

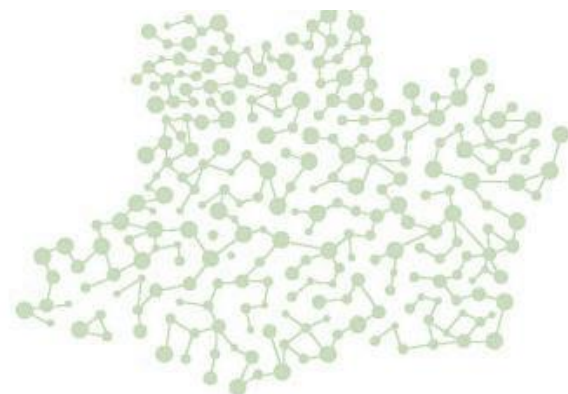


**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL MESTRADO
EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**



**RECORRÊNCIAS DE MALÁRIA POR *Plasmodium vivax*: AVALIAÇÃO DA
INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS EM *CYP2D6*, *MAOA* E *UGT2B7*
EM INDIVÍDUOS TRATADOS COM PRIMAQUINA**

GABRIELLY SANTOS DA SILVA



**MANAUS
2022**

GABRIELLY SANTOS DA SILVA

**RECORRÊNCIAS DE MALÁRIA POR *Plasmodium vivax*: AVALIAÇÃO DA
INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS EM *CYP2D6*, *MAOA* E *UGT2B7*
EM INDIVÍDUOS 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 Infecciosas*.

Orientadora: **Prof^a** Dr^a Gisely Cardoso de Melo
Co-orientadora: **Prof^a** Dr^a Anne Cristine Gomes de Almeida

**MANAUS
2022**

FICHA CATALOGRÁFICA

FOLHA DE JULGAMENTO

RECORRÊNCIAS DE MALÁRIA POR *Plasmodium vivax*: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS EM *CYP2D6*, *MAOA* E *UGT2B7* EM INDIVÍDUOS TRATADOS COM PRIMAQUINA

GABRIELLY SANTOS DA SILVA

Banca Julgadora:

Presidente

Membro

Membro

AGRADECIMENTOS

À Deus por sua infinita bondade, por todas oportunidades e bênçãos concedidas a mim.

À minha afetuosa e amada família por todo o apoio, por acreditarem nos meus sonhos e no meu potencial de realizá-los, e por serem fonte inesgotável de amor e compreensão. Nossos laços vão além dos laços sanguíneos, somos a prova de que as famílias também podem ser formadas nos corações.

À minha orientadora Dra Gisely Cardoso de Melo, pela oportunidade, acolhimento em seu grupo de pesquisa, por toda confiança depositada sobre mim, pelo incentivo, paciência e compreensão ao longo dos últimos anos. Agradeço por me permitir chegar onde estou e por guiar minha escolha profissional pela Ciência.

À minha co-orientadora Dra Anne Cristine Gomes de Almeida, por todos os ensinamentos carinhosamente compartilhados comigo, pela atenção e dedicação em todas as etapas deste projeto. Gratidão por se fazer presente nos momentos mais necessários, seu apoio e incentivo tem iluminado toda a minha caminhada.

Aos meus colegas Amanda Carvalho, Flávia Fontenelle, Marielle Macêdo, Rebeca Netto e Victor Mwangi pelo suporte e colaboração de excelência desde as atividades de bancada até as análises estatísticas. Um agradecimento especial a aluna de iniciação científica Manuela Crispim, pela contribuição para a qualidade de nossos dados.

À coordenação e secretaria do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas pelo ensino de alta qualidade e competência no atendimento das necessidades acadêmicas. À Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado, que por meio da Gerência de Malária e do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema forneceu espaço e infraestrutura necessários à pesquisa.

Por fim, aos participantes do estudo CURAVIVAX sem os quais este trabalho não seria possível.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Meus agradecimentos:

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM),
pelo financiamento da pesquisa e concessão da bolsa.

RESUMO

A malária por *Plasmodium vivax* constitui um grave problema de saúde pública e um importante desafio para a eliminação da doença, devido a ampla distribuição geográfica, formação precoce de gametócitos, grande porcentagem de infecções assintomáticas, e principalmente, formação de hipnozoítos (responsáveis pelas recaídas). A primaquina (PQ) é o principal medicamento antimalárico com efeito hipnozoiticida e necessita ser biotransformada para exercer sua função. Sua biotransformação envolve enzimas do citocromo P450, monoamina oxidase (MAO-A e MAO-B) e monooxigenase-3 contendo flavina (FMO-3). Polimorfismos em enzimas metabolizadoras de drogas podem afetar a atividade enzimática resultando em falha terapêutica ou reações adversas. Desta forma, o objetivo deste estudo é avaliar a influência de polimorfismos genéticos em *CYP2D6*, *MAOA* e *UGT2B7* na resposta clínica de pacientes com malária por *P. vivax* tratados com PQ. Para isso, foram selecionados 202 indivíduos com diagnóstico positivo para malária vivax, sendo 57 com recorrência e 145 sem recorrência. O DNA genômico foi genotipado através da técnica de qPCR para identificação dos polimorfismos e, quando possível, determinação do fenótipo predito dos indivíduos. A frequência dos alelos de *CYP2D6* foi semelhante entre os grupos, exceto para o alelo de função diminuída *41 no grupo recorrência e alelo de função normal *1 mais frequente nos sem recorrência. Além disso, o fenótipo *CYP2D6* gNM foi mais frequente em indivíduos sem recorrência ($p=0,040$). Porém, não foi possível estabelecer uma associação entre as recorrências e os genótipos de *MAOA* e *UGT2B7*. Estes resultados sugerem que variantes genéticas em *CYP2D6* podem contribuir para a falha terapêutica com PQ resultando nas recorrências de *P. vivax*, reforçando a importância da farmacogenética no monitoramento das terapias com antimaláricos.

Palavras-chave: *Plasmodium vivax* – Recorrências – Primaquina – *CYP2D6* – *MAOA* – *UGT2B7*.

ABSTRACT

Plasmodium vivax malaria is a serious public health problem and an important challenge for the elimination of the disease, due to the wide geographic distribution of the parasite, early formation of gametocytes infecting the vector, large percentage of asymptomatic infections in endemic regions, and mainly, formation of hypnozoites (responsible for relapses). Primaquine (PQ) is the main antimalarial drug with hypnozoitocidal effect and needs to be biotransformed to exert function. Biotransformation of PQ partly involves cytochrome P450 enzymes, monoamine oxidase (MAO-A and MAO-B) and flavin-containing monooxygenase-3 (FMO-3). Polymorphisms in drug metabolizing enzymes can affect enzyme activity resulting in therapeutic failure or adverse reactions. Thus, the aim of this study is to evaluate the influence of genetic polymorphisms in *CYP2D6*, *MAOA* and *UGT2B7* on the clinical response of *P. vivax* malaria patients treated with PQ. For this, 202 individuals with a positive diagnosis for vivax malaria, 57 with a record of recurrence and 145 without a record of new episodes were selected and followed for a period of 180 days in the FMT-HVD. Genomic DNA was genotyped using the qPCR to identify polymorphisms and, when possible, determine the predicted phenotype of individuals. The frequency of *CYP2D6* alleles was similar between the study groups, except for the decreased function allele *41 more frequent in the recurrence group ($p=0.004$) and normal function allele *1 more frequent in the non-recurrence group ($p=0.018$). In addition, the *CYP2D6* gNM phenotype had a higher frequency in individuals without recurrence ($p=0.040$), while it was not possible to establish an association between recurrences and the genotypes of *MAOA* and *UGT2B7*. These results suggest that genetic variants in *CYP2D6* may contribute to PQ therapeutic failure resulting in *P. vivax* recurrences, reinforcing the importance of pharmacogenetics in monitoring antimalarial therapies.

Keywords: *Plasmodium vivax* – Recurrences – Primaquine – *CYP2D6* – *MAOA* – *UGT2B7*.

RESUMO LEIGO

A malária causada pelo protozoário *Plasmodium vivax* permanece como um grande problema de saúde pública em virtude de sua presença em diversas regiões do mundo e, principalmente, sua capacidade de causar novos episódios. A primaquina é um medicamento usado para a cura radical da malária vivax e, precisa ser transformada no corpo para que exerça sua função. A transformação do medicamento é influenciada por fatores genéticos da população, o que pode resultar em falha do tratamento devido à grande variação. Por essa razão, o objetivo desta pesquisa é investigar variações genéticas em enzimas que metabolizam o medicamento e a influência que exercem no tratamento da malária vivax, uma vez que a doença apresenta grande frequência na população local.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Países com casos autóctones em 2000 e sua situação em 2020 (1)	14
Figura 2. Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, 2021 (9)	14
Figura 3. Ciclo biológico do parasito (10)	16
Figura 4. Antimaláricos e seus alvos de ação no ciclo biológico do parasito (32)	20
Figura 5. Resumo das estimativas de pontuação de atividade que determinam os fenótipos CYP2D6 (54)	24
Figura 6. Distribuição dos principais alelos CYP2D6 em diferentes regiões geográficas (55)	25

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

OMS – Organização Mundial da Saúde

CYP450 – Citocromo P450

CYP2D6 – Enzima do citocromo P450 2D6

AS – Score de atividade

gIM – Metabolizador intermediário (fenótipo predito)

gNM – Metabolizador normal (fenótipo predito)

gPM – Metabolizador lento (fenótipo predito)

gUM – Metabolizador ultra-rápido (fenótipo predito)

MAO-A – Enzima monoamina oxidase A

ADH – Aldeído desidrogenase

UGT2B7 – UDP-glucuroniltransferase-2B7

PCR – Reação em cadeia da polimerase

DNA – Ácido desoxirribonucleico

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

PQ – Primaquina

CQ – Cloroquina

RDT – Teste de diagnóstico rápido

HRP2 – Proteína 2 rica em histidina

pLDH – Lactato desidrogenase

FMT-HVD – Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Malária – Aspectos etiológicos e epidemiológicos	13
1.2 Ciclo biológico e particularidades do <i>P. vivax</i>	15
1.3 Manifestações clínicas e diagnóstico	17
1.4 Tratamento da malária por <i>P. vivax</i>	19
1.5 Primaquina	21
1.6 Citocromo P450	23
1.6.1 Citocromo P450 2D6 (CYP2D6)	23
1.7 Monoamina oxidase A (MAO-A)	26
1.8 UDP-glucuronosiltransferase 2B7 (UGT2B7)	27
2. OBJETIVOS	29
2.1 Geral	29
2.2 Específicos	29
3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO	30
4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS	52
5. CONCLUSÃO	53
6. REFERÊNCIAS	54
7. ANEXOS E APÊNDICES	63
7.1 Cronograma	63
7.2 Equipe do estudo	64
7.3 Procedimento operacional padrão – POP Extração de DNA	65
7.4 Procedimento operacional padrão – POP Genotipagem	72
7.5 Procedimento operacional padrão – POP Determinação de Haplótipos	85
7.6 Parecer consubstanciado do CEP	96

1. INTRODUÇÃO

1.1 Malária – Aspectos etiológicos e epidemiológicos

A malária permanece como um grave problema de saúde pública atingindo regiões tropicais e subtropicais do mundo (1). É uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo 7 espécies responsáveis pela infecção humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi*, *P. simium* e *P. cynomolgi* (2–4). No Brasil, destacam-se *P. falciparum* e o *P. vivax* (5).

O *P. falciparum* produz em humanos as formas mais graves da doença e é predominante na África, enquanto que o *P. vivax* é a espécie mais difundida geograficamente e atualmente reconhecida como causa de morbidade e mortalidade grave (6).

A transmissão natural da malária se dá pela picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*. Foram descritas aproximadamente 465 espécies de anofelinos, entretanto, atribui-se somente a 70 destas espécies a capacidade de transmitir parasitas da malária humana, destacando-se o *Anopheles darlingi* como principal vetor na América do Sul (7,8).

Quase metade da população mundial vive em áreas de risco de transmissão (Figura 1). Em 2020, foram estimados 241 milhões de casos e 627 mil mortes globalmente, com a maioria dos casos e mortes ocorridos na Região Africana. Na Região das Américas, a República Bolivariana da Venezuela, Brasil e Colômbia foram responsáveis por mais de 77% dos casos ocorridos em toda a região (1).

Em 2021, o Brasil notificou de 139.211 casos, apresentando uma redução de 4,1% em relação ao ano de 2020, tendo sido registrados 145.205 casos em todo o país. Do total de casos registrados no território nacional, 99% foram autóctones, sendo o *P. vivax* responsável por cerca de 83% destes. Na região Amazônica, 29 (3,6%) municípios foram classificados como de alto risco, 38 (4,7%) de médio risco, 61 (7,5%) de baixo risco e 163 outros (20,2%) como de muito baixo risco de transmissão da doença, segundo a Incidência Parasitária Anual (IPA) de malária (Figura 2) (9).

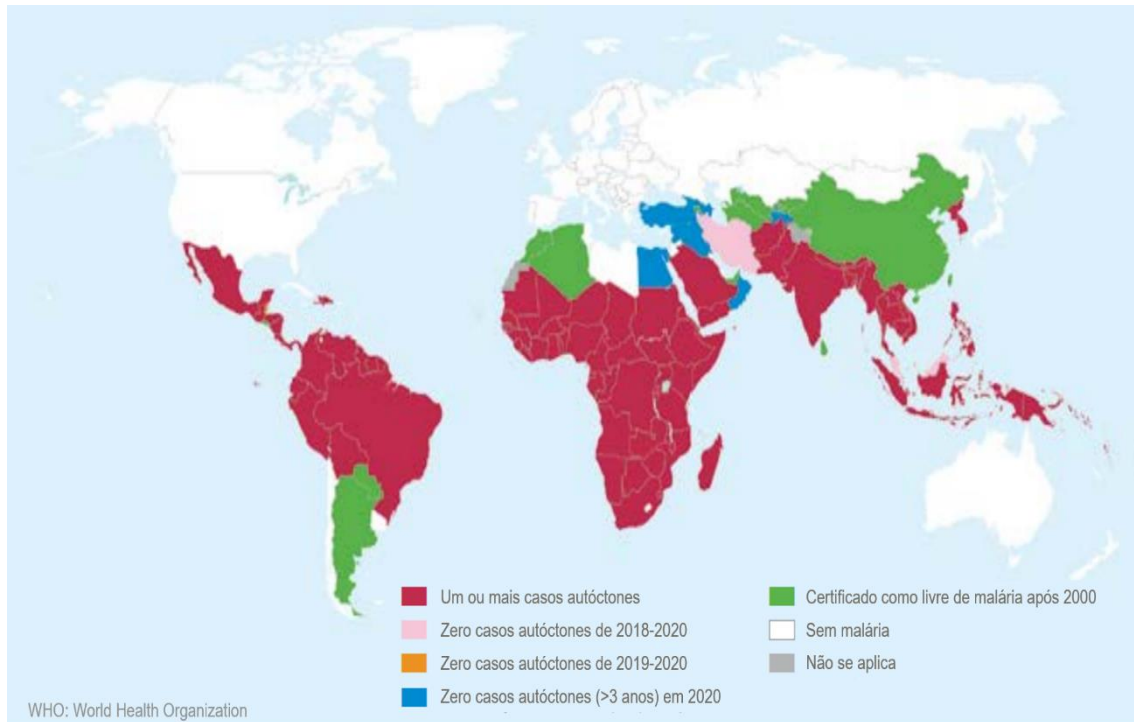
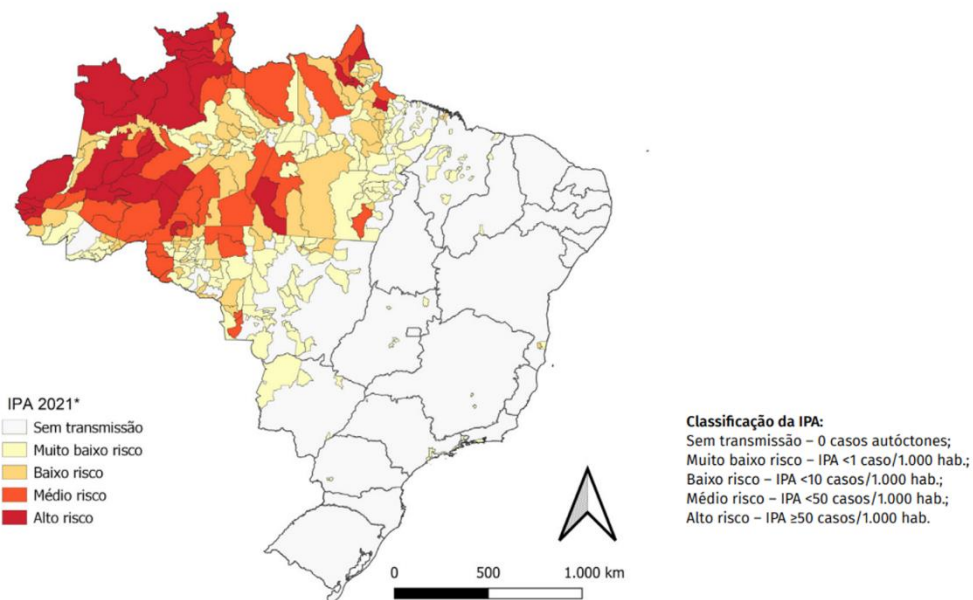


Figura 1. Países com casos autóctones em 2000 e sua situação em 2020 (1)



Fonte: Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS. Excluídas lâminas de verificação de cura. Dados do Sivep-Malária atualizados em: 14/3/2022. Dados do Sinan atualizados em: 10/3/2022.
*Dados de 2021 são preliminares, sujeitos a alterações.

Figura 2. Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, 2021 (9)

1.2 Ciclo biológico e particularidades do *P. vivax*

Os parasitos da malária possuem um complexo ciclo de vida, que difere entre as espécies infectantes ao homem. A inoculação dos esporozoítos no hospedeiro vertebrado pelo vetor anofelino durante o repasto sanguíneo representa o início da fase assexuada. A maioria dos esporozoítos são depositados na derme, podendo migrar ativamente em alta velocidade, passando por várias células da pele e entrar nos vasos sanguíneos. Esporozoítos que infectam mamíferos precisam entrar na corrente sanguínea para serem transportados para o fígado, onde se diferenciam em esquizontes que em seguida dão origem aos merozoítos invasores de eritrócitos, por um processo de esquizogonia. O *P. vivax* e *P. ovale*, podem entrar em um período de latência no fígado formando hipnozoítos em vez de esquizontes, e essas formas permitem a sobrevivência do parasito por um longo período e podem resultar nas recaídas da doença (10–12).

Após a saída do hepatócito, os merozoítos invadem eritrócitos em um processo rápido, dinâmico e de várias etapas, envolvendo o mecanismo actinmiosina. Dentro do eritrócito há uma segunda esquizogonia assexuada, na qual os trofozoítos em estágio de anel desenvolvem-se em esquizontes. Esquizontes maduros rompem liberando merozoítos capazes de iniciar outro ciclo de replicação infectando novas células (11).

