.785
CYP3A4	<b>*1</b>	16	0.889	136	0.791	50	0.862	25	0.833	
	<b>*1B</b>	2	0.039	36	0.209	8	0.138	5	0.167	0.521
	<b>Total</b>	18	0.065	172	0.618	58	0.208	30	0.108	

\*PM – poor metabolizer; IM – intermediate metabolizer; NM – normal metabolizer; UM – ultrarapid metabolizer.

**Table 4** - Predicted phenotype of CYP2D6, CYP2C19 and CYP3A4 allele x gametocyte clearance day

Gene		Gametocyte clearance day								p value
		Day 1		Day 2		Day 3		Day 7		
		N	frequency	n	frequency	n	frequency	n	frequency	
Predicted phenotype CYP2D6	<b>PM</b>	1	0.250	2	0.500	1	0.250	0	0	0.881
	<b>IM</b>	3	0.079	30	0.789	5	0.131	0	0	0.031
	<b>NM</b>	18	0.212	46	0.541	14	0.165	7	0.082	0.060
	<b>UM</b>	1	0.500	1	0.500	0	0	0	0	0.649
	<b>Total</b>	23	0.178	79	0.612	20	0.155	7	0.054	0.273
Predicted phenotype CYP2C19	<b>PM</b>	0	0	1	0.012	0	0	0	0	0.882
	<b>IM</b>	3	0.150	11	0.550	5	0.250	1	0.050	0.778
	<b>NM</b>	20	0.174	70	0.609	18	0.156	7	0.061	0.827
	<b>Total</b>	23	0.162	82	0.603	23	0.170	8	0.059	0.943
CYP3A4	<b>*1</b>	39	0.812	134	0.807	42	0.875	12	0.750	
	<b>*1B</b>	9	0.188	32	0.193	6	0.125	4	0.250	0.644
	<b>Total</b>	48	0.173	166	0.597	48	0.173	16	0.057	

\*PM – poor metabolizer; IM – intermediate metabolizer; NM – normal metabolizer; UM – ultrarapid metabolize



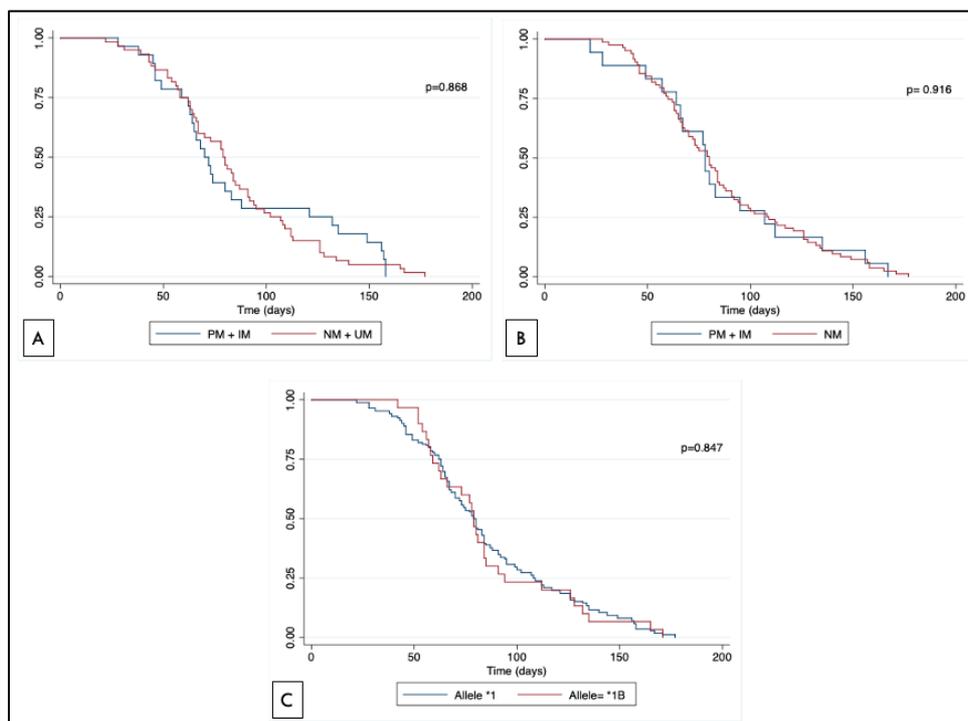
**Figure 3** - Kaplan–Meier curve for malaria gametocyte clearance time between individuals with normal and reduced CYP2D6 and CYP2C19 activity phenotype and normal and mutated CYP3A4 allele. A – CYP2D6 phenotype; B – CYP2C19 phenotype; C – CYP3A4 allele; PM – poor metabolizer; IM – intermediate metabolizer; NM – normal metabolizer; UM – ultrarapid metabolizer.

### **Predicted CYP2D6 and CYP2C19 phenotypes and CYP3A4 mutated allele versus malaria recurrence episodes**

The number of malaria recurrence episodes did not differ for the predicted phenotype of CYP2D6, CYP2C19 and CYP3A4 allele ( $p > 0.05$ ). Also, there were no significant differences in the occurrence of one or more malaria episodes (CYP2D6  $p = 0.455$ , CYP2C19  $p = 0.832$  and CYP3A4  $p = 0.437$ ).

### **Predicted CYP2D6 and CYP2C19 phenotypes and CYP3A4 mutated allele versus time to first recurrence**

For CYP2D6 and CYP2C19, the time of first recurrence episode was similar between the two groups (poor metabolizer + intermediate metabolizer x normal metabolizer) ( $p = 0.868$  and  $p = 0.916$ , respectively). For CYP3A4, the time did not differ with the presence of mutated allele ( $p = 0.847$ ) (Figure 4).



**Figure 4** -Kaplan–Meier curve for malaria recurrence time between individuals with normal and reduced CYP2D6 and CYP2C19 activity phenotype and normal and mutated CYP3A4 allele. A – CYP2D6 phenotype; B – CYP2C19 phenotype; C – CYP3A4 allele; PM – poor metabolizer; IM – intermediate metabolizer; NM – normal metabolizer

#### **Influence of predicted CYP2C19 and CYP2D6 phenotype, CYP3A4 mutated allele and combined CYP2C19+CYP2D6 on the occurrence of recurrence**

The relative risk (RR) was measured to evaluate the influence of predicted CYP2C19 and CYP2D6 phenotype, *CYP3A4* mutated allele and combined CYP2C19+CYP2D6 in the clinical response of patients treated with PQ (Table 5). The RR of recurrence with classification PM or IM predicted CYP2C19 phenotype was 0.93 (95%CI, 0.61-1.42;  $p=0.758$ ) compared with a classification of normal metabolizer. For CYP2D6, the RR with decreased predicted phenotype (PM+IM) was 1.10 (95%CI, 0.77-1.58;  $p=0.585$ ) in comparison with normal and ultrarapid metabolizers. For *CYP3A4*, there was no association of recurrence with mutated allele RR 1.01 (95%CI, 0.73-1.38;  $p=0.951$ ).

Finally, it was also measured the association between CYP2C19+CYP2D6 with recurrence. The presence of one or two PM or IM in any of the CYPs was not associated with risk for recurrence ( $p=0.972$ ).

**Figure 5** – Relative risk for recurrence associated with CYP2C19 and CYP2D6 predicted phenotype, CYP3A4 genotype and combined CYP2C19+CYP2D6

	Recurrence (n)	No recurrence (n)	RR (95% CI)	p value
CYP2C19 decreased predicted phenotype	18	39	0.93 (0.61-1.42)	0.758
CYP2D6 decreased predicted phenotype	28	48	1.10 (0.77-1.58)	0.585
CYP3A4 mutated genotype	61	30	1.01 (0.73-1.38)	0.951
Combined decreased predicted phenotype CYP2C19+CYP2D6	39	73	0.99 (0.70-1.39)	0.972

## DISCUSSION

Some drugs are biotransformed by multiple CYP450 pathways, which alone do not correspond to the real pharmacokinetics of the drug (8,16,23). This study is the first to evaluate the influence of CYP2D6, CYP2C19 and CYP3A4 genetic polymorphisms simultaneously in recurrence of *P. vivax* in the Brazilian Amazon.

Several studies have estimated the *CYP2D6* frequency around the world and *CYP2D6*\*2 is the most frequent *CYP2D6* variant (13,16,24–26). In Brazil, the most frequent null functional allele is \*4 (9.4%) and the most frequent decreased function allele is \*17 (5.6%) (24,25). In our study, the frequency of the \*1, \*4 and \*1xN alleles were similar to those previously reported in Brazil, differing in relation to \*2, \*5, \*39 and \*2xN alleles that presented higher frequency, and to \*17, \*29, \*35 and \*41, that were less frequent (13,24,25). Despite we genotyped 11 SNPs, the *CYP2D6* genotyping tests a limited number of SNPs, for this reason it is possible that some infrequent alleles can be misclassified as more frequent alleles like \*1 and \*2 (27). Although the alleles are categorized into functional groups, no significant difference was found between allele frequencies and patients with recurrence or without recurrence ( $p=0.646$ ). Besides that, increased function alleles were only observed in patients without recurrence ( $p=0.018$ ). In general, the frequency of these alleles is low and once that the majority of the studies are conducted to evaluate the association of impaired genotype and PQ failure, this is the first study to report the high frequency of multiplication in individuals without recurrence.

Furthermore, the UM phenotype presented higher frequency in those without recurrence ( $p=0.05$ ). Some studies have showed that the presence of UM phenotype is related to high risk of toxicity of codeine, a prodrug that is converted in morphine, and high risk of failure of tricyclic antidepressant (16,28). Moreover, for individuals with UM and NM phenotype, it's expected that a standard dose of tamoxifen, a selective estrogen receptor modulator, achieve the therapeutic effect in breast cancer treatment (29). For PQ, it's supposed that individuals with UM phenotype would exhibit the most metabolism through the CYP2D6 pathway. Gonçalves et al. evaluated the effect of CYP2D6 activity score (AS) on PQ plasma concentration over time after a PQ single dose, they showed that the prodrug concentration decreased faster in children with  $AS=3$  than the  $AS\leq 2$  (30). Besides that, the clinical effect of UM phenotype is still unknown (7). In our study, the CYP2D6 predicted PM, IM and NM phenotypes frequencies were similar between those with or without recurrence, similar to previously observed in Amazon region (13).

The influence of decreased CYP2D6 phenotypes (PM+IM) in the recurrence was not associated with high risk of recurrence. No significant effect of predicted CYP2D6 phenotype in recurrence episodes was also reported in Australia and Thailand (31,32). However, the effect of the CYP2D6 impaired phenotype and the increased risk of PQ failure was demonstrated in other studies suggesting that the PQ metabolism is dependent of CYP2D6 (10,11,13,33).

In this study, we did not find association between CYP2D6 phenotype and gametocytemia clearance or asexual parasitemia clearance. However, regarding the asexual parasitemia clearance, a non-significant trend ( $p=0.06$ ) for difference in frequency distribution among the different phenotypes was observed. A recent study in the Amazon region also did not show association between the presence of polymorphism in *CYP2C8*, *CYP3A4* and *CYP3A5* and late asexual clearance of *P. vivax* (34). Despite of Pett et al. demonstrated the effect of CYP2D6 PM/IM phenotype in extending *Plasmodium falciparum* gametocyte's clearance (35), it was also demonstrated that the biotransformation of PQ it's not a condition to the eradication of the blood stages (asexual and sexual) of *P. berghei* (36). The CYP2D6 phenotype was also not associated with the number of recurrence episodes neither with the time to the first episode of recurrence, similar to previously observed (13,31,33).

*CYP2C19\*2* frequency is higher in Oceanians (60%) and less frequent in Latin Americans (10%) (16). In Brazilians, the allele frequency varied between 12.5% to 13.2%

and in the North region this frequency is about 9.5% (25,37). The frequency measured in the current study was similar to the Brazilian average and did not differ statistically between the individuals with or without recurrence ( $p=0.212$ ). In recent study carried out in the North region of Brazil, the *CYP3A4\*1B* frequency was 19% in individuals with early recurrence episodes (34). In our study, the frequency of this allele is in agreement with north Brazilians.

A study that investigated the effect of *CYP2C19* polymorphism on PQ metabolism demonstrated that the presence of *CYP2C19\*2* allele was associated with less production of carboxyprimaquine (17). In this study, the frequency of PM+IM was 18.8%, similar to that seen in Latin Americans (16). Even though the PM phenotype was more observed in individuals with recurrence, the frequencies of PM and IM phenotypes were similar between the groups. Furthermore, this study demonstrated that there is no association between the *CYP2C19* polymorphism and the recurrence episodes neither with asexual parasitemia clearance nor gametocyte clearance. Pybus et. al. had showed that *CYP2C19* plays a role in PQ metabolism, although it is not clear the influence of this CYP in the production of PQ's hemolytic and/or therapeutic metabolite (8).

For *CYP3A4*, no statistical difference was found in the allele frequency between the individuals with or without recurrence ( $p=0.762$ ). Several studies were conducted to explain the importance of polymorphism in the *CYP3A4* genotype–phenotype relationship, although the functional effect of the polymorphism remains contentious (20,38). Although *CYP3A4* have a role in PQ biotransformation (8), we couldn't show the effect of *CYP3A4\*1B* in the recurrence episodes in individuals treated with PQ, neither in the asexual parasitemia clearance nor gametocyte clearance. A previous study conducted in Amazon also showed no association between this allele and the recurrence episodes nor between the presence of mutated allele and the clearance time (34)

Because PQ is not metabolized by only one enzyme (8,17), a multigenic analysis might be more suitable to determine the effect of CYP450 polymorphism in the PQ failure. In our study, we found a single individual representing the *CYP2D6* PM (*\*4/\*4*), *CYP2C19* IM (*\*1/\*2*) that had 2 recurrence episodes. Despite that, a *CYP2D6* + *CYP2C19* analysis was not associated with higher risk of recurrence.

To improve the efficacy and reduce the adverse drug reactions, precision medicine aims a drug therapy by genotype-based prescribing. This genotype-based prescribing assume that the genotyping predicts precisely the metabolic activity (39,40). However,

the prediction of phenotype from genotype has not been undoubtedly correlated, since about 50% of the translation is mistaken (41,42). Gene splicing, single nucleotide polymorphisms, epigenetics and microRNA, transcription regulation and multiple gene copies are narrow down genetic factors that can modify the enzymatic activity (27,41,43). Furthermore, the difference between the genotype and the enzymatic activity can be caused by a phenomenon known as phenoconversion, whereby a genotypic NM can be converted into a transient phenotypic IM or PM, once the genotype is immutable, mainly caused by extrinsic factors, such as drug-drug interactions and some pro-inflammatory cytokines in the inflammatory process (27,39,40).

This study had some limitations. The phenotype was predicted by the genotype and PQ metabolites were not assessed to confirm the impact of CYP2D6 in the pharmacokinetic of the drug. Drug-interaction and the presence of other inflammatory conditions were not evaluated. PQ administration was not supervised, but at each follow-up visit it was asked about the administration of the drug. The low sample size for individuals with recurrence found here is in agreement with other studies (11,13). However, data about recurrence episodes were accessed using the SIVEP Malaria platform (Malaria Epidemiological Surveillance System) that is susceptible to underreporting issues.

This prospective cohort demonstrated no influence of *CYP2D6*, *CYP2C19* and *CYP3A4* polymorphisms as a determining factor for vivax malaria recurrence. Despite this, our findings suggest that CYP2D6 ultrarapid phenotype was less susceptible to recurrence ( $p=0.057$ ). Although we found a single individual with CYP2D6 and CYP2C19 impaired phenotype, the multigenic analysis did not predict a higher risk of recurrence. Future studies are warranted to understand the association of PQ and CYP450, considering factors as the metabolites concentration, the drug–drug interactions and the presence of some inflammatory conditions, to improve vivax malaria treatment.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Ethics statement**

This study was approved by the Ethics Review Board of Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) (CAAE 0002.0.114.000-11 and 44605015.4.0000.0005). The individuals invited to participate were informed about the

objectives of the study and signed an informed consent form. In case of individuals under 18 years old, the consent was signed by the parents or a legal representat.

### **Study area**

This study was conducted in a reference center of infectious diseases in Manaus, Brazil. Individuals with *P. vivax* malaria diagnosis were selected for the study. These patients were treated according to the Brazilian Ministry Health Guideline (44).

### **Selection of patients**

The study included individuals of both genders, aged 6 months old or more, bodyweight greater than 5 kg, blood parasite density from 250 to 100,000 parasites/mL and axillary temperature of 37.5°C or history of fever in the last 48 hours. Use of antimalarial drugs in the previous 30 days, refusal to be followed up, pregnancy, or any clinical complication were considered non-inclusion criteria.

All individuals were treated with 25mg/kg of chloroquine phosphate for 3 days (10mg/kg on day 1 and 7.5mg/kg on days 2 and 3). PQ was administrated 0.5mg/kg/day for 7 days, starting at the same time or at the 42th day. Clinical and laboratory tests were performed, interviews and sample collection were done on D1, D2, D3, D4, D7, D14, D28 and D42 of follow-up. If there were any extra days of follow-up, the same sample collection procedures were performed.

This study was made using convenience sampling from other previous follow-ups. The individuals were allocated in two groups: recurrence group (patients with at least one episode of recurrence in 180 days) and the no recurrence group (those who didn't have a new register of malaria episode in 180 days). Dates of recurrence episodes were obtained during the follow-up or by passive detection via SIVEP-Malaria System, the official malaria epidemiological surveillance system in Brazil.

The asexual parasite clearance and gametocyte clearance analyse was performed with 147 individuals that took primaquine at the the day 1 of the treatment.

### **Malaria diagnosis**

Asexual and gametocytes parasitemia, as well as clearance of parasitemia were determined by optical microscopy. All diagnostic were performed by an experienced microscopist using parasite counts per 500 leucocytes.

## Laboratory procedures

Genomic DNA was purified from whole blood sample using the QIAmp® Blood Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) genotyped were chosen according to the functional importance and the frequency in Brazilian population. It was selected 11 polymorphisms in *CYP2D6* (2549delA [rs35742686], 100C>T [rs1065852], 1846G>A [rs3892097], 4180G>C [rs1135840], 2988G>A [rs28371725], 3183G>A [rs59421388], -1584C>G [rs1080985], 1023C>t [rs28371706], 2615\_2617delAAG [rs5030656], 31G>A [rs769258], 2850C>T [rs16947]); one polymorphism in *CYP2C19* (681G>A [rs4244285]); and one polymorphism in *CYP3A4* (-392A>G [rs2710574]).

The analysis was performed by allelic discrimination assay using Taqman probes at 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems) software. Polymorphisms discrimination of *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP3A4*, the identification of *CYP2D6* gene deletion and multiplication were performed according to the manufacturer's protocols. *CYP2D6* haplotype were inferred using the HaploStats software (version 1.7.7). The haplotypes identified were compared to the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database, for star (\*) allele designation. The wild-type allele (\*1) was determined when there was no mutated polymorphism (21).

Determination of predicted *CYP2D6* phenotype was performed according to the activity score system (AS). Alleles were grouped according to their perceived functionality: 0, null-function alleles (\*4, \*4xN, \*5); 0.5, decreased-function alleles (\*9, \*17, \*29, \*41) and 0.25 (\*10); 1, normal-function alleles (\*1, \*2, \*35, \*39); and 2 or more, increased-function alleles (\*1xN, \*2xN), depending on the number of copies (N). The predicted phenotype was obtained from the sum of diplotype activity scores. Individuals with AS = 0 and AS >2.5 were designated as genetic poor and ultrarapid metabolizers (gPM and gUM), respectively. On the other hand, individuals with AS=0.25-1 and AS=1.25-2.25 were designated as genetic intermediate and normal metabolizer (gIM and gNM), respectively (45).

The predicted *CYP2C19* phenotype was classified as normal metabolizer (\*1/\*1), intermediate metabolizer (\*1/\*2) and poor metabolizer (\*2/\*2)(46).

## Statistical analysis

Difference in frequency values of the star alleles of *CYP2D6*, *CYP2C19* and *CYP3A4* were assessed by chi-square test. To evaluate the influence of the genotype in the recurrence and clearance time, survival analysis method was applied through Kaplan-Meier curves and Wilcoxon test. Poisson regression was used to assess the effect of genotype in the number or recurrence episodes. The association between the genetic polymorphisms on *CYP2D6*, *CYP3A4* and *CYP2C19* in the clinical response of patients who were treated with PQ were evaluated by multiple log-binomial generalized linear regression model. Analysis was performed using software Stata 14.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank all participants who collaborated with this study, Dr Monica Costa, head of Malaria Department at FMT-HVD for technical support, CNPq for funding our research and CNPq and FAPESP for awarding scholarships. WMM and MVGL are CNPq fellows. We would like to thank FAPESP for providing financial support for publication via the PAPAC Edital N° 005/2019.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: GCM, WMM, MVGL, VSS and JLMC. Sample processing: JLMC and YEARS. Performed the experiments: JLMC, ACGA, EFGF, LRAB. Data entry and analyses: JLMC, MGAR, VSS and ACGA. Wrote the paper: JLMC, GCM, YEARS, LRAB, VSS, FRS, WMM and MVGL. All authors read and approved the final manuscript.

