



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



**INFLUÊNCIA DAS VARIANTES DOS GENES DE *CYP2C8*, *CYP2C9*,  
*CYP2C19*, *CYP3A4* e *UGT2B7* NA RECORRÊNCIA DE PACIENTES COM  
MALÁRIA POR *P. VIVAX* TRATADOS COM DIHIDROARTEMISININA-  
PIPERAQUINA**

**AMANDA CARVALHO DE OLIVEIRA**



**MANAUS  
2022**

**AMANDA CARVALHO DE OLIVEIRA**

**INFLUÊNCIA DAS VARIANTES DOS GENES DE *CYP2C8*, *CYP2C9*,  
*CYP2C19*, *CYP3A4* e *UGT2B7* NA RECORRÊNCIA DE PACIENTES COM  
MALÁRIA POR *P. VIVAX* TRATADOS COM DIHIDROARTEMISININA-  
PIPERAQUINA**

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 a obtenção do grau de *Mestre em Doenças Tropicais e Infeciosas*.

Orientadora: Prof. Dra. Gisely Cardoso de Melo  
Coorientadora: Prof. Dra. Anne Cristine Gomes Almeida

**MANAUS  
2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

C331ii de Oliveira, Amanda Carvalho  
Influência das variantes dos genes de CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e UGT2B7 na recorrência de pacientes com malária por *P. vivax* tratados com dihidroartemisinina-piperaquina / Amanda Carvalho de Oliveira. Manaus : [s.n], 2022.  
84 f.: color.; 29 cm.

Dissertação - PGSS - Doenças Tropicais e Infecciosas (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2022.

Inclui bibliografia

Orientador: Gisely Cardoso de Melo

Coorientador: Anne Cristine Gomes Almeida

1. Recorrências. 2. Dihidroartemisinina-piperaquina. 3. Citocromo P450. 4. UGT2B7. 5. Plasmodium vivax. I. Gisely Cardoso de Melo (Orient.). II. Anne Cristine Gomes Almeida (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Influência das variantes dos genes de CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e UGT2B7 na recorrência de pacientes com malária por *P. vivax* tratados com dihidroartemisinina-piperaquina

**FOLHA DE JULGAMENTO****INFLUÊNCIA DAS VARIANTES DOS GENES DE *CYP2C8*,  
*CYP2C9*, *CYP2C19* *CYP3A4* e *UGT2B7* NA RECORRÊNCIA DE  
PACIENTES COM MALÁRIA POR *P. VIVAX* TRATADOS COM  
DIHIDROARTEMISININA-PIPERAQUINA****AMANDA CARVALHO DE OLIVEIRA**

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

**Banca Julgadora:**

---

**Presidente**

---

**Membro**

---

**Membro**

## DEDICATÓRIA

À minha família,  
que nunca me deixou desistir.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Gisely Cardoso, por ter aceitado a orientação, por ter acreditado e confiado no meu trabalho, por todo incentivo, acolhimento e compreensão, e por todo o exemplo de força e profissionalismo na pesquisa científica

À minha coorientadora, Profa. Dra. Anne Almeida, sempre disponível a dar suporte e excelentes contribuições ao trabalho

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical (PPGMT) em parceria com a Universidade do Estado do Amazonas (UEA) por toda estrutura e qualidade em excelência;

À Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e ao Instituto de Pesquisa Clínica Dr. Carlos Borborema (IPCCB) pela estrutura fornecida para execução deste estudo

À Fundação de Amparo em Pesquisa (FAPEAM) pela concessão da bolsa de estudos que proporcionou minha dedicação exclusiva à execução deste estudo

À toda equipe de alunos e professores envolvidos da execução deste estudo, em especial à Gabrielly, Flávia, Laila, Rebecca, Victor e Manuela, o suporte de cada um de vocês fez toda diferença, não se faz pesquisa sozinho

Aos colegas de pós-graduação que formaram uma rede de apoio, incentivo e estudos, em especial: Ademir, Erick, Lucas, Jefferson, Eunice, Rêgila, Francys, Macejane, Dayane, Fabiane, Thaís, Yanka, por cada crítica construtiva, cada contribuição, hoje vocês também são família

Aos meus pais, Rosângela e Luis, que nunca deixaram de incentivar e investir nos meus estudos, serei eternamente grata a vocês. Ao meu amor, lury por todo apoio, colo, amor e incentivo, por toda compreensão nos momentos de ausência, meu maior torcedor. À Terezinha Queiroz, a primeira pedagoga da família, que sempre incentivou os estudos de seus sobrinhos queridos. À Neide Queiroz e à Lucimar Campos, os pilares que moldaram minha educação, onde quer que estejam, palavras nunca serão o suficiente para expressar minha gratidão a vocês, muito obrigada.

## **DECLARAÇÕES DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

O projeto foi apoiado financeiramente pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) por meio da bolsa de estudo durante os 24 meses de realização do projeto.

## EPÍGRAFE

*“Mesmo desacredito e ignorado, não posso desistir,  
pois para mim, vencer é nunca desistir”  
(Albert Einstein)*



## RESUMO

Em função do surgimento de cepas de *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* resistentes à cloroquina (CQ), a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o uso de 'terapias combinadas à base de artemisinina' (ACT) e seus derivados, como a dihidroartemisinina-piperaquina (DHA-PPQ), para o tratamento de malária não-complicada. Sua biotransformação envolve tanto as enzimas uridina difosfato glucuronosiltransferase (UGT) 1A9 e UGT2B7, quanto as enzimas do citocromo P450 (CYPs) 2C8, 2C9, 2C19 e 3A4. Variações genéticas nos genes responsáveis por codificarem estas enzimas, podem levar ao comprometimento da terapia antimalárica, resultando em uma falha terapêutica ou possíveis reações adversas. O principal objetivo deste estudo foi avaliar a influências das variantes genéticas de *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* e *UGT2B7* em pacientes com malária por *P. vivax* tratados com dihidroartemisinina-piperaquina. Foram selecionados 80 indivíduos com diagnóstico prévio confirmado para monoinfecção de malária por *P. vivax*, que foram divididos posteriormente em dois grupos: caso (20) e controle (60). A genotipagem dos genes selecionados foi realizada através de discriminação alélica através do sistema TaqMan por PCR em tempo real e, para os genes de *CYP2C9* e *CYP2C19* foi feita a determinação do fenótipo predito. Para *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* e *UGT2B7*, os alelos mutados estavam mais frequentes no grupo caso ( $p > 0,05$ ), e os alelos associados a baixa atividade (\*2/\*3/\*4) de *CYP2C8*, foram mais frequentes no grupo caso (20%) do que no grupo controle (3,3%) ( $p < 0,05$ ). Também foi observado uma associação significativa em relação ao clareamento parasitário no grupo controle, entre os participantes que apresentaram o alelo \*1 ( $p = 0,017$ ) e portadores dos alelos \*2/\*3/\*4 ( $p = 0,038$ ) com o desfecho recorrência. Nenhuma das variantes avaliadas mostraram associação com um aumento ao risco de recorrências ( $p > 0,05$ ). Nossos achados sugerem que as variantes em *CYP2C8* podem contribuir para falha terapêutica com DHA-PPQ, gerando recorrências de malária por *P. vivax*, reforçando a importância da farmacogenética na medicina de precisão visando o monitoramento das terapias antimaláricas com ACTs.

**Palavras-chave:** *Recorrências, Dihidroartemisinina-piperaquina, Citocromo P450, UGT2B7, Plasmodium vivax*

## ABSTRACT

Due to the emergence of strains of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* resistant to chloroquine (CQ), the World Health Organization (WHO) recommends the use of 'combination therapies based on artemisinin' (ACT) and its derivatives, such as dihydroartemisinin-piperaquine (DHA-PPQ), for the treatment of uncomplicated malaria. Its biotransformation involves both the uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) enzymes 1A9 and UGT2B7, and the cytochrome P450 enzymes (CYPs) 2C8, 2C9, 2C19 and 3A4. Genetic variations in the genes responsible for encoding these enzymes can lead to compromised antimalarial therapy, resulting in therapeutic failure or possible adverse reactions. The main objective of this study was to evaluate the influences of genetic variants of *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* and *UGT2B7* in patients with *P. vivax* malaria treated with dihydroartemisinin-piperaquine. Eighty individuals with a confirmed previous diagnosis of *P. vivax* malaria mono-infection were selected and subsequently divided into two groups: case (20) and control (60). Genotyping of the selected genes was performed through allelic discrimination using the TaqMan system by real-time PCR and, for the *CYP2C9* and *CYP2C19* genes, the predicted phenotype was determined. For *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* and *UGT2B7*, mutated alleles were more frequent in the case group ( $p > 0.05$ ), and alleles associated with low activity (\*2/\*3/\*4) of *CYP2C8* were more frequent in the case group (20%) than in the control group (3.3%) ( $p < 0.05$ ). A significant association was also observed in relation to parasite clearance in the control group, between participants who had the \*1 allele ( $p = 0.017$ ) and carriers of the \*2/\*3/\*4 alleles ( $p = 0.038$ ) with the outcome recurrence. None of the assessed variants showed an association with an increased risk of recurrences ( $p > 0.05$ ). Our findings suggest that *CYP2C8* variants may contribute to therapeutic failure with DHA-PPQ, generating recurrences of *P. vivax* malaria and reinforcing the importance of pharmacogenetics in precision medicine aimed at monitoring antimalarial therapies with ACTs.

Keywords: Recurrences, Dihydroartemisinin-piperaquine, Cytochrome P450, *UGT2B7*, *Plasmodium vivax*.



## RESUMO LEIGO

A malária é uma doença considerada um problema de saúde pública mundial. Seu tratamento deve ser feito corretamente para evitar futuras complicações e novos episódios da doença. Atualmente, o medicamento usado para tratar esta doença é a Cloroquina, porém, em alguns casos, este medicamento não é eficiente. Pensando nisso, um novo medicamento chamado Eurartesim®, que está mostrando uma boa resposta ao tratamento em outros países, está sendo estudado como uma possível alternativa de tratamento para esses casos. Mas, devido a diversidade da população este medicamento pode reagir de forma diferente em cada organismo, apresentando novos episódios da doença. Com isso, o objetivo deste estudo é entender como o organismo da população irá responder a este medicamento e a influência que isto pode trazer ao tratamento.

**LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1.** Ciclo biológico do *P. vivax* em humanos ..... 3

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

ACT – Terapias combinadas à base de artemisinina

AS – Escore de atividade

AS+AQ - Artesunato + Amodiaquina

CNV – Variantes no número de cópias

CQ – Cloroquina

CPIC – Consórcio de Implementação de Farmacogenética Clínica

CYP – Citocromo P450

DHA - Dihidroartemisinina

DHA-PPQ – Dihidroartemisinina-piperaquina

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

M1 – Produto da clivagem do ácido carboxílico

M2 – Produto mono-N-oxidado

IM – Metabolizador intermediário

IPA – Índice Parasitário Anual

OMS – Organização Mundial da Saúde

PM – Metabolizador lento ou fraco

PPIs – Inibidores da bomba de prótons

PQ – Primaquina

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

SSRIs – Inibidores seletivos da recaptção de serotonina

TCAAs – Antidepressivos tricíclicos

UGT – Uridina difosfato glicuronosiltransferase

UM – Metabolizador ultrarrápido

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Definição e aspectos epidemiológicos da doença .....	1
1.2 Ciclo evolutivo da doença.....	2
1.3 Tratamento .....	4
1.6. Dihidroartemisinina-piperaquina.....	5
1.6 Citocromo P450 (CYP) .....	6
1.6.1 Citocromo P450 2C8 ( <i>CYP2C8</i> ).....	7
1.6.2. Citocromo P450 2C9 ( <i>CYP2C9</i> ).....	9
1.6.3 Citocromo P450 2C19 ( <i>CYP2C19</i> ).....	10
1.6.4 Citocromo P450 3A4 ( <i>CYP3A4</i> ) .....	11
1.7 Uridina glucoronosiltransferase 2B7 ( <i>UGT2B7</i> ) .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 Geral.....	14
2.2 Específicos .....	14
<b>3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO</b> .....	15
<b>4. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	39
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	40
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41
<b>7. ANEXOS</b> .....	49
7.1 Equipe do projeto .....	49
7.2 Procedimento operacional padrão (POP) – Extração de DNA .....	50
7.3 Procedimento Operacional Padrão (POP) – Genotipagem .....	54
.....	54
7.4 Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa .....	62



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Definição e aspectos epidemiológicos da doença

A malária é uma doença parasitária de grande impacto a saúde pública mundial, afetando principalmente regiões tropicais e subtropicais. Tem como agente etiológico protozoários pertencentes ao gênero *Plasmodium*, sendo descritos até o momento 7 espécies que podem causar a doença em humanos: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* e *P. simium* (1–4).

Estes protozoários são transmitidos por mosquitos fêmea do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo, sendo *An. aquasalis*, *An. albimanus*, *An. albitarsis*, *An. nuneztovari* e *An. darlingi* alguns dos principais vetores transmissores da doença nas Américas (1), sendo a última espécie, o principal no Brasil.

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o impacto na interrupção de serviços em decorrência da pandemia de COVID-19 refletiu em aumento no número de casos de malária globalmente, passando de 227 milhões de casos em 2019, para 241 milhões de casos registrados em 2020, e cerca de 627.000 mortes, um aumento de 12% quando comparado ao ano anterior (1).

Nas Américas, cerca de 77% dos casos de malária estão concentrados entre República Bolivariana da Venezuela, Brasil e Colômbia, onde a espécie *P. vivax* foi responsável por 68% dos casos em 2020. No entanto, em locais como a República Bolivariana da Venezuela, o número de casos sofreu uma diminuição, em parte devido às restrições de viagens durante a pandemia, além da escassez de alguns insumos como combustíveis, afetando a indústria de mineração, reduzindo o risco de exposição ocupacional (1).

Neste mesmo ano, no Brasil, foram notificados 145.205 casos da doença, com redução de 7,8% em relação à 2019. Dados preliminares apontam que em 2021 houve uma redução de 4,1% em relação a 2020, com cerca de 139.211 casos notificados. A maioria dos casos registrados no país foram de origem

autóctone (99%), nos quais a maior parte concentrou-se em áreas rurais e indígenas (41,2%-34%) respectivamente (5).