Dentro de cada ciclo de replicação, uma pequena proporção de parasitas assexuados se desenvolve em estágios sexuais masculinos e femininos chamados gametócitos, que são as formas infectantes ao vetor. Os gametócitos se desenvolvem no hospedeiro vertebrado intermediário até a maturação antes de serem ingeridos por um artrópode. O tempo de maturação dos gametócitos difere entre as espécies de *Plasmodium*, com o *P. vivax* apresentando menor período de maturação em relação ao *P. falciparum*, o que justifica a presença destes na circulação dentro de uma semana após a inoculação pelo mosquito e antes da detecção do parasito por microscopia (13,14).

Uma vez que o gametócito é ingerido pelo vetor, a fase de reprodução sexuada inicia-se no intestino médio do artrópode. Neste processo o gametócito masculino se divide em até oito microgametas flagelados, enquanto o

macrogameta se desenvolve em apenas um. O resultado da fertilização de um macrogameta por um microgameta é a formação de um zigoto, capaz de sofrer meiose e desenvolver-se em oocineto. O oocineto penetra a parede do intestino médio do mosquito, próximo a lâmina basal, onde transforma-se em oocisto, dentro do qual o parasito se replica originando milhares de esporozoítos. O oocisto eventualmente rompe, liberando esporozoítos que se deslocam para as glândulas salivares do mosquito. O ciclo da infecção humana começa novamente quando o mosquito pica outra pessoa (Figura 3) (14).

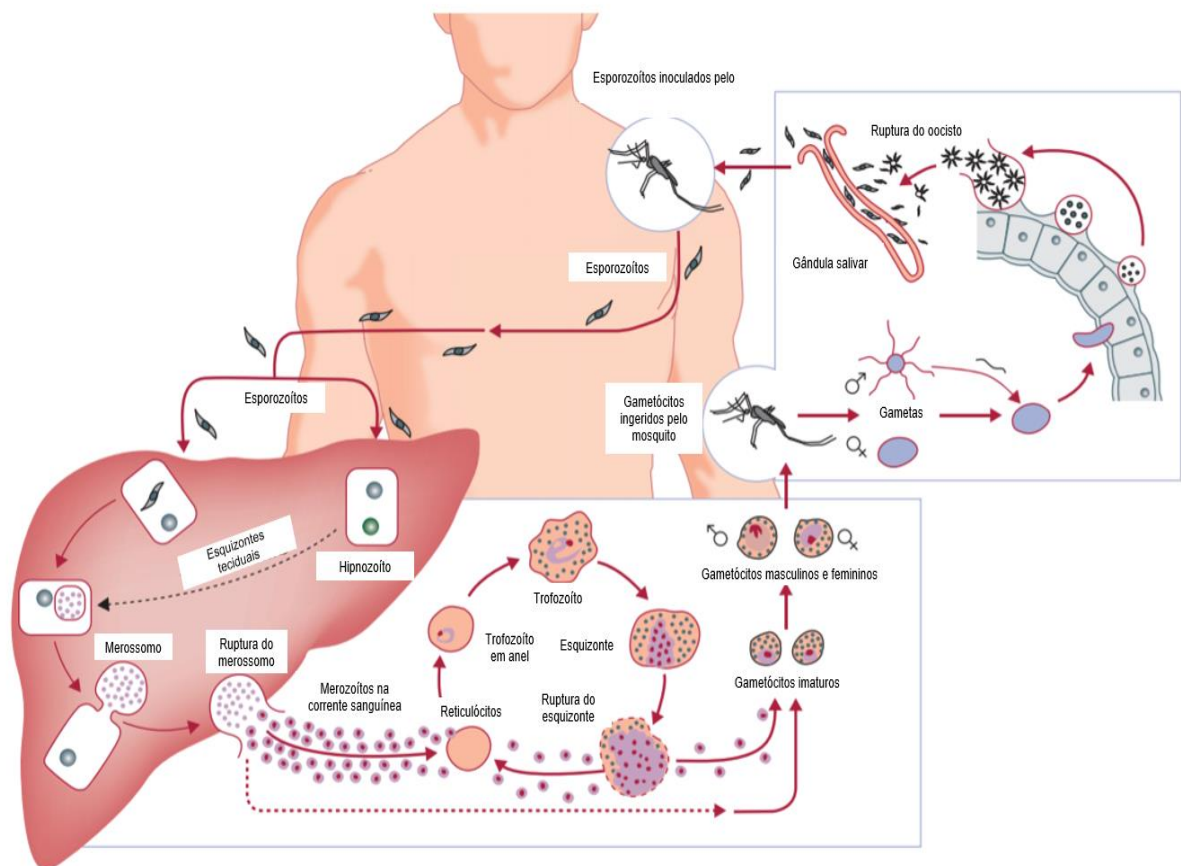


Figura 3. Ciclo biológico do parasito (10)

Os desafios no controle e eliminação da malária por *P. vivax* são em grande parte devido a características intrínsecas do ciclo biológico do parasito, mais especificamente: 1) pela formação dos estágios latentes hepáticos, clinicamente silenciosos e indetectáveis, que causam as recaídas semanas a meses após uma infecção inicial; 2) alto potencial de transmissão em razão da formação precoce de gametócitos infectivos ao mosquito vetor, iniciada nos

primeiros dias após infecção no hospedeiro humano; 3) alta infectividade para mosquitos e ciclo de desenvolvimento mais curto no vetor em comparação com outras espécies de *Plasmodium*; 4) grande porcentagem de infecções assintomáticas em regiões endêmicas, que em muitos casos apresentam parasitemias submicroscópicas detectadas somente por técnicas de biologia molecular, e que, devido ao subdiagnóstico, mantém o ciclo de transmissão ativo nestas regiões (15–17).

São desconhecidos os fatores que desencadeiam a ativação dos hipnozoítos, apesar de acreditar-se que a hemólise induzida pelo parasito e a doença febril sistêmica influenciam este processo (18). A frequência e o número de recaídas variam de acordo com a localização geográfica, com alto risco de recaída precoce ocorrendo a cada 3-4 semanas nas regiões tropicais em contraste com regiões temperadas e subtropicais que apresentam longos períodos de incubação entre a infecção inicial e a recaída, variando de 8-12 meses (19).

Entretanto, os hipnozoítos não são o único reservatório oculto resultantes das infecções por *P. vivax*, visto que o parasito invade preferencialmente células eritrocitárias jovens, os reticulócitos, restritos em sua grande parte aos sinusóides da medula óssea (20–22). Estudos revelam que uma proporção substancial da biomassa de trofozoítos e esquizontes assexuados de *P. vivax* ocorre nos espaços extravasculares da medula, baço e fígado (23,24). Conseqüentemente, a densidade parasitária no sangue periférico se apresenta baixa e indetectável, dificultando o diagnóstico e tratamento de indivíduos infectados. Somente na área periurbana do município de Manaus estima-se que exista uma carga de reservatórios assintomáticos de *P. vivax* de aproximadamente 50%, conforme o estudo de Almeida e colaboradores (17).

1.3 Manifestações clínicas e diagnóstico

O período de incubação da malária varia de acordo com a espécie responsável pela infecção. Para *P. falciparum*, de 8 a 12 dias; *P. vivax*, 13 a 17 dias; e *P. malariae*, 18 a 30 dias. A duração do período de incubação é

influenciada por fatores, como a forma de transmissão do parasita, imunidade adquirida do hospedeiro, uso quimioprolático de antimaláricos e a densidade parasitária. A liberação de parasitas e material eritrocítico na circulação sanguínea induz o processo fisiopatológico e o início dos sintomas. Atribui-se a ativação da cascata de citocinas o aparecimento dos sinais e sintomas da doença (5,25).

Convenientemente classifica-se a malária em: não complicada e grave. Os primeiros sintomas, comuns a todas as diferentes espécies, são inespecíficos e simulam uma síndrome semelhante à gripe. O acesso malárico é caracterizado por episódios de calafrio, febre e sudorese, que em geral são acompanhados por cefaleia, mialgia, náuseas e vômito (5). Em relação a malária grave, destacam-se como principais complicações a malária cerebral, edema pulmonar, insuficiência renal aguda, anemia grave e/ou sangramento. A acidose e a hipoglicemia são as complicações metabólicas mais comuns. Qualquer uma dessas complicações pode desenvolver-se rapidamente e evoluir para óbito em horas ou dias (26).

Segundo recomendações da OMS, todos os casos suspeitos devem ser submetidos a um teste parasitológico (microscopia ou teste de diagnóstico rápido) para confirmação do diagnóstico (27). O método reconhecido como padrão ouro é a gota espessa. Este método permite a detecção e identificação dos parasitas, bem como a quantificação da parasitemia, entretanto, a precisão e utilidade da técnica dependem da qualidade dos microscópios, reagentes, experiência do microscopista, controle de qualidade e sistema de garantia de qualidade (28).

Os testes de diagnóstico rápido (RDTs) são comumente utilizados, sendo estes dispositivos imunocromatográficos de fluxo lateral que oferecem diagnóstico qualitativo, com base na detecção de antígenos do parasita no sangue, como a proteína 2 rica em histidina (HRP2) expressa por *P. falciparum* e/ou lactato desidrogenase (pLDH) expressa por todas as espécies de parasitas da malária humana (29). Em comparação com a microscopia, os RDTs são simples de executar e interpretar, apresentam custo relativamente baixo, fornecem resultados rapidamente, sendo viáveis para aplicação no pronto

atendimento e em localidades onde o acesso ao diagnóstico microscópico é dificultado por distância geográfica ou incapacidade local do serviço (30).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é mais sensível do que a microscopia e os RDTs, tem sido utilizada para confirmação de diagnóstico, estudos epidemiológicos e avaliação da eficácia de medicamentos. Entretanto, em virtude do alto custo, demanda de tempo para obtenção de resultados, necessidade de configurações mais sofisticadas de laboratório para execução, não é um método de rotina. Além disso, a técnica revela-se de grande utilidade para identificação de infecções assintomáticas (31).

1.4 Tratamento da malária por *P. vivax*

Para cada espécie de *Plasmodium*, um esquema de tratamento é preconizado e cada esquema terapêutico combina diferentes antimaláricos visando atingir o parasito em pontos-chaves do seu ciclo evolutivo: interrompendo a esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção; interrompendo a transmissão do parasita, pelo uso de drogas que impedem o desenvolvimento das formas sexuadas (gametócitos); e destruindo as formas latentes (hipnozoítos) das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, responsáveis pelas recaídas da doença pós períodos variáveis (5).

Os agentes antimaláricos são classificados com base em sua estrutura química e atividade desempenhada no ciclo. Em relação a atividade antimalárica, há as seguintes classificações: gametocitocidas, como a artemisinina e a cloroquina, que destroem as formas sexuadas dos parasitas; esquizonticidas sanguíneos, como a halofantrina, sulfadoxina, mefloquina e quinina, responsáveis por promover a cura clínica; esquizonticidas teciduais ou hipnozoitocidas, como a primaquina e a tafenoquina, que atuam prevenindo as recaídas causadas pelas formas latentes hepáticas; e esporonticidas, como a primaquina e a pirimetamina, que impedem a infecção pelos esporozoítos (Figura 4) (32,33).

Quanto a classificação com base na estrutura química, existem as 4-aminoquinolinas (amodiaquina e cloroquina); 8-aminoquinolinas (primaquina); hidroxinaftoquinonas (atovaquona); derivados de artemisinina (artemeter e artesunato); diaminopirimidinas (pirimetamina); alcaloides cinchona à base de quinolinas (quinina e quinidina); 4-quinolinametanóis (mefloquina); biguanidas (proguanil e cloroproguanil); e sulfonamidas (sulfadoxina) (33).

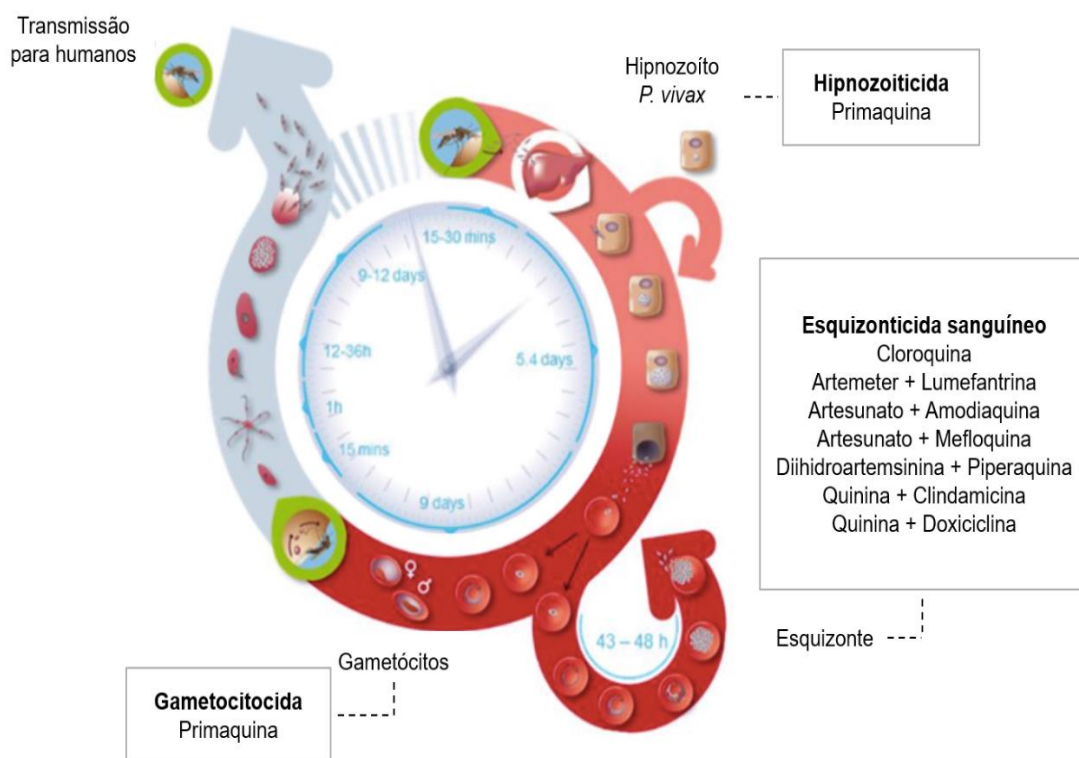


Figura 4. Antimaláricos e seus alvos de ação no ciclo biológico do parasito (32)

Em relação ao *P. vivax*, devido sua capacidade de formar hipnozoítos, o objetivo do tratamento concentra-se em eliminar tanto as formas sanguíneas quanto as formas hepáticas do parasito. Atualmente, o tratamento preconizado é cloroquina (CQ) ou derivados de artemisinina em combinação com a primaquina (PQ) que mantém-se como a principal escolha para o tratamento de hipnozoítos, oferecendo profilaxia e cura radical para as infecções por *P. vivax*, prevenindo as recorrências da doença (5). As recorrências de malária são conceituadas como o reaparecimento da parasitemia assexuada resultante de

recrudescência, recaída ou reinfeção (34). A recrudescência é definida como recorrência de parasitemia assexuada do mesmo genótipo que causou a doença original, devido à depuração incompleta de parasitos assexuados durante o tratamento. Já a recaída é definida como o reaparecimento da parasitemia e das manifestações clínicas causadas pela reinvasão das hemácias por merozoítos provenientes de hipnozoítos quiescentes. Reinfeção, por sua vez, designa uma nova infecção que segue uma infecção primária, devido contato com o mosquito vetor, após tratamento e eliminação da droga pelo organismo (34,35). Sendo assim, o regime terapêutico preconizado para a malária não complicada por *P. vivax* envolve administração de CQ durante 3 dias (10 mg/kg no dia 1 e 7,5 mg/kg nos dias 2 e 3) e PQ na dose de 0,5 mg/kg/dia, por 7 dias. Porém, em caso de reaparecimento dos sinais e sintomas da doença a partir do 5º ao 60º dia após início do tratamento, o que indica falha terapêutica tanto da CQ quanto da PQ (ou ambas), o tratamento recomendado passa a ser uso de artemeter/lumefantrina ou artesunato/mefloquina durante 3 dias (opção em caso de falha da CQ), e PQ (0,5 mg/kg/dia) por 14 dias (5).

1.5 Primaquina

A PQ é um pró-fármaco da família das 8-aminoquinolinas, com meia vida de 4-6h, ativa contra as formas pré-eritrocíticas em desenvolvimento (atividade profilática causal), os hipnozoítos (*P. vivax* e *P. ovale*), os estágios assexuados (exceto *P. falciparum*), e gametócitos (*P. falciparum*) de todos os parasitos da malária humana (36).

As propriedades antimaláricas da PQ foram relatadas pela primeira vez em 1946, quando a droga se apresentou eficaz contra os estágios sanguíneos do parasito, assim como para os estágios hepáticos, sendo licenciada como o único agente para a cura radical de *P. vivax* na década de 1950 (37).

A eficácia da PQ está relacionada principalmente com a dose total administrada e não exatamente com o tempo de tratamento (38). No Brasil, o esquema de 7 dias é usado para melhorar a adesão, o que é reforçado pelo fato

do esquema de 0,25 mg/kg por 14 dias não ser superior ao de 7 dias com 0,5 mg/kg (39).

Após a administração oral, as concentrações plasmáticas máximas são atingidas num período de 1-3 h (36). A PQ é metabolizada majoritariamente no fígado, e sua biotransformação ocorre através de três vias principais, envolvendo as enzimas do citocromo P450 (CYP450) (CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4, CYP1A2), monoamina oxidase (MAO-A e B) e monooxigenase-3 contendo flavina (FMO-3) (40).

O pró-fármaco é metabolizado principalmente pela MAO-A em aldeído, que é oxidado através da aldeído desidrogenase (ADH) em carboxiprimaquina, o principal metabólito encontrado no plasma. Posteriormente, a carboxiprimaquina é oxidada pela FMO em metabólito N-hidroxilado, que pode causar hemotoxicidade. Além disso, a PQ é metabolizada via CYP2D6 em 5-hidroxiprimaquina, 5,6-ortoquinona e outros metabólitos fenólicos. Acredita-se que outras enzimas do citocromo P450 também contribuam para o metabolismo da PQ (40). Adicionalmente, um estudo em roedores reportou que a eficácia antimalárica da PQ é dependente da sua biotransformação pela CYP2D6 e dos metabólitos fenólicos gerados (41).

Diversos fatores como gênero, dieta, idade e peso corporal podem interferir na farmacocinética de medicamentos, entretanto, estudos apontam evidências crescentes relacionadas à potencial contribuição de polimorfismos em genes codificadores de enzimas metabolizadoras de drogas antimaláricas para a redução da eficácia terapêutica (42).