## REFERENCES

1. World Health Organization. World Malaria Report 2019. Geneva. 2019. 1–232 p.
2. White MT, Shirreff G, Karl S, Ghani AC, Mueller I. Variation in relapse frequency and the transmission potential of *Plasmodium vivax* malaria. *Proc R Soc B Biol Sci* [Internet]. 2016 Mar 30;283(1827):20160048. Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2016.0048>
3. White MT, Karl S, Koepfli C, Longley RJ, Hofmann NE, Wampfler R, et al. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection dynamics: re-infections, recrudescences and relapses. *Malar J* [Internet]. 2018 Dec 17;17(1):170. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5905131/>

4. Battle KE, Karhunen MS, Bhatt S, Gething PW, Howes RE, Golding N, et al. Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. *Malar J* [Internet]. 2014 Dec 15;13(1):144. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4021508/>
5. Rishikesh K, Saravu K. Primaquine treatment and relapse in *Plasmodium vivax* malaria. *Pathog Glob Health* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 23];110(1):1–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4870028/>
6. Puaprasert K, Chu C, Saralamba N, Day NPJ, Nosten F, White NJ, et al. Real time PCR detection of common CYP2D6 genetic variants and its application in a Karen population study. *Malar J* [Internet]. 2018;17. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6238304/>
7. Marcsisin SR, Reichard G, Pybus BS. Primaquine pharmacology in the context of CYP 2D6 pharmacogenomics: Current state of the art. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2016;161:1–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27016470/>
8. Pybus BS, Sousa JC, Jin X, Ferguson JA, Christian RE, Barnhart R, et al. CYP450 phenotyping and accurate mass identification of metabolites of the 8-aminoquinoline, anti-malarial drug primaquine. *Malar J* [Internet]. 2012;11:1–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3438098/>
9. World Health Organization. GUIDELINES FOR THE TREATMENT OF MALARIA [Internet]. 2015 [cited 2019 Jun 10]. Available from: [www.who.int](http://www.who.int)
10. Bennett JW, Pybus BS, Yadava A, Tosh D, Sousa JC, McCarthy WF, et al. Primaquine Failure and Cytochrome P-450 2D6 in *Plasmodium vivax* Malaria. *N Engl J Med* [Internet]. 2013 Oct 3 [cited 2018 Mar 31];369(14):1381–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24088113/>
11. Baird JK, Louisa M, Noviyanti R, Ekawati L, Elyazar I, Subekti D, et al. Association of Impaired Cytochrome P450 2D6 Activity Genotype and Phenotype With Therapeutic Efficacy of Primaquine Treatment for Latent *Plasmodium vivax* Malaria. *JAMA Netw open* [Internet]. 2018 Aug 3 [cited 2019 Jul 20];1(4):e181449. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6324265/>
12. Silvino ACR, Costa GL, De Araújo FCF, Ascher DB, Pires DEV, Fontes CJF, et al. Variation in Human Cytochrome P-450 drug-metabolism genes: A gateway to the understanding of *plasmodium vivax* relapses. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(7). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4965052/>

13. Brasil LW, Rodrigues-Soares F, Santoro AB, Almeida ACG, Kühn A, Ramasawmy R, et al. CYP2D6 activity and the risk of recurrence of Plasmodium vivax malaria in the Brazilian Amazon: a prospective cohort study. *Malar J* [Internet]. 2018 Dec 1;17(1):57. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5795836/>
14. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2005 Feb 19;5(1):6–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15492763/>
15. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Klein T, Leeder JS. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet Med* [Internet]. 2017 Jan 7;19(1):69–76. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5292679/>
16. Hicks JK, Sangkuhl K, Swen JJ, Ellingrod VL, Müller DJ, Shimoda K, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline (CPIC) for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of tricyclic antidepressants: 2016 update. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2017;102(1):37–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27997040>
17. Ariffin NM, Islahudin F, Kumolosasi E, Makmor-Bakry M. Effects of MAO-A and CYP450 on primaquine metabolism in healthy volunteers. *Parasitol Res* [Internet]. 2019 Mar 31;118(3):1011–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30706164/>
18. Elewa H, Wilby KJ. A Review of Pharmacogenetics of Antimalarials and Associated Clinical Implications. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* [Internet]. 2017;42(5):745–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28070879/>
19. Thapar MM, Ashton M, Lindegårdh N, Bergqvist Y, Nivelius S, Johansson I, et al. Time-dependent pharmacokinetics and drug metabolism of atovaquone plus proguanil (Malarone) when taken as chemoprophylaxis. *Eur J Clin Pharmacol* [Internet]. 2002 Apr 28;58(1):19–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11956669/>
20. Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2008 Nov 10 [cited 2019 Jul

- 9];392(6):1093–108. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18695978/>
21. PharmVar PVC-. Pharmacogene Variation Consortium - PharmVar [Internet]. [cited 2019 Jul 11]. Available from: <https://www.pharmvar.org/>
  22. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2002 Nov 18;54(10):1271–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12406645/>
  23. Hicks JK, Bishop JR, Sangkuhl K, Müller DJ, Ji Y, Leckband SG, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and CYP2C19 Genotypes and Dosing of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2015 Aug;98(2):127–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25974703>
  24. Friedrich DC, Genro JP, Sortica VA, Suarez-Kurtz G, de Moraes ME, Pena SDJ, et al. Distribution of CYP2D6 Alleles and Phenotypes in the Brazilian Population. Carvalho LH, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Oct 20;9(10):e110691. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4203818/>
  25. Rede Nacional de Farmacogenética - Refargen. Refargen - Rede Nacional de Farmacogenética [Internet]. [cited 2019 Jul 11]. Available from: [http://www.refargen.org.br/rubrique.php3?id\\_rubrique=36&recalcul=oui](http://www.refargen.org.br/rubrique.php3?id_rubrique=36&recalcul=oui)
  26. LLerena A, Naranjo MEG, Rodrigues-Soares F, Penas-LLedó EM, Fariñas H, Tarazona-Santos E. Interethnic variability of CYP2D6 alleles and of predicted and measured metabolic phenotypes across world populations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* [Internet]. 2014 Nov 14;10(11):1569–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25316321/>
  27. Gaedigk A, Dinh JC, Jeong H, Prasad B, Leeder JS. Ten Years' Experience with the CYP2D6 Activity Score: A Perspective on Future Investigations to Improve Clinical Predictions for Precision Therapeutics. *J Pers Med* [Internet]. 2018 Apr 17 [cited 2020 Jun 21];8(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29673183>
  28. Crews KR, Gaedigk A, Dunnenberger HM, Leeder JS, Klein TE, Caudle KE, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for cytochrome P450 2D6 genotype and codeine therapy: 2014 update. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2014 Apr;95(4):376–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24458010>

29. Goetz MP, Sangkuhl K, Guchelaar H-J, Schwab M, Province M, Whirl-Carrillo M, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2018;103(5):770–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29385237>
30. Gonçalves BP, Pett H, Tiono AB, Murry D, Sirima SB, Niemi M, et al. Age, Weight, and CYP2D6 Genotype Are Major Determinants of Primaquine Pharmacokinetics in African Children. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2018 Mar 31];61(5):e02590-16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28289025>
31. Chen N, Dowd S, Gatton ML, Auliff A, Edstein MD, Cheng Q. Cytochrome P450 2D6 profiles and their relationship with outcomes of primaquine anti-relapse therapy in Australian Defence Force personnel deployed to Papua New Guinea and East Timor. *Malar J* [Internet]. 2019 Apr 18 [cited 2020 May 30];18(1):140. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30999967>
32. Chamnanphon M, Gaedigk A, Puangpetch A, Pasomsub E, Chantratita W, Longley RJ, et al. Pharmacogene Variation in Thai Plasmodium vivax Relapse Patients Treated with a Combination of Primaquine and Chloroquine. *Pharmgenomics Pers Med* [Internet]. 2020;13:1–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32021383>
33. Silvino ACR, Kano FS, Costa MA, Fontes CJF, Soares IS, de Brito CFA, et al. Novel Insights into Plasmodium vivax Therapeutic Failure: CYP2D6 Activity and Time of Exposure to Malaria Modulate the Risk of Recurrence. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2020 Apr 21 [cited 2020 Jul 25];64(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32122891>
34. Almeida ACG, Puça MCB, Figueiredo EFG, Barbosa LR, Salazar YEAR, Silva EL, et al. Influence of CYP2C8, CYP3A4 and CYP3A5 host genotypes on early recurrence of Plasmodium vivax. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2020 May 4 [cited 2020 May 31]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32366712>
35. Pett H, Bradley J, Okebe J, Dicko A, Tiono AB, Gonçalves BP, et al. CYP2D6 Polymorphisms and the Safety and Gametocytocidal Activity of Single-Dose Primaquine for Plasmodium falciparum. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2019 [cited 2020 Jun 16];63(10). Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31383656>
36. Milner EE, Berman J, Caridha D, Dickson SP, Hickman M, Lee PJ, et al. Cytochrome P450 2D-mediated metabolism is not necessary for tafenoquine and primaquine to eradicate the erythrocytic stages of *Plasmodium berghei*. *Malar J* [Internet]. 2016 Dec 7 [cited 2020 Jul 25];15(1):588. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27923405>
  37. Suarez-Kurtz G, Genro JP, de Moraes MO, Ojopi EB, Pena SDJ, Perini JA, et al. Global pharmacogenomics: Impact of population diversity on the distribution of polymorphisms in the CYP2C cluster among Brazilians. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2012 Jun [cited 2020 Jun 9];12(3):267–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21173785>
  38. Klein K, Zanger UM. Pharmacogenomics of Cytochrome P450 3A4: Recent Progress Toward the “Missing Heritability” Problem. *Front Genet*. 2013;4:12.
  39. Shah RR. Pharmacogenetics and precision medicine: Is inflammation a covert threat to effective genotype-based therapy? *Ther Adv drug Saf* [Internet]. 2017 Sep [cited 2020 Jul 26];8(9):267–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28861210>
  40. Shah RR, Smith RL. Inflammation-induced phenoconversion of polymorphic drug metabolizing enzymes: hypothesis with implications for personalized medicine. *Drug Metab Dispos* [Internet]. 2015 Mar [cited 2020 Jul 26];43(3):400–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25519488>
  41. Waring RH. Cytochrome P450: genotype to phenotype. *Xenobiotica* [Internet]. 2020 Jan [cited 2020 Jul 25];50(1):9–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31411087>
  42. de Andrés F, Sosa-Macías M, Ramos BPL, Naranjo M-EG, Llerena A. CYP450 Genotype/Phenotype Concordance in Mexican Amerindian Indigenous Populations-Where to from Here for Global Precision Medicine? *OMICS* [Internet]. 2017 [cited 2020 Jul 25];21(9):509–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28873029>
  43. He Z-X, Chen X-W, Zhou Z-W, Zhou S-F. Impact of physiological, pathological and environmental factors on the expression and activity of human cytochrome P450 2D6 and implications in precision medicine. *Drug Metab Rev* [Internet]. 2015 [cited 2020 Jul 26];47(4):470–519. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26574146>

44. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Guia de tratamento da malária no Brasil [Internet]. 1a edição. Brasília; 2020. 76 p. Available from: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/marco/17/guia-tratamento-malaria-.pdf>
45. Caudle KE, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Swen JJ, Haidar CE, Klein TE, et al. Standardizing CYP 2D6 Genotype to Phenotype Translation: Consensus Recommendations from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group. Clin Transl Sci [Internet]. 2020 Jan 24;13(1):116–24. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6951851/>
46. Scott S, Sangkuhl K, Stein C, Hulot J, Mega J, Roden D, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C19 Genotype and Clopidogrel Therapy: 2013 Update. Clin Pharmacol Ther [Internet]. 2013;94(3):317–23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3748366/>

#### 4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

Esse estudo teve algumas limitações. O fenótipo das CYP2D6 e CYP2C19 foram preditos a partir do genótipo e os metabolitos da PQ não foram mensurados para confirmar o impacto das enzimas na farmacocinética do medicamento. Além disso, a interação medicamentosa e a presença de outras condições inflamatórias não foram avaliadas. A administração da PQ não foi supervisionada, mas a cada visita do acompanhamento foram feitos questionamentos quanto a tomada do medicamento.

O número reduzido de indivíduos com recorrência encontrados nesse estudo estava em acordo com estudos prévios. Os dados de recorrência foram obtidos por acesso ao banco de dados da plataforma SIVEP Malária (Sistema de Vigilância Epidemiológica da Malária), que é suscetível a subnotificação de casos.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que o entendimento do efeito clínico da PQ ainda necessita de mais esclarecimentos. Embora estudos anteriores tenham demonstrado que a biotransformação da PQ é dependente da CYP2D6, fatores adicionais precisam ser analisados. As interações medicamentosas e a existência de outros processos inflamatórios têm se mostrado capazes de interferir na função enzimática e estudos que analisem os seus efeitos no tratamento de malária são necessários.

Embora amplamente usada, a predição de fenótipo a partir do genótipo não é capaz de determinar a função enzimática indubitavelmente. Por essa razão, estudos complementares que determinem as concentrações dos metabólitos gerados são necessários para o entendimento da relação genótipo/fenótipo na biotransformação da PQ. Além disso, poderiam auxiliar na proposição de diretrizes que permitiriam a interpretação dos resultados de genotipagem para orientar o tratamento da malária.

## 5. CONCLUSÃO

- As frequências de variantes genéticas das CYP2D6, CYP3A4, CYP2C19 foram investigadas com o intuito de se determinar o perfil genético da população local. As frequências alélicas apresentadas nesse estudo concordam com estudos anteriores realizados no Brasil e no Amazonas.
- Não foi observada diferença significativa nas frequências alélicas entre os dois grupos de investigação em relação as CYPs estudadas, com exceção do alelo CYP2D6\*2xN que foi observado somente nos indivíduos sem recorrência. Essa foi a primeira vez que esse achado foi reportado. Tendo em vista que a frequência de alelos com múltiplas cópias de atividade aumentada representa um percentual muito pequeno e que estudos anteriores foram feitos com número de amostra reduzidas, a influência desses alelos não pode ser devidamente avaliada.
- O fenótipo CYP2D6 de metabolização ultrarrápida foi observado com maior frequência nos indivíduos sem recorrência. Sendo a PQ um pró-fármaco que precisa ser biotransformado para que exerça sua atividade antimalárica, é esperado que indivíduos com esse fenótipo apresentem concentrações ideais de metabólitos ativos e com isso seja menos suscetíveis a falha terapêutica. Contudo, a concentração de metabólitos da PQ em indivíduos com fenótipo CYP2D6 UM ainda não foi indubitavelmente determinada.
- Embora o fenótipo CYP2D6 UM tenha apresentado frequências significativamente diferentes entre os grupos de análise, a determinação da influência dos fenótipos na resposta clínica dos pacientes não mostrou diferentes riscos de recorrência de acordo com o fenótipo predito. Diferentes fatores que podem afetar a função

enzimáticas das CYPs estudadas não foram avaliados nesse estudo.

- Semelhante ao observado anteriormente, o perfil fenotípico dos indivíduos estudados não teve influência no tempo e no número de recorrências;
- O tempo de clareamento da parasitas sanguíneos não foi influenciada pelo perfil fenotípico dos indivíduos estudados, mostrando que a biotransformação da PQ pelas enzimas CYPs não é essencial para a eliminação parasitária.
- Por fim, conclui-se que estudo de farmacogenética e farmacocinética da PQ são necessários para maior compreensão da dinâmica de biotransformação do medicamento e seu efeito clínico no tratamento da malária.

## 6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. World Health Organization. WORLD MALARIA REPORT 2018 [Internet]. [cited 2019 Jun 10]. Available from: [www.who.int/malaria](http://www.who.int/malaria)
2. Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Heal*. 2017 Oct;5(10):e1038–46.
3. Rajahram GS, Barber BE, William T, Grigg MJ, Menon J, Yeo TW, et al. Falling *Plasmodium knowlesi* Malaria Death Rate among Adults despite Rising Incidence, Sabah, Malaysia, 2010-2014. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(1):41–8.
4. Battle KE, Lucas TCD, Nguyen M, Howes RE, Nandi AK, Twohig KA, et al. Mapping the global endemicity and clinical burden of *Plasmodium vivax*, 2000-17: a spatial and temporal modelling study. *Lancet (London, England)*. 2019 Jun 19;0(0).
5. Bassat Q, Alonso PL. Defying malaria: Fathoming severe *Plasmodium vivax* disease. *Nat Med*. 2011 Jan 7;17(1):48–9.
6. Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MPG, Lacerda M V., et al. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2010 Oct;16(10):1611–4.
7. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*. 2009 Sep;9(9):555–66.
8. The Carter Center. The Life Cycle of Malaria [Internet]. [cited 2019 Jul 11]. Available from: [https://www.cartercenter.org/resources/pdfs/news/health\\_publications/malaria/malaria-life-cycle-chart.pdf](https://www.cartercenter.org/resources/pdfs/news/health_publications/malaria/malaria-life-cycle-chart.pdf)

9. Suh KN, Kain KC, Keystone JS. Malaria. CMAJ. 2004 May 25;170(11):1693–702.
10. Kanjee U, Rangel GW, Clark MA, Duraisingh MT. Molecular and cellular interactions defining the tropism of Plasmodium vivax for reticulocytes. Curr Opin Microbiol. 2018 Dec;46:109–15.
11. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax malaria: neglected and not benign. Am J Trop Med Hyg. 2007 Dec;77(6 Suppl):79–87.
12. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and Infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination. Clin Microbiol Rev. 2011 Apr 1;24(2):377–410.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil [Internet]. 2010 [cited 2019 Jun 10]. Available from: <http://www.saude.gov.br/bvs>
14. Pimenta PFP, Orfano AS, Bahia AC, Duarte APM, Ríos-Velásquez CM, Melo FF, et al. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon Anopheles vectors. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015 Feb;110(1):23–47.
15. Centers for Disease Control and Prevention. CDC - Malaria - About Malaria [Internet]. 2019 [cited 2019 Jul 4]. Available from: <https://www.cdc.gov/malaria/about/>
16. Mace KE, Arguin PM, Tan KR. Malaria Surveillance - United States, 2015. MMWR Surveill Summ. 2018;67(7):1–28.
17. World Health Organization. GUIDELINES FOR THE TREATMENT OF MALARIA [Internet]. 2015 [cited 2019 Jun 10]. Available from: [www.who.int](http://www.who.int)
18. Chu CS, White NJ. Management of relapsing Plasmodium vivax malaria. Expert Rev Anti Infect Ther. 2016;14(10):885–900.
19. Pillay E, Khodaiji S, Bezuidenhout BC, Litshie M, Coetzer TL. Evaluation of automated malaria diagnosis using the Sysmex XN-30 analyser in a clinical setting. Malar J.
20. World Health Organization. Universal access to malaria diagnostic testing an operational manual [Internet]. 2011 [cited 2019 Jun 15]. Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44657/9789241502092\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44657/9789241502092_eng.pdf?sequence=1)
21. Imwong M, Hanchana S, Malleret B, Rénia L, Day NPJ, Dondorp A, et al. High-

- throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemias. *J Clin Microbiol.* 2014 Sep;52(9):3303–9.
22. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Vol 51 n17 [Internet]. Brasília; 2020 [cited 2020 Sep 3]. Available from: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/April/24/Boletim-epidemiologico-SVS-17-.pdf>
  23. Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. GUIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE [Internet]. 1º. Brasília; 2017 [cited 2019 Jul 4]. Available from: [www.saude.gov.br/bvs](http://www.saude.gov.br/bvs)
  24. Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, et al. The International Limits and Population at Risk of *Plasmodium vivax* Transmission in 2009. Carlton JM, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Aug 3;4(8):e774.
  25. White MT, Shirreff G, Karl S, Ghani AC, Mueller I. Variation in relapse frequency and the transmission potential of *Plasmodium vivax* malaria. *Proceedings Biol Sci.* 2016;283(1827):20160048.
  26. Battle KE, Karhunen MS, Bhatt S, Gething PW, Howes RE, Golding N, et al. Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. *Malar J* [Internet]. 2014 Dec 15;13(1):144. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4021508/>
  27. White NJ. The rise and fall of long-latency *Plasmodium vivax*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2019 Apr 1;113(4):163–8.
  28. Rishikesh K, Saravu K. Primaquine treatment and relapse in *Plasmodium vivax* malaria. *Pathog Glob Health* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 23];110(1):1–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4870028/>
  29. Kim J-R, Nandy A, Maji AK, Addy M, Dondorp AM, Day NPJ, et al. Genotyping of *Plasmodium vivax* Reveals Both Short and Long Latency Relapse Patterns in Kolkata. Borrmann S, editor. *PLoS One.* 2012 Jul 13;7(7):e39645.
  30. Shanks GD, White NJ. The activation of *vivax* malaria hypnozoites by infectious diseases. *Lancet Infect Dis.* 2013 Oct;13(10):900–6.
  31. Hulden L, Hulden L. Activation of the hypnozoite: a part of *Plasmodium vivax* life cycle and survival. *Malar J.* 2011 Dec 16;10(1):90.

32. Maneerattanasak S, Gosi P, Krudsood S, Chimma P, Tongshoob J, Mahakunkijcharoen Y, et al. Molecular and immunological analyses of confirmed *Plasmodium vivax* relapse episodes. *Malar J*. 2017 Dec 30;16(1):228.
33. Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, Nandy A, et al. Relapses of *Plasmodium vivax* Infection Usually Result from Activation of Heterologous Hypnozoites. *J Infect Dis*. 2007 Apr 1;195(7):927–33.
34. White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2011 Oct 11;10(1):297.
35. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Terapêutica da Malária Manual de Terapêutica da Malária [Internet]. 2001 [cited 2019 Jun 24]. Available from: [http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/vigiamb/vetores/Malaria/manu\\_terapeutica\\_malaria.pdf](http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/vigiamb/vetores/Malaria/manu_terapeutica_malaria.pdf)
36. White MT, Karl S, Koepfli C, Longley RJ, Hofmann NE, Wampfler R, et al. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection dynamics: re-infections, recrudescences and relapses. *Malar J* [Internet]. 2018 Dec 17;17(1):170. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5905131/>
37. Delves M, Plouffe D, Scheurer C, Meister S, Wittlin S, Winzeler EA, et al. The Activities of Current Antimalarial Drugs on the Life Cycle Stages of *Plasmodium*: A Comparative Study with Human and Rodent Parasites. Beeson JG, editor. *PLoS Med*. 2012 Feb 21;9(2):e1001169.
38. Marcsisin SR, Reichard G, Pybus BS. Primaquine pharmacology in the context of CYP 2D6 pharmacogenomics: Current state of the art. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2016;161:1–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27016470/>
39. Setyadi A, Arguni E, Kenangalem E, Hasanuddin A, Lampah DA, Thriemer K, et al. Safety of primaquine in infants with *Plasmodium vivax* malaria in Papua, Indonesia. *Malar J*. 2019 Apr 2;18(1):111.
40. Lin JT, Lon C, Spring MD, Sok S, Chann S, Ittiverakul M, et al. Single dose primaquine to reduce gametocyte carriage and *Plasmodium falciparum* transmission in Cambodia: An open-label randomized trial. *PLoS One*. 2017;12(6):e0168702.
41. Pukrittayakamee S, Tarning J, Jittamala P, Charunwatthana P, Lawpoolsri S, Lee SJ, et al. Pharmacokinetic interactions between primaquine and chloroquine.