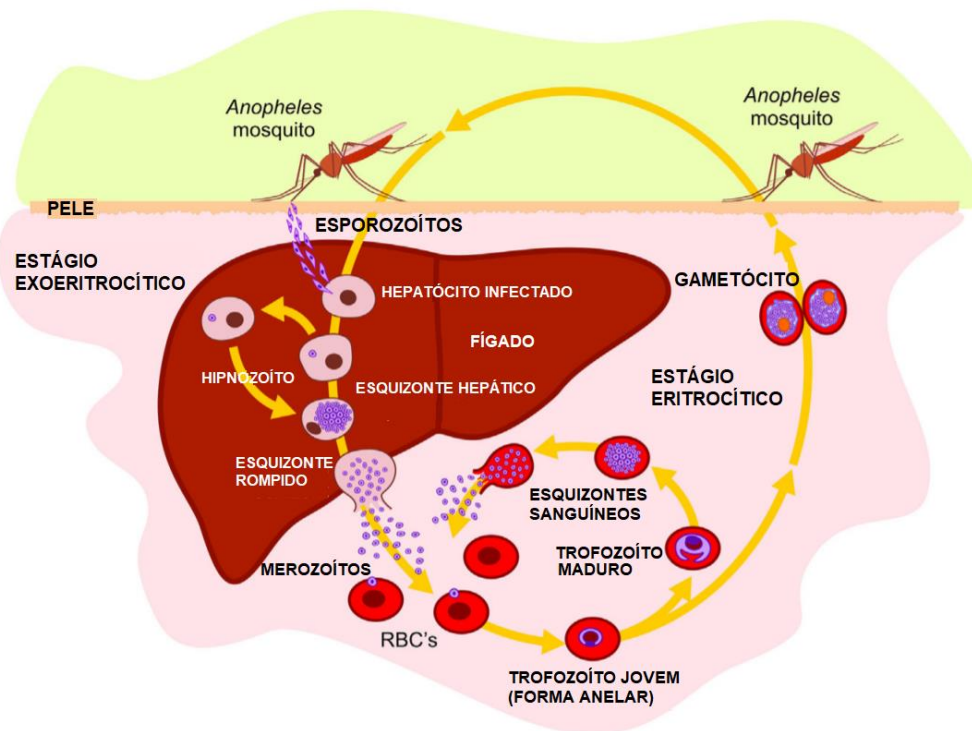
A distribuição dos casos da doença varia de estado para estado. Em 2021, na região Amazônica, alguns estados registraram a maior parte da transmissão da malária em áreas rurais: Maranhão (90,8%), Acre (70,3%), Rondônia (56,8%), Amapá (47,5%), Amazonas (41,6%), e (5).

A Incidência Parasitária Anual (IPA) é um índice utilizado para estimar o risco de adoecer pela malária em cada município. Com os valores gerados, é possível classificar os municípios em: muito baixo risco (<1 caso/1.000 habitantes), baixo risco (entre 1 e < 10 casos/1.000 hab.), médio risco (entre 10 e <50 casos/hab.), e alto risco ( $\geq 50$  casos/1.000 hab.), contabilizando apenas casos autóctones, excluindo recaídas e recrudescências (5).

Em 2021, 29 (3,6%) municípios da região Amazônica foram classificados como de alto risco, 38 (4,7%) de médio risco, 61 (7,5%) de baixo risco e outros 163 (20,2%) como de muito baixo risco de transmissão da doença. Quanto mais próximo do cenário de eliminação da doença, menor a quantidade de municípios com alto e médio riscos (5).

## 1.2 Ciclo evolutivo da doença

O ciclo evolutivo envolve dois hospedeiros: vertebrados (humanos, primatas) e invertebrado (mosquitos) (6). Durante o repasto sanguíneo, o mosquito fêmea inocula esporozoítos na pele do hospedeiro. Alguns são fagocitados por macrófagos residentes, ou migram para os linfonodos, onde são eliminados, e alguns conseguem invadir os capilares sanguíneos através da interação de proteínas presentes no complexo apical do parasita (7).



**Figura 1.** Ciclo biológico do *P. vivax* em humanos

Após a entrada na corrente sanguínea, os esporozoítos migram ao fígado, deslizam através dos sinusóides e transmigram pelas células de Kupffer para atingir seu alvo, os hepatócitos. Com o hepatócito invadido, o parasita reside dentro de um vacúolo parasitóforo, e inicia a primeira reprodução assexuada (esquizogonia pré-eritrocítica) (7). Em algumas espécies como *P. vivax* e *P. ovale*, os parasitas podem permanecer dormentes por longos períodos de tempo (hipnozoítos) podendo ser reativados levando o hospedeiro a recaídas (6).

A esquizogonia pré-eritrocítica dará origem aos merozoítos, que são liberados na circulação periférica dentro de merossomas que posteriormente serão rompidos. Os merozoítos invadem os glóbulos vermelhos, dando início à esquizogonia eritrocítica, onde o parasita se desenvolve em estágio de trofozoíto imaturo (forma anelar), trofozoíto maduro e em esquizonte, que darão origem a novos merozoítos, que serão liberados na corrente sanguínea, onde consequentemente irão invadir outros glóbulos vermelhos. Esta replicação assexuada também pode originar os estágios sexuais do parasita

(gametócitos), que podem ser ingeridos por um mosquito fêmea não infectado, durante o repasto sanguíneo, perpetuando o ciclo (7).

### 1.3 Tratamento

O tratamento da malária tem como principal objetivo: 1) interromper a esquizogonia sanguínea; 2) destruir as formas latentes (hipnozoítos) evitando recaídas; e 3) a interrupção da transmissão do parasita para o vetor com uso de drogas que impedem o desenvolvimento das formas sexuadas (gametócitos) (8).

As principais drogas antimaláricas podem ser divididas pelo seu alvo de ação no ciclo: esquizonticidas teciduais ou hipnozoiticidas, esquizonticidas sanguíneos, gametocitocidas e esporonticidas (9). Para *P. vivax* ou *P. ovale*, o principal objetivo do tratamento é combater tanto as formas sanguíneas quanto latentes, prevenindo os casos de recrudescência e recaída, respectivamente (8).

A recrudescência ocorre quando os estágios sanguíneos não são completamente eliminados, o que conseqüentemente faz com que a parasitemia volte a aumentar em até 28 dias após o tratamento, já as recaídas são definidas pelo retorno da parasitemia e das manifestações clínicas devido a uma reinvasão das hemácias por merozoítos oriundos de estágios dormentes do parasita no fígado, os hipnozoítos (10,11).

No Brasil, o tratamento é realizado com dois medicamentos em conjunto: cloroquina (CQ), e primaquina (PQ). O esquema de tratamento para malária não complicada por *P. vivax* consiste em CQ por 3 dias (10 mg/kg dia 1 e 7,5 mg/kg nos dias 2 e 3) e PQ (0,5 mg/kg dia) por 7 dias para melhor adesão. A PQ também possui efeito sinérgico em associação à CQ contra as formas assexuadas (8).

Em função do surgimento de cepas de *P. falciparum* e *P. vivax* resistentes à CQ, a OMS recomenda o uso de 'terapias combinadas à base de artemisinina' (ACT) e seus derivados para o tratamento de malária não-complicada (1). A dihidroartemisinina-piperaquina (DHA-PPQ) é uma das ACTs recomendada para o tratamento de malária não complicada, devendo ser associada à PQ para cura radical (1,12), e sua eficácia tem se mostrado promissora, tanto no clareamento

do parasita como sua utilização de maneira profilática em casos de recorrência por *P. vivax* (13,14).

#### 1.6. Dihidroartemisinina-piperaquina

Em 1973, na China, foi descoberto um princípio ativo extraído a partir da planta *Artemisia annua L.*, eficaz contra os estágios sanguíneos do parasita e não ativa para os estágios exoeritrocíticos, denominado de 'artemisinina'. Desde então, seus derivados semissintéticos têm sido utilizados no tratamento da doença (15).

A dihidroartemisinina (DHA) é o principal metabólito ativo das ACTs. Rapidamente absorvida, possui uma meia-vida de eliminação em torno de 2,6 horas e um tempo de concentração máxima no organismo de  $\approx$ 1-2 horas (15). Sua ponte de endoperoxidase aparenta ser essencial para sua atividade antimalárica, resultando em danos de radicais livres aos sistemas de membrana do parasita (16,17).

Estudos *in vitro* demonstraram que a DHA é metabolizada pela enzima uridina difosfato glucuronosiltransferase (UGT) 1A9 e UGT2B7 em  $\alpha$ -dihidroartemisinina- $\beta$ -glucuronídeo, sem sofrer metabolismo pelas enzimas do citocromo P450 (CYPs) (16–18).

Já a piperaquina trata-se de bisquinolina, e seu mecanismo de ação ainda é pouco conhecido, contudo, supõe-se que seja semelhante ao da CQ, seu análogo estrutural. Este pró-fármaco é conhecido por sua longa meia-vida (>20 dias), e sua biotransformação é mediada pelas enzimas do citocromo P450 (CYPs) CYP3A4, CYP2C8 e em menor extensão por CYP2C9 e CYP2C19 em dois metabólitos ativos principais: um produto da clivagem do ácido carboxílico (M1) e um produto mono-N-oxidado (M2) (16,17,19,20).

A combinação de um derivado da artemisinina de ação rápida e meia-vida curta com outro fármaco de meia-vida longa potencializa a eliminação do parasita e confere proteção contra reinfecções (21,22). Vale ressaltar que os antimaláricos podem estar sujeitos a interações medicamentosas, especialmente em áreas endêmicas com altos índices de outras doenças

infeciosas, como pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), que podem afetar a eficácia terapêutica (23).

A adesão ao tratamento continua sendo umas das principais prioridades rumo a erradicação da doença. Tanto a eficácia quanto a segurança dependem que os níveis do medicamento sejam atingidos e mantidos pelo tempo necessário, e sua exposição insuficiente pode estar relacionada ao risco de recorrência. Além disso, a genética humana pode influenciar diretamente no tratamento, comprometendo sua farmacodinâmica e farmacocinética (24).

Levando em consideração que fatores genéticos contribuem para a eficácia e segurança de um medicamento, a farmacogenética é uma das ciências que vem sendo levantada no ramo da medicina de precisão, que busca entender qual o papel das variantes genéticas sobre a resposta a medicamentos (21). É importante ressaltar que os dados que alteram a resposta clínica não são exclusivos do homem, mas também podem estar no agente etiológico como no caso do *P. falciparum* (25,26).

#### 1.6 Citocromo P450 (CYP)

As reações enzimáticas envolvidas no processo de biotransformação de fármacos podem ser classificadas em: reações de fase 1 (oxidação/redução) que envolvem tanto a inativação dos fármacos, quanto a ativação de um pró-fármaco, e reações de fase 2 (conjugação/hidrólise) que compreendem na eliminação de fármacos e a inativação de metabólitos tóxicos (27).

As CYPs fazem parte da principal família de enzimas capazes de catabolizar a biotransformação oxidativa da maioria das drogas e outros xenobióticos lipofílicos, sendo de alta relevância para a farmacologia clínica (28). As mais ativas pertencem às subfamílias CYP1, CYP2 e CYP3, como CYP3A4, CYP2C8, CYP2C9 e CYP2C19 (29).

Vários fatores podem influenciar a expressão e função das CYPs, como: idade, sexo, raça, etnia, hormônios, meio ambiente e variantes genéticas, bem como doenças. Esses fatores, juntamente com interações medicamentosas,

podem contribuir para as manifestações clínicas provocadas por reações adversas que surgem decorrentes das reações catabolizadas por CYPs (30).

As variantes genéticas podem exercer grandes efeitos na resposta aos medicamentos: o primeiro cenário a ser observado seria durante a administração de um pró fármaco, uma substância farmacologicamente inativa que requer sua bioativação através de enzimas metabolizadoras; variantes genéticas que resultam na perda de função dessas enzimas podem diminuir ou bloquear a ação deste fármaco. Outro cenário seria durante a administração de um fármaco ativo que sofre eliminação por um único sistema de metabolização; neste caso, as variantes de perda de função podem resultar em inativação diminuída, tornando as concentrações do fármaco mais altas, podendo gerar o aumento de metabólitos tóxicos (31).

Estas variantes envolvem polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) como inserções, deleções e substituições, assim como variações no número de cópias (CNVs) como duplicações ou deleções (30). Recebem a nomenclatura de alelo estrela (\*) e, de acordo com o status funcional da enzima, podem variar de nenhuma função a função aumentada, apresentando fenótipos preditos que podem ser inferidos a partir do genótipo (32).

Metabolizadores lentos ou fracos (PM), se referem a portadores homozigotos ou heterozigotos compostos de alelos com ausência completa de função; metabolizadores extensos (EM), que se referem aos indivíduos com metabolismo normal; intermediários (IM) que carregam um pelo menos um alelo funcionalmente deficiente, resultando na capacidade prejudicada de oxidação do fármaco; e metabolizadores ultrarrápidos (UM) que se originam de variantes de ganho de função ou que possuem mais de uma cópia do gene funcional (29).

#### 1.6.1 Citocromo P450 2C8 (*CYP2C8*)

A isoenzima *CPY2C8* trata-se de uma das principais enzimas CYP responsável por metabolizar uma variedade de xenobióticos e drogas, como amodiaquina (AQ), desabuvir, imatinibe, paclitaxel, loperamida, montelucaste, pioglitazona, repaglinida e rosiglitazona (32).

Os alelos \*2, \*3 e \*4 do gene de *CYP2C8* são responsáveis pela maioria da variabilidade não sinônima desta isoenzima em humanos. *CYP2C8*\*2 (c.805A>T, p.Ile269Phe; rs11572103) possui uma frequência que pode variar entre 10-37% em indivíduos com ascendência da África Subsaariana; *CYP2C8*\*3 consiste em duas variantes não sinônimas (c.416G>A,p.Arg139Lys; rs11572080, e c1196A>G,p.10509681) com uma frequência de 4-7% respectivamente com ancestralidade Europeia, assim como o alelo *CYP2C8*\*4 (c.792C.G, p.Ile264Met; rs1058930) que também é mais frequente em europeus (32,33). No Brasil, em estudos realizados na Região Amazônica, a frequência encontrada para os alelos \*2, \*3 e \*4 de *CYP2C8* variou de 3-5,8%, 5-7% e de 1,5-3% respectivamente (34,35).

Grande parte dos estudos *in vitro* sugere que esses alelos resultam em função moderadamente diminuída, no entanto já foram relatadas atividades opostas para os alelos *CYP2C8*\*3 e *CYP2C8*\*4 em relação ao metabolismo da cerivastatina por exemplo (32). Em relação aos antimaláricos, existem poucos estudos disponíveis que avaliem o impacto das variantes genéticas no metabolismo de drogas comumente usadas para o tratamento da malária (20,36,37).

Em Burkina Faso, em um estudo realizado em pacientes com malária não grave por *P. falciparum*, foi observada um aumento três vezes maior da concentração do fármaco e diminuição 6 vezes menor na depuração intrínseca da AQ, em portadores da variante *CYP2C8*\*2 e uma diminuição do seu metabólito ativo, a DEAQ foi mais acentuada em pacientes com o alelo *CYP2C8*\*3, contudo nenhuma evidência foi observada em relação a influência dos genótipos de *CYP2C8* na eficácia ou toxicidade da AQ, deixando claro que o tamanho da amostra limitou essas observações (36).