Em 2013, Bennet *et al.*, relataram falha terapêutica da PQ associada a presença de polimorfismos em *CYP2D6*, o que resultou em uma diminuição do metabolismo da droga, de modo que níveis suficientes do metabólito ativo não foram alcançados (43). Polimorfismos em *CYP2D6* associados a recorrência de malária por *P. vivax* também foram relatados no Brasil em uma área de transmissão ativa (44).

Em estudos *in vitro*, inibidores da MAO-A diminuem os níveis de carboxiprimaquina, principal metabólito plasmático da PQ, sugerindo um papel ativo desta enzima no metabolismo da PQ (45). Em 2019, Ariffin *et al.*,

demonstraram uma ocorrência semelhante em indivíduos com polimorfismos em *MAOA*, fortalecendo a descoberta da influência da *MAO-A* no metabolismo da *PQ*, uma vez que indivíduos portadores da variante com genótipo homocigoto mutado apresentaram um metabolismo mais lento da *PQ* em comparação com o tipo selvagem (46).

1.6 Citocromo P450

O citocromo P450 (*CYP450*) é uma superfamília de proteínas responsável por metabolizar um amplo espectro de diferentes substratos, tanto endógenos quanto xenobióticos. São predominantemente expressas no fígado, mas também ocorrem no intestino delgado, pulmões, placenta e rins (47). O sistema *CYP450* tem papel central na área de farmacogenética, uma vez que a maioria dos medicamentos é substrato para essas enzimas (48).

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*, que são geralmente polimórficas (49). As formas polimórficas são muitas vezes responsáveis pelo desenvolvimento de reações adversas a medicamentos ou falhas terapêuticas (50).

1.6.1 Citocromo P450 2D6 (*CYP2D6*)

CYP2D6 é um polipeptídeo de 497 aminoácidos, com gene localizado no cromossomo 22q13.1, membro da superfamília do gene do citocromo *CYP450*. A enzima é responsável por metabolizar entre 20 e 25% de todos os medicamentos em uso clínico (51).

O gene *CYP2D6* é altamente heterogêneo, com cerca de 133 alelos já definidos e fenótipos que variam de disfunção completa ao metabolismo ultrarrápido, resultante de diferentes tipos de variantes, principalmente polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), inserção/deleção (indel), e deleções ou duplicações de todo o gene (52,53). O alto nível polimórfico resulta em diferentes fenótipos

de CYP2D6: metabolizador lento, metabolizador intermediário, metabolizador normal, e metabolizador ultra-rápido (52).

Estes fenótipos podem ser determinados para alelos individuais através de um sistema de *score* de atividade (AS), desenvolvido por Gaedigk *et al* (2007), que categoriza os alelos em não funcionais, de atividade baixa, normal e aumentada, de acordo com a funcionalidade de cada um, atribuindo-se: 0 para alelos de função nula (*3, *4, *4xN, *5, *6, *7, *8, *11, *12, *36, *40, *42, *56); 0.5 para alelos de função diminuída (*9, *17, *29, *41, *44, *49) e 0.25 para alelos de função muito diminuída (*10); 1 para alelos de função normal (*1, *2, *35, *43, *45, *39); e 2 para alelos de função aumentada (*1xN, *2xN). A combinação dos alelos permite prever o fenótipo a partir do genótipo em: metabolizadores lentos (gPM), intermediários (gIM), normais (gNM) e ultrarrápidos (gUM) (Figura 5) (48,54).

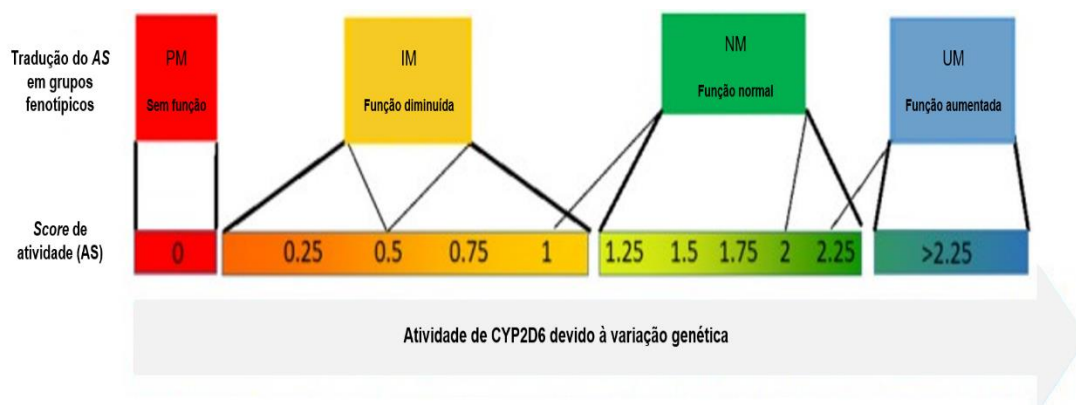


Figura 5. Resumo das estimativas de pontuação de atividade que determinam os fenótipos CYP2D6 (54)

Estudos demonstram que as frequências alélicas de *CYP2D6* variam substancialmente entre as populações. Algumas variantes alélicas estão presentes nas populações em frequências semelhantes, enquanto outras são observadas em frequências muito diferentes ou detectadas apenas em um determinado grupo étnico (52). Llerena *et al*, a partir da análise de 172 estudos originais sobre a variabilidade dos alelos de *CYP2D6* identificaram como mais frequentes por grupos étnico e região geográfica os alelos *CYP2D6* *4 em europeus, *CYP2D6* *10 em asiáticos, *CYP2D6* *41 e duplicações/multiplicações,

nas populações do Oriente Médio, *CYP2D6* *17 em negros africanos e *CYP2D6* *29 em afro-americanos (Figura 6) (55).

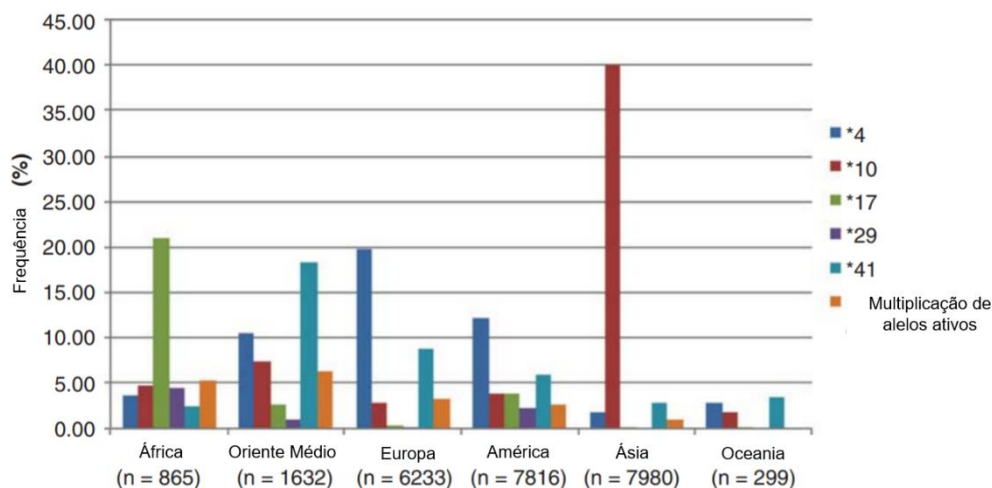


Figura 6. Distribuição dos principais alelos *CYP2D6* em diferentes regiões geográficas (55)

No Brasil, *CYP2D6* *2 é frequente em cerca de 21,5% da população, seguido dos alelos *CYP2D6* *4 (9,4%), *CYP2D6* *17 (5,6%) e *CYP2D6* *41 (5,5%), com variáveis frequências para os alelos individuais nas diferentes regiões do país (52). Rodrigues-Soares *et al.* (2018), em uma revisão sistemática envolvendo biomarcadores farmacogenéticos e sua distribuição por raça/cor autodeclaradas identificaram diferenças interétnicas significativas na população brasileira: *CYP2D6* *2, *CYP2D6* *4 e *CYP2D6* *41 apresentando frequências mais elevadas em brancos do que em negros, em contraste com *CYP2D6* *17 e *CYP2D6* *29 exibindo maior frequência em negros, demonstrando que a variância das frequências fármaco-alélicas é determinada pela etnia mais do que pela região geográfica (56).

Evidências de estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que a via metabólica mediada por *CYP2D6* é responsável pela ativação da PQ nos hepatócitos (57,58), conseqüentemente indivíduos com atividade enzimática reduzida apresentam risco aumentado de falha terapêutica e recorrências de malária por *P. vivax* (43,59). Silvino *et al.* (2016) demonstraram associação significativa entre múltiplos episódios de malária vivax e polimorfismos relacionados à redução da atividade de *CYP2D6* em viajantes retornando de áreas do Brasil onde a malária

é endêmica (60). Além disso, Brasil *et al.* (2018) identificaram risco aumentado de recorrência de malária *por P. vivax* em pacientes tratados com CQ/PQ com atividade enzimática de CYP2D6 nula ou reduzida em comparação com metabolizadores normais ou ultrarrápidos em um cenário de transmissão ativa (44).

Outros estudos reforçam estes achados, a exemplo de Park *et al.* (2022) que identificaram em uma meta-análise que metabolizadores lentos e intermediários de CYP2D6 apresentaram um risco 1,81 vezes maior de recorrências *por P. vivax* do que metabolizadores normais e ultrarrápidos (IC 95%, 1,34–2,45; $p= 0,0001$) (61). Ainda, outro estudo sugeriu que o fenótipo predito de metabolização ultrarrápida é menos suscetível a recorrência e falha terapêutica com PQ (62).

1.7 Monoamina oxidase A (MAO-A)

A monoamina oxidase A (MAO-A) é uma isoenzima ligada às mitocôndrias que catalisa a desaminação oxidativa de aminas dietéticas e neurotransmissores monoamínicos, como serotonina, norepinefrina, dopamina, β -feniletilamina e outras aminas residuais (63).

O gene que codifica MAO-A (*MAOA*) está localizado no braço curto do cromossomo X entre as bandas Xp11.23 e Xp11.43, e tem 15 éxons em sua estrutura. Vários polimorfismos diferentes foram identificados na região promotora da *MAOA* e em seus íntrons e éxons, no entanto apenas alguns desses polimorfismos modificam a atividade da proteína ou os seus níveis de expressão (64). O polimorfismo de número variável de repetições em série (VNTR) localizado na região de promotora de *MAOA* está associado à variação nos níveis de transcrição e atividade enzimática, principalmente em relação as variantes de 2 e 3 repetições (65). Um estudo encontrou dois SNPs no gene *MAOA* (rs6323 e rs1137070) que podem afetar a atividade da enzima, dos quais o haplótipo 941T/1460C está relacionado à baixa atividade enzimática (66). Além disso, o SNP *MAOA* 1460 C>T, o alelo T reduz a atividade da enzima MAO-A (67).

Existe diferença na distribuição da frequência das variantes de MAOA VNTR entre os grupos étnicos. De acordo com Sabol *et al* (1998), o alelo de 3 repetições apresenta frequência elevada na população latina (70,7%) e branca/não hispânica (64,8%), enquanto o alelo de 1 repetição é mais frequente em asiáticos (61,0%) e afro-americanos (59,1%) (68).

A MAO-A desempenha um papel importante no metabolismo primário da PQ. Em estudos *in vitro*, inibidores da MAO-A diminuíram os níveis do metabólito da PQ, a carboxiprimaquina, sugerindo um papel ativo da enzima no metabolismo da PQ (45,69). Em 2019, um estudo observou que indivíduos com uma variante (rs6323, 891 G>T) portadores do genótipo homozigoto GG apresentaram um metabolismo mais lento da PQ em comparação com o tipo selvagem (46). Porém, não se tem dados na literatura sobre uma possível relação entre recorrências de malária por *P. vivax* e a redução da atividade enzimática de MAO-A.

1.8 UDP-glucuronosiltransferase 2B7 (UGT2B7)

As enzimas UDP-glucuroniltransferases (UGTs) compreendem uma superfamília de proteínas-chave que catalisam a reação de glucuronidação em uma ampla gama de produtos químicos endógenos e exógenos estruturalmente diversos. A glucuronidação é uma das principais reações de metabolização de fase II que contribui para a biotransformação de fármacos (70).

Um membro importante das UGTs é a isoforma UGT2B7, que participa da glucuronidação de vários compostos endógenos fisiologicamente importantes, como hormônios esteroides, ácidos biliares, retinóides e ácidos graxos, além de drogas como opióides e numerosas drogas contendo ácido carboxílico. UGT2B7 é predominantemente expresso no fígado, mas também há expressão no trato gastrointestinal, rins, pâncreas e cérebro. O gene *UGT2B7* está localizado dentro de um grupo de genes *UGT2B* na posição cromossômica 4q13 e contém seis éxons que se estendem por quase 16 kb, e é polimórfico (70,71).

Semelhante às enzimas CYP450, as variações genéticas podem estar na forma de SNPs, indels e múltiplas cópias de alelos funcionais e não funcionais.

A presença de variantes pode alterar significativamente a capacidade de glucuronidação dos indivíduos, resultando em níveis ineficazes das drogas ou toxicidade (72). A variação mundial em *UGT2B7*, exibe algumas diferenças significativas observadas em diferentes grupos étnicos: o alelo *1a é altamente prevalente em todas as populações (32–45%); alelo *2a apresenta frequência elevada em europeus-americanos (49%), bem como o alelo *1m em hispano-americanos (37%) (73). Ngaimisi *et al* (2013) relataram frequência do SNP *UGT2B7*–327G>A, que ocorre em certos alelos *2, significativamente diferente em uma população da Tanzânia (29,3%) em comparação com uma população etíope (48,3%) (74).

A glucuronidação da dihidroartemisinina (DHA), que pertence a uma nova classe de antimaláricos altamente eficazes, é catalisada pelas *UGT1A9* e *UGT2B7* (75). Recentemente um estudo reportou maior risco de recorrências de *P. vivax*, em pacientes tratados com PQ e CQ, associado a diminuição da atividade de *CYP2C19*, *ABCG2* e *UGT2B7* em combinação com o metabolismo intermediário ou lento da *CYP2D6* (40).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a influência de polimorfismos genéticos em *CYP2D6*, *MAO* e *UGT2B7* na resposta terapêutica de pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) com malária por *P. vivax* tratados com PQ.

2.2 Específicos

1. Investigar a frequência de polimorfismos dos genes (*MAOA*, *CYP2D6*, *UGT2B7*) entre indivíduos com recorrência e sem recorrência;
2. Determinar a influência dos genótipos na resposta clínica de pacientes com infecção confirmada por *P. vivax* tratados com PQ;
3. Determinar a influência dos genótipos no tempo e número de recorrências.

3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

Recorrências de malária por *Plasmodium vivax*: Avaliação da influência de variantes genéticas em *CYP2D6*, *MAOA* e *UGT2B7* em indivíduos tratados com primaquina

Gabrielly Silva^{1,2}, Flávia Fontenelle¹, Amanda Carvalho^{1,2}, Marielle Macêdo^{1,3}, Manuela Crispim^{1,4}, Rebeca Netto^{1,2}, Victor Mwangi^{1,2}, Kim Machado^{1,2}, Marcus Lacerda^{1,5}, Anne Almeida^{1,2}, Gisely Melo^{1,2}

¹Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM, Brasil

²Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

³Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

⁴Univesidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

⁵Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Leônidas & Maria Deane, Manaus, AM, Brasil

RESUMO

INTRODUÇÃO – Polimorfismos nos genes codificadores de enzimas que participam do metabolismo da primaquina (PQ) são capazes de alterar a resposta clínica de pacientes com malária, levando à falha terapêutica.

OBJETIVOS – Neste estudo, investigamos se variantes genéticas em *CYP2D6*, *MAOA* e *UGT2B7* estão associadas com recorrências de indivíduos infectados por *P. vivax* tratados com PQ.

MÉTODOS – Trata-se de um estudo caso-controle no qual foram selecionados indivíduos com diagnóstico positivo para malária vivax. Os pacientes foram divididos em dois grupos: recorrência e sem recorrência. A genotipagem de *CYP2D6*, *MAOA* e *UGT2B7* foi realizada por PCR em tempo real.

RESULTADOS – A frequência dos alelos de *CYP2D6* foi semelhante entre os grupos, exceto para o alelo de função diminuída *41 mais frequente no grupo recorrência (p=0,004) e alelo de função normal *1 mais frequente no grupo sem recorrência (p=0,018). Além disso, o fenótipo *CYP2D6* gNM apresentou frequência mais elevada em indivíduos sem recorrência (p=0,040). Não foi possível estabelecer uma associação entre as recorrências e os genótipos de *MAOA* e *UGT2B7*.

CONCLUSÃO – Estes resultados sugerem que variantes genéticas em *CYP2D6* podem contribuir para a falha terapêutica com PQ resultando nas recorrências de *P. vivax*,

reforçando a importância da farmacogenética no monitoramento das terapias com antimaláricos.

Palavras-chave: *Plasmodium vivax* – Recorrências – Primaquina – *CYP2D6* – *MAOA* – *UGT2B7*.

INTRODUÇÃO

A malária permanece como um grave problema de saúde pública atingindo as regiões tropicais e subtropicais do mundo. Em 2020, foram estimados 241 milhões de casos e 627 mil mortes globalmente (1). No Brasil, 99,9% da malária ocorre na região amazônica, sendo atribuídos ao *Plasmodium vivax* cerca de 83% dos episódios notificados em todo o país (2). Um obstáculo para a eliminação da malária por *P. vivax* decorre das frequentes recorrências causadas por este parasita principalmente devido a ativação dos hipnozoítos, que são as formas latentes hepáticas responsáveis pelas recaídas (3,4).

A primaquina (PQ), um potente medicamento hipnozoiticida, recomendada para a cura radical da malária *vivax* necessita ser biotransformada para exercer sua função (5). O pró-fármaco é metabolizado principalmente pela monoamina oxidase A (MAO-A) em aldeído, que é oxidado em carboxiprimaquina, o principal metabólito encontrado no plasma (6). Além disso, a ativação da PQ é dependente da via do citocromo P450 *CYP2D6*, responsável por gerar os metabólitos fenólicos aos quais se atribui a eficácia antimalárica (7,8).

Bennet *et al.* (2013) (9) relataram pela primeira vez falha terapêutica da PQ no tratamento da malária *vivax* devido a variabilidade genética de *CYP2D6*, o que resultou em uma diminuição do metabolismo da droga. Além disso, a falha terapêutica da PQ e recorrências de *P. vivax* devido a variantes genéticas em *CYP2D6* também já foram observadas no Brasil, em uma área de transmissão ativa de malária (10). Chamnanphon *et al.* (2020) (11) verificaram associação entre risco de recorrência de *P. vivax* e atividade diminuída de *CYP2C19*, *ABCG2* e *UGT2B7* em combinação com status de metabolizador intermediário ou pobre de *CYP2D6*.