- Antimicrob Agents Chemother. 2014 Jun;58(6):3354–9.
42. Puaprasert K, Chu C, Saralamba N, Day NPJ, Nosten F, White NJ, et al. Real time PCR detection of common CYP2D6 genetic variants and its application in a Karen population study. *Malar J* [Internet]. 2018;17. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6238304/>
  43. Pybus BS, Sousa JC, Jin X, Ferguson JA, Christian RE, Barnhart R, et al. CYP450 phenotyping and accurate mass identification of metabolites of the 8-aminoquinoline, anti-malarial drug primaquine. *Malar J* [Internet]. 2012;11:1–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3438098/>
  44. Jin X, Pybus BS, Marcsisin SR, Logan T, Luong TL, Sousa J, et al. An LC–MS based study of the metabolic profile of primaquine, an 8-aminoquinoline antiparasitic drug, with an in vitro primary human hepatocyte culture model. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2013 Jun 25;39(2):139–46.
  45. Ariffin NM, Islahudin F, Kumolosasi E, Makmor-Bakry M. Effects of MAO-A and CYP450 on primaquine metabolism in healthy volunteers. *Parasitol Res* [Internet]. 2019 Mar 31;118(3):1011–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30706164/>
  46. Avula B, Tekwani BL, Chaurasiya ND, Fasinu P, Dhammika Nanayakkara NP, Bhandara Herath HMT, et al. Metabolism of primaquine in normal human volunteers: investigation of phase I and phase II metabolites from plasma and urine using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Malar J*. 2018 Aug 13;17(1):294.
  47. Minucci A, Moradkhani K, Hwang MJ, Zuppi C, Giardina B, Capoluongo E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: Review of the “old” and update of the new mutations. *Blood Cells, Mol Dis*. 2012 Mar 15;48(3):154–65.
  48. Howes RE, Dewi M, Piel FB, Monteiro WM, Battle KE, Messina JP, et al. Spatial distribution of G6PD deficiency variants across malaria-endemic regions. *Malar J*. 2013 Nov 15;12:418.
  49. Recht J, Ashley E, White N. Safety of 8-aminoquinoline antimalarial medicines. World Health Organization; 2014. 224 p.
  50. Howes RE, Piel FB, Patil AP, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, et al. G6PD

- Deficiency Prevalence and Estimates of Affected Populations in Malaria Endemic Countries: A Geostatistical Model-Based Map. von Seidlein L, editor. PLoS Med. 2012 Nov 13;9(11):e1001339.
51. Monteiro WM, Moura-Neto JP, Recht J, Bassat Q, Lacerda MVG. Fatal Primaquine-Induced Hemolysis in a Patient With Plasmodium vivax Malaria and G6PD A(-) Variant in the Brazilian Amazon. Clin Infect Dis. 2016 May 1;62(9):1188.1-1188.
  52. Lacerda MVG, Fragoso SCP, Alecrim MGC, Alexandre MAA, Magalhães BML, Siqueira AM, et al. Postmortem Characterization of Patients With Clinical Diagnosis of Plasmodium vivax Malaria: To What Extent Does This Parasite Kill? Clin Infect Dis. 2012 Oct 15;55(8):e67–74.
  53. Baird JK, Valecha N, Duparc S, White NJ, Price RN. Diagnosis and Treatment of Plasmodium vivax Malaria. Am J Trop Med Hyg. 2016 Dec 28;95(6 Suppl):35–51.
  54. Baird JK, Battle KE, Howes RE. Primaquine ineligibility in anti-relapse therapy of Plasmodium vivax malaria: the problem of G6PD deficiency and cytochrome P-450 2D6 polymorphisms. Malar J. 2018 Dec 22;17(1):42.
  55. Brunton L, Chabner BA, Knollmann BC. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman. 12<sup>a</sup>. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda; 2012. 2080 p.
  56. Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ, Armstrong AW. Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia. 2nd ed. Guanabara Koogan; 2009. 922 p.
  57. Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. Anal Bioanal Chem [Internet]. 2008 Nov 10 [cited 2019 Jul 9];392(6):1093–108. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18695978/>
  58. He Z-X, Chen X-W, Zhou Z-W, Zhou S-F. Impact of physiological, pathological and environmental factors on the expression and activity of human cytochrome P450 2D6 and implications in precision medicine. Drug Metab Rev [Internet]. 2015 [cited 2020 Jul 26];47(4):470–519. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26574146>
  59. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic,

- pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther.* 2007 Dec;116(3):496–526.
60. Sim SC, Ingelman-Sundberg M. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum Genomics.* 2010 Apr;4(4):278–81.
61. Scott SA, Sangkuhl K, Shuldiner AR, Hulot J-S, Thorn CF, Altman RB, et al. PharmGKB summary. *Pharmacogenet Genomics.* 2012 Feb;22(2):159–65.
62. PharmVar PVC-. Pharmacogene Variation Consortium - PharmVar [Internet]. [cited 2019 Jul 11]. Available from: <https://www.pharmvar.org/>
63. Rede Nacional de Farmacogenética - Refargen. Refargen - Rede Nacional de Farmacogenética [Internet]. [cited 2019 Jul 11]. Available from: [http://www.refargen.org.br/rubrique.php3?id\\_rubrique=36&recalcul=oui](http://www.refargen.org.br/rubrique.php3?id_rubrique=36&recalcul=oui)
64. Kelly RP, Close SL, Farid NA, Winters KJ, Shen L, Natanegara F, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics following maintenance doses of prasugrel and clopidogrel in Chinese carriers of CYP2C19 variants. *Br J Clin Pharmacol.* 2012 Jan;73(1):93–105.
65. Simon T, Bhatt DL, Bergougnan L, Farenc C, Pearson K, Perrin L, et al. Genetic Polymorphisms and the Impact of a Higher Clopidogrel Dose Regimen on Active Metabolite Exposure and Antiplatelet Response in Healthy Subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 Aug 29;90(2):287–95.
66. Elewa H, Wilby KJ. A Review of Pharmacogenetics of Antimalarials and Associated Clinical Implications. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* [Internet]. 2017;42(5):745–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28070879/>
67. Thapar MM, Ashton M, Lindegårdh N, Bergqvist Y, Nivelius S, Johansson I, et al. Time-dependent pharmacokinetics and drug metabolism of atovaquone plus proguanil (Malarone) when taken as chemoprophylaxis. *Eur J Clin Pharmacol* [Internet]. 2002 Apr 28;58(1):19–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11956669/>
68. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Klein T, Leeder JS. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet Med* [Internet]. 2017 Jan 7;19(1):69–76. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5292679/>

69. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2005 Feb 19;5(1):6–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15492763/>
70. Gaedigk A, Simon S, Pearce R, Bradford L, Kennedy M, Leeder J. The CYP2D6 Activity Score: Translating Genotype Information into a Qualitative Measure of Phenotype. *Clin Pharmacol Ther*. 2008 Feb;83(2):234–42.
71. Baird JK, Louisa M, Noviyanti R, Ekawati L, Elyazar I, Subekti D, et al. Association of Impaired Cytochrome P450 2D6 Activity Genotype and Phenotype With Therapeutic Efficacy of Primaquine Treatment for Latent *Plasmodium vivax* Malaria. *JAMA Netw open* [Internet]. 2018 Aug 3 [cited 2019 Jul 20];1(4):e181449. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6324265/>
72. Crews K, Gaedigk A, Dunnenberger H, Leeder J, Klein T, Caudle K, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Cytochrome P450 2D6 Genotype and Codeine Therapy: 2014 Update. 2014;
73. Friedrich DC, Genro JP, Sortica VA, Suarez-Kurtz G, de Moraes ME, Pena SDJ, et al. Distribution of CYP2D6 Alleles and Phenotypes in the Brazilian Population. Carvalho LH, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Oct 20;9(10):e110691. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4203818/>
74. Caudle KE, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Swen JJ, Haidar CE, Klein TE, et al. Standardizing CYP 2D6 Genotype to Phenotype Translation: Consensus Recommendations from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group. *Clin Transl Sci* [Internet]. 2020 Jan 24;13(1):116–24. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6951851/>
75. Bennett JW, Pybus BS, Yadava A, Tosh D, Sousa JC, McCarthy WF, et al. Primaquine Failure and Cytochrome P-450 2D6 in *Plasmodium vivax* Malaria. *N Engl J Med* [Internet]. 2013 Oct 3 [cited 2018 Mar 31];369(14):1381–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24088113/>
76. Pybus BS, Marcsisin SR, Jin X, Deye G, Sousa JC, Li Q, et al. The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP 2D6. *Malar J*. 2013 Jun 20;12(1):212.

77. Silvino ACR, Costa GL, De Araújo FCF, Ascher DB, Pires DEV, Fontes CJF, et al. Variation in Human Cytochrome P-450 drug-metabolism genes: A gateway to the understanding of plasmodium vivax relapses. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(7). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4965052/>
78. Brasil LW, Rodrigues-Soares F, Santoro AB, Almeida ACG, Kühn A, Ramasawmy R, et al. CYP2D6 activity and the risk of recurrence of Plasmodium vivax malaria in the Brazilian Amazon: a prospective cohort study. *Malar J* [Internet]. 2018 Dec 1;17(1):57. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5795836/>
79. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2002 Nov 18;54(10):1271–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12406645/>
80. Klein K, Zanger UM. Pharmacogenomics of Cytochrome P450 3A4: Recent Progress Toward the “Missing Heritability” Problem. *Front Genet*. 2013;4:12.
81. Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB. Modification of Clinical Presentation of Prostate Tumors by a Novel Genetic Variant in CYP3A4. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 1998 Aug 19;90(16):1225–9.
82. Cavaco I, Reis R, Gil JP, Ribeiro V. CYP3A4\*1B and NAT2\*14 Alleles in a Native African Population. *Clin Chem Lab Med*. 2003 Jan 25;41(4):606–9.
83. Favela-Mendoza AF, Martínez-Cortés G, Romero-Prado MM, Romero-Tejeda EM, Islas-Carbajal MC, Sosa-Macias M, et al. Correspondence between the CYP2C19 and CYP3A4 genotypes with the inferred metabolizer phenotype by omeprazole administration in Mexican healthy children. *J Clin Pharm Ther*. 2018 Oct 7;43(5):656–63.
84. Ball SE, Scatina J, Kao J, Ferron GM, Fruncillo R, Mayer P, et al. Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther*. 1999 Sep;66(3):288–94.
85. LLerena A, Naranjo MEG, Rodrigues-Soares F, Penas-LLedó EM, Fariñas H, Tarazona-Santos E. Interethnic variability of CYP2D6 alleles and of predicted and measured metabolic phenotypes across world populations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* [Internet]. 2014 Nov 14;10(11):1569–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25316321/>

86. Zhou L-P, Yao F, Luan H, Wang Y-L, Dong X-H, Zhou W-W, et al. CYP3A4\*1B polymorphism and cancer risk: A HuGE review and meta-analysis. *Tumor Biol.* 2013 Apr 20;34(2):649–60.
87. Yousef A-M, Qosa H, Bulatova N, Abuhaliema A, Almadhoun H, Khayyat G, et al. Effects of Genetic Polymorphism in CYP3A4 and CYP3A5 Genes on Tacrolimus Dose Among Kidney Transplant Recipients. *Iran J Kidney Dis.* 2016 May;10(3):156–63.
88. Shi W-L, Tang H-L, Zhai S-D. Effects of the CYP3A4\*1B Genetic Polymorphism on the Pharmacokinetics of Tacrolimus in Adult Renal Transplant Recipients: A Meta-Analysis. Stepkowski S, editor. *PLoS One.* 2015 Jun 3;10(6):e0127995.
89. He P, Court M, Greenblatt D, Vonmoltke L. Genotype-phenotype associations of cytochrome P450 3A4 and 3A5 polymorphism with midazolam clearance in vivo. *Clin Pharmacol Ther.* 2005 May;77(5):373–87.
90. Kotowski MJ, Bogacz A, Bartkowiak-Wieczorek J, Tejchman K, Dziewanowski K, Ostrowski M, et al. Effect of Multidrug-Resistant 1 (MDR1) and CYP3A4\*1B Polymorphisms on Cyclosporine-Based Immunosuppressive Therapy in Renal Transplant Patients. *Ann Transplant.* 2019 Feb 25;24:108–14.

## **7. ANEXOS E APÊNDICES**

7.1. PROCEDIMENTO OPERACIONAI PADRÃO – POP EXTRAÇÃO DE DNA

7.2. PROCEDIMENTO OPERACIONAI PADRÃO – POP – GENOTIPAGEM

7.3. PROCEDIMENTO OPERACIONAI PADRÃO – POP – DETERMINAÇÃO DE HAPLÓTIPOS DO GENE *CYP2D6*

7.4. PARECER COMITÊ ÉTICA E PESQUISA

7.5. PARECER COMITÊ ÉTICA E PESQUISA

7.6. TERMO DE ESCLARECIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

7.7. TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

7.8. TERMO DE ESCLARECIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



## 7.1. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP EXTRAÇÃO DE DNA

---

**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO**
**INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA**
**FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO**

<b>Código POP</b>	POP_IPCCB_LAB_003_PT	<b>Versão 4</b>	
<b>Título</b>	Procedimento para extração de DNA de <i>Plasmodium</i> spp. a partir de sangue Total, utilizando o QIAmp DNA kit (Qiagen®).		
<b>Língua do Documento</b>	PT		
<b>Elaborado por:</b> Anne C G de Almeida	<b>Revisado por:</b> Gisely C de Melo	<b>Aprovado por:</b> Monica Costa	<b>Data de aprovação:</b> 22/01/2020

<b>Nome</b>	<b>Versão</b>	<b>Alterações realizadas</b>
Mariana Marcovski	4	Formatação e adição do idioma do POP
Gisely C de Melo	3	Formatação e revisão do POP
Gisely C de Melo	2	Revisão dos procedimentos de extração

**1. OBJETIVO**

Descrever o procedimento da extração de DNA de *Plasmodium* spp. a partir de sangue total no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB) da Fundação de Medicina Tropical Doutor Vieira Dourado (FMT-HVD).

**2. CAMPO DE APLICAÇÃO**

Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB) da Fundação de Medicina Tropical Doutor Vieira Dourado (FMT-HVD).

**3. DEFINIÇÕES**

Não se aplica.

**4. RESPONSABILIDADES**

**4.1 Responsável pela coleta de sangue:** técnicos de patologia

**4.2 Responsável pela realização da extração de DNA:** alunos de iniciação científica, mestrado, doutorado, pesquisadores e colaboradores treinados na extração de DNA

**5. POP'S RELACIONADOS**

5.1 Procedimento para realização de PCR em tempo real para detecção de DNA de plasmódio (qPCR) – versão atual do **POP\_IPCCB\_LAB\_021\_PT**

## 6. PROCEDIMENTOS

### 6.1 Recursos necessários

**6.1.1 Amostra:** Sangue total de paciente a ser testado, armazenado em tubo ou papel de filtro.

#### 6.1.2 Materiais

- Pipetas automáticas de 10 µL, 100 µL e 1000 µL
- Ponteiras com filtro para pipetas automáticas
- Tubos para 1,5 e 2,0 mL

#### 6.1.3 Equipamentos

- Centrífuga
- Vortex
- Banho Maria

#### 6.1.4 Reagentes

Reagente	Armazenamento
1. Tampão Lise dos tecidos (Tampão ATL)	Temperatura ambiente
2. Proteinase K	Temperatura ambiente
3. Tampão de Lise (Tampão AL)	Temperatura ambiente
4. Etanol 95% PA	Temperatura ambiente
5. Tampão de Lavagem 1 (Tampão AW1)	Temperatura ambiente
6. Tampão de Lavagem 2 (Tampão AW2)	Temperatura ambiente
7. Tampão de Eluição (Tampão AE)	Temperatura ambiente

### 6.2 Obtenção de sangue total

#### 6.2.1 Em papel de filtro

1. Abrir o envelope que contém o papel de filtro.
2. Realizar a punção digital utilizando lanceta estéril descartável depois de limpar a área.
3. Limpar a primeira gota obtida após a punção e coletar no papel de filtro quantidade suficiente para saturação do papel de filtro.
4. Secar em Temperatura ambiente. Fechar o envelope. Armazenar entre 2°C a 8°C.
5. No laboratório, os papéis de filtro serão armazenados seguindo a mesma ordem com acrônimo, número de inclusão e dia da visita, caso necessário.

#### 6.2.2 Por punção endovenosa

1. Obter 5 ml de sangue venoso em tubo de EDTA identificado.
2. Centrifugar a 14000 rpm por 10 min.
3. Desprezar o soro e colocar a papa de hemácias em criotubo identificado.
4. Armazenar os criotubos a – 20°C em caixa de plástico ou papelão identificada e numerada.



---

5. Os criotubos serão armazenados seguindo com acrônimo, número de inclusão e dia da visita, caso necessário.

### **6.3 Extração do DNA**

Para a extração do DNA a partir de sangue total será usado o Protocolo de Extração do QIAMP® DNA Mini Kit da Qiagen.

#### **6.3.1 Procedimento para extração do DNA a partir de papel de filtro**

1. Cortar 3 círculos de 3 mm de diâmetro do papel de filtro e colocá-los em um tubo eppendorf de 1,5 mL. Pipetar 180 µL do Tampão ATL.

2. Incubar a 85°C no banho Maria por 10 minutos. Remover as bolhas por centrifugação.

3. Adicionar 25 µL de Proteinase K e agitar no vórtex. Incubar a 56° C por 1 hora.

Remover as bolhas por centrifugação.

4. Continuar com o procedimento comum para extração do DNA (6.3.3)

#### **6.3.2 Procedimento para extração do DNA a partir de tubo**

1. Pipetar 20 µL de Proteinase K (2) num tubo eppendorf de 1,5 mL.

2. Adicionar 200 µL de amostra ao tubo. Se não houver 200 µL de amostra, adicionar o volume apropriado de PBS.

3. Adicionar 200 µL de Tampão AL (3) a amostra. Vortexar por 15 segundos.

4. Incubar por 56 por 10 minutos.

5. Continuar com o procedimento comum para extração do DNA (6.3.3)

#### **6.3.3 Procedimento comum para extração do DNA**

1. Adicionar 200 µL de Etanol absoluto (96 a 100%) e agitar no vórtex imediatamente. Remover as bolhas por centrifugação.

2. Cuidadosamente transferir o conteúdo do tubo para o tubo filtro. Tampar e centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Descartar o filtrado com o tubo. Colocar o tubo filtro em um novo tubo coletor.

3. Cuidadosamente adicionar 500 µL de tampão AW1 e centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Descartar o filtrado com o tubo. Colocar em um novo tubo coletor.

4. Cuidadosamente adicionar 500 µL de tampão AW2 e centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos.

5. Descartar o tubo coletor com o filtrado. Colocar o tubo filtro em novo tubo coletor e centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto.

6. Colocar o tubo filtro em um tubo eppendorf de 1,5 mL novo. Descartar o filtrado e o tubo coletor. Adicionar cuidadosamente 150 µL de tampão AE ou água destilada e incubar à temperatura ambiente por 1 minuto.

7. O volume final utilizado de tampão AE pode ser menor. Em amostras antigas ou com problemas na extração poderão ser ressuspensas em 50 ou 100 µL de tampão AE.

8. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.

---

9. Armazenar por -20°C.

#### **6.4 Biossegurança**

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (1).

#### **7. REFERÊNCIAS**

1. Richmond JY, Mckinney RW. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.

#### **6 LISTA DE ANEXOS**

<b>TÍTULO ANEXO</b>	<b>CÓDIGO</b>

## 7.2. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP – GENOTIPAGEM

---

**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO**
**INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA**
**FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO**

<b>Código POP</b>	POP_IPCCB_LB_044_PT_D	<b>Versão 2</b>	
<b>Título</b>	Procedimento para realização da genotipagem de SNPs de enzimas do citocromo P450 (CYPs) utilizando sistema TaqMan <sup>®</sup>		
<b>Idioma da versão original</b>	PT		
<b>Elaborado por:</b> Jaiana Larissa de Morais Cardoso	<b>Revisado por:</b> Anne Cristine Gomes de Almeida	<b>Aprovado por:</b> Gisely Cardoso de Melo	<b>Data de aplicação:</b> 23/08/2019

Nome	Versão	Alterações realizadas
Gisely C. de Melo	2	Formatação

**1. OBJETIVOS**

Descrever o procedimento de realização da PCR em tempo real para genotipagem alélica de enzimas do citocromo P450 (CYP) com sistema TaqMan.

**2. CAMPO DE APLICAÇÃO**

Análise no laboratório de biologia molecular de amostras relacionadas à pesquisa clínica. Genotipagem das CYPs 2D6, 3A4, 3A5, 2C19 e 2C8

**3. DEFINIÇÕES**

- PCR: A reação em cadeia da polimerase (do inglês polymerase chain reaction), é uma técnica da biologia molecular para amplificar pequenas quantidades de um DNA específico a partir de um molde do DNA, usando uma reação enzimática simples, sem um organismo vivo.



- 
- Alelo: Uma de duas ou mais formas alternativas de um gene que afetam a mesma característica de modo diferente.
  - Alelo selvagem: é aquele encontrado em organismos naturais, ou seja, sem que este tenha sofrido algum tipo de alteração nos seus genes.
  - Alelo estrela (\*): é definido por variações de sequências específicas dentro do locus do gene.
  - Variação no número de cópias (CNV): um segmento de DNA em que um número variável daquele segmento tem sido encontrado.
  - Haplótipo: uma série de alelos encontrados em um locus ligado em um cromossomo.
  - Diplótipo: É a combinação específica dos dois haplótipos.
  - Genótipo: é a constituição genética de um indivíduo proveniente de ancestrais comuns.
  - Fenótipo: é o produto direto da informação proveniente no DNA, representa formas alternativas de expressão de um mesmo caráter que pode ser controlado por um ou vários genes.

#### 4. RESPONSABILIDADES

Equipe do laboratório de biologia molecular envolvida na realização da PCR.

#### 5. POP'S RELACIONADOS

- Procedimento para extração de DNA de *Plasmodium* spp. a partir de sangue total, utilizando o QIAmp DNA kit (Qiagen®) - POP\_IPCCB\_LB\_003\_v03D\_PT

#### 6. PROCEDIMENTOS

##### 6.1.1. Materiais

- Pipetas automáticas de 10µL, 100µL e 1000 µL
- Ponteiras com filtro para pipetas automáticas





- 
- Pipeta multicanal
  - Multipipetador
  - Ponteiras para multipipetador (0,5 ml)
  - Tubos eppendorf de 1,5 e 2,0 mL
  - Microplacas de 0,1mL, com 96 poços, para sistema de PCR em Tempo Real
  - Adesivo óptico para vedar as microplacas

#### **6.1.2. Equipamentos**

- Vortex
- Centrífuga
- Termociclador de PCR em tempo real
- Nanodrop

#### **6.1.3. Reagentes**

- Mastermix universal
- Mastermix de genotipagem
- RNase P
- Sondas genotipagem
- Água nuclease free

### **6.2 Reação de genotipagem**

#### **6.2.1 Obtenção de DNA**

- A extração do DNA deve ser feita de acordo com o POP\_IPCCB\_LB\_003\_v03D\_PT;
- As amostras devem ser armazenadas em tubo eppendorf ou microplaca e devem ser mantidas em câmara fria a 4°C.