Lau-Pernaute *et al* em Zanzibar (37), durante um estudo que buscou avaliar a influência de variantes genéticas de *CYP2C8* na eficácia e tolerabilidade do tratamento com artesunato-amodiaquina (AS-AQ). Os autores apontam que mesmo não havendo diferenças estatisticamente significantes na proporção de pacientes com as variantes *CYP2C8*\*2 e *CYP2C8*\*3 entre aqueles com reinfeções ou infecções recrudescentes quando comparados a indivíduos com



resposta clínica e parasitológica adequada, foi observada uma associação significativa destes indivíduos a um aumento da ocorrência de eventos adversos não graves quando comparado com *CYP2C8* \*1/\*1 homozigotos do tipo selvagem, indicando que a tolerabilidade ao fármaco nesses pacientes pode ser reduzida.

#### 1.6.2. Citocromo P450 2C9 (*CYP2C9*)

A isoenzima *CYP2C9* é uma das mais importantes, pois estima-se que contribua aproximadamente 15% para a metabolização dos fármacos (38). Os substratos principais incluem a varfarina, acenocumarol, fenitoína, losartana, fluvastatina, bosentana, a maioria das sulfonilureias, além de agentes inflamatórios não esteroides (32,38).

A frequência alélica de *CYP2C9* pode variar em torno de 12% a 6% em europeus para os alelos *CYP2C9*\*2 e *CYP2C9*\*3 respectivamente. As frequências descritas para *CYP2C9*\*2 são de: Americanos (7%), Asiáticos do Sul (5%) e Africanos (2%), e sendo menos frequente em Asiáticos do Leste, enquanto que *CYP2C9*\*3 é comum em Asiáticos do leste (3%) e Americanos (4%) (33). Na região Amazônia, a frequência observada para os alelos *CYP2C9*\*2 e *CYP2C9*\*3 variou entre 7 a 2,8% respectivamente (35).

Dois polimorfismos não sinônimos, rs1799853 (c.430C>T, p.Arg144Cys) e rs1057910 (c.1075A>C, p.Ile359Leu), correspondem aos alelos *CYP2C9*\*2 e *CYP2C9*\*3 respectivamente. São amplamente estudados por estarem relacionados à atividade enzimática diminuída e por serem as variantes mais comuns de *CYP2C9* (38).

Para *CYP2C9*, é possível ser feita a interpretação do fenótipo predito por meio de um sistema de combinações de alelos estrela. Um score de atividade é atribuído a cada alelo, variando de 0 a 1 e no final, esses valores são somados para ser obtido a pontuação do escore de atividade (AS) de um diplótipo de forma que: indivíduos com AS de 0 a 0,5 são classificados como PM, aqueles com AS de 1 a 1,5 são IMs e aqueles com pontuação 2 são classificados como EMs (39,40).

Em um estudo realizado no Brasil que teve como objetivo estudar a influência de variantes genéticas em CYPs no tratamento com CQ/PQ em pacientes malária por *P. vivax*, os autores observaram que pacientes portadores dos alelos *CYP2C9\*2* e *CYP2C9\*3* apresentaram uma taxa de depuração de gametócitos mais baixa durante o tratamento, embora não significativa, sugerindo estudos maiores para melhor avaliação do papel dessas variantes visando a prevenção de tratamentos ineficazes e efeitos adversos (35).

A literatura descreve que esta isoenzima está envolvida na metabolização do antimalárico PPQ, mesmo que em menor extensão (16,17), porém até o presente momento não existem estudos disponíveis que avaliem a influência de variantes no gene de *CYP2C9* no tratamento da malária com este medicamento (20).

### 1.6.3 Citocromo P450 2C19 (*CYP2C19*)

A isoenzima *CYP2C19* participa do metabolismo de vários medicamentos como benzodiazepínicos, inibidores da bomba de prótons (PPIs), inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs), antidepressivos tricíclicos (TCAs) e voriconazol, além de ser crucial para a ativação do clopidogrel (32).

O gene de *CYP2C19* é altamente variável, sendo o alelo relacionado à atividade enzimática nula *CYP2C19\*2* (C.681G<A; rs4244285) o mais estudado (32). Apresenta frequência alélica de 18% em Africanos e Europeus, e mais de 30% em Asiáticos; Já o alelo de função diminuída, *CYP2C19\*3* (c.636G>A; rs4986893) é menos frequente na população, com exceção em Asiáticos do Leste (7%) (33). No Brasil, a frequência do alelo *CYP2C19\*2* pode variar entre 10-12,5% (41).

Como a bioativação do clorproguanil/proguanil é mediada pela enzima *CYP2C19*, Elewa & Wilby descrevem que espera-se que indivíduos portadores dos alelos de perda de função de *CYP2C19* apresentem uma concentração mais baixa do medicamento, conseqüentemente apresentando falha terapêutica (21). Thapar *et al* observaram uma associação entre os fenótipos PM e uma diminuição dos níveis cicloguanil, seu metabólito ativo (42). Hodel *et al* não encontraram associação entre a variante *CYP2C19\*3* e o modelo

farmacocinético proposto, frisando que poderiam se tratar de achados isolados e ressaltado a importância de estudos em diferentes populações, idealmente com a mesma terapia, são necessários para compreender melhor o papel que fatores farmacogenéticos podem exercer na depuração de antimaláricos (43).

De acordo com as diretrizes do Consórcio de Implementação de Farmacogenética Clínica (CPIC), os fenótipos preditos do gene *CYP2C19* podem ser inferidos através dos genótipos apresentados, de forma que: Pacientes com fenótipo gEM apresentam dois alelos funcionais (\*1/\*1); gIM apresentam apenas um alelo funcional mais um alelo de função nula/diminuída, ou um alelo de função nula/diminuída mais um alelo de atividade aumentada (\*1/\*2, \*1/\*3, \*2/\*17); e gPM apresentam dois alelos de função nula/diminuída (\*2/\*2, \*2/\*3, \*3/\*3) (44).

#### 1.6.4 Citocromo P450 3A4 (*CYP3A4*)

A isoenzima *CYP3A4* contribui para a metabolização de cerca de 50% dos medicamentos usados clinicamente, incluindo um amplo espectro de fármacos e suas classes, como: benzodiazepínicos, bloqueadores dos canais de cálcio, ciclosporina, antibióticos macrolídeos, opióides, estatinas, além de hormônios esteroides (45).

Uma das variantes frequentemente estudadas é *CYP3A4\*1B*, geralmente encontrada em populações brancas com uma frequência de ~2 a 9%, e em frequências altas na população africana (29). Em estudos realizados no Brasil a frequência observada deste alelo variou entre 10-14% (34,41).

Embora amplamente estudada, seu status funcional permanece controverso (32,46). Yousef *et al* observaram uma necessidade de ajustes de dosagem em portadores do alelo *CYP3A4\*1B*, ressaltando a hipótese de que este alelo está associado ao aumento da atividade catalítica, portanto sugerindo um aumento da dosagem, embora nenhuma diretriz para esta *CYP* tenha sido publicada até o momento (47). Em contrapartida, nenhum efeito no metabolismo do midazolam foi observado para esta variante, sugerindo que as variantes

teriam um impacto limitado no metabolismo de fármacos mediados por CYP3A (48).

Estudos *in vitro* avaliaram as vias metabólicas de alguns antimaláricos como CQ (49) e PPQ (19) constataram que seu metabolismo era mediado principalmente pela enzima CYP3A4, embora a influência que essas variantes podem exercer no tratamento da malária permanecem desconhecidas (20,34,41).

### 1.7 Uridina glucoronosiltransferase 2B7 (*UGT2B7*)

A glicuronidação é uma das principais reações de fase 2 do processo de biotransformação dos fármacos mediada pelas enzimas UGT, que compreendem um conjunto de proteínas-chave responsáveis por catalisar a glucurodinação em uma ampla gama de produtos químicos endógenos e exógenos (28,50).

A isoforma *UGT2B7* é um dos membros mais importantes das UGTs hepáticas, responsável por metabolizar uma série de compostos clinicamente relevantes e pode ser encontrada em diversos órgãos, como cérebro, pâncreas, rins, glândulas mamárias, pulmão e trato gastrointestinal (50).

A frequência das variantes de *UGT2B7* apresenta algumas diferenças de acordo com os grupos étnicos: o alelo *UGT2B7\*1A* globalmente é o mais frequente (32-45%); Já o alelo *UGT2B7\*2A* é mais frequente em Americanos-Europeus (49%) e em Africanos-Americanos (32%); Por fim, o alelo *UGT2B7\*3* é menos frequente em Hispano-Americanos e Asiáticos-Americanos, mas não em outras populações examinadas (51).

Quando se trata de antimaláricos, a dihidroartemisinina (DHA) que trata-se de um derivado das artemisininas, é catabolizada pelas enzimas *UGT1A9* e *UGT2B7* no metabolito inativo  $\alpha$ -dihidroartemisinina- $\beta$ -glucuronídeo (16–18). Zang *et al* buscaram entender o papel das variantes de UGT na população chinesa durante o tratamento com DHA para malária não complicada, sugerindo que as variantes *UGT1A9* (I399C>T) e *UGT2B7\*2* (802C>T) pode não ser uma preocupação durante o tratamento com DHA (52).

Em um estudo realizado por Chamnanphon et al., foi avaliado a relação entre a variação de farmacogenes de CYPs e *UGT2B7* na resposta clínica a PQ, um dos principais antimaláricos responsável por combater os estágios latentes do parasita (8), concluindo uma possível relação entre atividade diminuída de *CYP2C19*, *ABCG2* e *UGT2B7* em combinação com status lento ou intermediários de *CYP2D6* indicando um risco maior de recorrências por *P. vivax* (53).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Avaliar a influências das variantes de *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* e *UGT2B7* em pacientes com malária por *P. vivax* tratados com dihidroartemisinina-piperaquina;

### 2.2 Específicos

- Estimar a frequência das variantes dos genes *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* e *UGT2B7* nos grupos recorrentes e não recorrentes;
- Estudar os genótipos de *CYP2C8*, *CYP3A4*, *UGT2B7* e fenótipos preditos de *CYP2C9* e *CYP2C19* na resposta clínica dos pacientes com *P. vivax* tratados com dihidroartemisinina-piperaquina;
- Relacionar genótipos e fenótipos preditos com clareamento de formas assexuadas.

### **3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO**

No presente documento segue o draft do principal manuscrito como produto da dissertação a ser submetido a revista “Memórias of Instituto Oswaldo Cruz”. O manuscrito abaixo está adequado ao formato solicitado pela revista em questão.

## **INFLUÊNCIA DAS VARIANTES GENÉTICAS DE *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* E *UGT2B7* NAS RECORRÊNCIAS DE MALÁRIA POR *PLASMODIUM VIVAX***

Amanda Oliveira<sup>1,2</sup>, Gabrielly Silva<sup>1,2</sup>, Victor Mwangi<sup>1,2</sup>, Rebecca Netto<sup>1,2</sup>, Marielle Macedo<sup>1,3</sup>, Kim Machado<sup>1,2</sup>, Manuela Crispim<sup>1</sup>, Anne Almeida<sup>1,2</sup>, Marcus Lacerda<sup>1,2,4</sup>, Gisely Melo<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brasil;

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Brasil;

<sup>3</sup>Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Brasil;

<sup>4</sup>Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Leônidas & Maria Deane, Manaus, AM, Brasil.

**Introdução:** O uso de ACTs como tratamento alternativo de malária é amplamente utilizado e recomendado pela OMS. Mutações em genes que codificam enzimas responsáveis pela metabolização de antimaláricos podem comprometer à terapia, levando a recorrências.

**Objetivo:** O objetivo do estudo foi avaliar a influência das variantes dos genes *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* e *UGT2B7* nas recorrências de malária por *P. vivax* em pacientes tratados com DHA-PPQ.

**Métodos:** Ao ser confirmado o diagnóstico de malária vivax, os pacientes tratados em um centro de referência em Manaus foram acompanhados por 180 dias e divididos em dois grupos: caso e controle. A genotipagem dos genes selecionados foi realizada através do sistema TaqMan por PCR em tempo real.

**Resultados:** Para *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* e *UGTB7*, os alelos mutados estavam mais frequentes no grupo caso ( $p > 0,05$ ), e os alelos associados a baixa atividade (\*2/\*3/\*4) de *CYP2C8*, foram mais frequentes no grupo caso (20%) do que no grupo controle (3,3%) ( $p < 0,05$ ). Também foi observado uma associação significativa em relação ao clareamento parasitário no grupo controle, entre os participantes que apresentaram o alelo \*1 ( $p = 0,017$ ) e portadores dos alelos



\*2/\*3/\*4 (p=0.038) com o desfecho recorrência. Nenhuma das variantes avaliadas mostraram associação com um aumento ao risco de recorrências (p>0,05).

Conclusão: Nossos achados sugerem que as variantes em *CYP2C8* podem contribuir para falha terapêutica com DHA-PPQ, gerando recorrências de malária por *P. vivax* e reforçando a importância da farmacogenética na medicina de precisão visando o monitorando das terapias antimaláricas com ACTs.

Palavras-chave: *CYP450*, *UGT2B7*, *Plasmodium vivax*, dihidroartemisinina-piperquina, recorrências, malária.

## INTRODUÇÃO

A malária está entre as doenças que mais sofreram com os impactos causados pela pandemia de COVID-19, registrando 241 milhões de casos de malária em mais de 85 países no ano de 2020, além de 627 mil mortes, tendo um aumento de 12% quando comparado a 2019 (1). No Brasil, no mesmo ano, foram registrados 145.205 casos, sendo 83,0% causados pelo *Plasmodium vivax*, parasita endêmico das Américas (1,2).

A dihidroartemisinina-piperquina (DHA-PPQ) é um dos fármacos que faz parte do grupo de 'terapias combinadas à base de artemisinina' (ACTs), recomendados no tratamento de malária não complicada (1). Sua biotransformação envolve duas principais vias: citocromo P-450 (CYPs) e uridina difosfato glucoronosiltransferase (UGTs). *In vitro* a DHA é metabolizada por UGT1A9 e UGT2B7 em  $\alpha$ -dihydroartemisinina- $\beta$ -glucurodine, e PPQ é metabolizada principalmente por CYP3A4, em menor extensão por CYP2C9 e CYP2C19 (3), além de uma possível contribuição de CYP2C8 (4), gerando dois principais metabólitos: ácido carboxílico (M1) e mono-N-óxido (M2) (3,5).

Cada vez mais vem sendo demonstrado a importância da genética do hospedeiro nos desfechos clínicos da doença (6–8). Sortica *et al.* (9) observaram que pacientes portadores de alelos de baixa atividade de CYP2C8 (\*2/\*3/\*4) apresentaram taxas de depuração de gametócitos mais baixas em comparação ao alelo do tipo selvagem \*1A, além de uma tendência mais baixa entre os portadores do alelo de atividade reduzida de CYP2C9 (\*2/\*3), embora não significativa.