Em estudos *in vitro*, os inibidores da MAO-A reduzem os níveis do metabólito de carboxiprimaquina (12). Ariffin *et al.* (2019) (13) observou metabolismo de PQ mais lento em indivíduos com uma variante de genótipo homozigoto recessivo em comparação com o selvagem em *MAOA*.

Muitos fatores podem afetar a resposta dos indivíduos aos medicamentos, incluindo gênero, idade, dieta e a genética do hospedeiro humano. Sendo assim, este estudo tem como objetivo investigar se variantes genéticas em *CYP2D6*, *MAOA* e *UGT2B7* estavam associadas com as recorrências de indivíduos infectados por *P. vivax* tratados com PQ.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo – Este é um estudo do tipo caso-controle, realizado entre 2018 e 2021 na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), considerada centro de referência para o tratamento de Doenças Tropicais na Amazônia, localizado em Manaus, Estado do Amazonas.

Seleção de participantes – Foram incluídos indivíduos de ambos os sexos, com idade superior de 6 meses, peso corporal >5 kg, mono-infecção sintomática por *P. vivax* com densidade parasitária entre 250 e 100.000 parasitas/ μ L confirmada por microscopia. Foram considerados critérios de não inclusão: uso de antimaláricos nos últimos 60 dias, infecção mista, gravidez ou aleitamento e doenças concomitantes ou de base.

Os indivíduos foram tratados com dihidroartemisinina+piperquina (DHA-PPQ) em uma dose única diária de comprimidos, contendo cada um 40 mg de DHA e 320 mg de PPQ ou 25 mg/kg de fosfato de cloroquina (CQ) por 3 dias. Uma dose de 0.5 mg/kg/dia de PQ foi administrada por 14 dias concomitantemente ao tratamento esquizonticida ou 42 dias após. Foram realizados exames clínicos e laboratoriais, entrevistas e coletas de amostras no dia de admissão (D1) e em todas as demais visitas de acompanhamento (D2, D3, D4, D7, D14, D28, D42, D63, D90, D120, D150 e D180).

Este estudo foi realizado com amostragem de conveniência de um estudo maior. Os participantes foram divididos em grupo caso e controle, sendo o grupo caso constituídos de pacientes que apresentaram recorrência ao longo do acompanhamento de 180 dias, e o grupo controle de indivíduos que não apresentaram novo episódio de malária durante o mesmo período de acompanhamento, pareados por gênero, idade e etnia.

Procedimentos laboratoriais – O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue utilizando o kit QIAmp® Blood Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) de acordo com o protocolo do fabricante. Foram genotipados 11 polimorfismos em *CYP2D6* (2549deA [rs35742686], 2615_2617delAAG [rs5030656], 100C>T [rs1065852], 1846G>A [rs3892097], 4180G>C [rs1080985], 1023C>T [rs28371706], 31G>A

[rs769258], 2850C>T [rs16947]); 1 polimorfismo em *MAOA* 1440C>T [rs1137070]; e 1 polimorfismo em *UGT2B7* 372A>G [rs28365063] por reação de PCR em tempo real utilizando o software Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR System, com sondas específicas para cada ensaio de SNP (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Todas as reações de amplificação e os parâmetros de ciclagem foram determinados conforme os protocolos do fabricante. A determinação do número de cópias do gene *CYP2D6* foi realizada por PCR em tempo real duplex e o produto da amplificação foi analisado no software CopyCaller v2.1.

Genótipos e alelos de *MAOA* e *UGT2B7* foram inferidos com Microsoft Office Excel v16.16.1, sem avaliação do fenótipo, uma vez que para estes genes não há diretrizes para predição de atividade enzimática. Haplótipos *CYP2D6* foram inferidos usando o pacote HaploStats (versão 1.7.7) implementado na plataforma R e comparados com a nomenclatura para identificação dos alelos estrela (*) (14). O sistema de score de atividade (AS) foi usado para definir o fenótipo predito de *CYP2D6* a partir da soma das pontuações atribuídas aos alelos estrela (*) de acordo com a funcionalidade de cada um: 0 para alelos de função nula (*3, *4, *4xN, *5, *6, *7, *8, *11, *12, *36, *40, *42, *56); 0.5 para alelos de função diminuída (*9, *17, *29, *41, *44, *49) e 0.25 (*10); 1 para alelos de função normal (*1, *2, *35, *43, *45, *39); e 2 para alelos de função aumentada (*1xN, *2xN) designando os fenótipos preditos a partir do genótipo como metabolizadores lentos, intermediários, normais e ultrarrápidos (gPM, gIM, gNM e gUM, respectivamente) (15,16).

Análises estatísticas – As análises foram realizadas através do software Stata v. 13. As frequências dos genótipos e alelos foi avaliada usando o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. A influência dos genótipos no tempo até recorrência e clareamento das formas sexuadas foi estimada com a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier. A associação entre as recorrências e as variantes genéticas estudadas se deu por regressão linear generalizada log-binominal múltipla. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo em todas as análises.

Aspectos éticos – Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-HVD através do CAAE 69476017.3.0000.0005. Todos os participantes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ou Termo de Assentimento para menores de 18 anos previamente a sua inclusão.

RESULTADOS

Características da população de estudo – Foram incluídos 205 participantes, sendo 59 casos e 146 controles. Dos indivíduos incluídos, 202 foram genotipados para *MAOA* e *UGT2B7* (57 casos e 145 controles), e 178 para *CYP2D6* (48 casos e 130 controles). A distribuição de gênero, idade e etnia foi semelhante entre os grupos. As recorrências foram observadas com maior frequência em um período <60 dias após o primeiro episódio de malária (56.1%), com 80.7% dos pacientes apresentando apenas um episódio. O tempo de clareamento das formas sexuadas e assexuadas não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$) (Tabela I).

Frequência dos alelos de CYP2D6, MAOA e UGT2B7 – A frequência dos alelos de *CYP2D6* diferiu significativamente em relação ao alelo de função normal de *CYP2D6* *1 observado em 24,6% dos casos e 36,9% dos controles ($p=0.018$). O alelo de função diminuída de *CYP2D6* *41 esteve presente em 11.4% dos casos e 3.8% dos controles ($p=0.004$). A análise do número de cópias do gene *CYP2D6* revelou 4.5% apresentavam somente uma cópia e 1.5% apresentavam multiplicações, para os quais não foi possível atribuir as multiplicações a um alelo específico em razão da heterozigose. Não foram observadas diferenças estatísticas em relação aos alelos de *MAOA* ($p=0.915$) e *UGT2B7* entre os grupos analisados ($p=0.634$) (Tabela II).

Frequência dos fenótipos preditos de CYP2D6 e genótipos de MAOA e UGT2B7 – Com relação a frequência dos fenótipos preditos de *CYP2D6*, foi encontrada diferença significativa para gNM observado em 54.4% dos casos e 69.7% dos controles (Tabela III) ($p=0.040$). A frequência do genótipo homocigoto mutado TT de *MAOA* se apresentou maior nos casos (26.3%) em comparação aos controles (23.5%), entretanto, sem diferença significativa ($p=0.669$). Genótipos de *UGT2B7* também não demonstraram diferença significativa entre casos e controles ($p>0.05$) (Tabela IV).

Tempo até a primeira recorrência – Os fenótipos preditos de *CYP2D6* foram agrupados em normal (gNM) e diminuído (gIM/gPM), *MAOA* e *UGT2B7* em genótipo tipo selvagem e mutado (heterocigotos e homocigotos mutados). Não foi observado diferença significativa entre o tempo do primeiro episódio de malária vivax até a recorrência nos grupos casos e controles (Figura 1) ($p>0.05$).

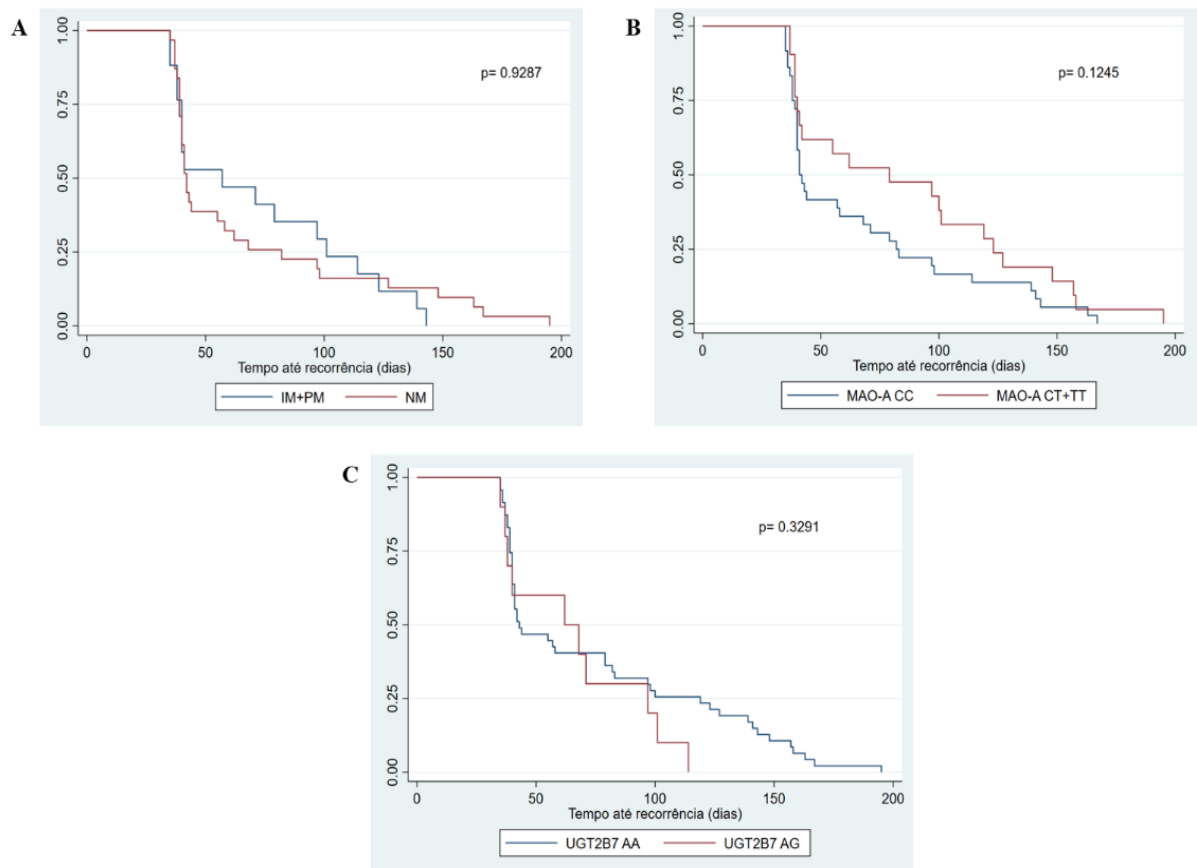


Figura 1. Curva de Kaplan-Meier para o tempo até a primeira recorrência de malária por *P. vivax*: (A) fenótipos preditos de CYP2D6; (B) genótipos de MAOA; (C) genótipos de UGT2B7.

Clareamento da gametocitemia – Não foi observado diferença no tempo de clareamento dos gametócitos de *P. vivax* associados aos fenótipos de CYP2D6 ($p=0.4183$), genótipos de MAOA ($p=0.9710$) e genótipos de UGT2B7 ($p=0.6415$) (Figura 2).

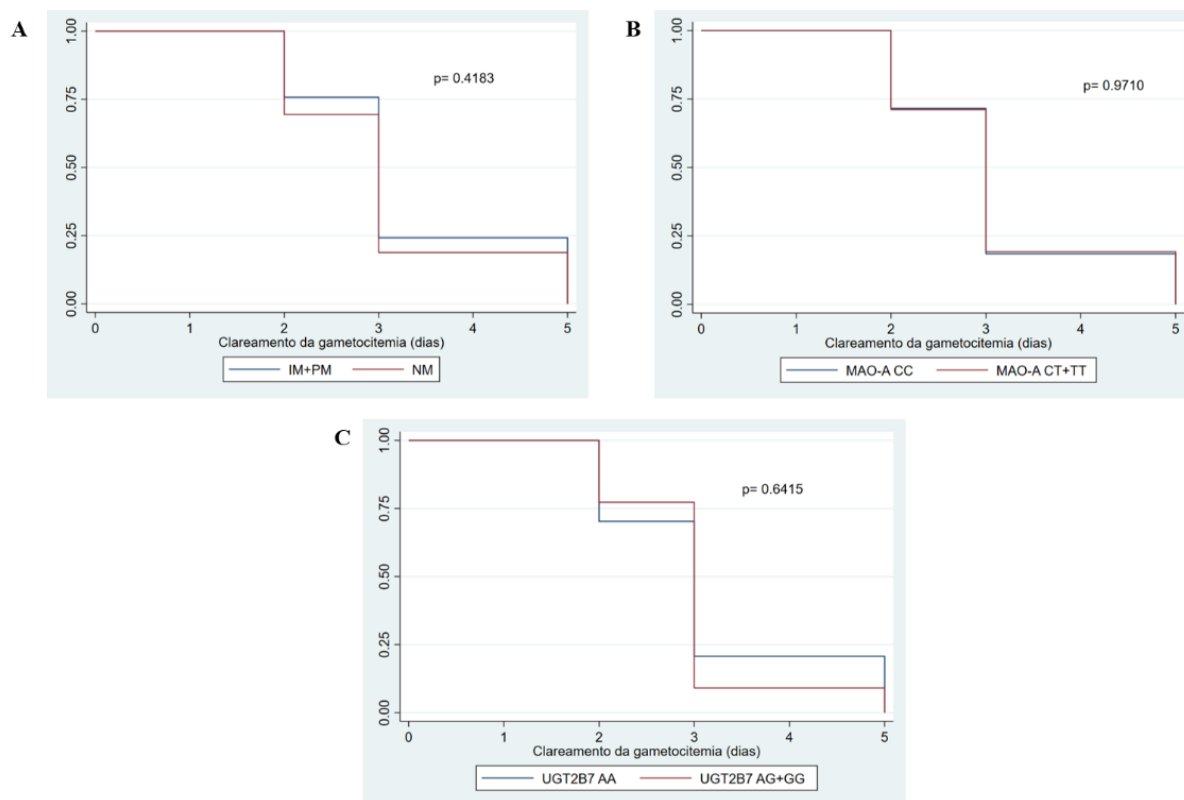


Figura 2. Curva de Kaplan-Meier para o clareamento da gametocitemia de *P. vivax* em dias: (A) fenótipos preditos de *CYP2D6*; (B) genótipos de *MAOA*; (C) genótipos de *UGT2B7*.

Risco relativo (RR) de recorrência – Foi observado que o risco relativo (RR) para metabolizador intermediário (gIM) e metabolizador lento (gPM) de *CYP2D6* foi de 1.57 (IC 95% 0.97 – 2.56; $p=0.068$) para ter recorrências por *P. vivax*. Genótipos mutados de *MAOA* (CT e TT) e de *UGT2B7* (AG e GG) apresentaram RR de 0,95 (IC 95% 0.60 – 1.96; $p=0.815$) e de 0.89 (IC 95% 0.49 – 1.60, $p=0,695$) respectivamente em comparação com indivíduos portadores do genótipo tipo selvagem. (Tabela V).

Níveis de PQ em relação aos genótipos e fenótipos preditos – A tabela VI, mostra que não houve diferença significativa entre os níveis de PQ no dia 7 entre os fenótipos de *CYP2D6* e genótipos de *MAOA* e *UGT2B7* ($p>0.05$) (Tabela VI e Figura 3). A concentração de PQ no D7 foi de 160.9 ng/mL (IC 95% 77.19 - 244.70) no grupo caso portadores dos genótipos CT/TT em comparação com indivíduos do mesmo grupo portadores do genótipo selvagem CC 138.9 ng/mL (IC 95% 99.40 - 178.39), embora sem diferença estatística ($p=0.5444$). Além disso, no grupo controle, a concentração de PQ no

D7 foi de 164.3 ng/mL (IC 95% 66.96 - 261.80) para os fenótipos gIM/gPM e de 162.5 ng/mL (IC 95% 136.06 - 189.04) para fenótipos gNM ($p=0.9649$) (Tabela 6 e Figura 3).

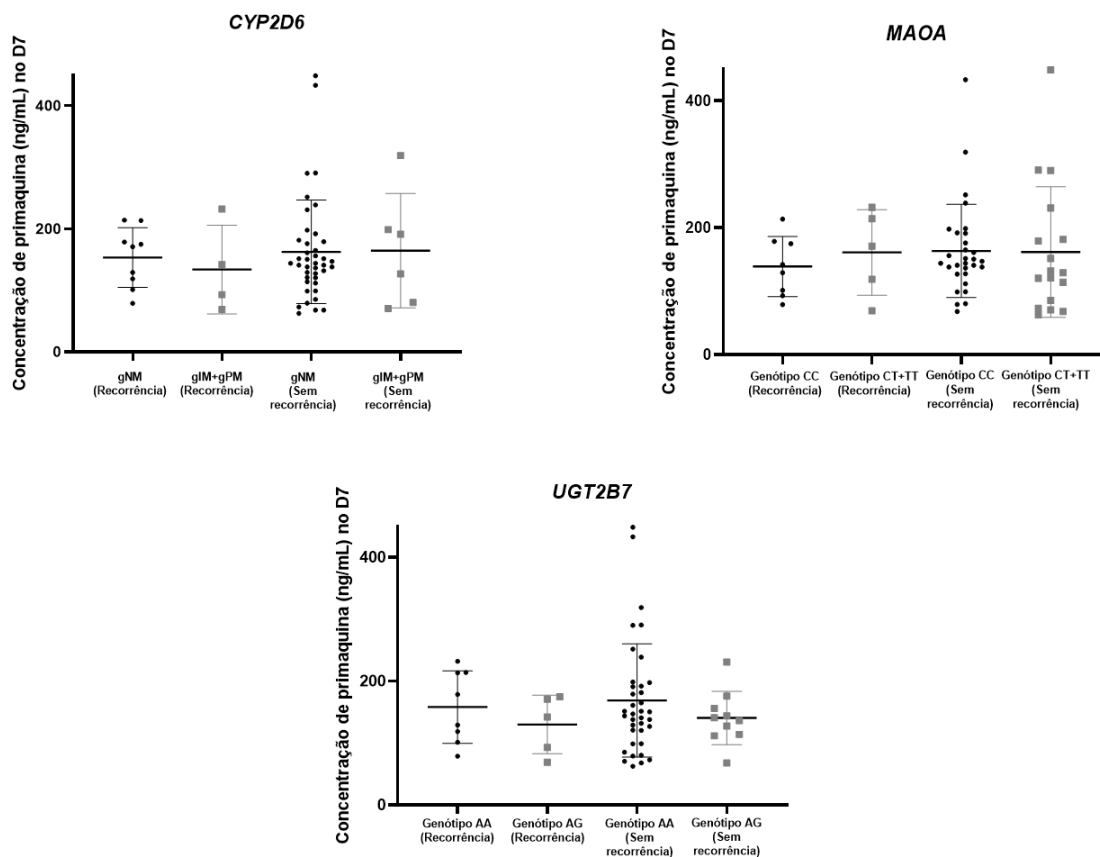


Figura 3. Níveis de PQ (ng/mL) entre indivíduos com diferentes fenótipos preditos de CYP2D6 e genótipos de MAOA e UGT2B7 nos grupos caso e controle.