#### **6.2.2 Preparação do Mix de genotipagem**

- O mix de genotipagem deve ser preparado e distribuído na microplaca para PCR na área apropriada (capela de fluxo laminar VECO CFLV estéril para





preparo de reagentes PCR);

- Ligar a luz UV (germicida) da capela de fluxo laminar cerca de 30 minutos antes do início do preparo. Após esse período desligar;
- Com o fluxo laminar da cabine em operação, proceder o preparo do mix de genotipagem;
- Centrifugar as sondas;
- Em um tubo eppendorf, pipetar os reagentes nas seguintes proporções:

**1x (VF=5 $\mu$ L)**

<b>Mastermix universal</b>	2,5 $\mu$ L
<b>Sonda de genotipagem</b>	0,25 $\mu$ L

Obs: Pode-se utilizar também os reagentes e volumes (mix de genotipagem e DNA template) recomendados pelo fabricante das sondas de genotipagem, a *ThermoFisher Scientific*

- f. Centrifugar o mix e pipetar 2,75 $\mu$ L em cada poço da microplaca;
- g. Cobrir a microplaca e seguir para a bancada de manipulação de DNA.

### 6.2.3 Montagem da placa de genotipagem

- Vortexar e/ou centrifugar todos os tubos e microplacas de armazenamento de DNA;
- Pipetar 2,25 $\mu$ L de DNA em cada poço da microplaca de genotipagem contendo o mix de genotipagem;
- Os controles negativos devem ser feitos misturando 2,25 $\mu$ L de água (miliQ/água para injeção/água nuclease free) em cada poço selecionado como controle negativo;
- Aplicar o adesivo óptico para vedar a microplaca, evitando tocar em sua área central;
- Centrifugar a microplaca;



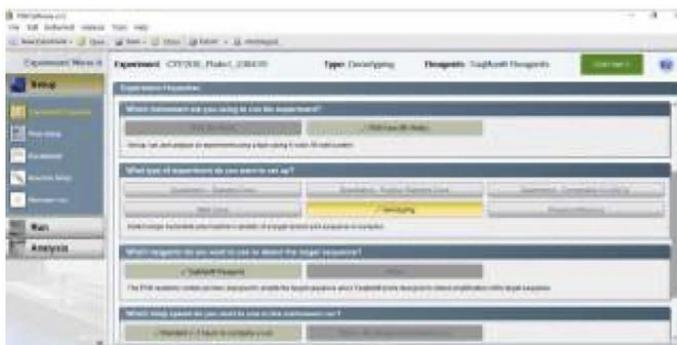


### 6.2.4 Reação de PCR real time

- A reação de PCR real time utiliza o software Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR System;
- Selecionar Advanced Setup na tela inicial;
- No Experiment Menu -> SETUP -> Experiment properties:

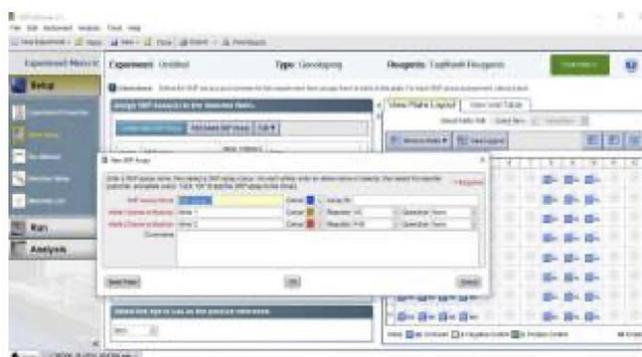


- Identificar o nome do experimento;
- Instrumento de corrida: 7500 fast (96wells);
- Tipo de experimento: Genotyping;
- Reagente: TaqMan® Reagents;
- Velocidade: Standard (~2 hours to complete run).



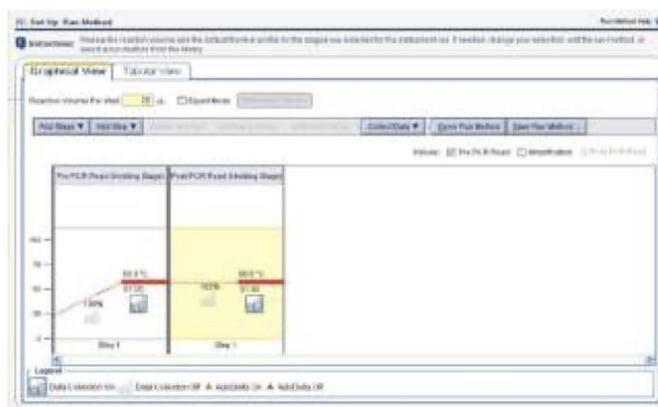


- No Experiment Menu -> SETUP -> Plate setup
  - Atribuir SNP assay;
  - Criar novo SNP assay;
  - Identificar o SNP assay;
  - Definir alelo 1 ou base e selecionar VIC.
  - Definir alelo 2 ou base e selecionar FAM;
  - No Plate layout, selecionar os poços e definir o SNP assay.



- e. No Experiment Menu -> SETUP -> Run method
  - Para configurar a corrida, preencha a quantidade de  $\mu\text{L}$  da reação. A reação

pode ter entre 10 e 30  $\mu\text{L}$ ;





- Na aba Tabular View selecione os tempos e temperatura da reação, bem como o número de ciclos.

Stage/Step	Pre-PCR Read	Thermal Cycling (Performed on a dedicated thermal cycler)			Post-PCR Read
	Holding Stage	Holding Stage	Cycling (50 cycles)		Holding Stage
			Denature	Anneal/Extend	
Temperature	60 °C	95 °C	92 °C	60 °C	60 °C
Time (mm:ss)	00:30	10:00	00:15	01:30	00:30
Data Collection	Yes	No	No	Yes <sup>1</sup>	Yes

- Após configurar PCR, conferir o Plate layout e salvar a reação;
  - Em seguida, clicar no botão START RUN.
  - O desenho da reação pode ser salvo como template para as demais análises;
  - No Experiment Menu -> ANALYSIS -> Multicomponent plot;
  - Analisar o resultado da curva de genotipagem.

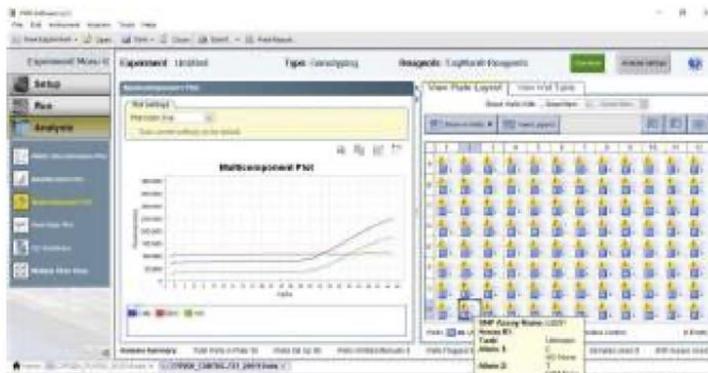
### 6.2.5 Análise da reação e definição do haplótipo

- No Experiment Menu -> ANALYSIS -> Multicomponent plot, analisar as curvas de genotipagem;
- Curva 1, curva de amostra heterozigoto para o alelo o SNP pesquisado;





- Curva 2, curva de amostra homozigoto para o alelo o SNP pesquisado;



- Com o resultado das genotipagem construir uma tabela como as bases definidas para SNP.

### 6.3 CYP2D6

- A enzima CYP2D6 requer etapas extras para realização da genotipagem

#### 6.3.1 Definição do diplótipo para CYP2D6

- A definição do diplótipo deve ser feita no software Haplo.Stats, implementado na plataforma R.

#### 6.3.2 Reação CNV

##### 6.3.2.1 Concentração de DNA

- É necessário que a concentração de DNA das amostras seja igual a 5ng/μL;
- Com o auxílio do equipamento Nanodrop, dosar a concentração de DNA;
- As amostras com concentração maior que 5ng/μL devem ser diluídas com





água nuclease free e, é preciso proceder nova extração das amostras com concentração menor.

### 6.3.2.2 Preparação do Mix

- O mix deve ser preparado e distribuído na microplaca para PCR na área apropriada (capela de fluxo laminar VECO CFLV estéril para preparo de reagentes PCR);
- Ligar a luz UV (germicida) da capela de fluxo laminar cerca de 30 minutos antes do início do preparo. Após esse período desligar;
- Com o fluxo laminar da cabine em operação, proceder o preparo do mix;
- Centrifugar a sonda e a RNase P;
- Em um tubo eppendorf, pipetar os reagentes nas seguintes proporções;

<b>1x (VF=5<math>\mu</math>L)</b>	
<b>Mastermix universal</b>	5 $\mu$ L
<b>TaqMan® copy number assay</b>	0,5 $\mu$ L
<b>RNase P</b>	0,5 $\mu$ L
<b>Água nuclease Fre</b>	2 $\mu$ L

- Centrifugar o mix e pipetar 8 $\mu$ L em cada poço da microplaca;
- Cobrir a microplaca e seguir para a bancada de manipulação de DNA.

### 6.3.2.3 Montagem da placa de PCR

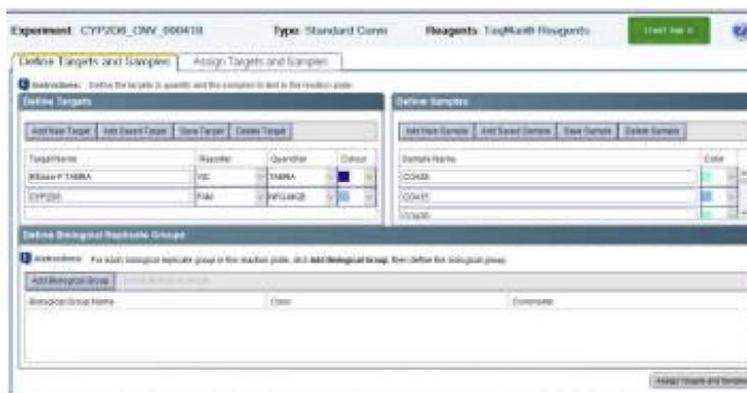
- Vortexar e/ou centrifugar todos os tubos e microplacas de armazenamento de DNA;
- Pipetar 2 $\mu$ L de DNA em cada poço da microplaca contendo o mix;
- As amostras deverão ser amplificadas em triplicata;
- É necessário ter uma amostra de controle positivo;
- Os controles negativos devem ser feitos misturando 2 $\mu$ L de água nuclease free em cada poço selecionado como controle negativo;



- Aplicar o adesivo óptico para vedar a microplaca, evitando tocar em sua área central;
- Centrifugar a microplaca;

#### 6.3.2.4 Reação de PCR real time

- Selecionar Advanced Setup na tela inicial;
- No Experiment Menu -> SETUP -> Experiment properties:
  - Identificar o nome do experimento;
  - Instrumento de corrida: 7500 fast (96wells);
  - Tipo de experimento: Standard curve
  - Reagente: TaqMan® Reagents;



- Velocidade: Standard (~2 hours to complete run).

#### c. No Experiment Menu -> SETUP -> Plate setup

- Definir alvos
- RNase P TAMRA – VIC – TAMRA e CYP2D6 – FAM – NFQ-MGB;
- Definir amostras;
- Distribuir amostras na placa.

- No Experiment Menu -> SETUP -> Run method



- Para configurar a corrida, preencha a quantidade de  $\mu\text{L}$  da reação;
- Na aba Tabular View selecione os tempos e temperatura da reação.

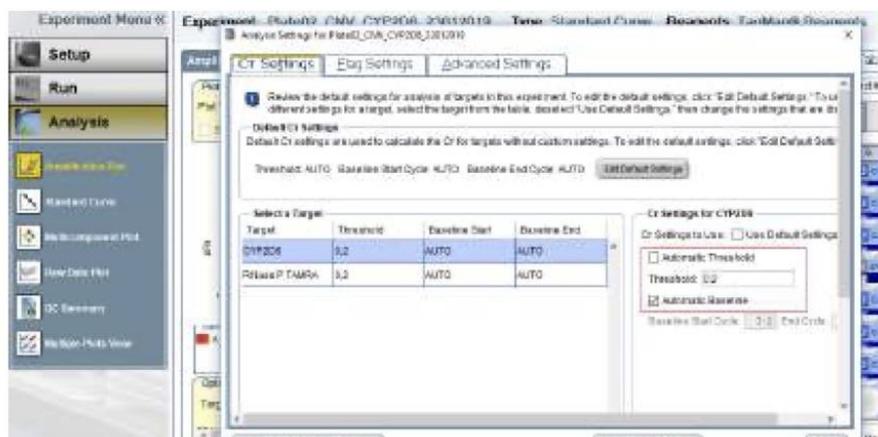
Step	Temperature	Time	Cycles
Initial denature / enzyme activation	95°C	10 minutes	1
Denature	95°C	15 seconds	40
Anneal / Extend	60°C	60 seconds	

- Após configurar PCR, conferir o Plate layout e salvar a reação;
  - Em seguida, clicar no botão START RUN.
  - O desenho da reação pode ser salvo como template para as demais análises;

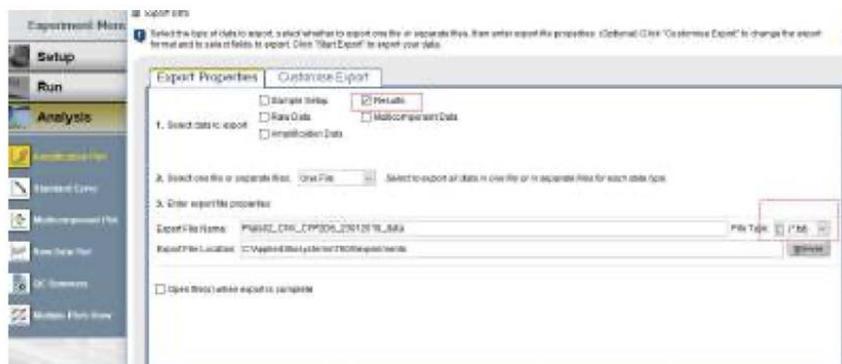
#### 6.3.2.5 Análise do resultado

- Após o término da reação, analisar primeiramente o arquivo de resultado “.eds”, no software do equipamento. Verificar se houve amplificação das amostras e controles, analisando a “Amplification plot” ou “Multicomponent plot”.
- Clicar em “Analysis settings”. Na janela “Ct settings” modificar os parâmetros de *CT threshold* e *Baseline*. Para cada alvo (CYP2D6 e RNase P), desmarcar a opção “Auto Threshold” e configurar o CT threshold para **0.2**. Para cada alvo, deixar selecionada a opção **Automatic Baseline**. Clicar em “Apply Analysis settings” para aplicar as novas configurações.





- Voltar à tela principal. Selecionar todos os poços. Clicar em “Export”
- Na janela de “Export properties”, selecionar apenas a opção “Results”. Em “File type”. Selecionar a opção (\*.txt). Selecionar também um local para o arquivo “.txt” exportado, em “Export file location”.



- Na janela “Customise export”, buscar a opção “Field Separator” → marcar a opção **Commas**.
- Clicar em “Start Export”. Verificar se o arquivo “.txt” foi gerado. Fechar o software do aparelho.



- 
- Após estes procedimentos, a análise de CNV será feita utilizando o software *CopyCaller*, disponível para download no site da empresa ThermoFisher.

## 7. REFERÊNCIAS

- Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-time PCR System. Genotyping Experiments. Part Number 4387784. Revision C. Applied Biosystems. Thermo Fisher Scientific.
- Taqman® Copy Number Assays. User Guide. Publication 4397425. Revision E. Applied Biosystems. Thermo Fisher Scientific

## 8. LISTA DE ANEXOS

TÍTULO ANEXO	CÓDIGO



**Quadro 3 – Polimorfismos CYP2D6**

Polimorfismo	SNP ID	Tipo	Alelos	Localização	Contexto VIC/FAM
2549delA	rs35742686	T/-, Insertion/Deletion	*3	Chr.22:42128242	GGCTGGGCTGGGTCCAGGTCATCC[T/-] GTGCTCAGTTAGCAGCTCATCCAGC
100C>T	rs1065852	A/G, Transition Substitution	*4 e *10	Chr.22:42130692	CCGGGCAGTGGCAGGGGGCTGGTG[A/G] GTAGCGTGCAGCCAGCGTTGGCGC
1846G>A	rs3892097	C/T, Transition Substitution	*4	Chr.22:42128945	AGACCGTTGGGGCGAAAGGGGCGTC[C/T] TGGGGTGGGAGATGCGGGTAAGGG
4180G>C	rs1135840	C/G, Transversion Substitution	*2, *4, *10, *17, *29, *35, *39 e *41	Chr.22:42126611	AGCACAAGCTCATAGGGGGATGGG[C/G] TCACCAGGAAAGCAAAGACACCATG
2988G>A	rs28371725	C/T, Transition Substitution	*41	Chr.22:42127803	TTCATGGGCCCCCGCCTGTACCCTT[C/T] CTCCCTCGGCCCTGCACTGTTCC
3183G>A	rs59421388	C/T, Transition Substitution	*29	Chr.22:42127608	TCTGGTCGCCGCACCTGCCCTATCA[C/T] GTCGTGATCTCCTGTTGGACACGG
-1584C>G	rs1080985	G/C, Transversion Substitution	*2, *35 e *41	Chr.22:42132375	TAATTTTGTATTTTTGTAGAGACC[G/C] GGTTCTCCAAGTTGTCCAGGCTGG
2615_2617del AAG	rs5030656	CTT/-, Insertion/Deletion	*9	Chr.22:42128175	CCCCACGTGGCAGCCACTCTCAC[CTT/-] CTCCATCTCTGCCAGGAAGGCCTC
31G>A	rs769258	C/T, Transition Substitution	*35	Chr.22:42130761	AGGAGCAGGAAGATGGCCAATCA[C/T] GGCCAGGGGCACCAGTGTCTTAGC
1023C>T	rs28371706	G/A, Transition Substitution	*17	Chr.22:42129770	ACGCGGCCCGAAACCCAGGATCTGG[G/A] TGATGGGCACAGGCGGGCGGTCGGC
2850C>T	rs16947	A/G, Transition Substitution	*2, *17, *34, *29, *35, e *41	Chr.22:42127941	GAGAACAGGTCAGCCACCACTATGC[A/G] CAGTTCTCATATGAAGCTGCTC



## 7 APÊNDICE

### Quadro 1 – Polimorfismos CYP2C19

Polimorfismo	SNP ID	Tipo	Alelos	Localização	Contexto VIC/FAM
681G>A	rs4244285	A/G, Transition Substitution	*2	Chr.10:94781859	TTCCCACTATCATTGATTATTTCCC[A/G] GGAACCCATAACAAATTACTTAAAA
636G>A	rs4986893	A/G, Transition Substitution	*3	Chr.10:94780653	ACATCAGGATTGTAAGCACCCCTG[A/G] ATCCAGGTAAGGCCAAGTTTTTTGC

### Quadro 3– Polimorfismo CYP3A4

Polimorfismo	SNP ID	Tipo	Alelos	Localização	Contexto VIC/FAM
-392A>G	rs2740574	C/T, Transition Substitution	*1B	Chr.7:99784473	TAAAATCTATTAAATCGCCTCTCTC[C/T] TGCCCTTGCTCTATGGCTGTCCTC



7.3. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP – DETERMINAÇÃO DE HAPLÓTIPOS DO GENE *CYP2D6*

**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO**

**INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA**

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

<b>Código POP</b>	POP_IPCCB_LB_050_PT		
<b>Título</b>	Procedimento para determinação de haplótipos do gene <i>CYP2D6</i> utilizando o Haplo-stats (ambiente R) e predição do fenótipo enzimático.		
<b>Idioma da versão original</b>	PT		
<b>Elaborado por:</b> Anne Cristine Gomes de Almeida; Yanka Evellyn Salazar.	<b>Revisado por:</b> Gisely Cardoso de Melo	<b>Aprovado por:</b>	<b>Data de aplicação:</b>
<b>Data e assinatura</b>	<b>Data e assinatura</b>	<b>Data e assinatura</b>	<b>Data da próxima revisão:</b>

<b>Histórico de revisões</b>			
<b>Nome</b>	<b>Assinatura</b>	<b>Data (DD/MMM/AA)</b>	<b>Alterações realizadas</b>

**1. OBJETIVOS**

Descrever o procedimento para determinação de haplótipos e predição de fenótipo a partir do genótipo de *CYP2D6*.

## 2. DEFINIÇÕES

- Alelo: Uma de duas ou mais formas alternativas de um gene que afetam a mesma característica de modo diferente.
- Alelo estrela (\*): é definido por variações de sequências específicas dentro do locus do gene.
- Variação no número de cópias (CNV): um segmento de DNA em que um número variável daquele segmento tem sido encontrado.
- Haplótipo: uma série de alelos encontrados em um locus ligado em um cromossomo.
- Diplótipo: É a combinação específica dos dois haplótipos.
- Genótipo: é a constituição genética de um indivíduo proveniente de ancestrais comuns.
- Fenótipo: é o produto direto da informação proveniente no DNA, representa formas alternativas de expressão de um mesmo caráter que pode ser controlado por um ou vários genes.
- Score de atividade enzimática (AS): ferramenta que permite a tradução do genótipo em uma medida qualitativa do fenótipo que pode ser utilizada pra prever a atividade de CYP2D6.

## 3. APLICAÇÃO

Análise no laboratório de biologia molecular de amostras relacionadas à pesquisa clínica e predição de fenótipos da enzima CYP2D6.

## 4. RESPONSABILIDADES

Equipe do laboratório de biologia molecular envolvida na realização da análise de CYP2D6.