Chamnanphon *et al.* (10) observaram uma associação entre o risco de recorrência por *P. vivax* entre indivíduos portadores do alelo \*2 de *CYP2C19* que foram tratados com uma combinação de cloroquina (CQ) e primaquina (PQ), além de maior frequência do alelo G de *UGT2B7* c.372G>A em comparação ao alelo A (OR=3,75, p=0,081).

O uso de ACTs como tratamento alternativo vem sendo amplamente utilizado e recomendado pela OMS em situações de resistência aos principais fármacos que pertencem aos esquemas atuais, como a CQ. Mutações em genes que codificam as enzimas responsáveis pela metabolização de antimaláricos, podem comprometer à terapia, levando a uma falha terapêutica. Devido a falta de evidências que associem as variantes destes genes aos resultados farmacocinéticos/farmacodinâmicos de DHA-PPQ, o objetivo do estudo foi avaliar a influência das variantes dos genes *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* e *UGT2B7* nas recorrências de malária por *P. vivax* em pacientes tratados com DHA-PPQ.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Aspectos éticos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), sob parecer: 2.659.845. Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE). No caso de menores de idade, o TCLE e Termo de Assentimento (TALE) foi assinado pelos pais ou representante legal.

### **Local do estudo**

Trata-se de um estudo do tipo caso-controle realizado entre os anos de 2018 e 2021, na FMT-HVD, um centro de referência para o tratamento de Doenças Tropicais na Amazônia, localizado na cidade de Manaus, capital do Estado do Amazonas, Brasil.

### **Seleção dos participantes**

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, com idade >6 meses, peso corporal  $\geq 5$  kg, com monoinfecção sintomática por *P. vivax*, com densidade

parasitária entre 100 e 100.000 parasitas/mL. Como critérios de exclusão: uso de antimaláricos nos últimos 60 dias, infecção mista, gravidez ou aleitamento e doenças concomitantes ou de base.

Todos os indivíduos foram tratados com DHA-PPQ por 3 dias, adaptadas de acordo com o peso corporal do paciente: peso corporal  $\geq 5$  e  $< 7$  kg, dose diária de 80mg DHA/PQP 10mg;  $\geq 7$  e  $< 13$  kg, dose diária de 160mg DHA/PQP 20mg;  $\geq 13$  e  $< 24$  kg, dose diária de 320 mg DHA/PQP 40 mg;  $\geq 24$  e  $< 36$  kg, dose diária de 640 mg DHA/PQP 80 mg;  $\geq 36$  e  $< 75$  kg, dose diária de 960 mg DHA/PQP 120 mg,  $\geq 75$  e  $< 100$  kg: dose diária de 1280mg DHA/PQP 160 mg. Uma dose de 0,5 mg/kg/dia de PQ foi administrada por 14 dias, concomitantemente no dia da inclusão ou no D42.

Foram realizados coleta de sangue, exames clínicos e laboratoriais nos dias: D1, D2, D3, D4, D7, D14, D28, D42, D63, D90, D120, D150 e D180 de acompanhamento. Em caso de dias extras de acompanhamento, os mesmos procedimentos de coleta de amostras eram realizados.

Este estudo foi realizado com amostragem de conveniência de outros seguimentos. Os participantes foram divididos em dois grupos: grupo caso, com participante com pelo menos 1 episódio de recorrência durante o período de acompanhamento de 180 dias e grupo controle, composto por indivíduos que não apresentaram nenhum episódio de recorrência durante este período. Os episódios de recorrências foram obtidos durante o acompanhamento clínico ou por detecção passiva através do sistema nacional SIVEP-Malária (Sistema de Vigilância Epidemiológica da Malária), que é o sistema oficial de vigilância epidemiológica da malária no Brasil.

### **Procedimentos laboratoriais**

A extração de DNA genômico das amostras de sangue total foi realizada com o kit comercial QIAmp DNA kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA). Os SNPs foram selecionados de acordo com funcionalidade (nulas ou diminuídas) e frequência mais elevada na população brasileira. Foram selecionados três SNPs de *CYP2C8* (A805T [rs11572103], C792G [rs1058930], G416A [rs11572080]) (11), dois SNPs de *CYP2C9* (3608 C>T [rs1799853], 42614 A>C [1057910]), dois SNPs de *CYP2C19* (681G>A [rs4244285], 636 G>A [4986893]) (12), um

SNP de *CYP3A4* (A392G [rs2740574])(11) e um SNP de *UGT2B7* (372 A>G [28365063]) (10). A genotipagem foi feita através do sistema Taqman, utilizando equipamento Applied® Biosystems 7500 Fast System. Reações de amplificação e parâmetros de ciclagem foram determinados de acordo com as informações do fabricante.

A determinação do fenótipo predito de *CYP2C9* foi realizada pelo sistema de escore de atividade (AS), sendo obtido através da soma de valores atribuídos a cada alelo. Aos alelos foram atribuídos valores de 0 a 1 de forma que: portadores de um alelo não funcional mais um alelo de função diminuída ou dois alelos não funcionais (\*2/\*3 ou \*3/\*2) foram atribuídos a um AS de 0 a 0,5 classificando-os como metabolizadores lentos (gPM); para aqueles que apresentaram pelo menos um alelo de função normal mais um alelo com função diminuída ou um alelo de função normal com um de função nula ou dois alelos de função diminuída (\*1/\*2, \*1/\*3, \*2/\*2) foi atribuído um AS de 1 a 1,5 classificando-os como metabolizadores intermediários (gIMs); e aqueles que apresentaram dois alelos com função normal (\*1/\*1) foram atribuídos a um AS de 2, classificando-os como metabolizadores extensivos (gEMs) (13).

Para *CYP2C19*, os fenótipos serão classificados como: gEM, gIM ou gPM. Pacientes com fenótipo gEM serão aqueles homozigotos (\*1/\*1), com atividade enzimática normal; gIM serão aqueles heterozigotos (\*1/\*2 ou \*1/\*3) resultando em diminuição da atividade enzimática; e gPM serão aqueles com dois alelos de perda de função (\*2/\*2 ou \*3/\*3), resultando em atividade do *CYP2C19* reduzida ou ausente (14).

Os fenótipos de *CYP2C8*, *CYP3A4* e *UGT2B7* não foram inferidos porque ainda não há diretrizes para predição da atividade enzimática destes genes.

Foram feitas alíquotas com 200 µL de plasma das amostras coletadas no D7 para medir os níveis de PPQ. A análise foi feita por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)(15).

### **Análises estatísticas**

As análises foram realizadas usando o software Stata v.13. Para avaliar a diferença nas frequências dos alelos foram usados os testes de qui-quadrado ou teste exato de fisher. Para avaliar a influência do genótipo na recorrência e no

tempo de clareamento das formas assexuadas, foi usado a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. A associação entre as variantes genéticas e as recorrências foi usada regressão linear generalizada log-binomial múltipla. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo em todas as análises.

## RESULTADOS

### Características da população de estudo

Foram incluídos 80 participantes neste estudo, sendo 20 no grupo caso e 60 no grupo controle. As características demográficas dos participantes estão descritas na Tabela 1. Foi observado que não houve diferença significativa entre os grupos com relação a idade, sexo, etnia, malária prévia, densidade de formas assexuadas e sexuadas e clareamento parasitária ( $p > 0,05$ ). A análise dos níveis de PPQ em relação ao genótipo foi realizada em 78 indivíduos e 9 variantes foram genotipadas em todos os participantes.

### Frequência alélica de *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* e *UGT2B7* e fenótipos preditos de *CYP2C9* e *CYP2C19*

A maioria dos indivíduos apresentou alelos associados a atividade enzimática normal (\*1 ou \*1A ou A) entre os 5 genes avaliados (Tabela 2). Para *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* e *UGT2B7*, os alelos mutados estavam mais frequentes no grupo com recorrência, porém sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Para o gene *CYP2C8*, o alelo associado à atividade normal (\*1) foi similar entre os grupos ( $p > 0,05$ ) e os alelos associados a atividade lenta (\*2/\*3/\*4) foram mais frequentes no grupo caso (20%) do que no grupo controle (3,3%) ( $p < 0,05$ ).

Com relação ao fenótipo predito, para *CYP2C9*, a frequência entre os grupos foi similar ( $p = 0,062$ ). A maioria dos participantes apresentou gEM, tanto no grupo caso (45%), quanto no grupo controle (68,3%). A frequência dos fenótipos de atividade intermediária e lenta (gIM+gPM) foi maior no grupo caso (55%) que no grupo controle (31,7%), porém sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3). Para o gene de *CYP2C19*, a maioria dos participantes apresentou gEM (82,5%) em ambos os grupos. Com relação a frequência dos fenótipos gIM+gPM, a frequência foi similar entre os grupos (25-15% respectivamente), sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3).

### **Variantes de *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* e *UGT2B7* e tempo até a primeira recorrência**

Não foi observado diferença estatística entre variantes dos genes estudados no tempo até a primeira recorrência entre os casos e controles ( $p > 0.05$ ) (Figura 1).

### **Clareamento parasitário e níveis de PPQ em relação aos genótipos e fenótipos preditos**

Com relação ao clareamento parasitário assexuado, para o gene de *CYP2C8*, foi observada uma diferença no grupo controle, entre os participantes que apresentaram o alelo \*1 ( $p = 0.017$ ) e portadores dos alelos \*2/\*3/\*4 ( $p = 0.038$ ) (Tabela 4). Porém, não foram observadas diferenças significantes associadas ao desfecho com clareamento parasitário entre genótipos e fenótipos estudados (Figura 2).

Para *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2C8*, *CYP3A4* e *UGT2B7*, a concentração de PPQ foi menor no grupo caso do que no grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 3). A concentração média no grupo caso em indivíduos com fenótipos gIM+gPM para *CYP2C9* foi de 34,9 ng/dL e 35,9 ng/dL de indivíduos com fenótipo gEM, (IC95% 28,3-41,6 vs 29,9-41,7) vs 69,9 ng/dL em indivíduos com fenótipos gIM+gPM e 71,7 ng/dL em indivíduos com fenótipos gEM no grupo controle (IC95% 58,5-81,4 vs 64,5-78,9). Para *CYP2C19*, a concentração média no grupo caso foi de 38,4 ng/dL em portadores dos fenótipos gIM+gPM e 34,3 ng/dL em indivíduos com fenótipo gEM (IC95% 29,2-47,6 vs 29,2-39,3) vs 77 ng/dL em indivíduos portadores dos fenótipos gIM+gPM e 70,1 ng/dL em indivíduos com fenótipo gEM no grupo controle (IC95% 62,2-91,8 vs 63,5-76,7). Para *CYP2C8* a concentração média no grupo caso foi de 34,2 ng/dL em portadores de alelos de metabolização lenta e 36 ng/dL em indivíduos com alelo de metabolização normal (IC95% 27-41,4 vs 30,2-41,8) vs 68,4 ng/dL em indivíduos portadores de alelos de metabolização lenta e 72,2 ng/dL em indivíduos com alelos de metabolização normal no grupo controle (IC95% 58,1-78,8 vs 64,8-79,6). Para *CYP3A4*, a concentração média no grupo caso foi de 40,7 ng/dL em portadores

de alelos mutados e 33 ng/dL em indivíduos com alelo do tipo selvagem (IC95% 35,5-45,9 vs 27,7-38,2) vs 63,3 ng/dL em indivíduos portadores de alelos mutados e 75 ng/dL em indivíduos com alelos do tipo selvagem no grupo controle (IC95% 52,5-74,2 vs 67,9-82). Já para *UGT2B7* a concentração média no grupo caso foi de 32,3 ng/dL em portadores de alelos mutados e 36 ng/dL em indivíduos com alelo do tipo selvagem (IC95% 19,2-45,3 vs 31,3-40,8) vs 70,8 ng/dL em indivíduos portadores de alelos mutados e 71,3 ng/dL em indivíduos com alelo do tipo selvagem no grupo controle (IC95% 58,8-82,7 vs 64,3-78,3) (Figura 1).

### **Influência dos genótipos de *CYP2C8*, *CYP3A4*, *UGT2B7* e fenótipos preditos de *CYP2C9* e *CYP2C19* na resposta clínica**

O Risco Relativo (RR) foi utilizado para avaliar a influência dos genótipos de *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* e *UGT2B7* e fenótipos preditos de *CYP2C9* e *CYP2C19* na resposta clínica dos pacientes que foram tratados com DHA-PPQ (Tabela 5). O RR dos fenótipos preditos de atividade diminuída/nula de *CYP2C9* no grupo caso foi de 55% vs 31,6% no grupo controle, com RR de 2,03, porém sem diferença significativa (IC95% 0.95-1.04;  $p=0.065$ ).

## **DISCUSSÃO**

Este estudo foi o primeiro a avaliar simultaneamente a influência das variantes genéticas de *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* e *UGT2B7* em relação as recorrências de *P. vivax* de indivíduos tratados com DHA-PPQ na Amazônia brasileira. As recorrências persistem como um obstáculo na eliminação da malária vivax, podendo contribuir para a manutenção da transmissão e morbidade relacionada a doença.

O impacto das variantes de CYPs na resposta aos antimaláricos vem sendo explorado cada vez mais (8), uma vez que a atividade enzimática pode diferir entre as populações e influenciar na eficácia terapêutica (9), contribuindo para o aumento de recorrências (8). Um estudo realizado na Amazônia brasileira envolvendo CYPs de CQ não encontrou relação entre os SNPs estudados com a recorrência, indicando que apesar da ocorrência de alelos associados ao

metabolismo lento, não houve influência na recorrência precoce de malária por *P. vivax* (11).

Sortica *et al* (9) por outro lado, observaram um efeito significativo no tratamento de malária por *P. vivax* com CQ/PQ em indivíduos portadores dos alelos associados a metabolização lenta de CYP2C8 (\*2/\*3/\*4) e também observaram uma maior redução na quantidade de gametócitos em indivíduos homozigotos para o alelo do tipo selvagem ( $p=0,007$ ). Além disso, foi observado um possível papel dos alelos de atividade diminuída de CYP2C9 no tratamento da malária, ressaltando a necessidade de estudos adicionais que expliquem melhor o papel dessas variantes na resposta clínica da doença.

Para o gene CYP2C8, a variante \*2 é encontrada de 10-37% em indivíduos com ancestralidade africana e CYP2C8\*3 e CYP2C8\*4 são mais comuns em indivíduos europeus (17,18). Para CYP2C9, a variante \*2 é mais comum em americanos (7%), asiáticos do sul (5%) e africanos (2%), e CYP2C9\*3 é mais comum em asiáticos do leste e americanos (3-4%) (18). Para CYP2C19, a variante \*2 é o mais comumente encontrado, variando em 18% em populações africanas e europeias, a 30% em asiáticos, e CYP2C19\*3 é mais comum entre asiáticos do leste (7%) (18). Para o gene de CYP3A4, a frequência da variante \*1B pode variar, sendo mais frequente em populações africanas (76%) (19). A frequência das variantes de CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e UGT2B7 encontradas em nosso estudo condizem com achados encontrados em estudos anteriores em outras populações (10) e também com achados encontrados na população brasileira (8,9,11,16). Apenas a frequência das variantes CYP2C9\*2 e CYP2C9\*3 foi maior.