DISCUSSÃO

A variabilidade genética em enzimas metabolizadoras de drogas, afeta cerca de 30% de todas as drogas (17). O gene *CYP2D6* apresenta uma alta heterogeneidade alélica que determina grande variação interindividual distribuída nas diferentes regiões e grupos étnicos. Os alelos *CYP2D6* *4 são mais frequentes em europeus, *CYP2D6* *10 em asiáticos, *CYP2D6* *41 nas populações do Oriente Médio, *CYP2D6* *17 em negros africanos e *CYP2D6* *29 em afro-americanos (18). No Brasil, *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%). O *status* metabólico predito mais frequente é o gNM (83.5%), seguido do fenótipo gUM (3.7%) e gPM (2.5%) (19).

Os resultados deste trabalho mostraram risco aumentado de recorrência de malária por *P. vivax* em pacientes tratados com PQ portadores do alelo *CYP2D6* *41 ($p=0.040$). Além disso, o fenótipo predito normal (gNM) foi mais frequente no grupo sem recorrência ($p=0.040$). Estes resultados estão de acordo com observado por Bennet *et al.* (2013) (9), pois pacientes que apresentaram múltiplas recorrências possuíam o *status* metabólico intermediário e lento, enquanto que indivíduos sem recorrência majoritariamente possuíam fenótipo normal. Park *et al.* (2022) (20), em uma meta-análise relataram observação semelhante ao identificarem que indivíduos com fenótipos gPM e gIM possuem risco aumentado de recorrência por *P. vivax* em comparação com gNM e gUM. Além disso, um estudo recente de nosso grupo de pesquisa sugeriu que indivíduos com fenótipo gUM foram menos suscetíveis à recorrência (21). Outros estudos realizados na região Amazônica, demonstraram que indivíduos com atividade enzimática de *CYP2D6* reduzida apresentam um maior número de episódios de malária (10,22,23).

A enzima MAO-A desempenha um papel importante na catalisação de várias vias biológicas, incluindo a metabolização da PQ (6,24). No SNP *MAOA* 1460 C>T, o alelo T reduz a atividade da enzima MAO-A (25), entretanto, não se tem dados na literatura sobre uma possível relação entre a atividade enzimática diminuída e as recorrências de malária vivax. Neste estudo não observamos associação entre as recorrências de *P. vivax* e os genótipos de *MAOA*, embora a frequência do genótipo homozigoto mutado TT se apresente maior no grupo recorrência (26.3%) em comparação com sem recorrência (23.4%). Porém, Ariffin *et al.* (2019) (13) encontraram associação entre metabolismo lento de PQ em indivíduos com variante *MAOA* 891G>T portadores do genótipo homozigoto mutado em comparação com o tipo selvagem ($p= 0.05$).

Um estudo recente reportou maior risco de recorrências de *P. vivax*, em pacientes tratados com PQ e CQ, associado a diminuição da atividade de *CYP2C19*, *ABCG2* e *UGT2B7* em combinação com o metabolismo intermediário ou lento da *CYP2D6* (11). No presente estudo, não foi encontrada diferença na frequência dos genótipos ($p=0,690$) e dos alelos ($p=0,630$) de *UGT2B7* entre os indivíduos casos e controles.

A avaliação dos níveis sanguíneos de PQ pode prover informação confiável sobre a exposição de parasitas ao medicamento durante o tratamento da malária vivax (26). Neste trabalho, não observamos associação entre as concentrações plasmáticas da PQ,

fenótipos preditos de CYP2D6 e os genótipos de *MAOA* e *UGT2B7* ($p > 0.05$). Entretanto, estudos tem demonstrado que a atividade diminuída de CYP2D6 exerce implicações diretas sobre a metabolização da PQ, resultando em baixos níveis dos metabólitos ativos (8,9,27). Baird *et al.* (2018) (28) ao investigarem associação entre a falha terapêutica na infecção por *P. vivax* e os genótipos e fenótipos de CYP2D6 analisaram a relação dextrometorfano/dextorfano (DM/DX), droga utilizada para avaliar a atividade de CYP2D6, e observaram que pacientes com maiores concentrações de DM/DX tinham mais chances de apresentar recorrência.

Esse trabalho apresentou algumas limitações como: número limitado de indivíduos com recorrência de *P. vivax*; fenótipos preditos de CYP2D6 baseados nos genótipos inferidos; impossibilidade de dosar o metabolito da PQ (carboxiprimaquina) e avaliar microssatélites para classificação das recorrências. Apesar disso, nossos resultados demonstraram que indivíduos com *status* de metabolizadores normais possuem menor risco de recorrência.

Assim, estes achados sugerem que as variantes genéticas em *CYP2D6* podem contribuir para a falha terapêutica com PQ resultando nas recorrências de *P. vivax*, e reforçam a importância da farmacogenética no monitoramento das terapias com antimaláricos podendo sugerir ajuste de dose de PQ baseada no *status* de metabolizador de *CYP2D6*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos os participantes que colaboraram com este estudo e a gerência de malária da FMT-HVD.

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento desta pesquisa e pela concessão de bolsas.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

GS, AA, GM, KM, ML - Idealização do projeto e dos experimentos; GS, FF, AC, MM, MC – Procedimentos laboratoriais; GS, RN, VM – Análises estatísticas; GS – Redação do manuscrito; AA, GM – Revisão do manuscrito.

Tabela I. Características clínicas e demográficas dos participantes do estudo

	Total (202)	Recorrência (57)	Sem recorrência (145)	<i>p value</i>
Idade (IC 95%)	40.0 (29.0 – 50.0)	40.0 (28.0 – 49.0)	40.0 (29.0 – 51.0)	0.53
Sexo (%)				0.86
	Feminino 55 (27.2)	15 (26.3)	40 (27.6)	
	Masculino 147 (72.8)	42 (73.7)	105 (72.4)	
Etnia (%)				0.43
	Branco 45 (22.3)	11 (19.3)	34 (23.4)	
	Pardo 137 (67.8)	38 (66.7)	99 (68.3)	
	Preto 20 (9.9)	8 (14.0)	12 (8.3)	
Tempo até a primeira recorrência em dias (%)				
	<60 -	32 (56.14)	-	
	61 - 120 -	14 (24.56)	-	-
	121 - 180 -	11 (19.30)	-	
Número de episódios (%)				
	1 -	46 (80.70)	-	-
	2 -	10 (17.54)	-	

	3	-	1 (1.75)	-	
	2	30 (14.93)	4 (7.14)	26 (17.93)	
	3	80 (39.80)	21 (37.50)	59 (40.69)	
Clareamento da parasitemia (%) (n=201)	5	80 (39.80)	27 (48.21)	53 (36.55)	0.106
	7	10 (4.98)	3 (5.36)	7 (4.83)	
	14	1 (0.50)	1 (1.79)	0 (0.00)	
	2	38 (28.57)	12 (31.58)	26 (27.37)	
Clareamento da gametocitemia (%) (n=133)	3	70 (52.63)	18 (47.37)	52 (54.74)	0.744
	5	25 (18.80)	8 (21.05)	17 (17.89)	

Tabela II. Frequência dos alelos de *CYP2D6*, *MAOA* e *UGT2B7*

Gene	Alelos	Recorrência n (%)	Sem recorrência n (%)	<i>p value</i>
<i>MAOA</i>	C	39 (68.42)	100 (68.97)	0.915
	T	18 (31.58)	45 (31.03)	0.915
<i>UGT2B7</i>	A	52 (91.23)	130 (89.66)	0.634
	G	5 (8.77)	15 (10.34)	0.634
<i>CYP2D6</i>	*1	28 (24.56)	107 (36.90)	0.018
	*2	28 (24.56)	82 (28.28)	0.450
	*4	17 (14.91)	28 (9.66)	0.131
	*5	2 (1.75)	5 (1.72)	0.634
	*9	0 (0.00)	5 (1.72)	0.189
	*10	1 (0.88)	5 (1.72)	0.458
	*17	4 (3.51)	5 (1.72)	0.229
	*29	1 (0.88)	6 (2.07)	0.366
	*35	1 (0.88)	5 (1.72)	0.458
	*39	1 (0.88)	1 (0.34)	0.485

*41	13 (11.40)	11 (3.79)	0.004
ND	18 (15.79)	30 (10.34)	0.128

Tabela III. Fenótipo predito de *CYP2D6* associado aos grupos caso e controle

Fenótipo predito	Total (202)	Recorrência (57)	Não recorrência (145)	<i>p value</i>
gPM (%)	9 (4.46)	4 (7.02)	5 (3.45)	0.274
gIM (%)	37 (18.32)	13 (22.81)	24 (16.55)	0.301
gNM (%)	132 (65.35)	31 (54.39)	101 (69.66)	0.040
Indeterminado (%)	24 (11.88)	9 (15.79)	15 (10.34)	0.282

Tabela IV. Frequência dos genótipos de *MAOA* e *UGT2B7* associados aos grupos caso e controle

Gene e Genótipo	Recorrência n (%)	Não Recorrência n (%)	<i>p value</i>
<i>MAO-A</i>			
CC	36 (63.16)	89 (61.38)	0.815
CT	6 (10.53)	22 (15.17)	0.390
TT	15 (26,32)	34 (23,45)	0.669
CT/TT	21 (36.84)	56 (38.62)	0.815
<i>UGT2B7</i>			
AA	47 (82.46)	116 (80.00)	0.691
AG	10 (17.54)	28 (19.31)	0.772
GG	0 (0.00)	1 (0.69)	0.718
AG/GG	10 (17.54)	29 (20.00)	0.691

Tabela V. Risco relativo de recorrência associado ao fenótipo predito de CYP2D6, genótipo MAOA e UGT2B7

Gene, fenótipo predito e genótipo	Recorrência n (%)	Sem recorrência n (%)	RR (IC 95%)	p value
CYP2D6 gIM/gPM	17 (35.42)	29 (22.31)	1.57 (0.97 - 2.56)	0.068
MAOA genótipo CT/TT	21 (36.84)	56 (38.62)	0.95 (0.60 - 1.96)	0.815
UGT2B7 genótipo AG/GG	10 (17.54)	29 (20.00)	0.89 (0.49 - 1.60)	0.695

Tabela VI. Níveis de PQ no D7 entre os grupos caso e controle em relação aos fenótipos preditos de CYP2D6 e genótipos de MAOA e UGT2B7

Gene, grupo e fenótipos/genótipos	N° de participantes	N° (%) de participantes com clareamento de formas sexuadas em:			Média dos níveis de PQ (ng/mL) no D7 (IC 95%)
		D2	D3	D5	
CYP2D6					
Recorrência					
gNM	9	2 (40.0)	2 (40.0)	1 (20.0)	153.32 (116.15 – 190.50)
gIM/ gPM	4	0 (0.00)	1 (50.0)	1 (50.0)	134.00 (19.35 – 248.65)
<i>p value</i>		0.48	0.71	0.52	0.6486
Sem recorrência					
gNM	41	8 (33.33)	16 (66.67)	0 (0.00)	162.55 (136.06 – 189.04)
gIM/ gPM	6	2 (40.00)	2 (40.00)	1 (20.00)	164.38 (66.96 – 261.80)
<i>p value</i>		0.58	0.27	0.17	0.9649
MAO-A					
Recorrência					
CC	8	1 (33.33)	1 (33.33)	5 (33.33)	138.90 (99.40 – 178.39)
CT/TT	5	1 (25.00)	2 (50.00)	1 (25.00)	160.95 (77.19 – 244.70)

<i>p value</i>		0.71	0.63	0.71	0.5444
Sem recorrência					
CC	30	6 (30.00)	13 (65.00)	1 (5.00)	163.42 (136.07 – 190.78)
CT/TT	17	4 (44.44)	5 (55.56)	0 (0.00)	161.65 (108.80 – 214.50)
<i>p value</i>		0.36	0.47	0.69	0.9506
UGT2B7					
Recorrência					
AA	8	1 (25.00)	1 (25.00)	2 (50.00)	158.26 (109.38 – 207.14)
AG	5	1 (33.33)	2 (66.67)	0 (0.00)	129.97 (71.31 – 188.63)
<i>p value</i>		0.71	0.37	0.29	0.3610
Sem recorrência					
AA	37	9 (36.00)	15 (60.00)	1 (4.00)	168.79 (138.27 – 199.32)
AG	10	1 (25.00)	3 (75.00)	0 (0.00)	140.55 (109.77 – 171.32)
<i>P value</i>		0.57	0.50	0.87	0.1734

REFERÊNCIAS

1. WHO. World Malaria Report 2021. World Malaria report Geneva: World Health Organization. (2021). Licence: CC. 2021. 2013–2015 p.
2. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil. *Bol Epidemiológico*. 2022;53:1–17.
3. Zanghi G, Vaughan AM. *Plasmodium vivax* pre-erythrocytic stages and the latent hypnozoite. *Parasitol Int* [Internet]. 2021;85(August):102447. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102447>
4. 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*. 2016;283(1827).
5. Chu CS, White NJ. Management of relapsing *Plasmodium vivax* malaria. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2016;14(10):885–900. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2016.1220304>
6. 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):1.
7. 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;12(1):1–7.
8. Potter BMJ, Xie LH, Vuong C, Zhang J, Zhang P, Duan D, et al. Differential CYP 2D6 metabolism alters primaquine pharmacokinetics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(4):2380–7.
9. Jason W Bennett, Brandon S Pybus, Anjali Yadava, Donna Tosh, Jason C Sousa, William F McCarthy, Gregory Deye, Victor Melendez CFO. Primaquine Failure and Cytochrome P-450 2D6 in *Plasmodium vivax*. 2013;
10. 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;17(1):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2139-7>
11. 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*. 2020;13:1–12.
12. 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*. 2014;39(2):139–46.
 13. Ariffin NM, Islahudin F, Kumolosasi E, Makmor-bakry M. Effects of MAO-A and CYP450 on primaquine metabolism in healthy volunteers. *Parasitol Res*. 2019;
 14. Pharmacogene Variation Consortium - PharmVar (2022) [Internet]. Available from: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>
 15. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Klein T, Steven Leeder J. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet Med*. 2017;19(1):69–76.
 16. Caudle KE, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Swen JJ, Haidar CE, Klein TE, et al. Standardizing CYP2D6 Genotype to Phenotype Translation: Consensus Recommendations from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group. *Clin Transl Sci*. 2020;13(1):116–24.
 17. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med*. 2006;57:119–37.
 18. 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*. 2014;10(11):1569–83.
 19. 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. *PLoS One*. 2014;9(10):5–12.
 20. Park YA, Park KH, Yoon HY, Yee J, Gwak HS. Effects of CYP2D6 genotypes on Plasmodium vivax recurrence after primaquine treatment: A meta-analysis. *Travel Med Infect Dis* [Internet]. 2022;48(April):102333. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2022.102333>
 21. Cardoso JLM, Salazar YEAR, Almeida ACG, Barbosa LRA, Silva EL, Rodrigues MGA, et al. Influence of CYP2D6, CYP3A4 and CYP2C19 Genotypes on

- Recurrence of *Plasmodium vivax*. *Front Trop Dis*. 2022;3(March):1–11.
22. 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*. 2016;11(7):1–14.
 23. 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*. 2020;64(5):1–14.
 24. Constantino L, Paixão P, Moreira R, Portela MJ, Do Rosario VE, Iley J. Metabolism of primaquine by liver homogenate fractions. Evidence for monoamine oxidase and cytochrome P450 involvement in the oxidative deamination of primaquine to carboxyprimaquine. *Exp Toxicol Pathol*. 1999;51(4–5):299–303.
 25. Hotamisligil GS, Breakefield XO. Human monoamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity. *Am J Hum Genet*. 1991;49(2):383–92.
 26. Mello AGNC, Vieira MVDF, de Sena LWP, da Paixão TP, Pinto ACG, Grisólia DP de A, et al. Levels of primaquine and carboxyprimaquine in patients with malaria *vivax* from the Brazilian Amazon basin. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2018;60(September):1–6.
 27. Joan Ingram RH, Crenna-Darusallam C, Soebianto S, Noviyanti R, Kevin Baird J. The clinical and public health problem of relapse despite primaquine therapy: Case review of repeated relapses of *Plasmodium vivax* acquired in Papua New Guinea. *Malar J*. 2014;13(1):1–7.
 28. 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*. 2018;1(4):4–15.

4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

Reconhecemos que este trabalho possui limitações, tais como: número limitado de indivíduos com recorrência de malária por *P. vivax*; fenótipos preditos de CYP2D6 foram baseados nos genótipos inferidos; ainda, houve impossibilidade de dosar o metabolito da PQ (carboxiprimaquina) e avaliar microssatélites para classificação das recorrências.

Entretanto, nossos resultados conseguiram demonstrar que indivíduos com *status* de metabolizador normal possuem menor risco de recorrência de malária por *P. vivax*. Sendo assim, espera-se que este trabalho possa contribuir futuramente no manejo e monitoramento das terapias com antimaláricos, bem como no ajuste de dose de PQ baseada no *status* CYP2D6.

5. CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa reforçam a hipótese de que a variabilidade genética de *CYP2D6* em indivíduos com malária por *P. vivax* diminui a atividade da enzima *CYP2D6* no metabolismo da PQ, levando as recorrências da doença em razão da eliminação inadequada dos hipnozoítos, sugerindo que a eficácia do medicamento pode estar relacionada com o genótipo de cada indivíduo. Já em relação a MAO-A e UGT2B7, embora estudos tenham relacionado polimorfismos nos genes codificadores destas enzimas ao metabolismo diminuído da PQ e as recorrências de *P. vivax*, neste estudo não foi possível demonstrar contribuição semelhante.

Assim, as principais contribuições do estudo incluem: descrição de menor risco de recorrência das infecções por *P. vivax* em indivíduos com função normal de *CYP2D6* (fenótipo predito gNM), sugestivo de sucesso terapêutico com a PQ; risco aumentado de recorrência de malária por *P. vivax* em portadores do alelo de função diminuída *41 de *CYP2D6*; e dados de frequência de polimorfismos de *CYP2D6* na região Amazônica.

Certamente estes achados reforçam a necessidade da realização de mais estudos relacionando fatores farmacogenéticos às recorrências de *P. vivax*, para fortalecer a compreensão do impacto das mudanças na atividade metabólica de CYPs e outras enzimas metabolizadoras de antimaláricos em diferentes estágios da malária, na tentativa de solucionar o problema da ineficácia terapêutica decorrente da variabilidade genética.