## 5. POP'S RELACIONADOS

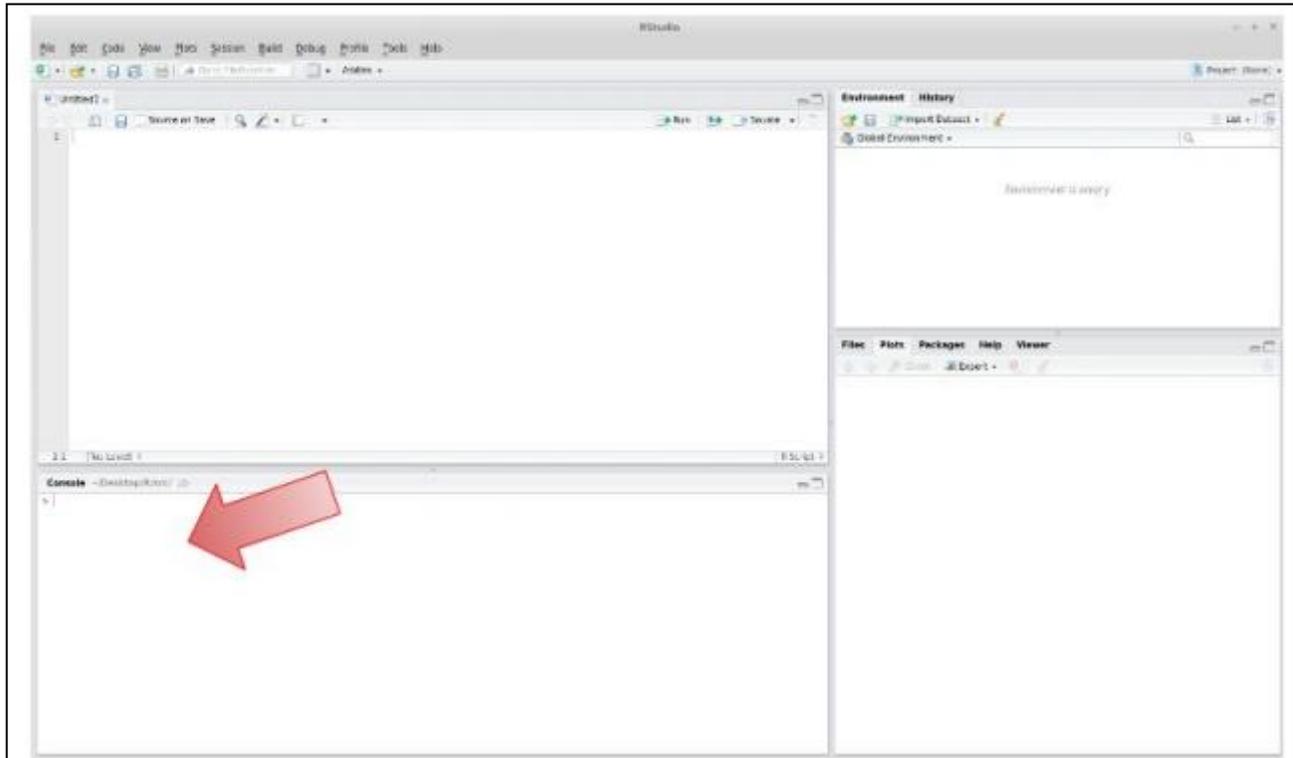
- Procedimento para extração de DNA de *Plasmodium* spp. a partir de sangue total, utilizando o QIAmp DNA kit (Qiagen®) - POP\_IPCCB\_LB\_003\_v03D\_PT
- Procedimento para realização da genotipagem de SNPs de enzimas do citocromo P450 (CYPs) utilizando sistema TaqMan® - POP\_IPCCB\_LB\_044\_v01D\_PT

## 6. RECURSOS NECESSÁRIOS

### 6.1. Instalar o R e Rstudio

- O R é um software livre para computação estatística e construção de gráficos que pode ser baixado e distribuído gratuitamente.
- Como baixar o **R** para o Windows:
  - Para baixar o R para o Windows entre no site do R [www.r-project.org](http://www.r-project.org)
  - Clique em CRAN (Comprehensive R Archive Network);
  - Escolha o espelho de sua preferência (CRAN mirrors);
  - Clicar em Windows 95 or later;
  - Clicar em base e salve o arquivo do R para Windows. Em seguida, executar o arquivo.
- Como baixar o **Rstudio** para o Windows:
  - Acessar <https://www.rstudio.com/products/rstudio/download/preview/>
  - Em Desktop Version - Installers, clicar em Windows 7+;
  - Seguir os passos da instalação.
- Ao instalar o R, apenas as configurações mínimas para seu funcionamento básico são instaladas (pacotes que vem na instalação “base”). Para análise de haplótipos de CYP2D6 será necessário instalar o pacote adicional (packages) denominado Haplo-stats.

- Para instalar o pacote, deve-se abrir o Rstudio, e na aba “Console” (mostrada na figura a seguir), digitar o seguinte comando: **> install.packages("haplo.stats")**



## 6.2 Determinação de diplótipos do gene CYP2D6 utilizando o Haplo-stats (ambiente R)

- Antes da análise no R, deve ser preparada uma Tabela em arquivo do Microsoft Excel (com alelos encontrados pela genotipagem) para ser lida no RStudio, conforme modelo a seguir:



- Observação: Para facilitar este passo, é preferível utilizar um template de tabela no formato .txt, onde a primeira linha contendo a referência de SNPs já esteja configurada. Isso evita também possíveis erros de leitura da tabela no RStudio.
- Abrir o programa RStudio.
- Selecionar “**New file**” >> “**R script**”.
- Colar o Script do quadro a seguir na área em branco da aba “**Untitled 1\***”.

```
library(haplo.stats)
geno = read.table(file.choose(), head= TRUE, sep = "\t",row.names=NULL)

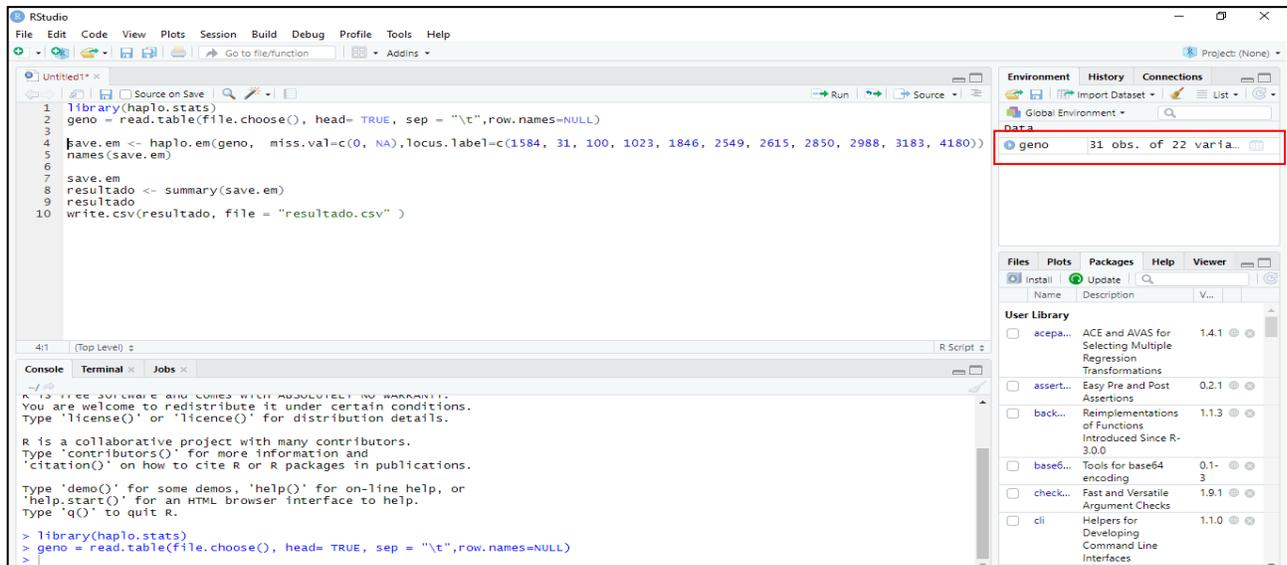
save.em <- haplo.em(geno, miss.val=c(0, NA),locus.label=c(1584, 31, 100, 1023, 1846,
2549, 2615, 2850, 2988, 3183, 4180))
names(save.em)

save.em
resultado <- summary(save.em)
resultado
write.csv(resultado, file = "resultado.csv" )
```

- Para rodar o comando desejado, colocar o cursor em qualquer ponto da respectiva linha e clicar tecla ENTER do computador ou clicar a opção “**Run**”.



- Ao clicar o segundo comando (*geno = read.table ...*), o programa irá solicitar a escolha da tabela a ser lida. Localizar o arquivo de texto com a tabela e clicar em ABRIR.
- Verificar se o comando foi executado com sucesso. No canto direito da tela deverá aparecer a informação com numero de observações e variáveis da tabela que acabou de ser lida pelo programa.



- Clicar no campo destacado na figura acima. Uma aba “**geno**” será aberta onde poderá se verificar se a tabela com alelos foi lida corretamente (observar o número de linhas, colunas, SNPs, quantidade de variáveis). Se corretas as informações, retornar para aba “**Untitled 1\***”.

	N.1584.1	N.1584.2	N.31.1	N.31.2	N.100.1	N.100.2	N.1023.1	N.1023.2	N.1846.1	N.1846.2	N.2549.1	N.2549.2	N.2615.1	N.2615.2
1	C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A
2	C	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A
3	G	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A
4	C	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A
5	C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A
6	C	G	G	G	C	T	C	C	G	A	A	A	A	A
7	C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A
8	C	C	G	G	T	T	C	C	G	A	A	A	A	A
9	C	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A
10	C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A

Showing 1 to 12 of 31 entries, 22 total columns

- Rodar o terceiro comando (*save.em <- haplo.em...*), seguido do quarto comando (*names(save.em)*) e quinto comando (*save.em*).
- Após rodar o quinto comando, aparecerá a tabela “Haplotypes” com haplótipos e frequências (determinados pelos dados contidos na tabela de alelos) na janela inferior, aba “**Console**”:

```

1 library(haplo.stats)
2 geno = read.table(file.choose(), head= TRUE, sep = "\t", row.names=NULL)
3
4 save.em <- haplo.em(geno, miss.val=c(0, NA), locus.label=c(1584, 31, 100, 1023, 1846, 2549, 2615, 2850, 2988, 3183, 4180))
5 names(save.em)
6
7 save.em
8 resultado <- summary(save.em)
9 resultado
10 write.csv(resultado, file = "resultado.csv" )

```

Console

```

[1] "inlike" "inlike.noLD" "lr" "df.lr" "hap.prob" "hap.prob.noLD" "converge"
[8] "locus.label" "indx.subj" "subj.id" "post" "hap1code" "hap2code" "haplotype"
[15] "nrtps" "rows.rem" "max.pairs" "control"
> save.em

```

Haplotypes												
	1584	31	100	1023	1846	2549	2615	2850	2988	3183	4180	hap.freq
1	C	A	C	C	G	A	A	T	A	G	C	0.01613
2	C	G	C	C	G	A	A	C	G	G	C	0.33871
3	C	G	C	C	G	A	A	T	A	G	C	0.08065
4	C	G	C	C	C	G	A	T	G	A	C	0.03226
5	C	G	C	C	G	A	A	T	G	A	G	0.00000
6	C	G	C	C	C	G	A	T	G	G	C	0.00000
7	C	G	C	C	C	G	A	T	G	G	C	0.00000

- A tabela com haplótipos pode ser copiada para outro tipo de arquivo (Word, Excel, Power Point).
- Rodar o sexto comando (*resultado <- summary(save.em)*) e sétimo comando e (*resultado*). Na aba “**Console**” aparecerá a tabela “Subjects: Haplotype Codes and Posterior Probabilities”, contendo os diplótipos por indivíduo/amostra e suas probabilidades.
- A segunda coluna desta tabela, “**Subj.id**”, corresponde ao número da amostra.
  - Observação: Uma amostra pode ter mais de uma probabilidade de diplótipo. Nesse caso, selecionar o diplótipo do indivíduo considerando a probabilidade maior e a coerência do resultado.
- A tabela com os diplótipos pode ser copiada para outro tipo de arquivo (Word, Excel, Power Point).

```

1 library(haplo.stats)
2 geno = read.table(file.choose(), head= TRUE, sep = "\t", row.names=NULL)
3
4 save.em <- haplo.em(geno, miss.val=c(0, NA), locus.label=c(1584, 31, 100, 1023, 1846, 2549, 2615, 2850, 2988, 3183, 4180))
5 names(save.em)
6
7 save.em
8 resultado <- summary(save.em)
9 resultado
10 write.csv(resultado, file = "resultado.csv" )

```

9:1 (Top Level) R Script

Console Terminal Jobs

C:/Users/Toshiba/Desktop/ resultado <- summary(save.em)

-----  
 Subjects: Haplotype Codes and Posterior Probabilities  
 -----

subj.id	hap1	hap2	posterior
1	1	2	1.00000
2	2	3	1.00000
3	3	14	1.00000
4	4	4	1.00000
5	5	2	1.00000
6	6	10	1.00000
7	7	2	1.00000
8	8	9	1.00000
9	9	2	1.00000
10	10	2	1.00000
11	11	2	1.00000
12	12	9	1.00000
13	13	2	1.00000

- O último comando do script (`write.csv(resultado, file = "resultado.csv" )`) permite exportar os resultados da análise para planilha do Microsoft Excel. Deve-se utilizar a ferramenta de busca do Windows para acessar o local desta planilha (buscando o arquivo da planilha pelo nome “resultado.csv”).

### 6.3 Determinação de Alelo Estrela

- A partir dos haplótipos obtidos pela análise no ambiente R (tabela “Haplotypes”), deve ser feita a comparação dos mesmos com bases de dados/artigos para determinação do alelo estrela correspondente a cada haplótipo.
- Esta comparação pode ser feita utilizando as tabelas de SNPs disponíveis no site da *PharmGKB*, *PharmVar* e, no caso de alelos existentes na população brasileira, pode-se utilizar diretamente a tabela do artigo de *Fridrich et al., 2014* (dados da Rede Nacional de Farmacogenética), que consta nos Apêndices deste POP.
- Após a identificação do alelo estrela, deve-se determinar o diplótipo de cada indivíduo (Ex: Amostra 1 = \*1/\*2; Amostra 2 = \*1/\*4, etc) utilizando os dados da tabela “Subjects: Haplotype Codes and Posterior Probabilities”.

- Após determinação dos diplótipos, deve-se seguir para as etapas de predição do fenótipo de CYP2D6, utilizando o *score de atividade* (AS), como descrito nos tópicos a seguir.
  - Caso se faça determinação de CNV (*copy number variation*) de CYP2D6, as deleções, duplicações ou multiplicações do gene devem ser consideradas da determinação do diplótipo final.

## 7. PREDIÇÃO DE FENÓTIPO A PARTIR DO GENÓTIPO

### 7.1 Variação do número de cópias

A predição de fenótipo é realizada somente após a determinação de diplótipos e análise da variação do número de cópias de *CYP2D6* conforme descrito no item 8 de POP\_IPCCB\_LB\_044\_v01D\_PT.

### 7.2 Score de atividade enzimática (AS)

Durante a análise de *CYP2D6*, é comum utilizar o sistema de score de atividade enzimática para predizer o fenótipo a partir do genótipo. Esse sistema emprega valores aos alelos conforme a sua atividade enzimática correspondente (Tabela 1). Os valores podem variar entre os alelos, para descobrir qual valor é empregado a um alelo deve-se checar os estudos de *Gaedigk et al., 2017* e, *Caudle et al., 2019*

ATIVIDADE ENZIMÁTICA	VALOR ATRIBUÍDO	T
		abela
		3.
		Valore
		s
		atribuí
		dos

aos alelos utilizando o sistema AS.

<b>Aumentada</b>	> 2,25
<b>Normal</b>	1,25 – 2,25
<b>Intermediária</b>	0,25 – 1,0
<b>Não funcional</b>	0

### 7.2.1 Multiplicações

As multiplicações são reportadas somente aos alelos \*2, \*4, \*10 e \*35.

Observação: Se houver outro alelo presente no diplótipo, a multiplicação é reportada ao alelo \*1.

### 7.2.2 Deleções

As deleções devem ser reportadas somente em casos de **homozigose**.

- Se houver deleção, o alelo é substituído por \*5 (não funcional).

### 7.3 Cálculo de AS

O cálculo para a determinação de AS é realizado a partir do resultado obtido da determinação de diplótipos e análise de CNV.

- Os valores dos alelos presentes no diplótipo de um indivíduo serão somados conforme apresentado na tabela 2;
- O fenótipo é determinado a partir do valor obtido para o AS.

Tabela 4. Exemplos de determinação de AS a partir do genótipo.

<b>DIPLÓTIPO</b>	<b>CNV</b>	<b>SOMA</b>	<b>AS</b>
*1/*1	2	1 + 1	2
*2/*2 <sup>a</sup>	1	1 + 0	1
*2/*4	2	1 + 0	1
*1/*10	3	1 + 0,25 + 0,25	1,5
*2/*17	3	1 + 1 + 0,5	2,5
*4/*4	2	0 + 0	0

<sup>a</sup> O alelo \*2 é substituído por \*5 (não funcional). O diplótipo final seria: \*2/\*5.

#### 7.4 Predição do fenótipo

Após o cálculo de AS, a predição de fenótipo pode ser realizada conforme descrito na tabela 3.

**Tabela 5.** Determinação de fenótipo a partir do AS.

AS	Fenótipo
0	PM (metabolização lenta)
0,25 – 1,0	IM (metabolização intermediária)
1,25 – 2,25	NM (metabolização normal)
>2,25	UM (metabolização ultrarrápida)

## 8. REFERÊNCIAS

- Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-time PCR System. Genotyping Experiments. Part Number 4387784. Revision C. Applied Biosystems. Thermo Fisher Scientific.
- GAEDIGK, A. *et al.* Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. **Genetics in Medicine**, v. 19, n. 1, p. 69–76, 2017.
- \_\_\_\_\_. Ten years' experience with the CYP2D6 activity score: A perspective on future investigations to improve clinical predictions for precision therapeutics. **Journal of Personalized Medicine**, v. 8, n. 2, p. 1–15, 2018.
- Pharmacogene Variation Consortium (PharmVar). Disponível em: <https://www.pharmvar.org/>
- PharmGKB. Disponível em: <https://www.pharmgkb.org/>
- Friedrich DC, Genro JP, Sortica VA, Suarez-Kurtz G, Moraes ME, Pena SD, et al. Distribution of CYP2D6 alleles and phenotypes in the Brazilian population. PLoS ONE. 2014;9:e110691.  
Disponível em:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4203818/pdf/pone.0110691.pdf>

- [f](#)
- CAUDLE, K. E. *et al.* Standardizing CYP2D6 Genotype to Phenotype Translation: Consensus Recommendations from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group. **Clinical and Translational Science**, v. 13, n. 1, p. 116–124, 2019.

## 8. APÊNDICES

**Tabela 1: Determinação do haplótipo (alelo estrela), de acordo com SNPs encontrados pela genotipagem de CYP2D6. Os alelos estrela na tabela são os principais já descritos na população Brasileira (Fridrich et al., 2013)**

Alelo CYP2D6	Posição do nucleotídeo no gene CYP26											Duplicação CYP2D6	Atividade enzimática
	-1584	31	100	1023	1846	2549	2615	2850	2988	3183	4180		
*1	C	G	C	C	G	A	A	C	G	G	G	-	Normal
*2	<b>G</b>	G	C	C	G	A	A	<b>T</b>	G	G	<b>C</b>	-	Normal
*3	C	G	C	C	G	Del	A	C	G	G	G	-	Nula
*4	C	G	<b>T</b>	C	<b>A</b>	A	A	C	G	G	<b>C</b>	-	Nula
*5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Nula
*9	C	G	C	C	G	A	<b>Del</b>	C	G	G	G	-	Diminuída
*10	C	G	<b>T</b>	C	G	A	A	C	G	G	<b>C</b>	-	Diminuída
*17	C	G	C	<b>T</b>	G	A	A	<b>T</b>	G	G	<b>C</b>	-	Diminuída
*29	C	G	C	C	G	A	A	<b>T</b>	G	<b>A</b>	<b>C</b>	-	Diminuída
*34	C	G	C	C	G	A	A	<b>T</b>	G	G	G	-	ND
*35	<b>G</b>	<b>A</b>	C	C	G	A	A	<b>T</b>	G	G	<b>C</b>	-	Normal
*39	C	G	C	C	G	A	A	C	G	G	<b>C</b>	-	Normal
*41	C	G	C	C	G	A	A	<b>T</b>	<b>A</b>	G	<b>C</b>	-	Diminuída
*1x	C	G	C	C	G	A	A	C	G	G	G	+	Aumentada
*2x	<b>C/G</b>	G	C	C	G	A	A	<b>T</b>	G	G	<b>C</b>	+	Aumentada
*4x	C	G	<b>T</b>	C	<b>A</b>	A	A	C	G	G	<b>C</b>	+	Nula
*17x	C	G	C	<b>T</b>	G	A	A	<b>T</b>	G	G	<b>C</b>	+	ND
*3x	<b>G</b>	<b>A</b>	C	C	G	A	A	<b>T</b>	G	G	<b>C</b>	+	Aumentada

\*nucleotídeos em negrito são polimórficos

\*\* ND – não definido

**Quadro 1 – Polimorfismos (SNPs) do gene CYP2D6**

Polimorfismo	SNP ID	Tipo	Alelos	Localização	Contexto VIC/FAM
2549delA	rs35742686	T/-, Insertion/Deletion	*3	Chr.22:42128242	GGCTGGGCTGGGTCCCAGGTCATCC <b>[T/-]</b> GTGCTCAGTTAGCAGCTCATCCAGC
100C>T	rs1065852	A/G, Transition Substitution	*4 e *10	Chr.22:42130692	CCGGGCAGTGGCAGGGGGCCTGGTG <b>[A]</b> <b>G]</b> GTAGCGTGCAGCCCAGCGTTGGCGC
1846G>A	rs3892097	C/T, Transition Substitution	*4	Chr.22:42128945	AGACCGTTGGGGCGAAAGGGGCGTC <b>[C/T]</b> <b>]</b> TGGGGGTGGGAGATGCGGGTAAGGG
4180G>C	rs1135840	C/G, Transversion Substitution	*2, *4, *10, *17, *29, *35, *39 e *41	Chr.22:42126611	AGCACAAAGCTCATAGGGGGATGGG <b>[C/G]</b> <b>]</b> TCACCAGGAAAGCAAAGACACCATG
2988G>A	rs28371725	C/T, Transition Substitution	*41	Chr.22:42127803	TTCATGGGCCCCCGCCTGTACCCTT <b>[C/T]</b> CTCCCTCGGCCCTGCACTGTTTCC
3183G>A	rs59421388	C/T, Transition Substitution	*29	Chr.22:42127608	TCTGGTGCCCGCACCTGCCCTATCA <b>[C/T]</b> GTCGTGATCTCCTGTTGGACACGG
-1584C>G	rs1080985	G/C, Transversion Substitution	*2, *35 e *41	Chr.22:42132375	TAATTTTGTATTTTTTGTAGAGACC <b>[G/C]</b> GGTTCTTCCAAGTTGTCCAGGCTGG
2615_2617de IAAG	rs5030656	CTT/-, Insertion/Deletion	*9	Chr.22:42128175	CCCCACCGTGGCAGCCACTCTCAC <b>[CTT/-]</b> <b>]</b> CTCCATCTCTGCCAGGAAGGCCTC
31G>A	rs769258	C/T, Transition Substitution	*35	Chr.22:42130761	AGGAGCAGGAAGATGGCCACTATCA <b>[C/T]</b> GGCCAGGGGCACCAGTGCTTCTAGC
1023C>T	rs28371706	G/A, Transition Substitution	*17	Chr.22:42129770	ACGCGGCCCGAAACCCAGGATCTGG <b>[G/A]</b> <b>]</b> TGATGGGCACAGGCCGGGCGGTCCGC
2850C>T	rs16947	A/G, Transition Substitution	*2, *17, *34, *29, *35, e *41	Chr.22:42127941	GAGAACAGGTCAGCCACCACTATGC <b>[A/G]</b> CAGTTCTCATCATTGAAGCTGCTC

## 7.4. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL  
 "Doutor Heitor Vieira Dourado"  
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS-CEP

**PARECER Nº 2064-CEP/FMT-HVD****Registro CEP: Protocolo Nº426/2011-CEP/FMT-AM****CAAE – 0002.0.114.000-11**

**Projeto de Pesquisa:** "Um estudo randomizado comparativo para avaliar a eficácia e tolerabilidade de tratamento esquizotípicos sanguíneos com artesunato amodiaquina whintrop®/coarsucam™ (ASAQ) versus cloroquina (CQ) para malária não complicada por monoinfecção de *plasmodium vivax*".