Nossos resultados mostraram maior frequência de alelos associados a metabolização lenta de CYP2C8 (\*2, \*3, \*4) no grupo caso, quando comparados ao grupo controle ( $p=0.002$ ). Esses resultados corroboram com achados anteriores na Amazônia brasileira que observarem uma associação no desfecho recorrência em indivíduos portadores de alelos associados a metabolização lenta de CYP2C8 (8), além de observarem um efeito significativo da presença destes alelos sobre a resposta terapêutica (9).



Além disso, observamos uma associação entre os alelos de metabolização lenta de *CYP2C8* com o tempo de clareamento parasitário em indivíduos do grupo controle ( $p < 0,05$ ). É importante ressaltar a proporção desigual de indivíduos deste grupo que apresentaram o alelo do tipo selvagem comparado aos que apresentaram as variantes de metabolização lenta de *CYP2C8* [34,5% vs 100% ( $p = 0,017$ ); 66% vs 0 ( $p = 0,038$ )], o que pode ter influenciado a gerar estas diferenças encontradas.

Um estudo realizado em pacientes cambodianos e tailandeses, encontraram alta frequência de *CYP2C9\*3* e *CYP3A4\*1B*, mas não encontraram diferenças significativas. Além disso, nenhum dos SNPs melhorou o ajuste do modelo farmacocinético, sugerindo que dados farmacocinéticos não precisam ser incluídos em tratamentos de primeira linha com as atuais ACTs disponíveis (20).

Em nosso estudo, não encontramos associação entre os genótipos de *CYP2C8*, *CYP3A4* e *UGTB7* e os fenótipos preditos de *CYP2C19* e *CYP2C9* com o clareamento parasitário, nem com o tempo até o primeiro episódio de recorrência. Almeida *et al* (11) e Cardoso *et al* (16) que também não encontraram associação entre variantes de CYPs de CQ e PQ com o tempo até a primeira recorrência e clareamento parasitário na população da Amazônia brasileira.

Phyo *et al.* (21) observaram em 24 horas uma redução de 63,7% no clareamento de indivíduos tratados com DHA-PPQ comparados com aqueles que foram tratados com CQ (21,1%) o que era de se esperar já que os derivados da artemisinina possuem uma ação mais rápida em um intervalo de tempo menor, no entanto sem esperar que a droga exercesse efeito nas recaídas ou reinfeções subsequentes da doença.

A falha da eficácia DHA-PPQ já foi relatada anteriormente em países como Vietnã e Cambodia durante o tratamento da malária não complicada por *P. falciparum* (22,23), porém sendo associada as mutações relacionadas ao gene do parasita como *kelch13* Cys580Tyr, frisando a importância da regularização e monitoramento rigoroso do uso de antimaláricos.

Quando comparamos os níveis de PPQ entre os grupos, observamos uma diferença significativa entre indivíduos portadores de alelos mutados vs

indivíduos portadores de alelos do tipo selvagem ( $p < 0.05$ ). Price *et al* (24), observaram que a concentração plasmática de DHA-PPQ no D7 foi um dos principais determinantes para falha terapêutica, observando que pacientes com concentração abaixo de 30 ng/dL estavam mais propensos a recorrência. Estudos farmacocinéticos sobre essa combinação ainda são limitados e escassos.

Não encontramos nenhuma associação relacionada ao gene de *UGT2B7* e a resposta ao tratamento com DHA-PPQ, apenas quanto aos níveis de PPQ observados entre os grupos. Zang *et al.* (25) não encontraram associação entre as variantes de *UGT1A9* e *UGT2B7* no metabolismo de DHA-PPQ, deixando claro que outros estudos com uma amostragem maior, além da avaliação de outros fatores genéticos como CYPs, UGTs transportadores e receptores que não foram testados, seriam necessários para entender o real papel dessas variantes na resposta clínica a doença.

Este estudo teve algumas limitações: o baixo número de recorrências por *P. vivax* limitou a quantidade de casos a serem analisados; os fenótipos de *CYP2C9* e *CYP2C19* foram preditos pelo genótipo; não foi possível realizar a dosagem dos metabólitos de DHA-PPQ; interações medicamentosas e a presença de outras condições inflamatórias não foram avaliadas; não foi possível analisar a qualidade dos medicamentos administrados e a administração do DHA-PPQ não foi supervisionada.

Nosso estudo é o primeiro a sugerir que as variantes em *CYP2C8* podem contribuir para falha terapêutica com DHA-PPQ, gerando recorrências de malária por *P. vivax*, indicando também um pequeno papel, embora não significativo, de *CYP2C9*, reforçando a necessidade da execução de estudos sobre farmacogenética de antimaláricos, visando a contribuição de novas informações no campo da medicina de precisão e no monitorando das terapias antimaláricas baseadas em derivados da artemisinina para o tratamento da malária, que ainda segue sendo uma das doenças de maior fator de morbimortalidade em várias regiões do mundo, incluindo a região Amazônica.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaríamos de agradecer a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento desta pesquisa e subsequente concessão de bolsas aos pesquisadores, a toda estrutura fornecida pela FMT-HVD para o desenvolvimento das atividades e por fim, a cada um dos pacientes que aceitaram participar e colaborar com este estudo.

### **CONFLITO DE INTERESSES**

Todos os autores declaram não possuir conflito de interesses.

### **CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES**

GM, AA, AO – Contextualização e elaboração do trabalho; AO, GS, MM, KM, MC – Coleta de dados e procedimentos laboratoriais; AO, VM, RN – Análise de dados; AO – Redação do manuscrito; GM, AA, ML – Revisão e edição.

### **REFERÊNCIAS**

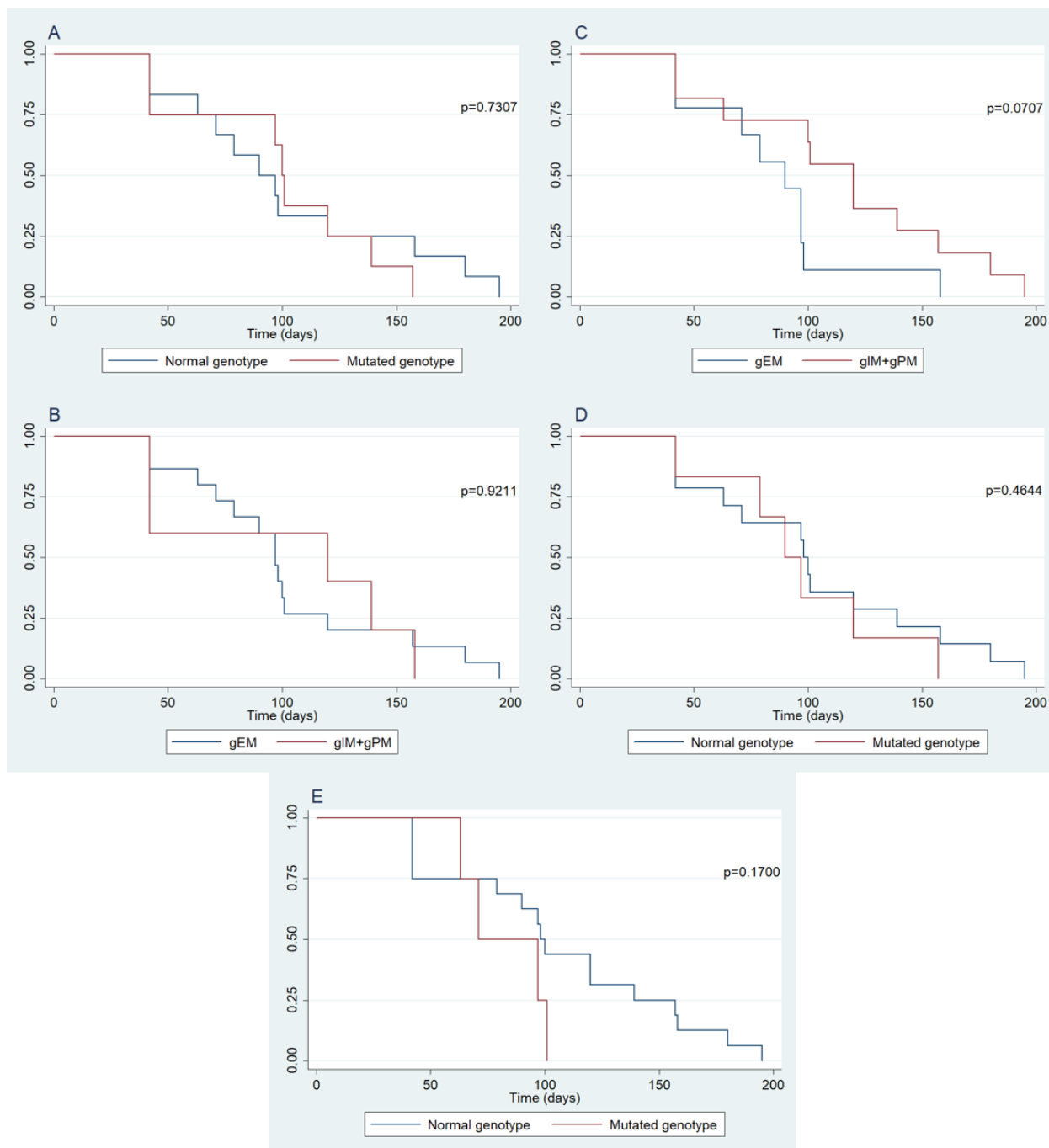
1. WHO. World Malaria Report 2021. World Malaria report Geneva: World Health Organization. (2021). Licence: CC. 2021. 2013–2015 p.
2. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil. Bol Epidemiológico. 2022;53:1–17.
3. CHMP. Eurartesim, INN-piperaquine & INN-artenimol.
4. Lee TMN, Huang L, Johnson MK, Lizak P, Kroetz D, Aweeka F, et al. In vitro metabolism of piperaquine is primarily mediated by CYP3A4. Xenobiotica. 2012;42(11):1088–95.
5. Aziz MY, Hoffmann KJ, Ashton M. LC–MS/MS quantitation of antimalarial drug piperaquine and metabolites in human plasma. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci [Internet]. 2017;1063:253–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.035>
6. Pernaute-Lau L, Camara M, Nóbrega de Sousa T, Morris U, Ferreira MU, Gil JP. An update on pharmacogenetic factors influencing the metabolism and toxicity of artemisinin-based combination therapy in the treatment of malaria [Internet]. Vol. 18, Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology. 2022 [cited 2022 Sep 7]. p. 39–59. Available from:

- <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iemt20>
7. Elewa H, Wilby KJ. A Review of Pharmacogenetics of Antimalarials and Associated Clinical Implications. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2017;42(5):745–56.
  8. Silvino ACR, Costa GL, Araújo FCF de, 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. Renia L, editor. *PLoS One* [Internet]. 2016 Jul 28;11(7):14. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0160172>
  9. Sortica VA, Lindenau JD, Cunha MG, Ohnishi M DO, Ventura AMR, Ribeiro-dos-Santos ÂK, et al. The effect of SNPs in CYP450 in chloroquine/primaquine Plasmodium vivax malaria treatment. *Pharmacogenomics* [Internet]. 2016 Nov;17(17):1903–11. Available from: [www.futuremedicine.com](http://www.futuremedicine.com)
  10. Chamnanphon M, Gaedigk A, Puangpetch A, Pasomsub E, Chantratita W, Longley RJ, et al. Pharmacogene Variation in Thai Plasmodium vivax Relapse Patients Treated with a Combination of Primaquine and Chloroquine. *Pharmgenomics Pers Med* [Internet]. 2020 Jan;Volume 13:1–12. Available from: <http://doi.org/10.2147/PGPM.S201007>
  11. Almeida ACG, Puça MCB, Figueiredo EFG, Barbosa LR, Salazar YEAR, Silva EL, et al. Influence of CYP2C8 , CYP3A4 , and CYP3A5 Host Genotypes on Early Recurrence of Plasmodium vivax. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2020 Jun 23;64(7):1–11. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.02125-19>
  12. Hodel EMS, Csajka C, Arie 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* [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2020 Sep 27];57(2):950–8. Available from: <https://aac.asm.org/content/57/2/950>
  13. Karnes JH, Rettie AE, Somogyi AA, Huddart R, Fohner AE, Formea CM,