6. REFERÊNCIAS

1. WHO. World Malaria Report 2021. World Malaria report Geneva: World Health Organization. (2021). Licence: CC. 2021. 2013–2015 p.
2. Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of plasmodium knowlesi. Clin Microbiol Rev. 2013;26(2):165–84.
3. 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;5(10):e1038–46.
4. Kotepui M, Masangkay FR, Kotepui KU, Milanez GDJ. Preliminary review on the prevalence, proportion, geographical distribution, and characteristics of naturally acquired Plasmodium cynomolgi infection in mosquitoes, macaques, and humans: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis. 2021;21(1):1–14.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Guia de tratamento da malária no Brasil [Internet]. 2020. Available from: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/29/af-guia-tratamento-malaria-28jan20-isbn.pdf>
6. 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 [Internet]. 2019;394(10195):332–43. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31096-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31096-7)
7. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, et al. A global map of dominant malaria vectors. Parasites and Vectors [Internet]. 2012;5(1):69. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/69>
8. 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;110(1):1–25.

9. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil. *Bol Epidemiológico*. 2022;53:1–17.
10. Frischknecht F, Matuschewski K. Plasmodium sporozoite biology. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(5):1–14.
11. Venugopal K, Hentzschel F, Valkiūnas G, Marti M. Plasmodium asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(3):177–89.
12. 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* [Internet]. 2009;9(9):555–66. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X)
13. Elamaran Meibalan and Matthias Marti. The biology of malaria transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2017;87–124. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5334247/pdf/cshperspectmed-MLR-a025452.pdf>
14. Ngotho P, Soares AB, Hentzschel F, Achcar F, Bertuccini L, Marti M. Revisiting gametocyte biology in malaria parasites. *FEMS Microbiol Rev*. 2019;43(4):401–14.
15. Angrisano F, Robinson LJ. Plasmodium vivax – How hidden reservoirs hinder global malaria elimination. *Parasitol Int* [Internet]. 2022;87:102526. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102526>
16. Bantuchai S, Imad H, Nguitragool W. Plasmodium vivax gametocytes and transmission. *Parasitol Int* [Internet]. 2022;87:102497. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102497>
17. Almeida ACG, Kuehn A, Castro AJM, Vitor-Silva S, Figueiredo EFG, Brasil LW, et al. High proportions of asymptomatic and submicroscopic Plasmodium vivax infections in a peri-urban area of low transmission in the Brazilian Amazon. *Parasites and Vectors*. 2018;11(1):1–13.

18. Shanks GD, White NJ. The activation of vivax malaria hypnozoites by infectious diseases. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2013;13(10):900–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70095-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70095-1)
19. Battle KE, Karhunen MS, Bhatt S, Gething PW, Howes RE, Golding N, et al. Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. *Malar J*. 2014;13(1):1–16.
20. Malleret B, Li A, Zhang R, Tan KSW, Suwanarusk R, Claser C, et al. *Plasmodium vivax*: Restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. *Blood*. 2015;125(8):1314–24.
21. Baro B, Deroost K, Raiol T, Brito M, Almeida ACG, de Menezes-Neto A, et al. *Plasmodium vivax* gametocytes in the bone marrow of an acute malaria patient and changes in the erythroid miRNA profile. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(4):6–13.
22. Obaldia N, Meibalan E, Sa JM, Ma S, Clark MA, Mejia P, et al. Bone marrow is a major parasite reservoir in *plasmodium vivax* infection. *MBio*. 2018;9(3):1–16.
23. Machado Siqueira A, Lopes Magalhães BM, Cardoso Melo G, Ferrer M, Castillo P, Martin-Jaular L, et al. Spleen Rupture in a Case of Untreated *Plasmodium vivax* Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(12):1–5.
24. Kho S, Qotrunnada L, Leonardo L, Andries B, Wardani PAI, Fricot A, et al. Evaluation of splenic accumulation and colocalization of immature reticulocytes and *Plasmodium vivax* in asymptomatic malaria: A prospective human splenectomy study [Internet]. Vol. 18, *PLoS Medicine*. 2021. 1–35 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1003632>
25. Bartoloni A, Zammarchi L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012;4(1).
26. Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. Clinical review: Severe malaria. *Crit Care*. 2003;7(4):315–23.
27. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria - 3rd

- edition [Internet]. 2015. Available from: <https://www.who.int/docs/default-source/documents/publications/gmp/guidelines-for-the-treatment-of-malaria-eng.pdf>
28. Ngasala B, Bushukatale S. Evaluation of malaria microscopy diagnostic performance at private health facilities in Tanzania. *Malar J* [Internet]. 2019;18(1):1–7. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2998-1>
 29. Cunningham J, Jones S, Gatton ML, Barnwell JW, Cheng Q, Chiodini PL, et al. A review of the WHO malaria rapid diagnostic test product testing programme (2008-2018): Performance, procurement and policy. *Malar J* [Internet]. 2019;18(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-3028-z>
 30. Zhu W, Ling XX, Shang W, Du Y, Liu J, Cao Y, et al. High value of rapid diagnostic tests to diagnose malaria within children: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Health*. 2020;10(1).
 31. Golassa L, Enweji N, Erko B, Aseffa A, Swedberg G. Detection of a substantial number of sub-microscopic *Plasmodium falciparum* infections by polymerase chain reaction: A potential threat to malaria control and diagnosis in Ethiopia. *Malar J* [Internet]. 2013;12(1):1. Available from: Malaria Journal
 32. 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. *PLoS Med*. 2012;9(2).
 33. Alven S, Aderibigbe B. Combination therapy strategies for the treatment of malaria. *Molecules*. 2019;24(19).
 34. Simões, Luciano Rodrigues ER, Ribatski-silva D, Gomes LT. Fatores associados às recidivas de malária causada por *Plasmodium vivax* no Município de Porto Velho , Rondônia, Brasil , 2009. *Cad Saúde Pública*, Rio Janeiroa [Internet]. 2014;30(7):1–15. Available from: http://www.scielo.br/pdf/csp/v30n7/pt_0102-311X-csp-30-7-1403.pdf

35. Brasil. Ministério da Saúde. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. 5. ed. Brasília; 2021. 1.126 p. : il.
36. Chu CS, White NJ. Management of relapsing *Plasmodium vivax* malaria. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2016;14(10):885–900. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2016.1220304>
37. John GK, Douglas NM, Von Seidlein L, Nosten F, Baird JK, White NJ, et al. Primaquine radical cure of *Plasmodium vivax*: A critical review of the literature. *Malar J*. 2012;11:1–11.
38. Durand S, Cabezas C, Lescano AG, Galvez M, Gutierrez S, Arrospide N, et al. Efficacy of three different regimens of primaquine for the prevention of relapses of *Plasmodium vivax* malaria in the Amazon Basin of Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;91(1):18–26.
39. Daher A, Silva JCAL, Stevens A, Marchesini P, Fontes CJ, Ter Kuile FO, et al. Evaluation of *Plasmodium vivax* malaria recurrence in Brazil. *Malar J* [Internet]. 2019;18(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2644-y>
40. 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*. 2020;13:1–12.
41. 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;12(1):1–7.
42. Hodel EMS, Csajka C, Ariey F, Guidi M, Kabanywany AM, Duong S, et al. Effect of single nucleotide polymorphisms in cytochrome P450 isoenzyme and N-acetyltransferase 2 genes on the metabolism of artemisinin-based combination therapies in malaria patients from Cambodia and Tanzania. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(2):950–8.
43. Jason W Bennett, Brandon S Pybus, Anjali Yadava, Donna Tosh, Jason C Sousa, William F McCarthy, Gregory Deye, Victor Melendez CFO. Primaquine Failure and Cytochrome P-450 2D6 in *Plasmodium vivax*.

- 2013;
44. 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;17(1):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2139-7>
 45. 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*. 2014;39(2):139–46.
 46. Ariffin NM, Islahudin F, Kumolosasi E, Makmor-bakry M. Effects of MAO-A and CYP450 on primaquine metabolism in healthy volunteers. *Parasitol Res*. 2019;
 47. Lynch T, Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician*. 2007;76(3):391–6.
 48. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Klein T, Steven Leeder J. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet Med*. 2017;19(1):69–76.
 49. Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem*. 2008;392(6):1093–108.
 50. Phillips KA, Veenstra DL, Oren E, Lee JK, Sadee W. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: A systematic review. *Jama*. 2001;286(18):2270–9.
 51. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): Clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J*. 2005;5(1):6–13.
 52. 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. PLoS One. 2014;9(10):5–12.
53. 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. 2020;64(5):1–14.
 54. Caudle KE, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Swen JJ, Haidar CE, Klein TE, et al. Standardizing CYP2D6 Genotype to Phenotype Translation: Consensus Recommendations from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group. Clin Transl Sci. 2020;13(1):116–24.
 55. 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. 2014;10(11):1569–83.
 56. Rodrigues-Soares F, Kehdy FSG, Sampaio-Coelho J, Andrade PXC, Céspedes-Garro C, Zolini C, et al. Genetic structure of pharmacogenetic biomarkers in Brazil inferred from a systematic review and population-based cohorts: a RIBEF/EPIGEN-Brazil initiative. Pharmacogenomics J [Internet]. 2018;18(6):749–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41397-018-0015-7>
 57. 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 [Internet]. 2013;12(1):1. Available from: Malaria Journal
 58. Potter BMJ, Xie LH, Vuong C, Zhang J, Zhang P, Duan D, et al. Differential CYP 2D6 metabolism alters primaquine pharmacokinetics. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(4):2380–7.
 59. Joan Ingram RH, Crenna-Darusallam C, Soebianto S, Noviyanti R, Kevin Baird J. The clinical and public health problem of relapse despite primaquine therapy: Case review of repeated relapses of Plasmodium vivax acquired in Papua New Guinea. Malar J. 2014;13(1):1–7.
 60. 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*. 2016;11(7):1–14.
61. Park YA, Park KH, Yoon HY, Yee J, Gwak HS. Effects of CYP2D6 genotypes on Plasmodium vivax recurrence after primaquine treatment: A meta-analysis. *Travel Med Infect Dis [Internet]*. 2022;48(April):102333. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2022.102333>
62. Cardoso JLM, Salazar YEAR, Almeida ACG, Barbosa LRA, Silva EL, Rodrigues MGA, et al. Influence of CYP2D6, CYP3A4 and CYP2C19 Genotypes on Recurrence of Plasmodium vivax. *Front Trop Dis*. 2022;3(March):1–11.
63. Marco Bortolato, Kevin Chen and JCS. Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;
64. Nishioka SA, Perin EA, Sampaio AS, Cordeiro Q, Cappi C, Mastrorosa SR, et al. The role of the VNTR functional polymorphism of the promoter region of the MAOA gene on psychiatric disorders. *role VNTR Funct Polymorph Promot Reg MAOA gene Psychiatr Disord*. 2011;38(1):34–42.
65. Alexis C. Edwards, Kenneth A. Dodge, Shawn J. Latendresse JEL, John E. Bates, Gregory S. Pettit, John P. Budde, Alison M. Goate and DMD. MAOA uVNTR and Early Physical Discipline Interact to Influence Delinquent Behavior. *J Child Psychol Psychiatry*. 2010;
66. Fan M, Liu B, Jiang T, Jiang X, Zhao H, Zhang J. Meta-analysis of the association between the monoamine oxidase-A gene and mood disorders. *Psychiatr Genet*. 2010;20(1):1–7.
67. Hotamisligil GS, Breakefield XO. Human monoamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity. *Am J Hum Genet*. 1991;49(2):383–92.
68. Sabol SZ, Hu S, Hamer D. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum Genet*. 1998;103(3):273–9.
69. Constantino L, Paixão P, Moreira R, Portela MJ, Do Rosario VE, Iley J.

- Metabolism of primaquine by liver homogenate fractions. Evidence for monoamine oxidase and cytochrome P450 involvement in the oxidative deamination of primaquine to carboxyprimaquine. *Exp Toxicol Pathol.* 1999;51(4–5):299–303.
70. Guillemette C. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J.* 2003;3(3):136–58.
 71. Holthe M, Rakvåg TN, Klepstad P, Idle JR, Kaasa S, Krokan HE, et al. Sequence variations in the UDP - Glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) gene: Identification of 10 novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) and analysis of their relevance to morphine glucoronidation in cancer patients. *Pharmacogenomics J.* 2003;3(1):17–26.
 72. Court MH. Interindividual variability in hepatic drug glucuronidation: Studies into the role of age, sex, enzyme inducers, and genetic polymorphism using the human liver bank as a model system. *Drug Metab Rev.* 2010;
 73. Čolić A, Alessandrini M, Pepper MS. Pharmacogenetics of CYP2B6, CYP2A6 and UGT2B7 in HIV treatment in African populations: Focus on efavirenz and nevirapine. *Drug Metab Rev.* 2015;47(2):111–23.
 74. Ngaimisi E, Habtewold A, Minzi O, Makonnen E, Mugusi S, Amogne W, et al. Importance of Ethnicity, CYP2B6 and ABCB1 Genotype for Efavirenz Pharmacokinetics and Treatment Outcomes: A Parallel-Group Prospective Cohort Study in Two Sub-Saharan Africa Populations. *PLoS One.* 2013;8(7).
 75. Rajeev K, Mehlotra, Moses J, Bockarie PAZ. Prevalence of UGT1A9 and UGT2B7 nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in West African, Papua New Guinean, and North American populations. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007;

7.2 Equipe do estudo

Participante	Vínculo	Formação	Função
Gabrielly Santos da Silva	UEA/FMT-HVD	Biomédica	Coordenadora
Flávia Alencar Fontenelle	FMT-HVD	Biomédica	Colaboradora
Amanda de Oliveira Carvalho	UEA/FMT-HVD	Biomédica	Colaboradora
Marielle Machado Macêdo	UEA/HEMOAM	Biomédica	Colaboradora
Victor Irungu Mwangi	UEA/FMT-HVD	Biomédico	Colaborador
Manuela Crispim Morais	UFAM/FMT-HVD	Iniciação Científica	Colaboradora
Kim Vinícius Amaral Machado	UEA/FMT-HVD	Enfermeiro	Colaborador
Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda	FIOCRUZ/FMT-HVD	Médico	Colaborador
Rebeca Linhares de Abreu Netto	UEA/FMT-HVD	Farmacêutica	Colaboradora
Profa. Dra. Anne Cristine Gomes de Almeida	FMT-HVD	Farmacêutica	Co-orientadora
Profa. Dra. Gisely Cardoso de Melo	UEA/FMT-HVD	Farmacêutica	Orientadora

7.3 Procedimento operacional padrão – POP Extração de DNA

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

Código POP	POP_IPCCB_LB_003_v03D_PT		
Título	Procedimento para extração de DNA de <i>Plasmodium</i> spp. a partir de sangue Total, utilizando o QIAmp DNA kit (Qiagen®).		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Gisely Cardoso de Melo; Anne Cristine Gomes de Almeida	Revisado por: Gisely Cardoso de Melo	Aprovado por:	Data de aplicação:
Data e assinatura	Data e assinatura	Data e assinatura	Data da próxima revisão:

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

Emenda	Razão da emenda
V02	Revisão dos procedimentos de extração.
V03	Alteração do título do POP.

1. OBJETIVOS

Descrever o procedimento da extração de DNA de *Plasmodium* spp. a partir de sangue total.

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica.

3. APLICÁVEL A

Análise no laboratório de biologia molecular de amostras relacionadas à pesquisa.

4. RESPONSABILIDADES

Pessoal encarregado da coleta das amostras da pesquisa.

Equipe do laboratório de biologia molecular.

5. POP'S RELACIONADOS

- Seguimento dos participantes no estudo "Epidemiologia da Malária no Município do Careiro, Amazonas" (versão atual do POP_IPCCB_TC_002).

- Caracterização da Malária Grave por *Plasmodium vivax* na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Brasil (versão atual do **POP_IPCCB_HO_001**).
- Procedimento para a realização de PCR em tempo real para detecção de plasmódio (versão atual do **POP_IPCCB_LB_002**).
- Procedimento para realização de PCR em tempo real para detecção de DNA de plasmódio (qPCR) – versão atual do **POP_PCCB_LB_021**.

6. PROCEDIMENTOS

a. Recursos necessários

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

ii. Materiais

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

6.1.3 Equipamentos

1. Centrífuga
2. Vortex
3. 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 de biologia molecular, os papéis de filtro serão armazenados seguindo a mesma ordem que as lâminas. Isto é, seguindo a numeração das caixas de lâminas: cada caixa de papéis de filtro terá no máximo 50 amostras, seguindo a ordem das lâminas.

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. No laboratório de biologia molecular, os criotubos serão armazenados seguindo a mesma ordem que as lâminas.

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 (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 °C por 10 minutos.
5. Continuar com o procedimento comum (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 50 µL de tampão AE ou água destilada e incubar à temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.

7. Armazenar por -20°C.

6.4 Biossegurança

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

7. REFERÊNCIAS

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

8. REGISTRO DOS ANEXOS

TÍTULO DO ANEXO		CÓDIGO DO ANEXO (Incluindo versão/idioma):	
NOME DO ANEXO:		CÓDIGO DO ANEXO (Incluindo versão/idioma):	
Novo		Criado por:	Aprovado por:
Revisão			Data e assinatura
Tradução			Data e assinatura

1. DECLARAÇÃO

Este documento se refere à versão final deste POP e encontra-se em vigor a partir da data estipulada no cabeçalho.

7.4 Procedimento operacional padrão – POP Genotipagem

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

Código POP	POP_IPCCB_LB_044_v01D_PT		
Título	Procedimento para realização da genotipagem de SNPs de enzimas do citocromo P450 (CYPs) utilizando sistema TaqMan [®]		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Jaiana Larissa de Moraes Cardoso	Revisado por: Anne Cristine Gomes de Almeida	Aprovado por: Gisely Cardoso de Melo	Data de aplicação: 23/08/2019
Data e assinatura	Data e assinatura	Data e assinatura	Data da próxima revisão:

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

1. OBJETIVOS

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

1. 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.

2. APLICAÇÃO

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

3. RESPONSABILIDADES

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

4. 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

5. Recursos necessários

6.1. 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

6.2. Equipamentos

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

6.3. Reagentes

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

6. Reação de genotipagem

7.1. 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.

7.2. 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=5µL)

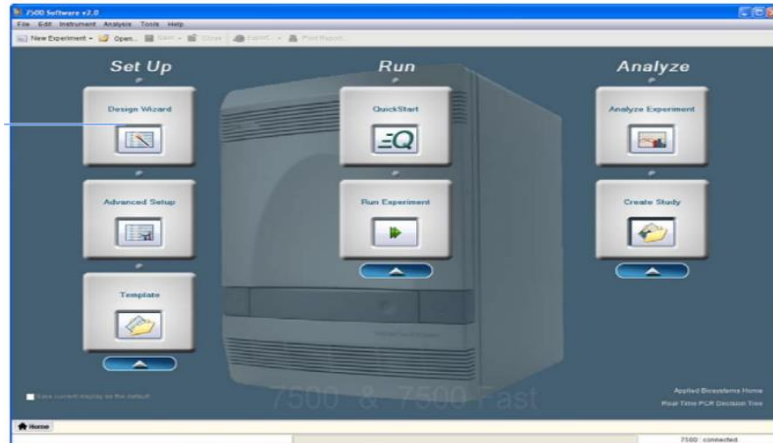
Mastermix universal	2,5µL
Sonda de genotipagem	0,25µL

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*.