**Pesquisador Responsável:** Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda

**Instituição Proponente:** Fundação de Medicina Tropical "Doutor Heitor Vieira Dourado".

**Instituição Co-Participante:** Não se aplica

**Área Temática Especial:** Novos fármacos, com cooperação estrangeira.

**Patrocinador:** Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda

**Registro para armazenamento de material Biológico humano:** Não.

Ao se proceder a análise da proposta de emenda do projeto de pesquisa em questão, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação de Medicina Tropical "Doutor Heitor Vieira Dourado" - CEP/FMT-HVD, em sessão ordinária do dia 16 de setembro de 2011 e de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96 e suas complementares, manifesta-se favorável à **aprovação** do protocolo. Fica informado o pesquisador, que ao tomar conhecimento dessa decisão, o mesmo terá o prazo de 6 (seis) meses para apresentar relatório parcial do estudo ao CEP (mod. Relatório proposto pela CONEP), em atendimento à Resolução CNS nº 251/97, III.2ºh", bem como atentar ao cumprimento às demais alíneas desse mesmo item, que compõem o rol de suas responsabilidades no estudo.

**Situação do Protocolo: APROVADO**

Manaus, 16 de setembro de 2011.

  
 Francisco Nailson Santos Pinto  
 Coordenador do CEP/FMT-HVD

## 7.5. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA  
DOURADO ((FMT-HVD))



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** CLOROQUINA EM ASSOCIAÇÃO À PRIMAQUINA NO TRATAMENTO DA MALÁRIA VIVAX: BUSCA DE BIOMARCADORES PARA DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA CLINICA A CLOROQUINA

**Pesquisador:** Gisely Cardoso de Melo

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 44605015.4.0000.0005

**Instituição Proponente:** Diretoria de Ensino e Pesquisa - DENPE

**Patrocinador Principal:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.074.306

**Data da Relatoria:** 08/05/2015

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se do Projeto sob CAAE : 44605015.4.0000.0005, intitulado "CLOROQUINA EM ASSOCIAÇÃO À PRIMAQUINA NO TRATAMENTO DA MALÁRIA VIVAX: BUSCA DE BIOMARCADORES PARA DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA CLINICA A CLOROQUINA ! sob a responsabilidade da pesquisadora Gisely Cardoso de Melo, que pretende lançar luz a compreensão dos mecanismos de resistência a cloroquina é importante no entendimento da ação das drogas e na descoberta de biomarcadores que sirvam como uma ferramenta no diagnóstico e na epidemiologia molecular da resistência do parasito aos antimaláricos. Os biomarcadores inovadoras, tais como a expressão de genes relacionados com a provável resistência da droga pode ser utilizado na prática clínica para a monitorização da eficácia do tratamento, para o diagnóstico ou para prever o prognóstico. O objetivo deste trabalho será avaliar a eficácia do esquema terapêutico cloroquina em associação à primaquina e buscar biomarcadores para detecção de resistência clinica a cloroquina nos pacientes com malária vivax sem complicações atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado. Será realizado estudo do tipo ensaio clínico com pacientes com malária por P. vivax.

**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 DR. HEITOR VIEIRA  
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.074.306

Serão realizados os seguintes procedimentos: gota espessa pela técnica de Walker, hemograma, exames bioquímicos, PCR para confirmação da espécie de plasmódio, RT-PCR para analisar a expressão gênica,

**METODOLOGIA**

O estudo incluirá pacientes com malária por *P. vivax* de ambos os sexos, maiores de 18 anos, temperatura axilar 37,5 ° C ou história de febre nas últimas 48 horas, densidade parasitária superior a 0,02% com predomínio de estágio em anel (80,0% dos estágios totais presentes), mediante a assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. Os doentes receberão tratamento supervisionado com 25 mg / kg de fosfato de CQ ao longo de um período de 3 dias (10 mg / kg nos dias 0 e 7,5 mg / kg nos dias 1 e 2) associados com primaquina 0,5 mg/kg por 7 dias. Os pacientes serão avaliados nos dias 0, 1, 2, 3,4,5,7, 14,21,28,35 e 42 e, se eles se sentirem doentes, em qualquer momento durante o período de acompanhamento. Em cada visita, será realizada gota espessa pelo método de coloração de Walker (15) e hemograma completo. Na admissão (D0), será coletado sangue para realização de teste de susceptibilidade *ex vivo*, detecção molecular (16), microssatélite se para armazenamento de RNA e para determinação de níveis plasmáticos de CQ e desetilcloroquina (DCQ) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) No dia dia da resistência (DR), será coletado sangue para diagnóstico molecular, para armazenamento de RNA, microssatélites e para determinação de níveis plasmáticos de CQ e desetilcloroquina (DCQ) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (17). As amostras serão processadas dentro de 6 horas após a coleta e em seguida serão depletados os leucócitos por meio de fibras de celulose (18), cultivados na presença de entre 8-514 ng / mL de difosfato de cloroquina (19). Depois de 42 horas de cultivo, 200 uL da mistura do meio com sangue de cada poço será misturado e 20 ul de cada poço será dispensado em um tubo de fundo curvo e coradas com 2 uL de Dihidroetídio e 5 uL de SYBR Green (diluídas com 63 uL de PBS) e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente. Durante o tempo de coloração. A reação será interrompida após 20 minutos com a adição de 400 uL de PBS e será armazenado em gelo até a realização da citometria de fluxo (20). A proporção 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 DR. HEITOR VIEIRA  
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.074.306

maturação de esquizontes em cada concentração do fármaco será calculado pelo estimulador de índice inibitório (IC) (<http://www.antimalarial-icestimator.net/MethodIntro.htm>) e a IC50 calculados por análise de regressão não-linear (21, 22). As reações de amplificação do RNA será realizadas utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 45 ng de cDNA de cada amostra.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Avaliar a eficácia do esquema terapêutico cloroquina em associação à primaquina e buscar biomarcadores para detecção de resistência clínica a cloroquina nos pacientes com malária vivax sem complicações atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

**Objetivo Secundário:**

Estimar as falhas terapêuticas ao término do seguimento clínico-parasitológico; verificar a taxa real de recorrência parasitária pela PCR ao término do seguimento clínico-parasitológico; determinar e comparar as concentrações sanguíneas de cloroquina e desetilcloroquina em pacientes com ou sem falhas terapêuticas; avaliar a utilização de microssatélites de *P. vivax* para distinguir resistência, reinfeções e recaídas durante a avaliação da resposta terapêutica; validar a expressão dos genes *pvcr1* e *pvmr1* como biomarcador de resistência a cloroquina *in vivo* e *ex vivo*; determinar o número de cópias em amostras resistentes e sensíveis a cloroquina; verificar mutação em região promotora em amostras resistentes e sensíveis a cloroquina; verificar se existe concordância entre resistência a cloroquina *in vivo* e *ex vivo*; padronizar a citometria de fluxo para avaliar sensibilidade a antimaláricos para *P. vivax*.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e gradações variados de acordo com a resolução CNS 466/2012. Como este projeto utilizará pacientes provenientes da FMT-HVD, o possível risco envolvido na pesquisa seria a divulgação de informações pessoais e de saúde dos participantes da pesquisa, e para evitar esse problema, os participantes da pesquisa serão

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: oep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA  
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.074.308

identificados com códigos. Os nomes e todas as informações obtidas serão utilizados apenas pelo investigador principal.

**Benefícios:**

O benefício em estar participando deste estudo será um aumento de informações sobre os genes relacionados a resistência do *P. vivax* a cloroquina, mas não será pago nem receberá incentivo financeiro durante o acompanhamento.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O presente projeto mostra-se de grande relevância pois pretende lançar luz ao entendimento do mecanismo de resistência de determinados gens ao tratamento preconizado na malária. Especialmente na busca de biomarcadores. Traz como hipótese:

A expressão gênica de *pvmr1* e *pvcr1* será maior em amostras resistentes a cloroquina tanto *in vitro* e *in vivo*, podendo ser usado como biomarcador para prognóstico de resistência a cloroquina.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O projeto apresentou todos os itens obrigatórios de acordo com a resolução CNS 466/

Folha de Rosto folha rosto .

TCLE - Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declarações Diversas como as cartas anuência

Termo de assentimento

Projeto Detalhado

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Por considerar o projeto apresentado em consonância com as exigências éticas solicitadas considero o projeto , SMJ , APROVADO

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando

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 DR. HEITOR VIEIRA  
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.074.306

o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

MANAUS, 22 de Maio de 2015

---

**Assinado por:**  
**Marilaine Martins**  
**(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

## 7.6. TERMO DE ESCLARECIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ADULTOS

243

Favor leia estas informações com atenção. Tome o tempo necessário para fazer as perguntas que você quiser. A equipe do estudo explicará qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

#### INTRODUÇÃO

Você está sendo convidado para participar de um estudo clínico. O seu médico do estudo (o médico que vai conduzir o estudo) acha que você tem as condições iniciais para poder participar deste estudo. Antes de concordar em participar neste estudo, é muito importante que você entenda o que a sua participação envolverá, entendendo as informações fornecidas neste documento. Este termo descreve o objetivo, os procedimentos, os benefícios, os riscos, os desconfortos e as precauções do estudo. Também descreve os procedimentos alternativos que estão disponíveis para você e seus direitos de se retirar do estudo a qualquer momento.

Você deve ser bem sincero com o médico a respeito do seu histórico de saúde, incluindo o uso anterior e atual de outras medicações. Caso contrário, você poderá prejudicar a si mesmo com a participação neste estudo. O médico do estudo lhe fará perguntas sobre o seu histórico de saúde. Será necessário que você converse sobre o uso anterior e atual de outras medicações.

Se você não puder ler ou escrever, uma testemunha, que é uma pessoa independente do patrocinador e do médico, lerá este documento para você. Se você concordar em participar, a sua impressão digital (carimbo do seu dedo polegar) substituirá a sua assinatura.

#### OBJETIVO DO ESTUDO

Você apresenta sinais de malária. A malária é uma doença causada por 4 diferentes tipos de parasitas (todos da mesma família), transmitidos por picadas de mosquitos. Um destes tipos de parasita foi encontrado no seu sangue.

A malária pode causar febre, dor de cabeça, dor e fraqueza. Pode ser muito séria e pode até levar à morte se não tratada correta e imediatamente.

Atualmente, um dos tratamentos recomendados pelas autoridades de saúde internacionais contém artesunato amodiaquina; esta medicação combinada é conhecida pelo nome de Artesunato Amodiaquina da Winthrop® /Coarsucam™ (ASAQ). Este medicamento, ainda não aprovado para uso no Brasil, demonstrou a sua eficácia e segurança contra outro parasita da malária (*Plasmodium falciparum*) na África e na Colômbia. Este estudo tem o objetivo de juntar ainda mais informações sobre o medicamento, por isso a eficácia e segurança de ASAQ contra outro parasita da malária (*Plasmodium vivax*) será comparada a um medicamento anti-malária comumente utilizado no Brasil, chamado cloroquina.

#### DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Este estudo clínico será realizado em um centro de saúde em Manaus - Estado do Amazonas (Brasil) com aproximadamente 380 pacientes com mais de 6 meses de idade.

Se você concordar em participar deste estudo e se você tiver as condições para ser selecionado, você será tratado com artesunato amodiaquina (ASAQ) ou cloroquina. Você será sorteado para receber um destes tratamentos (semelhante à retirada de um número de um chapéu). A duração do tratamento será de 3 dias e o acompanhamento durará 39 dias. Você deverá ir ao centro de saúde pelo menos 7 vezes, além de hoje.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ADULTOS

244

Se você não tiver as condições de seleção, ou se escolher não participar do estudo, não haverá nenhum problema para receber o tratamento padrão contra malária; você receberá a mesma qualidade de tratamento por parte do pessoal do centro de saúde.

### **PROCEDIMENTOS DO ESTUDO**

Se você concordar em participar do estudo, o médico realizará um exame físico, coleta de amostra e verificará o seu histórico médico, também as medicações anteriores e atuais, para determinar se você pode participar do estudo.

### **Visitas**

Nos 3 primeiros dias, você virá ao centro todas as manhãs para receber o seu tratamento oral (pela boca).

A partir daí, você retornará ao centro no 4º, 8º, 15º, 29º e 43º dias.

Ao final de cada visita, o seu médico marcará a data da próxima visita.

### **Exames**

Em cada visita, será realizado um exame clínico e físico, incluindo medir sua temperatura corporal e a pressão do sangue.

Na 1ª visita e durante as visitas sem coleta de amostra de sangue para exame laboratorial, uma pequena quantidade de sangue será retirada por meio de uma picada no dedo para pesquisar os parasitas da malária e outra amostra de sangue será coletada e guardada em papel de filtro para análises complementares.

Nas visitas do 1º dia, 8º dia e 29º dia, uma amostra de sangue, igual a uma colher de café, será coletada de uma veia do seu braço para exames laboratoriais e para a análise complementar. Uma coleta de sangue adicional poderá ser realizada no 15º e no 43º dia, dependendo do seu estado, ou se os resultados anteriores forem anormais. A equipe buscará reduzir a uma coleta de sangue por visita.

Análises complementares são:

Uma para confirmar a espécie de malária do qual você foi infectado, realizado no primeiro dia e no dia que você tiver um novo sinal de malária (se isso ocorrer).

Outra para estudar a dosagem do medicamento no dia 7 e no dia que você tiver um novo sinal de malária (se isso ocorrer). Especificamente para a dosagem do medicamento artesunato de amodiaquina, a sua amostra de sangue será analisada num país estrangeiro, mantendo a sua confidencialidade adequadamente, conforme requerido pelos regulamentos internacionais e nacionais.

Um exame será realizado para uma análise complementar no futuro. Esta amostra de sangue será tomada no primeiro dia ou no dia em que seu médico achar que você está doente novamente. Esta amostra de sangue será usada no futuro para ajudar a ter um melhor conhecimento sobre os

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ADULTOS

245

parasitas da malária. Sua amostra de sangue poderá ser armazenada por 5 anos, de acordo com as leis do Brasil, no hospital, sob responsabilidade da instituição e do médico do estudo.

**Atenção:** Para estas análises complementares, nenhum sangue extra será retirado de você se forem realizados no mesmo dia do teste de laboratório. Mas se não forem, estas análises serão feitas de uma pequena picada onde apenas uma gota será obtida.

Estes exames não atrasarão o início do tratamento da doença.

O tratamento neste estudo não é recomendado durante os primeiros três meses da gravidez. Por este motivo, se você for uma mulher que pode engravidar, deverá concordar em utilizar um método contraceptivo eficaz durante o estudo, conforme indicado pelo seu médico do estudo. Além disso, no primeiro dia você realizará um teste de gravidez pela urina. Se este teste for negativo, você poderá participar deste estudo.

Em caso de teste de gravidez positivo, você receberá o tratamento recomendado nas diretrizes das Autoridades de Saúde utilizadas no Brasil para o tratamento de malária em uma mulher grávida.

Um segundo teste de gravidez será realizado no 43º dia; caso seja positivo, a sua saúde e a do seu bebê serão acompanhadas até o final da sua gravidez e nascimento, pelo tempo necessário.

Na visita no 1º, 3º e 29º dia, será realizado um eletrocardiograma, que é um exame do coração com equipamento especial, que não penetra no corpo. Este exame não causa dor.

Todos os resultados destes exames serão comunicados a você e permanecerão confidenciais.

Se o tratamento dado a você não estiver funcionando bem, um novo tratamento será imediatamente administrado, sem custos para você.

### RISCOS OU INCONVENIÊNCIAS RAZOAVELMENTE PREVISÍVEIS

Nos estudos anteriores, não foram informados sinais de intolerância graves em relação a estes tratamentos; mas, caso você sinta algo incomum, favor informar ao seu médico assim que possível. Não interrompa o tratamento por sua própria vontade. Todos os sinais listados abaixo em geral são reversíveis e leves.

#### O uso de ASAQ pode envolver os efeitos colaterais a seguir:

- Eventos mais frequentes: perda de apetite (fome), dificuldade para dormir, sono, dor de barriga, náusea (enjôo), fraqueza, cansaço, tosse.
- Eventos não comuns: bronquite aguda, problema no estômago, diminuição na contagem de células vermelhas do sangue (anemia), hipoglicemia (pouco açúcar no sangue), alucinação, formigamento e dormência dos membros, amarelamento do olho, tontura, distúrbios do batimento do coração, diarreia, vômito, coceira, feridas na pele, inchaço da face, problemas na pele, dor nas juntas, inchaço dos membros, febre.

#### Efeitos colaterais que podem estar ligados à amodiaquina, um dos ingredientes ativos de ASAQ:

- Baixa contagem de células brancas do sangue (que podem lhe tornar mais sujeito a infecções), problemas graves da função do fígado, problemas de visão, cor cinza na pele, especialmente dos dedos e das partes mucosas (dentro da sua boca), problemas no sistema nervoso e muscular.

#### O uso de Cloroquina pode envolver os efeitos a seguir:

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ADULTOS

- Eventos freqüentes: visão anormal ou embaçada, dor de cabeça, problema no estômago, náusea (enjôo), vômito, dor de barriga, coceira.
- Eventos menos freqüentes: cansaço, nervosismo, ansiedade, fraqueza, coloração azul da boca, das unhas e da pele, branqueamento do cabelo, perda de cabelo, feridas na pele.
- Eventos raros: irritabilidade, agitação, agressividade, confusão, alteração da consciência (efeitos sobre o comportamento), alteração da saúde do coração pelo resultado do exame de eletrocardiograma, baixa contagem de alguns tipos de células do sangue, fraqueza muscular, problemas de audição.

A coleta de sangue pode causar algum desconforto, sangramento ou mancha roxa, mas raramente causa tontura. Antes de cada amostra de sangue, o braço ou o dedo será desinfetado e uma nova seringa e agulha serão utilizadas para coletar o sangue.

Durante o período do estudo, você poderá apresentar efeitos colaterais ou desconfortos que não estão listados neste termo. Informe o médico ou a equipe do estudo imediatamente se você apresentar algum problema. Você receberá assistência médica adequada.

### BENEFÍCIOS RAZOAVELMENTE ESPERADOS

Este estudo clínico oferece benefício individual direto para o participante, porque o medicamento em teste já está aprovado em alguns países e a sua eficácia já é conhecida. Os exames laboratoriais permitirão que o Médico do estudo determine se você está ou não infectado pelo parasita da malária. Se você estiver infectado, este tratamento poderá melhorar a sua saúde e você será monitorado de perto por 42 dias.

Além disso, você deverá retomar à clínica para avaliação adicional e/ou tratamento se for verificado que você está doente. Outras doenças relacionadas ao estudo que ocorram durante o período do estudo serão tratadas.

A sua participação nos ajudará a entender melhor esta medicação e a atingir os objetivos do estudo. A sua comunidade também poderá se beneficiar dos resultados deste estudo no futuro.

### PROCEDIMENTOS OU TRATAMENTOS ALTERNATIVOS

Mesmo se você decidir não participar do estudo, você receberá um tratamento adequado. Se você tiver dúvidas a respeito de suas alternativas de tratamento, favor fazer as suas perguntas ao seu médico do estudo. Você e o seu médico podem decidir qual tratamento é o melhor para você.

### PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA NO ESTUDO - RETIRADA DO ESTUDO

A sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Você tem o direito de sair deste estudo a qualquer momento e por qualquer motivo. A recusa em participar ou se você sair do estudo não afetará o seu tratamento médico, nem causarão uma perda de benefícios aos quais você tem direito, de outra forma. A recusa não afetará a sua relação com o seu médico.

A sua participação neste estudo será interrompida pelos motivos a seguir, você concorde ou não:

- Se você não seguir os procedimentos do estudo,
- Se, na opinião do médico do estudo, for o melhor para você,



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ADULTOS

- Se o patrocinador do estudo encerrar o estudo por qualquer motivo,
  - Se as autoridades regulatórias responsáveis, ou o Comitê de Ética, decidir encerrar o estudo.
- Caso ocorra uma interrupção, o Comitê de Ética Institucional será informado sobre as razões do término do estudo, para que possa aprovar esta interrupção. A interrupção deste estudo, por qualquer razão, não prejudicará de forma alguma o acompanhamento médico ao qual você tem direito.

CASO SEJA NECESSÁRIO CONTINUAR O SEU TRATAMENTO CONTRA MALÁRIA APÓS O FINAL DO ESTUDO, O MÉDICO DO ESTUDO IRÁ GARANTIR O SEU RETORNO AOS CUIDADOS USUAIS PRATICADOS NESSA INSTITUIÇÃO.