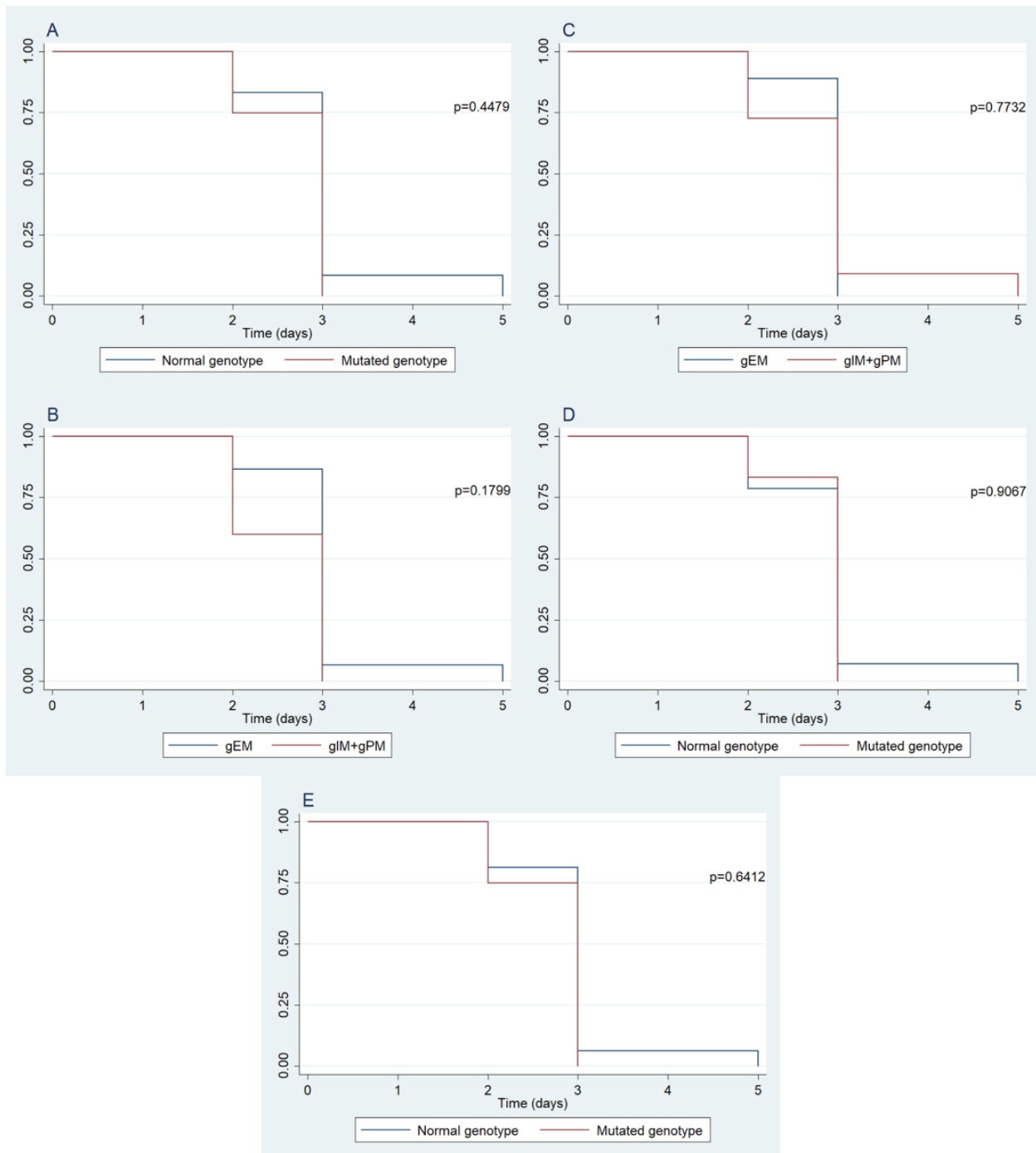
- et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2C9 and HLA-B Genotypes and Phenytoin Dosing: 2020 Update. *Clin Pharmacol Ther.* 2021;109(2):302–9.
14. Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, Hulot JS, Mega JL, Roden DM, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94(3):317–23.
  15. Melo MM, Costa MRF, Filho FSS, Brito-Sousa JD, Almeida ACG, Monteiro WM, et al. Pharmacokinetics of chloroquine in patients with malaria by *P. vivax* from the Western Brazilian Amazon basin. *Biomed Pharmacother.* 2022;149.
  16. 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* [Internet]. 2022;3:1. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
  17. Tornio A, Backman JT. Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update [Internet]. 1st ed. Vol. 83, *Advances in Pharmacology*. Elsevier Inc.; 2018. 3–32 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apha.2018.04.007>
  18. Zhou Y, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Worldwide Distribution of Cytochrome P450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2017;102(4):688–700. Available from: [www.cpt-journal.comARTICLES](http://www.cpt-journal.comARTICLES)
  19. Cavaco I, Reis R, Gil JP, Ribeiro V. CYP3A4\*1B and NAT2\*14 Alleles in a Native African Population. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2003 Jan 25;41(4):606–9. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/CCLM.2003.091/html>
  20. Hodel EMS, Csajka C, Arieu 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.
  21. Phyo AP, Lwin KM, Price RN, Ashley EA, Russell B, Sriprawat K, et al.

- Dihydroartemisinin-piperaquine versus chloroquine in the treatment of plasmodium vivax malaria in Thailand: A randomized controlled trial. *Clin Infect Dis*. 2011;53(10):977–84.
22. van der Pluijm RW, Imwong M, Chau NH, Hoa NT, Thuy-Nhien NT, Thanh NV, et al. Determinants of dihydroartemisinin-piperaquine treatment failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: a prospective clinical, pharmacological, and genetic study. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(9):952–61.
  23. Spring MD, Lin JT, Manning JE, Vanachayangkul P, Somethy S, Bun R, et al. Dihydroartemisinin-piperaquine failure associated with a triple mutant including kelch13 C580Y in Cambodia: An observational cohort study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2015 Jun;15(6):683–91. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70049-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70049-6)
  24. Price RN, Hasugian AR, Ratcliff A, Siswanto H, Purba HLE, Kenangalem E, et al. Clinical and pharmacological determinants of the therapeutic response to dihydroartemisinin-piperaquine for drug-resistant malaria. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2007 [cited 2022 Oct 3];51(11):4090–7. Available from: <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/AAC.00486-07?src=getftr>
  25. Zang M, Zhu F, Zhao L, Yang A, Li X, Liu H, et al. The effect of UGTs polymorphism on the auto-induction phase II metabolism-mediated pharmacokinetics of dihydroartemisinin in healthy Chinese subjects after oral administration of a fixed combination of dihydroartemisinin-piperaquine. *Malar J* [Internet]. 2014;13(1):9. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/13/1/478>

## FIGURAS E TABELAS

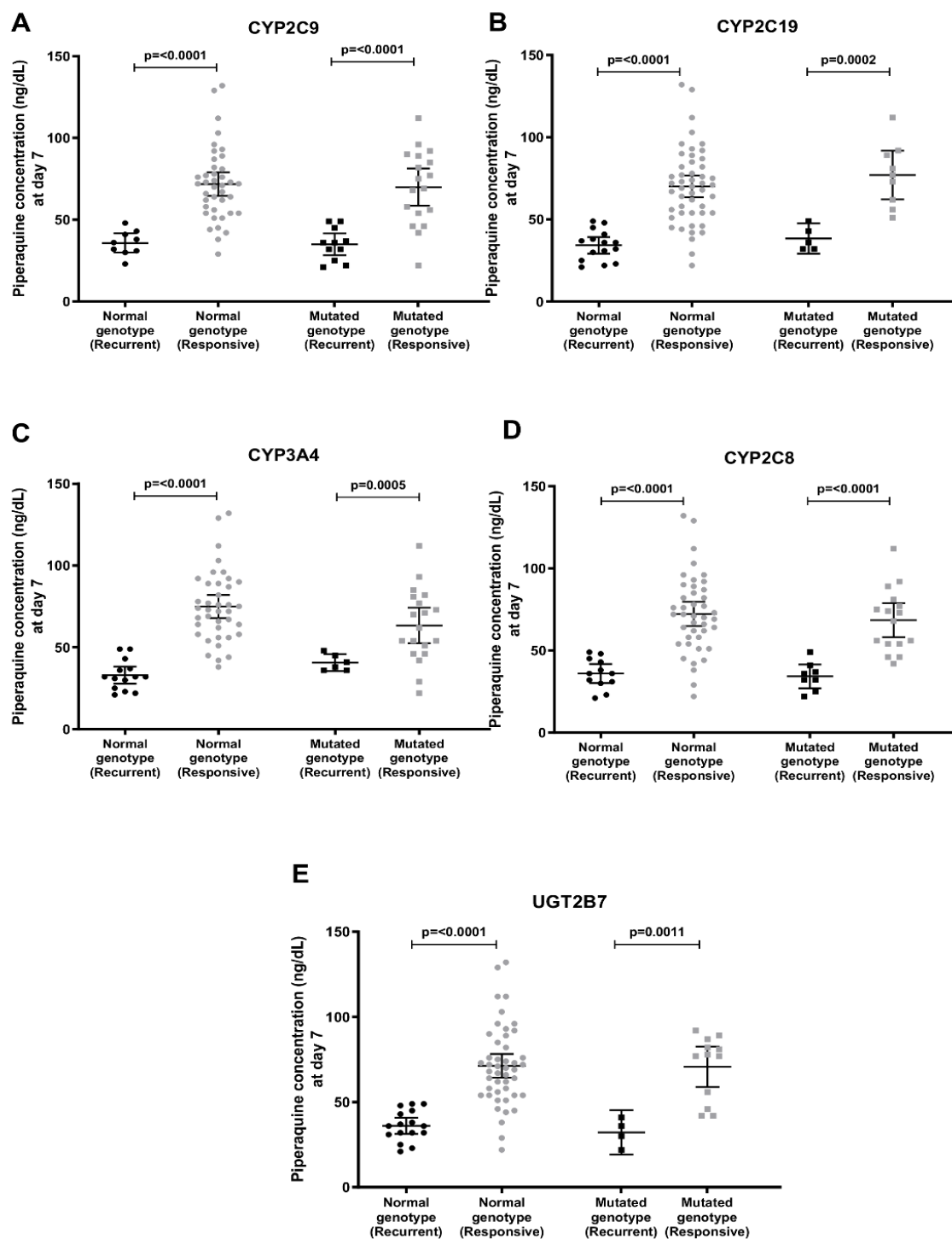


**Figura 1.** Tempo até a primeira recorrência com diferentes genótipos de CYP2C8, CYP3A4 E UGT2B7 e fenótipos preditos de CYP2C9 e CYP2C19. A- Genótipo CYP2C8. B- Genótipo CYP2C9. C- Genótipo CYP2C19. D- Genótipo CYP3A4. E- Genótipo UGT2B7.



**Figura 2.** Clareamento parasitário com diferentes genótipos de *CYP2C8*, *CYP3A4* e *UGT2B7* e fenótipos preditos de *CYP2C9* e *CYP2C19*. A- Genótipo *CYP2C8*. B- Genótipo *CYP2C9*. C- Genótipo *CYP2C19*. D- Genótipo *CYP3A4*. E- Genótipo *UGT2B7*.





**Figura 3.** Média da concentração de DHA-PPQ no D7 entre os diferentes genótipos de *CYP2C8*, *CYP3A4*, *UGT2B7* e fenótipos preditos de *CYP2C9* e *CYP2C19*. A- Genótipo *CYP2C8*. B- Genótipo *CYP2C9*. C- Genótipo *CYP2C19*. D- Genótipo *CYP3A4*. E- Genótipo *UGT2B7*

Tabela 1. Dados sociodemográficos dos indivíduos incluídos no estudo

		<b>Total</b>	<b>Caso</b>	<b>Controle</b>	<b>p valor<sup>1</sup></b>
Nº de participantes		80	20	60	
Média de idade (DP; IC95%)	-	35.2 (11,5; 32,7 - 37,8)	33.8 (12,2; 28,0 - 39,5)	35.7 (11,4; 32,8-38,7)	0,5262
Sexo n (%)	Masculino	52 (65)	13 (35)	39 (65)	> 0.999
	Feminino	28 (35)	7 (65)	21 (35)	
Etnia autodeclarada (%)	Branco	19 (23,8)	3 (15)	16 (26,7)	0,188
	Pardo	50 (62,5)	12 (60)	38 (63,3)	
Nº de episódios prévios (dias, %)	1	-	18 (90)	-	-
	2	-	2 (10)	-	
	<60	-	4 (20)	-	
Tempo até a primeira recorrência (dias, %)	61-120	-	11 (55)	-	-
	121-180	-	4 (20)	-	
	>180	-	1 (5)	-	
Densidade de formas assexuadas no D0*	-	4672 (2539-6828)	4949 (3315-6959)	4520 (2216-6829)	0,4047
Densidade de formas assexuadas na recorrência*	-	-	2686 (729-5995)	-	-
	2	26 (32,5)	4 (20)	22 (36,7)	
Clareamento (dias, %)	3	48 (60)	15 (75)	33 (55)	0,286
	5	6 (7,5)	1 (5)	5 (8,3)	

Mediana\* (25-75% intervalo interquartil).

<sup>1</sup>p valor foram determinados por Teste t, Qui quadrado, Fisher ou Mann-Whitney

Tabela 2. Frequência alélica dos genes de *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* e *UGT2B7*

Gene	Alelos	Caso n (%)	Controle n (%)	Total N (%)	p value <sup>1</sup>
<i>CYP2C9</i>	*1	28 (70)	99 (82,5)	127 (79,4)	0,091
	*2/*3	12 (30)	21 (17,5)	33 (30,6)	0,091
<i>CYP2C19</i>	*1	35 (87,5)	110 (91,67)	145 (90,6)	0,434
	*2/ *3	5 (12,5)	10 (8,33)	15 (9,4)	0,434
<i>CYP2C8</i>	*1	32 (80)	116 (96,7)	148 (92,5)	0,002
	*2/*3/*4	8 (20)	4 (3,3)	12 (7,5)	0,002
<i>CYP3A4</i>	*1A	34 (85)	100 (83,3)	134 (83,8)	0,805
	*1B	7 (17,5)	19 (15,8)	26 (16,3)	0,805
<i>UGT2B7</i>	A	36 (90)	107 (89,2)	143 (89,4)	1,000
	G	4 (10)	13 (10,8)	17 (10,7)	1,000

<sup>1</sup>p valor foram determinados por qui-quadrado ou teste de fisher

Tabela 3. Frequência dos fenótipos preditos de *CYP2C9* e *CYP2C19*

Gene	Fenótipo Predito	Caso n (%)	Controle n (%)	Total N (%)	p value <sup>1</sup>
<i>CYP2C9</i>	gEM	9 (45)	41 (68,3)	50 (62,5)	0,062
	gIM+ gPM	11 (55)	19 (31,7)	30 (37,5)	0,062
<i>CYP2C19</i>	gEM	15 (75)	51 (85)	66 (82,5)	0,308
	gIM+ gPM	5 (25)	9 (15)	14 (17,5)	0,308

<sup>1</sup>p valor foram determinados por qui-quadrado ou teste de fisher

Tabela 4. Clareamento parasitário e níveis da droga entre os diferentes grupos

Gene, Grupo e Alelos	N° de participantes	N° (%) de participantes com clareamento		
		assexuado <sup>1</sup> :		
		D2	D3	D5
<i>CYP2C8</i>				
Recorrência				
*1	32	6 (19)	24 (75)	2 (6,2)
*2/*3/*4	8	2 (25)	6 (75)	0 (0)
P valor		0,650	1,000	1,000
Não recorrência				
*1	116	40 (34,5)	66 (57)	10 (8,3)
*2/*3/*4	4	4 (100)	0 (0)	0 (0)
P valor		0,017	0,038	1,000
<i>CYP2C9</i>				
Recorrência				
*1	28	5 (17,9)	22 (78,5)	1 (3,6)
Portadores dos alelos *2/*3	12	3 (25)	8 (66,7)	1 (8,3)
P valor		0,677	0,451	0,515
Não Recorrência				
*1	99	35 (35,4)	54 (54,6)	10 (10,1)
Portadores dos alelos *2/*3	21	9 (42,9)	12 (57,1)	0 (0)
P valor		0,517	0,828	0,206
<i>CYP2C19</i>				
Recorrência				
*1	35	6 (17,1)	27 (77,1)	2 (5,7)
Portadores dos alelos *2/*3	5	2 (40)	3 (60)	0 (0)
P valor		0,257	0,584	1,000
Não Recorrência				
*1	110	39 (35,5)	62 (56,3)	9 (8,2)
Portadores dos alelos *2/*3	10	5 (50)	4 (40)	1 (10)
P valor		0,361	0,343	0,596
<i>CYP3A4</i>				
Recorrência				
*1A	34	7 (20,6)	25 (73,5)	2 (5,8)

*1B	6	1 (16,70)	5 (83,3)	0 (0)
P valor		1,000	1,000	1,000
Não Recorrência				
*1A	100	38 (38)	54 (54)	8 (8)
*1B	20	6 (30)	12 (60)	2 (10)
P valor		0,498	0,622	0,672
<i>UGT2B7</i>				
Recorrência				
A	36	7 (19,4)	27 (75)	2 (5,6)
G	4	1 (25)	3 (75)	0 (0)
P valor		1,000	1,000	1,000
Não recorrência				
A	107	41 (38,3)	56 (52,3)	10 (9,4)
G	13	3 (23,1)	10 (76,9)	0 (0)
P valor		0,369	0,139	0,598