- Centrifugar o mix e pipetar 2,75µL em cada poço da microplaca;
- Cobrir a microplaca e seguir para a bancada de manipulação de DNA.

7.3. Montagem da placa de genotipagem

- a. Vortexar e/ou centrifugar todos os tubos e microplacas de armazenamento de DNA;
- b. Pipetar 2,25µL de DNA em cada poço da microplaca de genotipagem contendo o mix de genotipagem;
- c. Os controles negativos devem ser feitos misturando 2,25µL de água (miliQ/água para injeção/água nuclease free) em cada poço



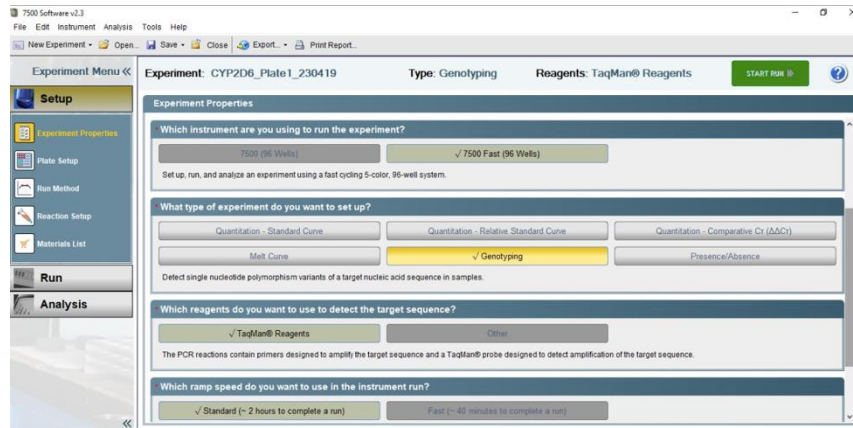
selecionado como controle negativo;

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

7.4. Reação de PCR real time

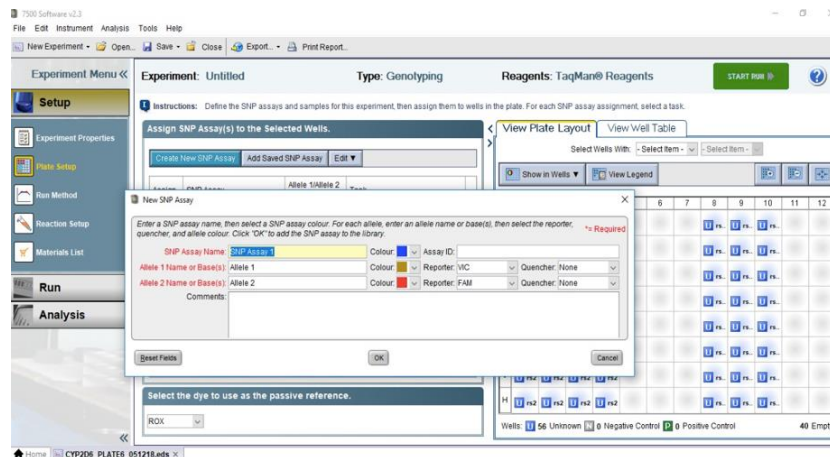
- a. A reação de PCR real time utiliza o software Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR System;
- b. Selecionar Advanced Setup na tela inicial;
- c. No Experiment Menu -> SETUP -> Experiment properties:
 - Identificar o nome do experimento;
 - Instrumento de corrida: 7500 fast (96wells);
 - Tipo de experimento: Genotyping;
 - Reagente: TaqMan® Reagents;

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



d. No Experiment Menu -> SETUP -> Plate setup

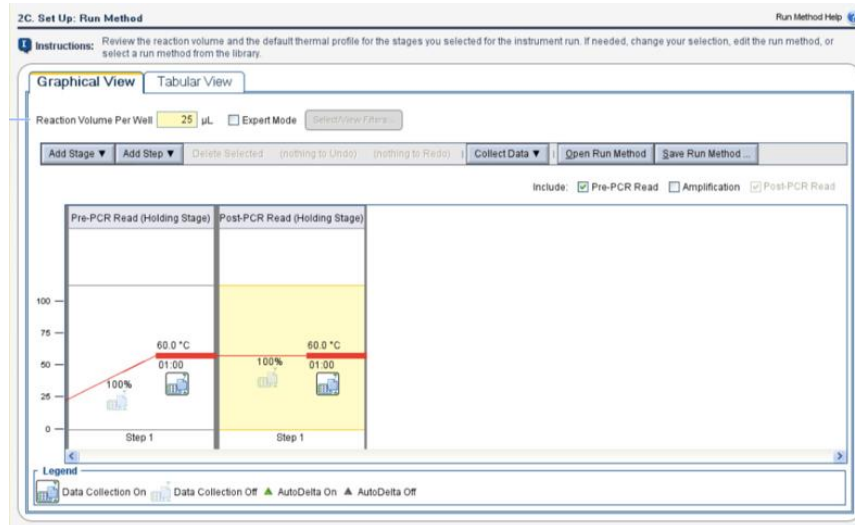
- Atribuir SNP assay;
- Criar novo SNP assay;
- Identificar o SNP assay;
- Definir alelo 1 ou base e selecionar VIC.
- Definir alelo 2 ou base e selecionar FAM;
- No Plate layout, selecionar os poços e definir o SNP assay.



e. No Experiment Menu -> SETUP -> Run method

- Para configurar a corrida, preencha a quantidade de μL da reação. A reação

pode ter entre 10 e 30 μL ;



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

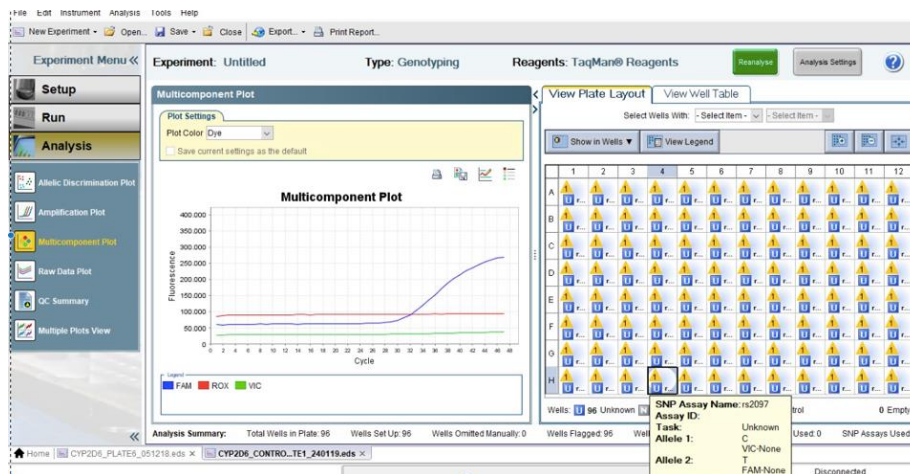
Stage/Step	Pre-PCR Read	Thermal Cycling (Performed on a dedicated thermal cycler)			Post-PCR Read
	Holding Stage	Holding Stage	Cycling (50 cycles)		Holding Stage
			Denature	Anneal/Extend	
Temperature	60 °C	95 °C	92 °C	60 °C	60 °C
Time (mm:ss)	00:30	10:00	00:15	01:30	00:30
Data Collection	Yes	No	No	Yes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

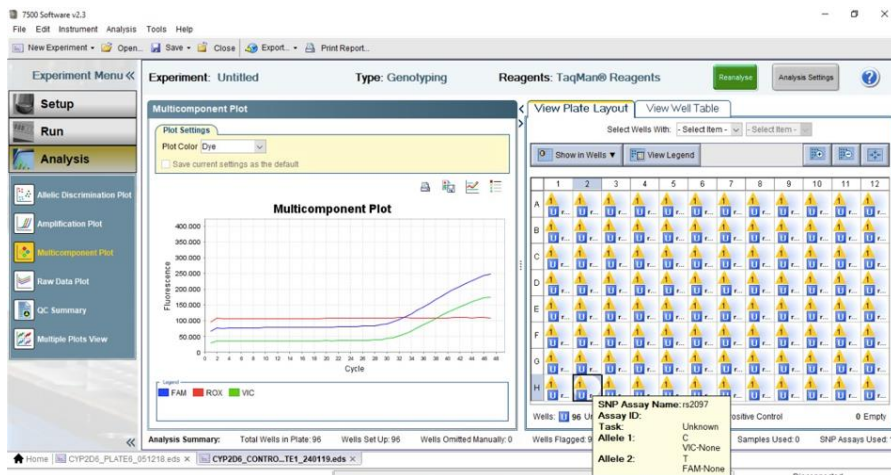
7.5. Análise da reação e definição do haplótipo

- No Experiment Menu -> ANALYSIS -> Multicomponent plot, analisar as curvas de genotipagem;

b. Curva 1, curva de amostra heterozigoto para o alelo o SNP



c. Curva 2, curva de amostra homozigoto para o alelo o SNP



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

8. CYP2D6

- A enzima CYP2D6 requer etapas extras para realização da genotipagem

8.1. Definição do diplótipo para CYP2D6

- a. A definição do diplótipo deve ser feita no software Haplo.Stats, implementado na plataforma R.
- b. A definição dos alelos deve ser feita de acordo com a nomenclatura estabelecida em Pharmacogene Variation (PharmVar) Consortium;
- c. Para a designação de alelos, apenas devem ser consideradas combinações perfeitas.
- d. O alelo CYP2D6 *1 será determinado quando nenhuma alteração nucleotídica for observada em todos os SNPs genotipados (Tabela 1).
- e. Em casos de combinações de SNP que não podem ser atribuída a alelos conhecidos, estes devem agrupados como outros.

8.2. Reação CNV

8.2.1. Concentração de DNA

- a. É necessário que a concentração de DNA das amostras seja igual a 5ng/μL;
- b. Com o auxílio do equipamento Nanodrop, dosar a concentração de DNA;
- c. 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.

8.2.2. Preparação do Mix

- a. 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);
- b. Ligar a luz UV (germicida) da capela de fluxo laminar cerca de 30 minutos antes do início do preparo. Após esse período desligar;
- c. Com o fluxo laminar da cabine em operação, proceder o preparo do mix;
- d. Centrifugar a sonda e a RNase P;

- e. Em um tubo eppendorf, pipetar os reagentes nas seguintes proporções;

1x (VF=5μL)	
Mastermix universal	5 μ L
TaqMan® copy number assay	0,5 μ L
RNAse P	0,5 μ L
Água nuclease Fre	2 μ L

- f. Centrifugar o mix e pipetar 8 μ L em cada poço da microplaca;
 g. Cobrir a microplaca e seguir para a bancada de manipulação de DNA.

8.2.3. Montagem da placa de PCR

- Vortexar e/ou centrifugar todos os tubos e microplacas de armazenamento de DNA;
- Pipetar 2 μ 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 μ 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;

8.2.4. 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.

d. No Experiment Menu -> SETUP -> Run method

- Para configurar a corrida, preencha a quantidade de μL da reação;

Experiment: CYP2D6_CNV_090419 Type: Standard Curve Reagents: TaqMan® Reagents START RUN

Define Targets and Samples Assign Targets and Samples

Instructions: Define the targets to quantify and the samples to test in the reaction plate.

Define Targets

Target Name	Reporter	Quencher	Colour
RNase P TAMRA	VIC	TAMRA	Blue
CYP2D6	FAM	NFQ-MGB	Blue

Define Samples

Sample Name	Colour
COA28	Green
COA15	Blue
COA39	Green

Define Biological Replicate Groups

Instructions: For each biological replicate group in the reaction plate, click Add Biological Group, then define the biological group.

Biological Group Name	Color	Comments
-----------------------	-------	----------

Assign Targets and Samples

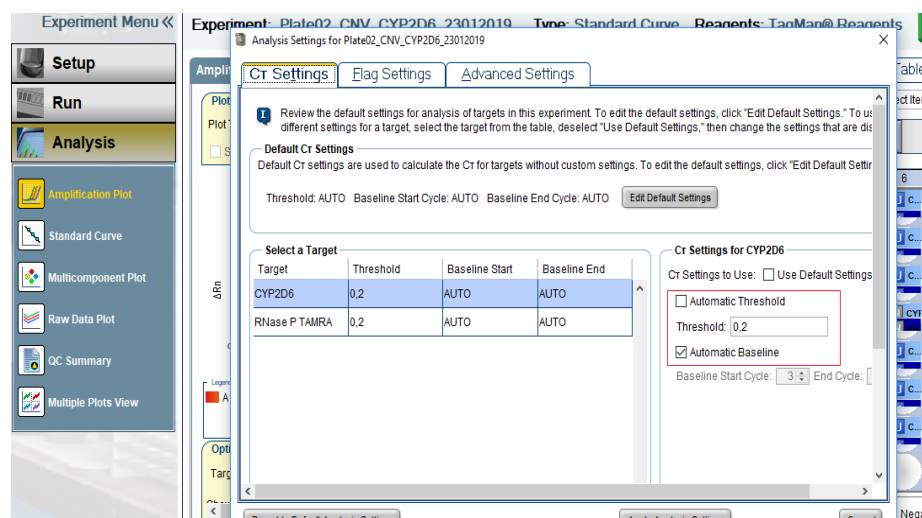
- Na aba Tabular View selecione os tempos e temperatura da reação.

e. Após configurar PCR, conferir o Plate layout e salvar a reação;

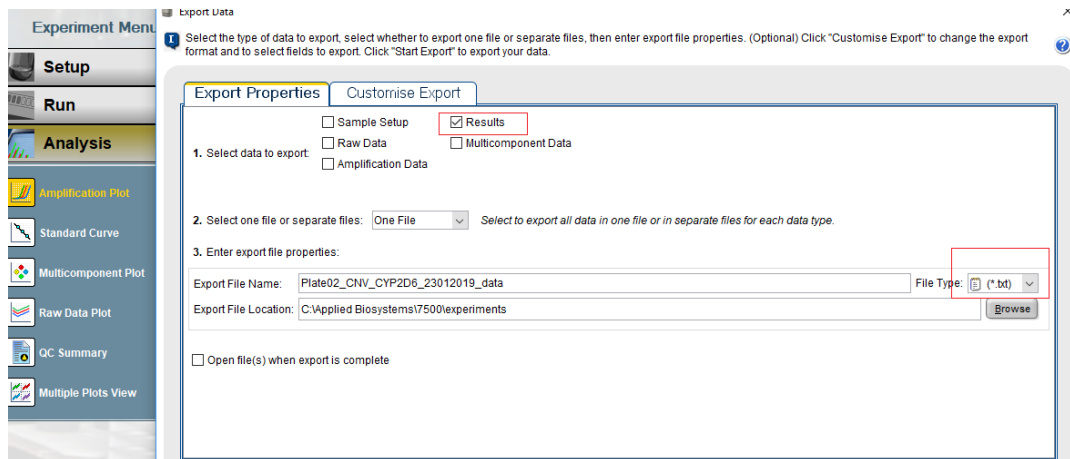
- Em seguida, clicar no botão START RUN.
- O desenho da reação pode ser salvo como template para as demais análises;

8.2.5. Análise do resultado

- a. 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”.
- b. 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.



- c. Voltar à tela principal. Selecionar todos os poços. Clicar em “Export”
- d. 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”.



- e. Na janela “Customise export”, buscar a opção “Field Separator” → marcar a opção **Commas**.
- f. Clicar em “Start Export”. Verificar se o arquivo “.txt” foi gerado. Fechar o software do aparelho.
- g. Após estes procedimentos, a análise de CNV será feita utilizando o software *CopyCaller*, disponível para download no site da empresa ThermoFisher.

9. 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

7.5 Procedimento operacional padrão – POP Determinação de Haplótipos

Title: Laboratory SOP Format (Generic Template – International)
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LB_050_PT		
Título	Procedimento para determinação de haplótipos do gene CYP2D6 utilizando o Haplo-stats (ambiente R) e predição do fenótipo enzimático.		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Fernanda R. Soares Anne C. G. de Almeida Yanka E. Salazar	Revisado por: Gisely C de Melo	Aprovado por: Gisely C de Melo	Data de aplicação:
Data e assinatura	Data e assinatura	Data e assinatura	Data da próxima revisão:

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

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 para 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

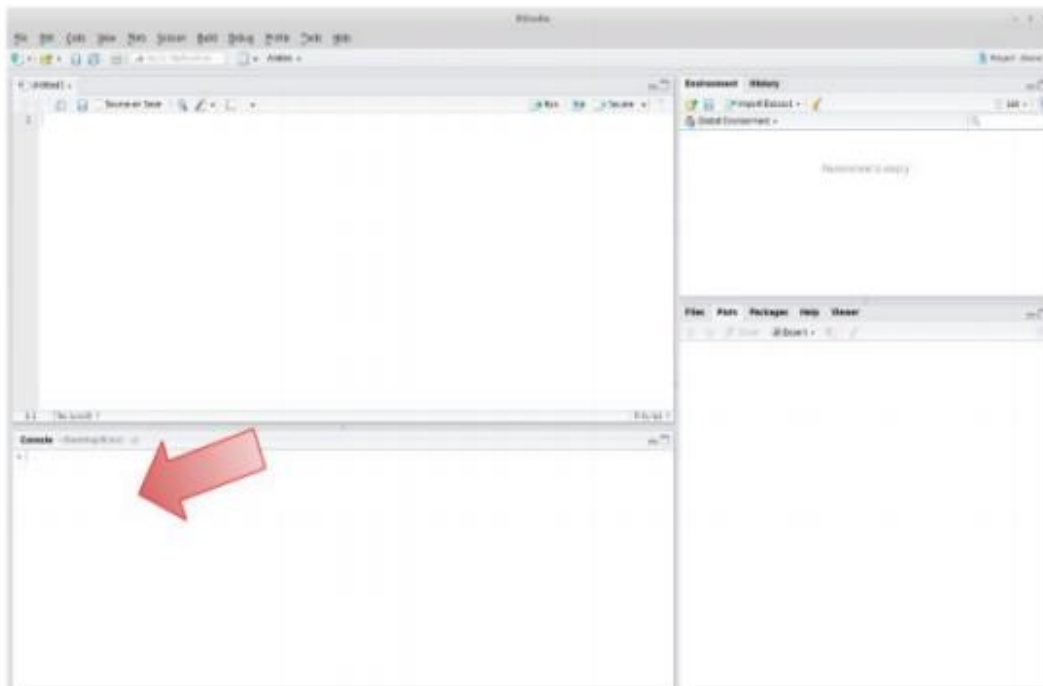
- Procedimento para extração de DNA de *Plasmodium* spp. a partir de sangue total, utilizando o QIAmp DNA kit (Qiagen®) - POP_IPCCB_LB_003_v03D_PT
- Procedimento para realização da genotipagem de SNPs de enzimas do citocromo P450 (CYPs) utilizando sistema TaqMan® - POP_IPCCB_LB_044_v01D_PT