O ACESSO AO MEDICAMENTO EM TESTE LHE SERÁ ASSEGURADO CASO O ESTUDO COMPROVE QUE ELE É MELHOR DO QUE O TRATAMENTO CONVENCIONAL E VOCÊ TENHA PRESCRIÇÃO DE SEU INVESTIGADOR PRINCIPAL PARA USÁ-LO.

Caso você se retire do estudo antes da sua conclusão, solicitamos que participe dos procedimentos programados (exame físico, coleta de sangue, etc.), para a sua própria segurança.

Antes de sua participação no estudo clínico, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deverá ser pessoalmente assinado e datado por você, ou por uma testemunha independente do médico se você não puder ler ou escrever (neste caso você fornecerá sua impressão digital) e pela pessoa que conversou sobre o consentimento livre e esclarecido. Antes de assinar este termo (ou de deixar a sua impressão digital como assinatura), você deverá fazer todas as perguntas que tiver sobre o que você não entender. A equipe responsável pelo estudo responderá às suas perguntas.

Você receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e poderá solicitar informações adicionais, a qualquer momento durante o estudo, do médico no centro, ou poderá entrar em contato no número de telefone que neste termo.

### RESPONSABILIDADES DO PACIENTE/ RECOMENDAÇÕES PRÁTICAS

A partir do primeiro dia e até o final do estudo, você não deverá tomar qualquer outra medicação sem conversar antes com o médico. Se você atualmente toma outros medicamentos, é importante que informe ao médico.

Se você faltar a uma consulta, uma pessoa do centro de saúde lhe visitará em casa para verificar porque você faltou à consulta e lhe trará ao centro de saúde para avaliação.

### CUSTOS, NÃO REMUNERAÇÃO E COMPENSAÇÃO

O(s) medicamento(s) do estudo, *COARSUCAM™ (artesunato amodiaquina da Winthrop®) e CLOROQUINA, se necessário PRIMAQUINA*, serão dados a você sem nenhum custo durante o estudo. O patrocinador do estudo, sanofi-aventis, arcará com as despesas relacionadas a todos os exames requeridos pelo estudo. Portanto, sua participação neste estudo não terá nenhum custo para você. Quando for necessário, os custos de transporte até o hospital e os custos para sua alimentação nos dias de visita ao centro de estudos serão ressarcidos. No entanto, sua participação neste estudo não será remunerada.

Se você/sua parceira é mulher em idade fértil, e caso seja necessário, o método contraceptivo indicado será fornecido gratuitamente pelo patrocinador do estudo, mediante prescrição médica.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ADULTOS

Mesmo assim, se você/sua parceira engravidar durante o estudo, você deve informar o médico do estudo imediatamente, e ele irá lhe orientar sobre os procedimentos/cuidados necessários. Seu médico do estudo será responsável por acompanhar e assistir você ou sua parceira até o final da gravidez e avaliar você/sua parceira e o estado do recém nascido. Se necessário, a assistência médica apropriada será fornecida pelo seu médico para você e/ou seu bebê.

A sanofi-aventis possui um seguro para cobrir riscos relacionados à participação no estudo.

Caso ocorra algum dano, mencionado ou não neste termo, que tenha sido resultante de sua participação no estudo, a sanofi-aventis lhe assegura o tratamento e acompanhamento médico necessário, bem como uma eventual compensação.

### CONFIDENCIALIDADE

A garantia de sigilo e privacidade dos seus dados, de acordo com as normas brasileiras, será assegurada.

Toda informação obtida durante este estudo, incluindo os registros médicos, dados pessoais e da pesquisa são confidenciais. Sua identidade pessoal, quer dizer, seu nome, endereço e outros dados, permanecerão sob sigilo, no centro de estudos. A forma de garantir este sigilo será identificá-lo(a) através de um código numérico e data de nascimento. Somente a equipe do estudo será capaz de ligar o código numérico ao seu nome completo. Durante sua participação neste estudo clínico, seu médico irá coletar seus dados pessoais e os dados sobre sua saúde. Estes dados serão repassados ao patrocinador do estudo de forma codificada. Estas informações serão guardadas por pelo menos 15 anos.

Você tem o direito de acessar seus dados junto ao médico do estudo e pedir correções, caso estes estejam errados ou incompletos.

Caso você seja acompanhado por um médico pessoal, e caso você concorde com isso, o médico do estudo informará este médico sobre sua participação no estudo.

O patrocinador irá analisar os dados estatisticamente para determinar a eficácia e a segurança do *COARSUCAM™ / ARTESUNATO AMODIAQUINA DA WINTHROP®*, assim como obter informações gerais sobre sua doença. Além disto, seus dados codificados podem ser usados em publicações científicas.

### NOVAS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS

VOCÊ SERÁ INFORMADO PELO SEU MÉDICO O QUANTO ANTES DE TODA NOVA INFORMAÇÃO RELEVANTE QUE SE TORNE DISPONÍVEL NO DECORRER DESTE ESTUDO E QUE POSSA AFETAR SUA DECISÃO EM PARTICIPAR. SEU MÉDICO DISCUTIRÁ COM VOCÊ SE VOCÊ DESEJA OU NÃO CONTINUAR NO ESTUDO. SE VOCÊ DECIDIR SE RETIRAR, SEU MÉDICO TOMARÁ PROVIDÊNCIAS PARA QUE VOCÊ CONTINUE RECEBENDO OS CUIDADOS MÉDICOS NECESSÁRIOS.

### OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

O Investigador Principal deste estudo, médico do estudo, é o **Dr. Marcus V. G. de Lacerda**, que pode ser encontrado no seguinte endereço: **Av. Pedro Teixeira, 25 - Manaus - Amazonas - Brasil – CEP: 69040-000** e telefone (horário comercial e fora do horário comercial) **(92) 2127 3537 Celular (92) 9114 7633**.





## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ADULTOS

249

EM QUALQUER FASE DO ESTUDO, VOCÊ TERÁ ACESSO AO INVESTIGADOR E SUA EQUIPE PARA COMUNICAR SINTOMAS INESPERADOS E NÃO HABITUAIS DURANTE O ESTUDO, ESCLARECER DÚVIDAS OU PEDIR INFORMAÇÕES ADICIONAIS.

ESTE ESTUDO FOI APROVADO POR UM COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS E ESTÁ DE ACORDO COM AS NORMAS NACIONAIS E INTERNACIONAIS PARA SUA REALIZAÇÃO. SE VOCÊ TIVER ALGUMA DÚVIDA OU QUISER ALGUMA INFORMAÇÃO ADICIONAL SOBRE SEUS DIREITOS COMO SUJEITO DE PESQUISA OU SOBRE OS ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO, ENTRE EM CONTATO COM O **COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS NO ENDEREÇO AV. PEDRO TEIXEIRA, 25 - MANAUS - AMAZONAS – CEP: 69040-000 E TELEFONES (92) 2127-3402 / (92) 2127-3432.**

1. Eu li ou leram para mim o termo de consentimento livre e esclarecido para esse estudo. Recebi todas as explicações sobre a natureza, objetivo, duração, efeitos e riscos previsíveis do estudo, assim como sobre as minhas responsabilidades. As minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente.
2. Concordo em participar desse estudo. Concordo em cooperar totalmente com o médico do estudo e entrarei em contato com ele/ela imediatamente caso eu apresente quaisquer sintomas inesperados ou não usuais durante o estudo. Durante o período do estudo, eu informarei ao médico do estudo sobre quaisquer outros tratamentos médicos que eu possa vir a precisar.
3. Informei ao médico do estudo sobre todas as minhas doenças e medicações que venho usando, além de informar sobre todas as minhas consultas médicas recentes.
4. Informei também ao médico do estudo sobre qualquer participação minha em outros estudos clínicos no último ano.
5. Estou ciente de que se não cooperar com os pedidos e as orientações do médico do estudo, posso vir a me prejudicar ao participar deste estudo.
6. Entendo que minha participação no estudo é voluntária e que posso me recusar a participar ou posso sair do estudo a qualquer momento. Caso eu recuse participar deste estudo, não serei penalizado de nenhuma forma e minha decisão não prejudicará qualquer cuidado médico ao qual tenho direito. Entendo ainda que quaisquer informações que possam surgir durante a condução do estudo, que possam afetar minha decisão em participar, me serão passadas assim que possível.
7. Representantes do patrocinador, Comitê de Ética em Pesquisa e autoridades regulatórias nacionais e ou internacionais poderão examinar e copiar meus registros médicos para verificar as informações neles coletadas. Ao assinar este documento, autorizo este uso de meus registros.
8. Receberei uma via assinada deste consentimento.

**Nome do paciente:** \_\_\_\_\_  
(a ser preenchido pelo paciente - ou representante legal/ testemunha, quando aplicável)

**Assinatura do paciente:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_\_  
(ou impressão digital, ou nome e assinatura do representante legal, se aplicável)

**Nome da testemunha:** \_\_\_\_\_  
(a ser preenchido pela testemunha, quando aplicável)

**Assinatura da testemunha:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_\_  
(se aplicável)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ADULTOS**

**Razão para a necessidade de testemunha:** \_\_\_\_\_  
(se aplicável)

**Investigador/Sub-investigador ou pessoa que conduziu a discussão sobre o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Confirmando que expliquei pessoalmente a natureza, propósito, duração, efeitos e riscos previsíveis do estudo ao paciente acima mencionado.

**Nome:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_\_

## 7.7. TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: UM ESTUDO RANDOMIZADO COMPARATIVO PARA AVALIAR A EFICÁCIA E TOLERABILIDADE DE TRATAMENTOS ESQUIZONTICIDAS SANGUÍNEOS COM ARTESUNATO AMODIAQUINA WHINTROP® / COARSUCAM™ (ASAQ) VERSUS CLOROQUINA (CQ) PARA MALÁRIA NÃO COMPLICADA POR MONOINFECÇÃO DE *PLASMODIUM VIVAX*.

Número do Estudo: *ARAMF\_C\_05370*

Composto: *Coarsucam™ / Artesunato Amodiaquina da Winthrop® (uma associação de dose fixa de artesunato com amodiaquina)*

Patrocinador do Estudo: Grupo Sanofi-aventis

Nome do Investigador Principal: Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda

Instituição: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (Gerência de Malária)

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25 - Manaus - Amazonas - Brasil – CEP: 69040-000

Por favor, leia estas informações com atenção. Tome o tempo necessário para fazer as perguntas que você quiser. A equipe do estudo explicará qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

### INTRODUÇÃO

Seu filho(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo clínico. O médico do estudo (o médico que conduz o estudo) acha que seu filho(filha) tem as condições iniciais para poder participar do estudo. Antes de concordar que seu filho (a) participe do estudo, é muito importante que você entenda o que participação dele envolverá, entendendo as informações fornecidas neste documento. Este termo descreve o objetivo, os procedimentos, os benefícios, os riscos, os desconfortos e as precauções do estudo. Descreve também os procedimentos alternativos que estão disponíveis para seu filho(a) e seu direito para se retirar do estudo a qualquer momento.

Você deve ser bem sincero com seu médico a respeito do histórico de saúde de seu filho(a), incluindo o uso anterior e atual de outras medicações. Caso contrário, seu filho(a) poderá ser prejudicado ao participar desse estudo. O médico do estudo lhe fará perguntas sobre o histórico da saúde de seu filho(a). Será necessário que você fale sobre o uso anterior e atual de outras medicações.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA REPRESENTANTE LEGAL DE MENORES DE IDADE

Se não puder ler ou escrever, uma testemunha, que é uma pessoa independente, do patrocinador e do médico lerá este documento para você. Se concordar com a participação de seu filho(a), sua impressão digital (carimbo do seu dedo polegar) substituirá a sua assinatura.

### OBJETIVO DO ESTUDO

Seu filho(a) apresenta sinais de malária. A malária é uma doença causada por 4 diferentes tipos de parasitas (todos da mesma família) transmitidos por picadas de mosquitos. Um desses tipos de parasita foi encontrado no sangue de seu filho(a).

A malária pode causar febre, dor de cabeça, dor e fraqueza. Pode ser muito séria e até levar à morte se não for tratada correta e imediatamente.

Atualmente, um dos tratamentos recomendados pelas autoridades de saúde internacionais contém artesunato de amodiaquina; essa medicação combinada é conhecida pelo nome de Artesunato Amodiaquina Winthrop® / Coarsucam™ (ASAQ). Esse medicamento, ainda não está aprovado para uso no Brasil, demonstrou sua eficácia e segurança contra outro parasita da malária (*Plasmodium falciparum*) na África e na Colômbia. Este estudo tem o objetivo de juntar ainda mais informações sobre o medicamento, por isso a eficácia e segurança de ASAQ contra outro parasita da malária (*Plasmodium vivax*) será comparada a um medicamento anti-malária comumente utilizado no Brasil, chamado cloroquina.

### DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Este estudo clínico será realizado em um centro de saúde em Manaus – Estado do Amazonas (Brasil) com aproximadamente 380 pacientes com mais de 6 meses de idade.

Se você concordar que seu filho(a) participe desse estudo e se ele tiver as condições para ser selecionado, ele será tratado com artesunato amodiaquina (ASAQ) ou cloroquina. Seu filho(a) será sorteado para receber um desses tratamentos (como se fosse tirar um número de um chapéu). A duração do tratamento será de 3 dias e o acompanhamento durará 39 dias. Seu filho(a) deverá ir ao centro de saúde pelo menos 7 vezes, além de hoje.

Se seu filho(a) não tiver as condições de seleção ou se você escolher para que ele(a) não participe do estudo, não haverá nenhum problema para seu filho receber o tratamento padrão contra malária; ele terá direito a receber a mesma qualidade de tratamento por parte do pessoal do centro de saúde.

### PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se você concordar com a participação de seu filho(a) no estudo, o médico realizará um exame físico e coleta de amostra de seu filho(a) e verificará seu histórico médico, bem como as medicações anteriores e atuais, a fim de determinar se ele pode participar do estudo.

#### Visitas

Nos 3 primeiros dias, seu filho(a) deverá comparecer ao centro todas as manhãs para receber o tratamento oral (pela boca).

A partir daí, ele deverá retomar ao centro nos dias 4º, 8º, 15º, 29º e 43º.

Ao final de cada visita, seu médico marcará a data da próxima visita.

#### Exames

Em cada visita, será realizado um exame clínico e físico, incluindo medir temperatura corporal e a pressão do sangue do seu filho(a).

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA REPRESENTANTE LEGAL DE MENORES DE IDADE

Na primeira visita e durante as visitas sem coleta de amostra de sangue para exames laboratoriais, uma pequena quantidade de sangue será retirada por meio de uma picada no dedo para pesquisar os parasitas da malária e outra amostra de sangue será coletada e guardada em papel-filtro para análises complementares.

Nas visitas dos dias 1, 8 e 29, uma amostra de sangue igual a uma colher de café será coletada de uma veia do seu braço para exames laboratoriais e análise complementar. Uma coleta de sangue adicional poderá ser realizada nos dias 15 e 43 dependendo do estado de seu filho(a) ou se os resultados anteriores forem anormais. A equipe buscará reduzir a uma coleta de sangue por visita.

Análises complementares são:

Uma para confirmar a espécie de malária do qual seu filho (a) foi infectado, realizado no primeiro dia e no dia que ele/ela tiver um novo sinal de malária (se isso ocorrer).

Outra para estudar a dosagem do medicamento no dia 7 e no dia que ele/ela tiver um novo sinal de malária (se isso ocorrer). Especificamente para a dosagem do medicamento artesunato de amodiaquina, a amostra de sangue será analisada num país estrangeiro, mantendo a confidencialidade adequadamente, conforme requerido pelos regulamentos internacionais e nacionais.

Um Exame será realizado para uma análise complementar no futuro. Esta amostra de sangue será tomada no primeiro dia ou no dia em que o médico achar que seu filho (a) está doente novamente. Esta amostra de sangue será usada no futuro para ajudar a ter um melhor conhecimento sobre os parasitas da malária. A amostra de sangue poderá ser armazenada por 5 anos, de acordo com as leis do Brasil, no hospital, sob responsabilidade da instituição e do médico do estudo.

**Atenção:** Para estas análises complementares, nenhum sangue extra será retirado de você se forem realizados no mesmo dia do teste de laboratório. Mas se não forem, estas análises serão feitas de uma pequena picada onde apenas uma gota será obtida.

Esses exames não atrasarão o início do tratamento da doença.

O tratamento nesse estudo não é recomendado durante os primeiros três meses de gravidez. Por este motivo, se sua filha for uma moça jovem que pode engravidar, ela deverá concordar em usar um método contraceptivo eficaz durante o estudo, como indicado pelo seu médico do estudo. Além disso, no primeiro dia sua filha deverá fazer um teste de gravidez pela urina. Se este teste for negativo, sua filha poderá participar desse estudo. Em caso de teste de gravidez positivo, sua filha receberá o tratamento recomendado pelas diretrizes das Autoridades de Saúde usadas no Brasil para o tratamento de malária em uma mulher grávida.

Um segundo teste de gravidez será realizado no 43º dia; caso seja positivo, a saúde de sua filha e do bebê serão acompanhadas até o final da gravidez e nascimento, pelo tempo necessário.

Se seu filho(a) tiver 10 anos de idade ou mais, nas consultas dos dias 1, 3 e 29 será realizado um eletrocardiograma, que é um exame do coração com equipamento especial que não penetra no corpo. Este exame não causa dor.

Todos os resultados desses exames serão comunicados a você e permanecerão confidenciais.

Se o tratamento dado ao seu filho(a) não estiver funcionando bem, um novo tratamento será imediatamente administrado, sem custos para você.

### **RISCOS OU INCONVENIÊNCIAS RAZOAVELMENTE PREVISÍVEIS**

Nos estudos anteriores, não foram informados sinais de intolerância graves em relação a esse tratamento; mas, caso seu filho(a) sinta algo incomum, favor informar ao seu médico assim que possível. Não interrompa o tratamento por sua própria vontade. Todos os sinais listados abaixo em geral são reversíveis e leves.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA REPRESENTANTE LEGAL DE MENORES DE IDADE

### O uso do ASAQ pode envolver os seguintes efeitos colaterais:

- Eventos mais frequentes: perda do apetite (fome), dificuldade para dormir, sono, dor de barriga, náusea (enjôo), fraqueza, cansaço, tosse.
- Eventos não comuns: bronquite aguda, problema no estômago e intestino, fungo oral, diminuição na contagem de células vermelhas do sangue (anemia), hipoglicemia (pouco açúcar no sangue), alucinações, formigamento e dormência dos membros, amarelamento dos olhos, tontura, distúrbios do batimento do coração, diarreia, vômitos, coceira, feridas na pele, inchaço na face, problemas na pele, dor nas juntas, inchaço dos membros, febre.

### Efeitos colaterais que podem estar ligados à amodiaquina, um dos ingredientes ativos do ASAQ:

- Baixa contagem de células brancas do sangue (que podem lhe tornar mais sujeito a infecções), problemas graves da função do fígado, problemas de visão, cor cinza na pele, especialmente dos dedos e partes mucosas (dentro da sua boca), problemas no sistema nervoso e muscular.

### O uso de Cloroquina pode envolver os seguintes efeitos:

- Eventos frequentes: Visão anormal ou embaçada, dor de cabeça, problemas no estômago e intestino, náuseas (enjôo), vômitos, dor de barriga, coceira.
- Eventos menos frequentes: cansaço, nervosismo, ansiedade, fraqueza, coloração azul da boca, unhas e pele, branqueamento dos cabelos, perda de cabelo, feridas na pele.
- Eventos raros: irritabilidade, agitação, agressividade, confusão, alteração da consciência (efeitos sobre o comportamento), alteração da saúde do coração pelo resultado do exame de eletrocardiograma, contagem baixa de alguns tipos de células do sangue, fraqueza muscular, problemas de audição.

A coleta de sangue pode causar algum desconforto, sangramento ou mancha roxa, mas, raramente causa tonturas. Antes de cada coleta de amostra de sangue, o braço ou dedo será desinfetado e será usada uma nova seringa e agulha para coletar o sangue.

Durante o período do estudo, seu filho(a) pode apresentar efeitos colaterais ou desconfortos que não estão listados neste termo. Informe ao médico ou à equipe do estudo imediatamente se seu filho(a) apresentar algum problema. Seu filho(a) receberá assistência médica adequada.

## **BENEFÍCIOS RAZOAVELMENTE ESPERADOS**

Esse estudo clínico oferece benefício individual direto para os participantes porque o medicamento em teste já está aprovado em alguns países e sua eficácia já é conhecida. Os exames laboratoriais realizados permitirão ao médico do estudo determinar se seu filho(a) está ou não infectado pelo parasita da malária. Se seu filho(a) estiver infectado, esses tratamentos poderão melhorar sua saúde e seu filho(a) será monitorado de perto por 42 dias.

Além disso, você deverá retornar à clínica para futuras avaliações e/ou tratamentos se seu filho(a) estiver doente. Outras doenças relacionadas ao estudo que ocorram durante o período do estudo serão tratadas.

A participação de seu filho(a) nos ajudará a entender melhor essa medicação e atingir os objetivos do estudo. A sua comunidade também poderá se beneficiar dos resultados deste estudo no futuro.

## **PROCEDIMENTOS OU TRATAMENTOS ALTERNATIVOS**



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA REPRESENTANTE LEGAL DE MENORES DE IDADE

Mesmo se você decidir que seu filho(a) não deve participar do estudo, ele receberá um tratamento adequado. Se tiver dúvidas a respeito das alternativas de tratamento, favor fazer as suas perguntas ao seu médico do estudo. Você e seu médico podem decidir qual o melhor tratamento para seu filho(a).

### **PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA NO ESTUDO – RETIRADA DO ESTUDO**

A participação de seu filho(a) neste estudo é totalmente voluntária. Você tem o direito de retirar a participação de seu filho(a) a qualquer momento e por qualquer razão. Recusar-se a participar ou descontinuar o estudo não afetará a assistência médica ao seu filho(a) ou perda de benefícios aos quais ele tenha direito de outra forma. A recusa não afetará sua relação com o seu médico.

A participação de seu filho(a) neste estudo será interrompida pelos motivos a seguir, você concorde ou não:

- Se seu filho(a) não seguir os procedimentos do estudo,
- Se, na opinião do médico do estudo, for o melhor para seu filho(a),
- Se o patrocinador do estudo encerrar o estudo, por qualquer motivo,
- Se as autoridades regulatórias responsáveis ou o Comitê de Ética decidir encerrar o estudo.