<sup>1</sup> p valor foram determinados por qui-quadrado ou teste de fisher

Tabela 5. Risco Relativo para recorrência associada aos diplótipos, genótipos de CYP2C8, CYP3A4, UGT2B7 e os fenótipos preditos de CYP2C9 E CYP2C19

	<b>Caso n (%)</b>	<b>Controle n (%)</b>	<b>RR (IC95%)</b>	<b>P valor</b>
<i>CYP2C8</i> diplótipo *1/*1	12 (60)	44 (73,3)	0.64 (0.30-1.36)	0.252
<i>CYP2C8</i> diplótipos *1/*2, *1/*3, *1/*4, *3/*4	8 (40)	16 (26,7)	1.55 (0.73-3.31)	0.252
<i>CYP2C9</i> gEM	9 (45)	41 (68,3)	0.49 (0.23-1.04)	0.065
<i>CYP2C9</i> gIM+gPM	11 (55)	19 (31,6)	2.03 (0.95-4.33)	0.065
<i>CYP2C19</i> gEM	15 (75)	51 (85)	0.63 (0.27-1.46)	0.287

<i>CYP2C19</i> gIM	5 (25)	9 (15)	1.57 (0.68-3.61)	0.287
<i>CYP3A4</i> diplótipo *1A/*1A	14 (70)	41 (68,3)	1.06 (0.46-2.43)	0.890
<i>CYP3A4</i> diplótipo *1A/1B	6 (30)	19 (31,7)	0.94 (0.41-2.16)	0.890
<i>UGT2B7</i> genótipo A/A	16 (80)	47 (78,33)	1.07 (0.41-2.80)	0.876
<i>UGT2B7</i> genótipo A/G	4 (20)	13 (22)	0.92 (0.35-2.40)	0.876

---

#### 4. LIMITAÇÕES E PESPECTIVAS FUTURAS

Este estudo teve algumas limitações: o baixo número de recorrências por *P. vivax*; os fenótipos de *CYP2C9* e *CYP2C19* foram preditos pelo genótipo; não foi possível realizar a dosagem dos metabólitos de DHA-PPQ; interações medicamentosas e a presença de outras condições inflamatórias não foram avaliadas; não foi possível analisar a qualidade dos medicamentos administrados e a administração do DHA-PPQ não foi supervisionada.

No entanto, nossos resultados mostram que indivíduos com variantes genéticas em *CYP2C8* e *CYP2C9* associadas à atividade enzimática reduzida podem contribuir para um aumento no número de recorrências da doença. Com isso, espera-se que este trabalho possa contribuir para o monitoramento das terapias combinadas à base de artemisinina, visando a otimização do tratamento.

## 5. CONCLUSÃO

Nosso estudo é o primeiro a sugerir que as variantes em *CYP2C8* podem contribuir para falha terapêutica com DHA-PPQ, gerando recorrências de malária por *P. vivax*, indicando também um pequeno papel, embora não significativo, de *CYP2C9*, reforçando a necessidade da execução de estudos sobre farmacogenética de antimaláricos, visando a contribuição de novas informações no campo da medicina de precisão e no monitorando das terapias antimaláricas baseadas em derivados da artemisinina para o tratamento da malária, que ainda segue sendo uma das doenças de maior fator de morbimortalidade em várias regiões do mundo, incluindo a região Amazônica.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. World Malaria Report 2021. World Malaria report Geneva: World Health Organization. (2021). Licence: CC. 2021. 2013–2015 p.
2. White NJ. Plasmodium knowlesi: The fifth human malaria parasite [Internet]. Vol. 46, Clinical Infectious Diseases. 2008 [cited 2020 Sep 29]. p. 172–3. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/46/2/172/454007>
3. Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM. First case of a naturally acquired human infection with Plasmodium cynomolgi. Malar J [Internet]. 2014;13:68. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3937822&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. 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 [Internet]. 2017 Oct;5(10):e1038–46. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214109X17303339>
5. 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.
6. Josué da Costa Lima-Junior, Lilian Rose Pratt-Ricio. Major Histocompatibility Complex and Malaria: Focus on Plasmodium vivax infection. Front Immunol [Internet]. 2016 [cited 2020 Sep 29];7:1–13. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
7. De Niz M, Burda PC, Kaiser G, Del Portillo HA, Spielmann T, Frischknecht F, et al. Progress in imaging methods: Insights gained into Plasmodium biology. Vol. 15, Nature Reviews Microbiology. Nature Publishing Group; 2017. p. 37–54.
8. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde D de I e DT. Guia de tratamento da malária no Brasil [Internet]. Segunda Ed. 2021. 84 p. Available from: [www.bvsms.saude.gov.br](http://www.bvsms.saude.gov.br).
9. Ministério da Saúde FN de S. Manual de Terapêutica da Malária [Internet].

- Sexta edição. Brasília; 2001 [cited 2021 Feb 23]. 104 p. Available from: [http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/vigiamb/vetores/Malaria/manu\\_terapeutica\\_malaria.pdf](http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/vigiamb/vetores/Malaria/manu_terapeutica_malaria.pdf)
10. Luciano Rodrigues Simões, Eduardo Rodrigues Alves-Jr, Daniele Ribatski-Silva, Luciano Teixeira Gomes, Andréia Ferreira Nery CJFF. 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](http://www.scielo.br/pdf/csp/v30n7/pt_0102-311X-csp-30-7-1403.pdf)
  11. Popovici J, Pierce-Friedrich L, Kim S, Bin S, Run V, Lek D, et al. Recrudescence, Reinfection, or Relapse? A More Rigorous Framework to Assess Chloroquine Efficacy for *Plasmodium vivax* Malaria. *J Infect Dis* [Internet]. 2019 Jan 7 [cited 2022 Oct 27];219(2):315–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30102351/>
  12. Douglas NM, Anstey NM, Angus BJ, Nosten F, Price RN. Artemisinin combination therapy for vivax malaria. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2010;10(6):405–16. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70079-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70079-7)
  13. Phyto AP, Lwin KM, Price RN, Ashley EA, Russell B, Sriprawat K, et al. Dihydroartemisinin-piperaquine versus chloroquine in the treatment of *Plasmodium vivax* malaria in Thailand: A randomized controlled trial. *Clin Infect Dis*. 2011;53(10):977–84.
  14. Ratcliff A, Siswantoro H, Kenangalem E, Maristela R, Wuwung R, Laihad F, et al. Two fixed-dose artemisinin combinations for drug-resistant *falciparum* and *vivax* malaria in Papua, Indonesia: an open-label randomised comparison. *Lancet*. 2007;369(9563):757–65.
  15. Chen C. Development of antimalarial drugs and their application in China: A historical review. *Infect Dis Poverty*. 2014;3(1):1–10.
  16. Keating GM. Dihydroartemisinin/piperaquine: A review of its use in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Drugs*. 2012;72(7):937–61.
  17. CHMP. Eurartesim, INN-piperaquine & INN-artenimol.

18. Ilett KF, Ethell BT, Maggs JL, Davis TME, Batty KT, Burchell B, et al. Glucuronidation of dihydroartemisinin in vivo and by human liver microsomes and expressed UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(9):1005–12.
19. Lee TMN, Huang L, Johnson MK, Lizak P, Kroetz D, Aweeka F, et al. In vitro metabolism of piperazine is primarily mediated by CYP3A4. *Xenobiotica.* 2012;42(11):1088–95.
20. Pernaute-Lau L, Camara M, Nóbrega de Sousa T, Morris U, Ferreira MU, Gil JP. An update on pharmacogenetic factors influencing the metabolism and toxicity of artemisinin-based combination therapy in the treatment of malaria [Internet]. Vol. 18, *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology.* 2022 [cited 2022 Sep 7]. p. 39–59. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iemt20>
21. Elewa H, Wilby KJ. A Review of Pharmacogenetics of Antimalarials and Associated Clinical Implications. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2017;42(5):745–56.
22. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet.* 2014;383(9918):723–35.
23. Kiang TKL, Wilby KJ, Ensom MHH. Clinical pharmacokinetic drug interactions associated with artemisinin derivatives and HIV-antivirals. *Clin Pharmacokinet.* 2014;53(2):141–53.
24. Ingelman-Sundberg M, Rodriguez-Antona C. Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: Implications for a safer and more effective drug therapy. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [Internet]. 2005. p. 1563–70. Available from: <http://www.imm.ki.se/>
25. van der Pluijm RW, Imwong M, Chau NH, Hoa NT, Thuy-Nhien NT, Thanh NV, et al. Determinants of dihydroartemisinin-piperazine treatment failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: a prospective clinical, pharmacological, and genetic study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2019 [cited 2022 Oct 5];19(9):952–61. Available from:

- <https://www>.
26. Skrzypek R, Callaghan R. The “pushmi-pullyu” of resistance to chloroquine in malaria. *Essays Biochem*. 2017;61(1):167–75.
  27. 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.
  28. Metzger IF, Souza-Costa DC, Tanus-Santos JE. Farmacogenética: Princípios, aplicações e perspectivas. *Medicina (B Aires)*. 2006;39(4):515–21.
  29. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther [Internet]*. 2013;138(1):103–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>
  30. Manikandan P, Nagini S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr Drug Targets*. 2017;19(1):38–54.
  31. Roden DM, McLeod HL, Relling M V., Williams MS, Mensah GA, Peterson JF, et al. Pharmacogenomics. *Lancet [Internet]*. 2019 Aug [cited 2022 Nov 21];394(10197):521–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673619312760>
  32. Tornio A, Backman JT. Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update [Internet]. 1st ed. Vol. 83, *Advances in Pharmacology*. Elsevier Inc.; 2018. 3–32 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apha.2018.04.007>
  33. Zhou Y, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Worldwide Distribution of Cytochrome P450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects. *Clin Pharmacol Ther [Internet]*. 2017;102(4):688–700. Available from: [www.cpt-journal.comARTICLES](http://www.cpt-journal.comARTICLES)
  34. Almeida ACG, Puça MCB, Figueiredo EFG, Barbosa LR, Salazar YEAR, Silva EL, et al. Influence of CYP2C8 , CYP3A4 , and CYP3A5 Host Genotypes on Early Recurrence of Plasmodium vivax. *Antimicrob Agents Chemother [Internet]*. 2020 Jun 23;64(7):1–11. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.02125-19>
  35. Sortica VA, Lindenau JD, Cunha MG, Ohnishi M DO, Ventura AMR,

- Ribeiro-dos-Santos ÂK, et al. The effect of SNPs in CYP450 in chloroquine/primaquine Plasmodium vivax malaria treatment. *Pharmacogenomics* [Internet]. 2016 Nov;17(17):1903–11. Available from: [www.futuremedicine.com](http://www.futuremedicine.com)
36. Parikh S, Ouedraogo JB, Goldstein JA, Rosenthal PJ, Kroetz DL. Amodiaquine metabolism is impaired by common polymorphisms in CYP2C8: Implications for malaria treatment in Africa. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;82(2):197–203.
  37. Pernaute-Lau L, Morris U, Msellem M, Mårtensson A, Björkman A, Gil JP. Influence of cytochrome P450 (CYP) 2C8 polymorphisms on the efficacy and tolerability of artesunate-amodiaquine treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Zanzibar. *Malar J* [Internet]. 2021;20(1):1–7. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03620-6>
  38. Daly AK, Rettie AE, Fowler DM, Miners JO. Pharmacogenomics of CYP2C9: Functional and clinical considerations. *J Pers Med* [Internet]. 2018;8(1):1–31. Available from: [www.mdpi.com/journal/jpm](http://www.mdpi.com/journal/jpm)
  39. Karnes JH, Rettie AE, Somogyi AA, Huddart R, Fohner AE, Formea CM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2C9 and HLA-B Genotypes and Phenytoin Dosing: 2020 Update. *Clin Pharmacol Ther.* 2021;109(2):302–9.
  40. Theken KN, Lee CR, Gong L, Caudle KE, Formea CM, Gaedigk A, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline (CPIC) for CYP2C9 and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Clin Pharmacol Ther.* 2020;108(2):191–200.
  41. 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* [Internet]. 2022;3:1. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
  42. Thapar MM, Ashton M, Lindegårdh N, Bergqvist Y, Nivelius S, Johansson I, et al. Time-dependent pharmacokinetics and drug metabolism of atovaquone plus proguanil (Malarone) when taken as chemoprophylaxis.

- Eur J Clin Pharmacol [Internet]. 2002 Apr 28;58(1):19–27. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00228-002-0426-9>
43. 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* [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2020 Sep 27];57(2):950–8. Available from: <https://aac.asm.org/content/57/2/950>
  44. Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, Hulot JS, Mega JL, Roden DM, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94(3):317–23.
  45. Zhou S-F. Drugs Behave as Substrates, Inhibitors and Inducers of Human Cytochrome P450 3A4. *Curr Drug Metab.* 2008;9(4):310–22.
  46. Shi W-L, Tang H-L, Zhai S-D. Effects of the CYP3A4 Å 1B Genetic Polymorphism on the Pharmacokinetics of Tacrolimus in Adult Renal Transplant Recipients: A Meta-Analysis. 2015;
  47. Yousef AM, Qosa H, Bulatova NR, Abuhaliema A, Almadhoun H, Khayyat G, et al. Effects of genetic polymorphism in CYP3A4 and CYP3A5 genes on tacrolimus dose among kidney transplant recipients. *Iran J Kidney Dis.* 2016;10(3):156–63.
  48. He P, Court MH, Greenblatt DJ, Von Moltke LL. Genotype-phenotype associations of cytochrome P450 3A4 and 3A5 polymorphism with midazolam clearance in vivo. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;77(5):373–87.
  49. Kim KA, Park JY, Lee JS, Lim S. Cytochrome P450 2C8 and CYP3A4/5 are involved in chloroquine metabolism in human liver microsomes. *Arch Pharm Res.* 2003;26(8):631–7.
  50. Guillemette C. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J.* 2003;3(3):136–58.
  51. 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.
52. Zang M, Zhu F, Zhao L, Yang A, Li X, Liu H, et al. The effect of UGTs polymorphism on the auto-induction phase II metabolism-mediated pharmacokinetics of dihydroartemisinin in healthy Chinese subjects after oral administration of a fixed combination of dihydroartemisinin/piperazine. *Malar J* [Internet]. 2014;13(1):9. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/13/1/478>
53. Chamnanphon M, Gaedigk A, Puangpetch A, Pasomsub E, Chantratita W, Longley RJ, et al. Pharmacogene Variation in Thai Plasmodium vivax Relapse Patients Treated with a Combination of Primaquine and Chloroquine. *Pharmgenomics Pers Med* [Internet]. 2020 Jan; Volume 13:1–12. Available from: <http://doi.org/10.2147/PGPM.S201007>
54. Aziz MY, Hoffmann KJ, Ashton M. LC–MS/MS quantitation of antimalarial drug piperazine and metabolites in human plasma. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2017;1063:253–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.035>
55. Silvino ACR, Costa GL, Araújo FCF de, 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. Renia L, editor. *PLoS One* [Internet]. 2016 Jul 28;11(7):14. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0160172>
56. Melo MM, Costa MRF, Filho FSS, Brito-Sousa JD, Almeida ACG, Monteiro WM, et al. Pharmacokinetics of chloroquine in patients with malaria by P. vivax from the Western Brazilian Amazon basin. *Biomed Pharmacother.* 2022;149.
57. Cavaco I, Reis R, Gil JP, Ribeiro V. CYP3A4\*1B and NAT2\*14 Alleles in a Native African Population. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2003 Jan 25;41(4):606–9. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/CCLM.2003.091/html>
58. Hodel EMS, Csajka C, Ariei 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.
59. van der Pluijm RW, Imwong M, Chau NH, Hoa NT, Thuy-Nhien NT, Thanh NV, et al. Determinants of dihydroartemisinin-piperaquine treatment failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: a prospective clinical, pharmacological, and genetic study. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(9):952–61.
60. Spring MD, Lin JT, Manning JE, Vanachayangkul P, Somethy S, Bun R, et al. Dihydroartemisinin-piperaquine failure associated with a triple mutant including kelch13 C580Y in Cambodia: An observational cohort study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2015 Jun;15(6):683–91. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70049-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70049-6)
61. Price RN, Hasugian AR, Ratcliff A, Siswantoro H, Purba HLE, Kenangalem E, et al. Clinical and pharmacological determinants of the therapeutic response to dihydroartemisinin-piperaquine for drug-resistant malaria. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2007 [cited 2022 Oct 3];51(11):4090–7. Available from: <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/AAC.00486-07?src=getfr>