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**
 - 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:

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	1584C>G		31G>A		100C>T		1023C>T		1846G>A		2549G>A	
2	C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
3	C	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
4	G	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
5	C	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
6	C	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
7	C	G	G	G	C	T	C	C	G	G	A	A
8	C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
9	C	C	G	G	T	T	C	C	A	A	A	A
10	C	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
11	C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
12	C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
13	C	G	G	G	C	T	C	C	G	A	A	A
14	C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
15	C	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
16	C	C	G	G	C	T	C	C	G	A	A	A
17	G	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
18	C	C	G	G	C	E	C	C	G	A	A	A
19	C	C	G	G	C	T	C	C	G	G	A	A
20	C	C	G	G	C	T	T	G	G	A	A	A
21	C	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
22	ND	ND	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
23	C	C	G	G	T	T	C	C	A	A	A	A
24	G	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A

- As posições onde não foi possível determinar o alelo pela genotipagem, devem ser preenchidas na Tabela com "NA" (Não se aplica).
- Salvar a Tabela com alelos no formato de arquivo de texto (.txt).
- Abrir o arquivo de texto para modificação da referência dos SNP (primeira linha). A referência de cada SNP deve estar como no exemplo: "N*1584,1" (que corresponderia ao SNP -1584C>G). A tabela deve ficar como no modelo a seguir:

Arquivo	Editar	Formatar	Exibir	Ajuda										
N*1584,1		N*1584,2		N*31,1		N*31,2		N*100,1		N*100,2		N*1023,1		N*1023,2
C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	C
G	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	T
G	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	T
C	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	T
C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	C
C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	C
C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	C
C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	C
C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	C
C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	C
C	C	G	G	C	T	C	C	G	A	A	A	A	A	C
C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	T
C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	C
C	C	G	G	C	T	C	C	G	A	A	A	A	A	C
C	C	G	G	C	C	C	C	G	A	A	A	A	A	C
C	C	G	G	C	T	T	T	G	G	A	A	A	A	T
C	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	C
NA	NA	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A	A	A	C
C	C	G	G	T	T	C	C	A	A	A	A	A	A	C
G	G	G	G	C	C	C	C	G	A	A	A	A	A	T

- Verificar se não estão sobrando linhas ou colunas a mais no arquivo de texto (colunas após a última referência de SNP), pois isso pode interferir na leitura da tabela pelo RStudio.
 - 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".



```

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

```

- 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.



```

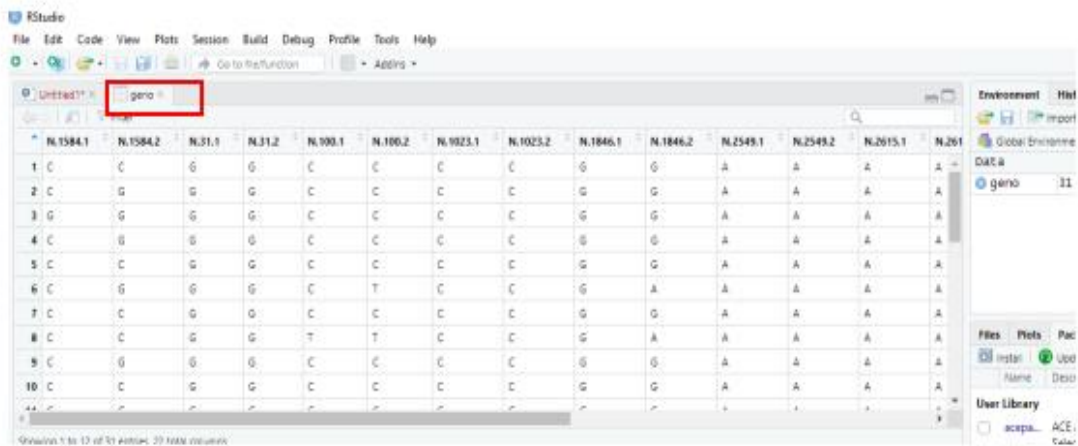
1 library(haplo.stats)
2 geno = read.table(file.choose(), head= TRUE, sep = "\t", row.names=NULL)
3
4 save.en <- haplo.en(geno, miss.val=c(0, NA), locus.label=c(1584, 31, 100, 1023, 1846, 2549, 2615, 2850, 2988, 3183, 4180))
5 names(save.en)
6
7 save.en
8 resultado <- summary(save.en)
9 resultado
10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

```

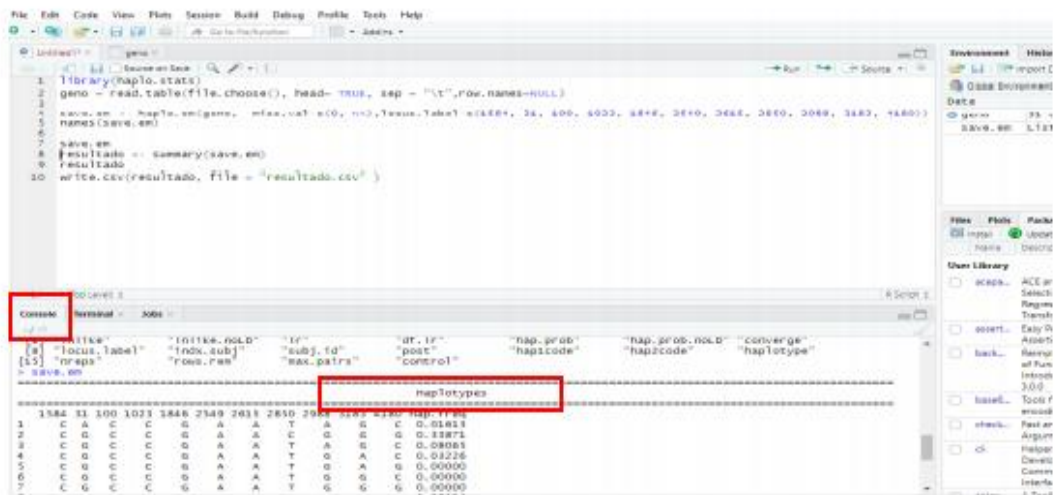
Environment

Object	Class	Attributes
geno	data.frame	31 obs. of 22 variables

- 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**".



- 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**".



- 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" )

```

Console Terminal Jobs
 C:\Users\Toshiba\Desktop\ > haplo.em <- summary y carve.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 prever 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*.

Tabela 1. Valores atribuídos aos alelos utilizando o sistema AS.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA VALOR ATRIBUÍDO	
Aumentada	> 2,25
Normal	1,25 – 2,25
Intermediária	0,25 – 1,0
Não funcional	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 2. Exemplos de determinação de AS a partir do genótipo.

DIPLÓTIPO CNV	SOMA	AS	
*1/*1	2	1 + 1	2
*2/*2 ^a	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

^a 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 3. 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>
- 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.

7.6 Parecer consubstanciado do CEP

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Um estudo aberto randomizado comparativo para avaliar eficácia e tolerabilidade dos tratamentos esquizotomicidas sanguíneos com Eurartesim® versus Cloroquina para malária não complicada por mono-infecção de Plasmodium vivax.

Pesquisador: Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 69476017.3.0000.0005

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

Patrocinador Principal: Ministério da Saúde

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.659.845

Apresentação do Projeto:

Descreve as alterações, no documentos intitulado " PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1121874_E2.pdf, postado em 25/04/2018, item Justificativa da Emenda, lê-se:" Nesta emenda, é enviado o protocolo na íntegra, o qual foi modificado de acordo com a Emenda (LOA) 1 e novas sugestões dialogadas entre patrocinador e investigadores do estudo. As alterações são sinalizadas com o recurso de controle de revisão no word, nos documentos de TCLE e TALE.

Trata-se da Pesquisa" Um estudo aberto randomizado comparativo para avaliar eficácia e tolerabilidade dos tratamentos esquizotomicidas sanguíneos com Eurartesim® versus Cloroquina para malária não complicada por mono-infecção de Plasmodium vivax".

Pesquisador Responsável: Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda.

Objetivo da Pesquisa:

Apresentados, sem alterações. Vide projeto aprovado e Emenda (LOA) 1 CAAE: 69476017.3.0000.0005

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Apresentados, sem alterações. Vide projeto aprovado e Emenda 1 (LOA) CAAE: 69476017.3.0000.0005

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

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

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



Continuação do Parecer: 2.659.845

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de Emenda ao projeto acima intitulado. As seguintes alterações dizem respeito ao Estudo CuraVivax- Versão 1, de 27 de março de 2017, adaptado em 20 de abril de 2018 para Emenda de Protocolo nº 2. As versões estão com as seguintes denominações:

Na versão TCLE_LOA2.Respons.docx, foi realizada uma revisão em todo TCLE_LOA 1-CuraVivax.docx, no item: Objetivo do Estudo: Lê-se. Atualmente, um dos tratamentos recomendados pelas autoridades de saúde internacionais contém duas substâncias chamadas de Dihidroartemisinina e Piperaquina (DHA-PQP); esta combinação é conhecida pelo nome de Eurartesim®. Este medicamento ainda não foi aprovado para uso no Brasil, porém já demonstrou eficácia e segurança contra o mesmo parasita da malária que tem no sangue do(a) seu filho(a) (chamado de Plasmodium vivax) em estudos na Ásia. Por isso, nós queremos comparar o DHA-PQP com um outro medicamento muito utilizado no Brasil para tratar malária, que é a Cloroquina. Mais do que isso, nós também queremos entender melhor como esses dois medicamentos interagem com a Primaquina, que também é um medicamento muito utilizado no Brasil e serve para diminuir a chance do(a) seu filho(a) voltar a ter malária, mesmo se não for picado por um mosquito novamente". Na versão TCLE_LOA2.Respons.docx, foi alterada para ". Mais do que isso, nós também queremos entender melhor como esses dois medicamentos interagem com a Primaquina, que também é muito utilizada no Brasil. Neste estudo nós vamos utilizar a dose de Primaquina recomendada por uma importante agência do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América, chamada Centers for Disease Control e Prevention para diminuir a chance de você voltar a ter malária, se não for picado por um mosquito novamente. Mais do que isso, nós também queremos entender melhor como esses dois medicamentos interagem com a Primaquina, que também é um medicamento muito utilizado no Brasil e serve para diminuir a chance do(a) seu filho(a) voltar a ter malária, mesmo se não for picado por um mosquito novamente."

2- Descrição do Estudo: Lê-se "Este estudo clínico será realizado em um centro de saúde em Manaus, com aproximadamente 460 pacientes com mais de 6 meses de idade. ". Foi alterado para "Este estudo clínico será realizado na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), que é um centro de saúde em Manaus (AM) que há muitos anos trata pessoas com malária. Nesse estudo serão acompanhadas realizado em um centro de saúde em Manaus, com aproximadamente 460 pacientes com mais de 6 meses de idade."

3- Exames: Lê-se " Nas visitas dos dias 1, 7, 28, 63, 90, 120, 150 e 180, uma amostra de sangue igual a uma colher de café será coletada de uma veia do seu braço para exames laboratoriais e

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

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

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.659.845

análise complementar. Uma coleta de sangue adicional poderá ser realizada nos dias 14 e 42 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". Foi alterada para "Nas visitas dos dias 1, 7, 28, 63, 90, 120, 150 e 180, 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 14 e 42a qualquer visita, dependendo do estado de saúde de seu (sua) filho(a), à critério médico ou se os resultados anteriores forem anormais. A equipe buscará reduzir a uma coleta de sangue por visita e sempre conversará com o(a) sr.(a) sobre isso. Todos os resultados desses exames serão comunicados a você e permanecerão confidenciais."

Na versão TCLE_LOA 2.docx, foi realizada uma revisão na Versão 2 do TCLE_LOA1-CuraVivax.docx. item Visitas: lê-se: "Visitas

Nos 3 primeiros dias, você virá ao centro todos os dias para receber o seu tratamento oral (pela boca). A partir daí, você retornará ao centro no 7º, 14º, 28º, 42º, 63º, 90º, 120º, 150º e 180º dias. No final de cada visita, a equipe que estará acompanhando você marcará a data da próxima visita." Foi alterado para "Nos 3 primeiros dias, você virá ao centro todos os dias para receber o seu tratamento oral (pela boca) com cloroquina ou DHA-PQP (Eurartesim®). A partir daí, você retornará ao centro será atendido pela equipe do estudo no 5º, 7º, 14º, 21º, 28º, 42º, 63º, 90º, 120º, 150º e 180º dias. No final, depois de cada visita, a equipe que estará acompanhando você marcará a data da próxima visita."

2-Exames, lê-se: Na primeira visita e durante as visitas de acompanhamento (os retornos), uma pequena quantidade de sangue será retirada por meio de uma picada no dedo para procurar os parasitas da malária e outra amostra de sangue será coletada e guardada em papel de filtro para análises complementares sobre a quantidade dos medicamentos do estudo que está presente no seu sangue e de polimorfismo genético". Foi alterado para "Em cada visita, será realizado um exame clínico e físico, incluindo medir sua temperatura corporal e a pressão do sangue. Serão realizados exames de sangue (hemograma e bioquímica) no 1º dia (hoje), no 7º dia e no 21º dia. Caso algum dos resultados esteja alterado, também pode ser necessário coletar sangue nos dias 14 (alteração no dia 7) ou no dia 28 (alteração no dia 21)." Foi acrescentado um item Análises Complementares, lê-se" Adicionalmente, você pode ser convidado para coletar sangue para uma análise de farmacocinética, que vai nos permitir saber se a quantidade de drogas contra malária no seu sangue está adequada. Essas coletas precisam ser feitas antes de você tomar a primeira dose de remédio contra malária e depois de 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 180 minutos, 240 minutos, 8 horas e 24 horas."

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

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

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.659.845

Por favor, informe abaixo se você concorda ou não, marcando com X uma das opções. Se decidir que não, não tem problema. Você poderá continuar no estudo mesmo assim.

Na versão TALE_LOA2.docx.. foi realizada uma revisão. VERSÃO 2-TALE_LOA I-Cura Vivax.docx. Assunto: Informações sobre o medicamento.Item 2. lê-se "Depois você vai precisar voltar aqui mais 9 vezes nos próximos 6 meses (no 7o dia, no 14o dia, no 28o dia, no 42o dia, no 63o dia, no 90o dia, no 120o dia, no 150o dia e no 180o dia). Todas as vezes nós vamos precisar tirar um pouco de sangue do seu dedo para ver se você ainda tem malária no sangue, aproximadamente tres gotas, tiradas do seu dedo como uma picada. Podera doer um pouco, mas o machucado ira desaparecer logo. Em algumas visitas (no 7o, 28o, 63o, 90o, 120o, 150o e 180o dias) nós vamos precisar tirar sangue do seu braço. Dessa forma, nós vamos conseguimos cuidar melhor da sua saúde."

Na versão TALE-LOA2.docx. foi alterada para "Depois você vai precisar voltar aqui mais 9 vezes nos próximos 6 meses (amanhã, depois de amanhã, no 5o dia, 7o dia, no 14o dia, no 21o dia, no 28o dia, no 42o dia, no 63o dia, no 90o dia, no 120o dia, no 150o dia e no 180o dia). Todas as vezes nós vamos precisar tirar um pouco de sangue do seu dedo para ver se você ainda tem malária no sangue, aproximadamente tres gotas, tiradas do seu dedo como uma picada. Podera doer um pouco, mas o machucado ira desaparecer logo. Em algumas visitas(no 7o, 28o, 63o, 90o, 120o, 150o e 180o dias)nós vamos precisar tirar sangue do seu braço. Dessa forma, nós vamos conseguimos cuidar melhor da sua saúde".

As mudanças nos formulários, são apresentadas com destaque no texto(uso da ferramenta de controle de alterações do (Microsoft Word), nos modelos anexos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Constatei que todas as informações propostas na Emenda nº 2, foram feitas alterações nos documentos1- TCLE_LOA2.docx;2-TCLE_LOA2.Respons.docx;3-TALE-LOA2.docx.. apensados a PB datados de 25/04/2018.

Recomendações:

Não se aplica

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 09.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.659.945

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda apresentada de forma adequada à regulamentação ética vigente.

Diante do exposto, o voto desta relatora é pela APROVAÇÃO desta Emenda.

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 o final, do estudo conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_112187_4_E2.pdf	25/04/2018 11:59:33		Aceito
Brochura Pesquisa	Protocolo_LOA2.docx	25/04/2018 11:49:15	Marcus Vinicius Guimaraes de Lacerda	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_LOA2.docx	25/04/2018 11:43:49	Marcus Vinicius Guimaraes de Lacerda	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LOA2_Respons.docx	25/04/2018 11:43:28	Marcus Vinicius Guimaraes de Lacerda	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LOA2.docx	25/04/2018 11:42:58	Marcus Vinicius Guimaraes de Lacerda	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CuraVivax_LOA1_180717.docx	19/07/2017 03:28:54	Marcus Vinicius Guimaraes de Lacerda	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CuraVivax_LOA1_180717.pdf	19/07/2017 03:28:18	Marcus Vinicius Guimaraes de Lacerda	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LOA1_CuraVivax_Responsaveis.docx	19/07/2017 03:27:09	Marcus Vinicius Guimaraes de Lacerda	Aceito
TCLE / Termos de	TALE_LOA1_CuraVivax.docx	19/07/2017	Marcus Vinicius	Aceito

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@fnt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.858.848

Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_LOA1_CuraVivax.docx	03:26:56	Guimarães de Lacerda	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LOA1_CuraVivax.docx	19/07/2017 03:26:35	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Protocolo.pdf	08/06/2017 14:47:16	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_desenho_estudo.pdf	08/06/2017 13:53:59	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_CuraVivax.docx	07/06/2017 20:31:20	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CuraVivax_Responsaveis.docx	07/06/2017 20:30:41	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CuraVivax.docx	07/06/2017 20:29:58	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
Outros	Declaracao_apolo_governo.pdf	07/06/2017 11:51:50	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
Outros	Anuencia_LAC.pdf	07/06/2017 11:48:38	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
Outros	Anuencia_DAM.pdf	07/06/2017 11:48:00	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Lista_membros.pdf	07/06/2017 11:43:30	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Armazenamento_amstras.pdf	07/06/2017 11:42:00	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_cumprimento_resolucoes.pdf	07/06/2017 11:41:03	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	InfraEstrutura.pdf	07/06/2017 10:09:39	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito

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@fnt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.659.846

Outros	SafetyManagementPlan.pdf	07/06/2017 09:23:15	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
Outros	ST_Agreement.pdf	07/06/2017 09:21:00	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	07/06/2017 09:08:44	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 17 de Maio de 2018

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador)

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (02)2127-3572

Fax: (02)2127-3572

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