Caso ocorra uma interrupção, o Comitê de Ética Institucional será informado sobre as razões do término do estudo, para que possa aprovar esta interrupção. A interrupção deste estudo, por qualquer razão, não prejudicará de forma alguma o acompanhamento médico ao qual seu filho(a) tem direito.

Caso seja necessário continuar o seu tratamento contra malária após o final do estudo, o médico do estudo irá garantir o seu retorno aos cuidados usuais praticados nessa instituição.

O acesso ao medicamento em teste lhe será assegurado caso o estudo comprove que ele é melhor do que o tratamento convencional e você tenha prescrição de seu investigador principal para usá-lo.

Caso você retire a participação de seu filho(a) no estudo antes da sua conclusão, solicitamos que ele/ela participe dos procedimentos programados (exame físico, amostra de sangue, etc.) para a própria segurança de seu filho(a).

Antes da participação de seu filho(a) no estudo clínico, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deve ser pessoalmente assinado e datado por você, ou por uma testemunha independente do médico, se você não puder ler ou escrever (neste caso você fornece sua digital) e pela pessoa que conversou sobre o consentimento livre e esclarecido. Se seu filho(a) for capaz de entender esse estudo, ele/ela deverá assinar um termo de assentimento após ler (ou ouvir quando o documento for lido) ou, se não souber ler, deve imprimir a digital. Antes de assinar esse termo (deixar sua impressão digital como assinatura), você deverá fazer todas as perguntas que tiver sobre o que você não entendeu. A equipe responsável pelo estudo responderá suas perguntas.

Você receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e poderá solicitar informações adicionais a qualquer momento durante o estudo, do médico no centro ou poderá entrar em contato no número de telefone que está neste termo.

### **RESPONSABILIDADES DO PACIENTE/RECOMENDAÇÕES PRÁTICAS**

A partir do primeiro dia e até o final do estudo, seu filho(a) não deverá tomar qualquer outra medicação sem conversar antes com o médico. Se atualmente seu filho(a) estiver tomando outros medicamentos é importante que você informe ao médico .

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA REPRESENTANTE LEGAL DE MENORES DE IDADE

Se seu filho(a) faltar a uma consulta, uma pessoa do centro de saúde lhe visitará em casa para verificar porque ele/ela faltou à consulta e trará você e seu filho(a) ao centro de saúde para avaliação.

### **CUSTOS, NÃO REMUNERAÇÃO E COMPENSAÇÃO**

O(s) medicamento(s) do estudo, *COARSUCAM™ (artesanato amodiaquina da Winthrop®) e CLOROQUINA, se necessário PRIMAQUINA*, serão dados a você sem nenhum custo durante o estudo. O patrocinador do estudo, sanofi-aventis, arcará com as despesas relacionadas a todos os exames requeridos pelo estudo. Portanto, a participação de seu filho(a) neste estudo não terá nenhum custo para você. Quando for necessário, os custos de transporte até o hospital e os custos para alimentação nos dias de visita ao centro de estudos serão ressarcidos. No entanto, a participação de seu filho(a) neste estudo não será remunerada.

Se sua filha/parceira de seu filho é uma jovem mulher em idade fértil, e caso seja necessário, o método contraceptivo indicado será fornecido gratuitamente pelo patrocinador, mediante prescrição médica.

Mesmo assim, se sua filha/parceira de seu filho engravidar durante o estudo, vocês devem informar o médico do estudo imediatamente, e ele irá orientar sobre os procedimentos/cuidados necessários. Seu médico do estudo será responsável por acompanhar e assistir sua filha ou parceira de seu filho até o final da gravidez e avaliar sua filha/parceira de seu filho e o estado do recém nascido. Se necessário, a assistência médica apropriada será fornecida pelo seu médico para você e/ou seu bebê.

A sanofi-aventis possui um seguro para cobrir riscos relacionados à participação no estudo.

Caso ocorra algum dano, mencionado ou não neste termo, que tenha sido resultante de sua participação no estudo, a sanofi-aventis lhe assegura o tratamento e acompanhamento médico necessário, bem como uma eventual compensação.

### **CONFIDENCIALIDADE**

A garantia de sigilo e privacidade dos dados de seu filho(a), de acordo com as normas brasileiras, será assegurada.

Toda informação obtida durante este estudo, incluindo os registros médicos, dados pessoais e da pesquisa são confidenciais. A identidade pessoal de seu filho(a), quer dizer, seu nome, endereço e outros dados, permanecerão sob sigilo, no centro de estudos. A forma de garantir este sigilo será identificá-lo(a) através de um código numérico e data de nascimento. Somente a equipe do estudo será capaz de ligar o código numérico ao nome completo. Durante sua participação neste estudo clínico, seu médico irá coletar dados pessoais e os dados sobre a saúde de seu filho(a). Estes dados serão repassados ao patrocinador do estudo de forma codificada. Estas informações serão guardadas por pelo menos 15 anos.

Você tem o direito de acessar os dados de seu filho(a) junto ao médico do estudo e pedir correções, caso estes estejam errados ou incompletos.

Caso seu filho(a) seja acompanhado por um médico pessoal, e caso você concorde com isso, o médico do estudo informará este médico sobre a participação de seu filho(a) no estudo.

O patrocinador irá analisar os dados estatisticamente para determinar a eficácia e a segurança do *COARSUCAM™ / ARTESUNATO AMODIAQUINA DA WINTHROP®*, assim como obter informações

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA REPRESENTANTE LEGAL DE MENORES DE IDADE

gerais sobre sua doença. Além disto, seus dados codificados podem ser usados em publicações científicas.

### NOVAS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS

Você será informado pelo seu médico o quanto antes de toda nova informação relevante que se torne disponível no decorrer deste estudo e que possa afetar sua decisão em seu filho(a) participar. Seu médico discutirá com você se seu filho(a) deseja ou não continuar no estudo. Se você decidir retirar seu filho(a), seu médico tomará providências para que ele/ela continue recebendo os cuidados médicos necessários.

### OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

O Investigador Principal deste estudo, médico do estudo, é o **Dr. Marcus V. G. de Lacerda**, que pode ser encontrado no seguinte endereço: **Av. Pedro Teixeira, 25 - Manaus - Amazonas - Brasil - CEP: 69040-000** e telefone (horário comercial e fora do horário comercial) **(92) 2127 3537 Celular (92) 9114 7633**.

Em qualquer fase do estudo, você terá acesso ao investigador e sua equipe para comunicar sintomas inesperados e não habituais durante o estudo, esclarecer dúvidas ou pedir informações adicionais.

Este estudo foi aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e está de acordo com as normas nacionais e internacionais para sua realização. Se você tiver alguma dúvida ou quiser alguma informação adicional sobre seus direitos como sujeito de pesquisa ou sobre os aspectos éticos do estudo, entre em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas no endereço Av. Pedro Teixeira, 25 - Manaus - Amazonas - CEP: 69040-000 e telefones (92) 2127-3402 / (92) 2127-3432**.

1. Eu li ou leram para mim o termo de consentimento livre e esclarecido para esse estudo. Recebi todas as explicações sobre a natureza, objetivo, duração, efeitos e riscos previsíveis do estudo, assim como sobre as minhas responsabilidades. As minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente.
2. Concordo que meu filho(a) participe desse estudo. Concordo em cooperar totalmente com o médico do estudo e entrarei em contato com ele/ela imediatamente caso meu filho(a) apresente quaisquer sintomas inesperados ou não usuais durante o estudo. Durante o período do estudo, eu informarei ao médico do estudo sobre quaisquer outros tratamentos médicos que meu filho(a) possa vir a precisar.
3. Informe ao médico do estudo sobre todas as doenças de meu filho(a) e medicações que ele/ela usa, além de informar sobre todas as consultas médicas recentes.
4. Informe também ao médico do estudo sobre qualquer participação de meu filho(a) em outros estudos clínicos no último ano.
5. Estou ciente de que se não cooperar com os pedidos e as orientações do médico do estudo, meu filho(a) pode vir a se prejudicar ao participar deste estudo.
6. Entendo que a participação de meu filho(a) no estudo é voluntária e que ele/ela pode recusar a participar ou sair do estudo a qualquer momento. Caso ele/ela recuse participar deste estudo, não será penalizado de nenhuma forma e esta decisão não prejudicará qualquer cuidado médico ao qual meu filho(a) tenha direito. Entendo ainda que quaisquer

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA REPRESENTANTE LEGAL DE MENORES DE IDADE

informações que possam surgir durante a condução do estudo, que possam afetar minha decisão em meu filho(a) participar, me serão passadas assim que possível.

7. Representantes do patrocinador, Comitê de Ética em Pesquisa e autoridades regulatórias nacionais e ou internacionais poderão examinar e copiar registros médicos de meu filho(a) para verificar as informações neles coletadas. Ao assinar este documento, autorizo este uso dos registros de meu filho(a).
8. Receberei uma via assinada deste consentimento.

### Anexo – INFORMAÇÕES PARA PACIENTES MENORES DE IDADE

O médico descobriu que você está com uma doença chamada **malária**.

Essa doença é causada por um parasita (*parasita é um bichinho muito pequeno, microscópico, que vive em seu corpo*) e que entrou em seu sangue por uma picada de mosquito.

Já existem medicamentos para essa doença, mas, alguns não são totalmente eficazes, por isso devemos continuar a procurar por medicamentos que possam funcionar melhor.

O médico que sabe muito a respeito dessa doença gostaria de convidá-lo a experimentar um novo medicamento chamado *Artesunato Amodiaquina (ASAQ)*. Esse tratamento ainda não é utilizado no Brasil. Outros pacientes, em outros países, particularmente na África, já foram tratados com esse medicamento e ele demonstrou sua eficácia e segurança contra um outro parasita responsável pela **malária**. O parasita que foi encontrado em seu corpo é da mesma família daquele que existe na África. A eficácia e a segurança do ASAQ serão comparadas neste estudo com um remédio para malária comumente utilizado em seu país, chamado de cloroquina.

Sempre que os pacientes estejam testando esse medicamento, e mesmo depois, eles serão acompanhados por um médico. Terão a assistência de outras pessoas que conhecem tudo sobre a malária e sobre experimentos com medicamentos.

Existem leis e regulamentos muito precisos que protegem os pacientes que estão testando os medicamentos; que serão seguidos pelo médico e o pessoal que organizou este estudo.

O médico já falou com seus pais (*ou com a pessoa que cuida de você*) a respeito deste estudo.

Ele explicou, com detalhes, como será realizado este teste.

Seus pais concordaram que seu médico falasse com você a respeito deste teste e sabem que também estamos solicitando seu consentimento.

Se você concorda em participar do estudo, o médico realizará alguns exames na primeira consulta:

- Retirada de uma amostra de sangue, o que significa que o médico usará uma agulha para retirar uma pequena quantidade de sangue de uma veia em seu braço e irá coletá-la em um pequeno tubo. Esse sangue será examinado mais tarde para medir as coisas que contêm. Você poderá sentir alguma dor na área onde a agulha picar e, às vezes, poderá aparecer uma pequena mancha roxa.
- Quando não for coletada nenhuma amostra de sangue, umas poucas gotas de sangue serão retiradas de seu dedo. Você poderá sentir um pouco de dor ou ter medo quando seu dedo for picado. O sangue será colocado sobre um pequeno vidro e sobre um pequeno pedaço de papel. Isso será usado para estudar a malária em seu corpo.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA REPRESENTANTE LEGAL DE MENORES DE IDADE

- A temperatura de seu corpo e sua pressão sanguínea serão medidas.
- Exames da saúde do coração serão realizados com equipamentos especiais que não entram no seu corpo e não causam dor (esse teste só será realizado em pacientes com 10 anos de idade ou mais).

Se você é uma moça jovem que pode engravidar, o médico pedirá que você use um método anticoncepcional durante o estudo e faça um exame de urina para verificar se você está grávida ou não, porque o tratamento desse estudo não é recomendado durante o primeiro trimestre da gravidez. Se o resultado do teste for negativo, será possível que você participe do estudo.

Um segundo teste de gravidez será feito no 43º dia; caso o resultado seja positivo, será realizado um acompanhamento até o fim da sua gravidez para verificar sua saúde e a do seu futuro bebê.

Após estes testes, o médico decidirá se você pode tomar o medicamento.

Para decidir qual tratamento você vai receber no estudo, se ASAQ ou cloroquina, será feito como um sorteio. A cada manhã, nos primeiros 3 dias do estudo, você visitará o médico para tomar o medicamento pela boca.

Você deverá retornar ao médico 7 vezes após esta primeira visita, para verificar se tudo está indo bem. Durante cada visita de acompanhamento, o médico repetirá alguns dos exames realizados na primeira visita. O sangue colhido com uma picada no dedo será retirado no máximo 7 vezes. Será necessária uma pequena amostra de sangue que será retirada de seu braço. Isto acontecerá somente duas vezes. Sua temperatura será medida em cada visita. Se você tiver até 10 anos de idade, faremos dois exames do coração.

Após 42 dias, o estudo será encerrado.

Se o médico decidir que você não pode tomar este medicamento, você será tratado com outro tratamento padrão para malária e receberá a assistência de seu médico com a mesma qualidade.

As vantagens e as desvantagens dos medicamentos utilizados neste estudo são conhecidas. Você pode sentir-se um pouco mal e ter enjoos, vômitos, dor de barriga, perda de apetite, dor de cabeça, tontura, problemas no sono, tosse, problemas de visão, sentir cansado e nervoso, coceira, feridas na pele, cor azulada da boca, unhas e pele.

Mas o medicamento poderá apresentar alguns efeitos indesejáveis ou alguns efeitos que ainda não sabemos. Se algo fora do normal acontecer com você, não deixe de informar aos seus pais, ao médico ou à sua equipe. Você tem liberdade para informar seus pais e seu médico, a qualquer momento, quanto às suas preocupações ou dúvidas. O médico também forneceu informações aos seus pais sobre o que fazer caso você tenha algum problema ou fique doente durante o estudo.

Se alguma coisa **não estiver clara para você** ou se **não entendeu tudo**, **faça todas as perguntas** que quiser ao seu médico (*ou a alguém da equipe dele*), até que você tenha **entendido tudo**.

**Se você decidir participar** do estudo, seus pais (*ou a pessoa que cuida de você*) também deverão concordar.

**Se você não concorda** em participar desse estudo, poderá **dizer não** sem qualquer problema, mesmo se seus pais tenham concordado. **A escolha é sua**. O médico **continuará a cuidar de você** e ninguém ficará preocupado ou chateado com você. **Você não tem** que participar desse estudo para ser tratado pelo médico.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA REPRESENTANTE LEGAL DE MENORES DE IDADE

**Se você concordar em participar**, o médico pedirá que assine um termo de assentimento (que lhe será apresentado após ter lido estas informações), ou para ser assinado com seu nome ou para fazer sua impressão digital (carimbo do polegar).

Entretanto, mesmo se disser agora que concorda, poderá **mudar de idéia a qualquer momento** e dizer que não quer mais participar do estudo.

Você deve discutir a respeito com seus pais (*ou com a pessoa que cuida de você*) e com o médico, para que possa ser tratado de outra forma.

O médico estará autorizado a falar com você a respeito da sua participação nesse estudo, apenas com você, seus pais (*ou a pessoa que cuida de você*) ou com as pessoas que trabalham no estudo. O médico não falará a respeito com ninguém mais, só se você ou seus pais (*ou a pessoa que cuida de você*) concordarem. As informações sobre você que serão coletadas do estudo serão guardadas e ninguém, exceto o médico e sua equipe, poderá vê-las. Qualquer informação a seu respeito receberá um número no lugar do seu nome. Apenas o médico e sua equipe saberão qual é o seu número.

Quando tivermos terminado a pesquisa, informaremos a você e aos seus pais o que foi aprendido.

Use o tempo que precisar para **pensar a respeito** antes de tomar sua decisão e não hesite em falar sobre este estudo com seus pais (*ou a pessoa que cuida de você*) ou com qualquer pessoa de sua confiança.

**Nome do Paciente:** \_\_\_\_\_

(a ser preenchido pelo paciente ou seu representante legal/testemunha, se aplicável)

**Assinatura do Paciente:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_\_

(assinatura do paciente ou impressão digital, se aplicável)

**Nome do Representante Legal:** \_\_\_\_\_

(a ser preenchido pelo representante legal ou testemunha, se aplicável)

**Assinatura do Representante Legal:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_\_

(assinatura do representante legal ou impressão digital, se aplicável)

**Nome da Testemunha:** \_\_\_\_\_

(a ser preenchido pela testemunha, se aplicável)

**Assinatura da Testemunha:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_\_

(se aplicável)

**Razão da necessidade de Testemunha:** \_\_\_\_\_

(se aplicável)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA REPRESENTANTE LEGAL DE  
MENORES DE IDADE

**Pesquisador/Sub-pesquisador ou pessoa que liderou as discussões a respeito do Termo de  
Consentimento Informado/ Consentimento**

Confirmando que expliquei, pessoalmente, a natureza do estudo, seu propósito, sua duração, seus  
riscos e seus efeitos previsíveis para o paciente acima mencionado.

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

## 7.8. TERMO DE ESCLARECIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### **Termo de consentimento livre esclarecido - TCLE**

Você está sendo convidado para participar da pesquisa: **Cloroquina em associação à primaquina no tratamento da malária vivax: busca de biomarcadores para detecção de resistência clínica a cloroquina**. Este estudo tem o objetivo de fazer uma avaliação contínua do efeito dos medicamentos que são utilizados para tratar a malária no município que você reside. O principal benefício em participar desse estudo é saber se os medicamentos utilizados para malária estão sendo capazes de curar a doença ou se o parasito já apresenta resistência ao remédio utilizado e como ocorre essa resistência.

Você, ou a pessoa pela qual é responsável, será tratado para malária com o mesmo medicamento que está sendo usado pelo serviço de saúde de seu município para o tratamento dessa doença. Com a sua autorização iniciaremos um acompanhamento do tratamento no 1º, 2º, 3º, 7º, 14º, 21º, 28º e 42º. As visitas de acompanhamento serão feitas por um profissional da equipe, o qual irá pedir informações sobre o seu estado de saúde e coletará sangue da ponta do dedo para fazer exames laboratoriais de controle do tratamento.

Serão coletados 10 ml de sangue da veia antes do tratamento e, eventualmente, no 3º dia ou caso haja indicação de falha do tratamento, para outros exames de laboratório e demais análises. Você pode sentir alguma dor por causa da coleta de amostra de sangue na veia do braço. Mas qualquer dor deve durar apenas alguns instantes. Existe um risco muito pequeno de infecção onde o sangue for coletado, mas qualquer infecção será monitorada e tratada pela equipe médica. Pode acontecer também de ocorrer um sangramento local, caso a agulha atravesse o vaso e que resultará em um pequeno hematoma de aproximadamente um centímetro. Após a agulha ser retirada, o sangramento será contido com uma pequena bandagem (do tipo band-aid). Em caso de infecção no local de introdução da agulha ou hematoma entre em contato com os responsáveis pelo estudo, pois se necessário você receberá tratamento.

Depois que os resultados dos exames estiverem prontos, a pessoa que participar da pesquisa poderá ver estes resultados. Esse sangue também poderá ser usado para outros exames relacionados à malária.

Durante o acompanhamento do tratamento poderão surgir sinais ou sintomas da malária grave, ou de alguma reação ao remédio. Caso isso aconteça, um profissional da equipe na sua cidade irá encaminhar você (ou o paciente) ao serviço médico mais próximo da sua casa. Será garantido assistência integral para atender complicações e danos decorrentes, direta ou indiretamente, da pesquisa.

Participando deste estudo, o paciente receberá cuidados médicos durante todo o seguimento do seu tratamento, e, em caso de qualquer complicação decorrente da malária e do uso dos medicamentos, estaremos disponíveis para qualquer problema. Você não será pago nem receberá incentivo financeiro durante o acompanhamento. A participação neste estudo não levará a riscos futuros para a saúde. Se ocorrer qualquer dano ou prejuízo à sua saúde em decorrência deste projeto, você terá direito à indenização.

Se você concordar em participar, todas as informações coletadas serão confidenciais, usadas somente no estudo. Nós não compartilharemos suas informações, e um código será usado para identificar você em vez de seu nome. Nós não tornaremos público qualquer detalhe sobre você. No caso de algum pesquisador tirar uma foto sua, ele cuidará

para que você não seja identificado. Esta imagem sua será publicada apenas em revistas para médicos.

A sua participação neste estudo é voluntária e se o senhor(a) /seu filho/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 o seu atendimento, tratamento ou acompanhamento na FMT-HVD.

O senhor(a)/seu filho/seu familiar terá a garantia de que problemas como efeitos adversos de medicamentos, mal estar decorrentes do estudo serão assistidos, tratados e acompanhados na FMT-HVD pelos pesquisadores do estudo e equipe hospitalar, sem qualquer gasto para o senhor(a) /você/seu filho/seu familiar, durante todo o tempo que for necessário. Da mesma forma, terão direito à indenização garantido caso ocorra algum dano permanente devido à participação nesse estudo.

A pessoa que aceitar participar da pesquisa guarda uma cópia deste documento que será assinado duas vezes, uma cópia fica com o pesquisador e a outro com o paciente.

#### **Pessoas para contato**

Os pesquisadores: Dra. **Gisely Cardoso de Melo** (Farmacêutica-bioquímica, contato: 99159-8604) e **Siuhelem Rocha da Silva** (Biomédica, contato: 98408-9080), responsáveis por este estudo estarão disponíveis na **Fundação Medicina Tropical Dr.Heitor Vieira Dourado, Localizada na Av. Pedro Teixeira, 25 – Dom Pedro I** no horário das 08h às 17h para esclarecer dúvidas que o senhor(a)/seu filho/seu familiar possa ter e dar as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

A pessoa que aceitar participar da pesquisa guarda uma cópia deste documento que será assinado duas vezes, uma cópia fica com o pesquisador e a outro com o paciente.

#### **CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO:**

Eu....., participante desse estudo ou responsável pelo paciente ....., recebi a explicação sobre a metodologia e objetivo do estudo.

E por estar devidamente informado (a) e esclarecido (a) sobre o conteúdo deste termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expresse meu consentimento para minha inclusão nesta pesquisa.

.....  
Assinatura do paciente ou representante legal

Impressão do polegar direito do paciente,  
caso este não saiba escrever seu nome.

.....  
LOCAL E DATA



**PESQUISADOR RESPONSÁVEL PELO ACOMPANHAMENTO E INFORMAÇÕES AO PACIENTE:**

NOME LEGIVEL:.....

FONE: .....

ASSINATURA: .....