## 7. ANEXOS

### 7.1 Equipe do projeto

Participante	Vínculo	Formação	Função
Amanda Carvalho de Oliveira	UEA/FMT-HVD	Biomédica	Mestranda
Profa. Dra. Gisely Cardoso de Melo	UEA/FMT-HVD	Farmacêutica	Orientadora
Dra. Anne Christine Gomes Almeida	UEA/FMT-HVD	Farmacêutica	Co-orientadora
Msc. Kim Vinícius Amaral Machado	UEA/FMT-HVD	Enfermeiro	Doutorando
Rebeca Linhares de Abreu Netto	UEA/FMT-HVD	Farmacêutica	Doutoranda
Gabrielly Santos da Silva	UEA/FMT-HVD	Biomédica	Mestranda
Flavia Fontenelle Alencar	UEA/FMT-HVD	Biomédica	Apoio técnico

## 7.2 Procedimento operacional padrão (POP) – Extração de DNA

## PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

## INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

## FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

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

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

**1. OBJETIVO**

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

**2. CAMPO DE APLICAÇÃO**

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

**3. DEFINIÇÕES**

Não se aplica.

**4. RESPONSABILIDADES**

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

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

**5. POP'S RELACIONADOS**

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



## 6. PROCEDIMENTOS

### 6.1 Recursos necessários

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

#### 6.1.2 Materiais

- Pipetas automáticas de 10  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  e 1000  $\mu\text{L}$
- Ponteiras com filtro para pipetas automáticas
- Tubos para 1,5 e 2,0 mL

#### 6.1.3 Equipamentos

- Centrifuga
- Vortex
- Banho Maria

#### 6.1.4 Reagentes

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

### 6.2 Obtenção de sangue total

#### 6.2.1 Em papel de filtro

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

#### 6.2.2 Por punção endovenosa

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



---

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

### 6.3 Extração do DNA

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

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

1. Cortar 3 círculos de 3 mm de diâmetro do papel de filtro e colocá-los em um tubo eppendorf de 1,5 mL. Pipetar 180 µL do Tampão ATL.
2. Incubar a 85°C no banho Maria por 10 minutos. Remover as bolhas por centrifugação.
3. Adicionar 25 µL de Proteinase K e agitar no vórtex. Incubar a 56° C por 1 hora. Remover as bolhas por centrifugação.
4. Continuar com o procedimento comum para extração do DNA (6.3.3)

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

1. Pipetar 20 µL de Proteinase K (2) num tubo eppendorf de 1,5 mL.
2. Adicionar 200 µL de amostra ao tubo. Se não houver 200 µL de amostra, adicionar o volume apropriado de PBS.
3. Adicionar 200 µL de Tampão AL (3) a amostra. Vortexar por 15 segundos.
4. Incubar por 56 por 10 minutos.
5. Continuar com o procedimento comum para extração do DNA (6.3.3)

#### 6.3.3 Procedimento comum para extração do DNA

1. Adicionar 200 µL de Etanol absoluto (96 a 100%) e agitar no vórtex imediatamente. Remover as bolhas por centrifugação.
2. Cuidadosamente transferir o conteúdo do tubo para o tubo filtro. Tampar e centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Descartar o filtrado com o tubo. Colocar o tubo filtro em um novo tubo coletor.
3. Cuidadosamente adicionar 500 µL de tampão AW1 e centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Descartar o filtrado com o tubo. Colocar em um novo tubo coletor.
4. Cuidadosamente adicionar 500 µL de tampão AW2 e centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos.
5. Descartar o tubo coletor com o filtrado. Colocar o tubo filtro em novo tubo coletor e centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto.
6. Colocar o tubo filtro em um tubo eppendorf de 1,5 mL novo. Descartar o filtrado e o tubo coletor. Adicionar cuidadosamente 150 µL de tampão AE ou água destilada e incubar à temperatura ambiente por 1 minuto.
7. O volume final utilizado de tampão AE pode ser menor. Em amostras antigas ou com problemas na extração poderão ser ressuspensas em 50 ou 100 µL de tampão AE.
8. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.

---

9. Armazenar por -20°C.

#### 6.4 Biossegurança

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

#### 7. REFERÊNCIAS

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

#### 6 LISTA DE ANEXOS

TÍTULO ANEXO	CÓDIGO

## 7.3 Procedimento Operacional Padrão (POP) – Genotipagem

## PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

## INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

## FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

<b>Código POP</b>	POP_IPCCB_LB_044_v02D_PT		
<b>Título</b>	Procedimento para realização da genotipagem de SNPs de enzimas do citocromo P450 (CYPs) utilizando sistema TaqMan®		
<b>Idioma da versão original</b>	PT		
<b>Elaborado por:</b> Jaiana Larissa de Morais Cardoso	<b>Revisado por:</b> Anne Cristine Gomes de Almeida	<b>Aprovado por:</b> Gisely Cardoso de Melo	<b>Data de aplicação:</b> 23/08/2019
<b>Data e assinatura</b>	<b>Data e assinatura</b>	<b>Data e assinatura</b>	<b>Data da próxima revisão:</b>

<b>Histórico de revisões</b>			
<b>Nome</b>	<b>Assinatura</b>	<b>Data (DD/MMM/AA)</b>	<b>Alterações realizadas</b>
<b>Gisely C. de Melo</b>		<b>24/set/19</b>	- Inserção numero de páginas - Adicionado log de treinamento

**1. OBJETIVOS**

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



## 2. 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 ligados 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.

## 3. APLICAÇÃO

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

## 4. RESPONSABILIDADES

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

## 5. POP'S RELACIONADOS



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

## 6. 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

## 7. Reação de genotipagem

### 7.1. Obtenção de DNA





- a. A extração do DNA deve ser feita de acordo com o POP\_IPCCB\_LB\_003\_v03D\_PT;
- b. 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

- a. 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);
- 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 de genotipagem;
- d. Centrifugar as sondas;
- e. Em um tubo eppendorf, pipetar os reagentes nas seguintes proporções:.

**1x (VF=5µL)**

<b>Mastermix universal</b>	2,5µL
<b>Sonda de genotipagem</b>	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*

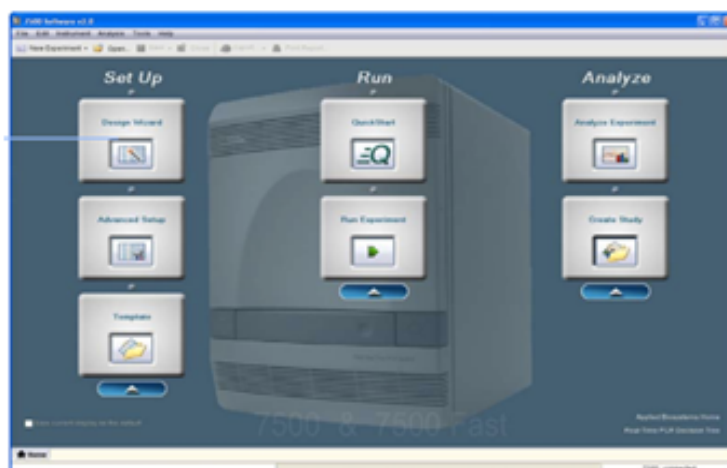
- f. Centrifugar o mix e pipetar 2,75µL em cada poço da microplaca;
- g. Cobrir a microplaca e seguir para a bancada de manipulação de DNA.

## 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

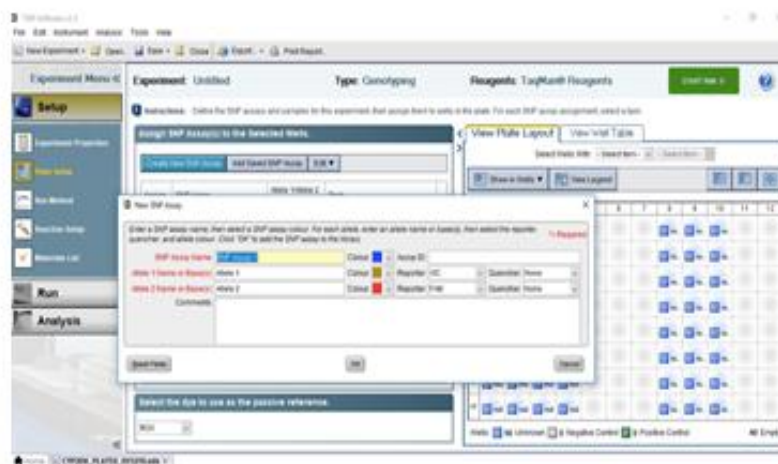
- a. A reação de PCR real time utiliza o software Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR System;
- b. Selecionar Advanced Setup na tela inicial;
- c. No Experiment Menu -> SETUP -> Experiment properties:
  - Identificar o nome do experimento;
  - Instrumento de corrida: 7500 fast (96wells);
  - Tipo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

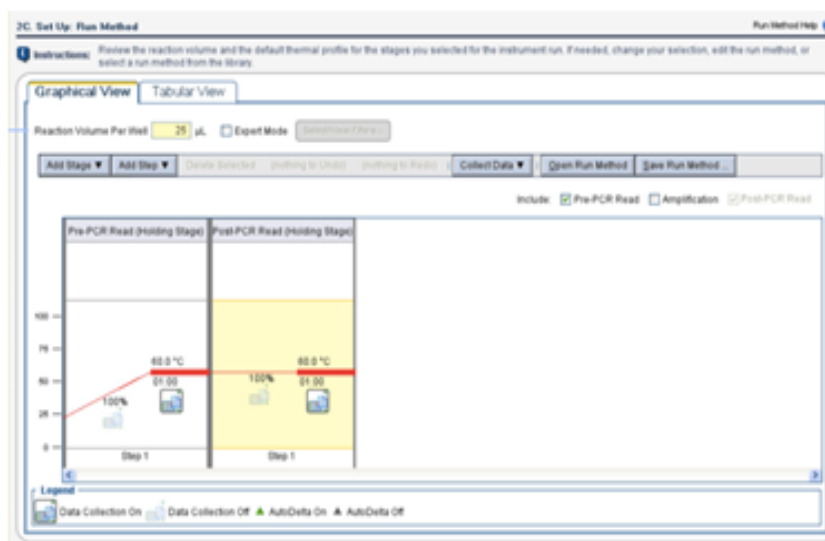


e. No Experiment Menu -> SETUP -> Run method

- Para configurar a corrida, preencha a quantidade de  $\mu\text{L}$  da reação. A reação



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



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

Stage/Step	Pre-PCR Read	Thermal Cycling (Performed on a dedicated thermal cycler)			Post-PCR Read
	Holding Stage	Holding Stage	Cycling (50 cycles)		Holding Stage
			Denature	Anneal/Extend	
Temperature	60 °C	95 °C	92 °C	60 °C	60 °C
Time (mm:ss)	00:30	10:00	00:15	01:30	00:30
Data Collection	Yes	No	No	Yes <sup>2</sup>	Yes

- f. 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.

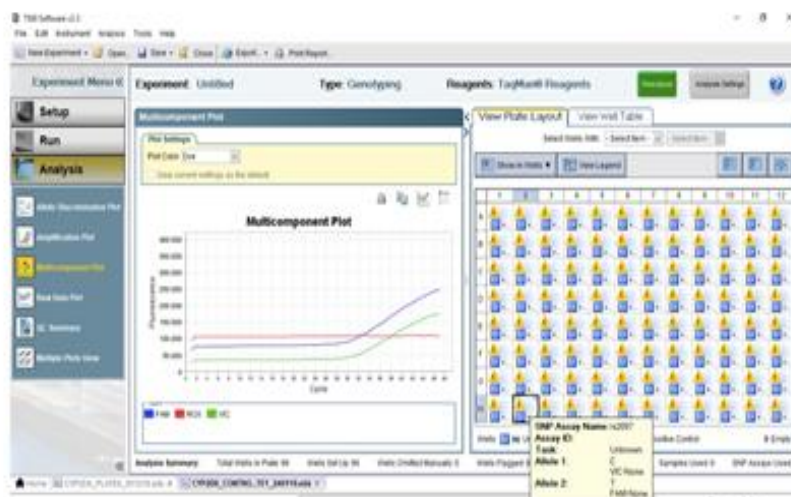
## 7.5. Análise da reação e definição do haplótipo



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



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



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



## 7.4 Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa

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 esquizotônicos 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 documento 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 esquizotônicos 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. Poderá 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. Poderá 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: 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

**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_1121874_E2.pdf	25/04/2018 11:59:33		Aceito
Brochura Pesquisa	Protocolo_LOA2.docx	25/04/2018 11:49:15	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_LOA2.docx	25/04/2018 11:43:49	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LOA2_Respons.docx	25/04/2018 11:43:28	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LOA2.docx	25/04/2018 11:42:58	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CuraVivax_LOA1_180717.docx	19/07/2017 03:28:54	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CuraVivax_LOA1_180717.pdf	19/07/2017 03:28:18	Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LOA1_CuraVivax_Responsaveis.docx	19/07/2017 03:27:09	Marcus Vinicius Guimarães 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@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.659.845

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_apoio_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_amostras.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@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.659.845

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: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

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