

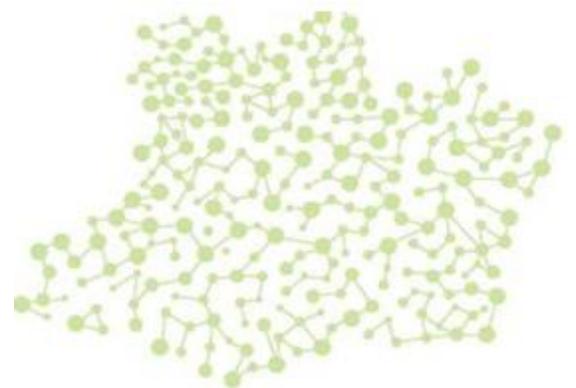


**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**



**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS VARIANTES DO GENE *CYP2D6* EM
INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA DE G6PD NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

LYBIA KÁSSIA SANTOS SARRAFF



**Manaus
2024**

LYBIA KÁSSIA SANTOS SARRAFF

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS VARIANTES DO GENE *CYP2D6* EM
INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA DE G6PD NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Gisely Cardoso de Melo

Coorientadora: Profa. Dra. Anne Cristine Gomes Almeida

Manaus

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Sarraff, Lybia Kássia Santos

Avaliação da influência das variantes do gene *CYP2D6* em indivíduos com deficiência de G6PD na Amazônia brasileira. Lybia Kássia Santos Sarraff. - Manaus, 2024.
viii. 136f.

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

Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2024.

Inclui bibliografia

Orientador(a): Melo de, Gisely Cardoso

Coorientador(a): Almeida, Anne Cristine Gomes

1.Malária. 2.Primaquina. 3.Farmacogenética. 4.Deficiência de G6PD. 5. Hemólise
I.Gisely Cardoso de Melo (Orient.). II. Anne Cristine Gomes Almeida (Coorient.).
III. Universidade do Estado do Amazonas.
IV. Avaliação da influência das variantes do gene *CYP2D6* em indivíduos com deficiência de G6PD na Amazônia brasileira.

FOLHA DE JULGAMENTO**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS VARIANTES DO GENE *CYP2D6*
EM INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA DE G6PD NA AMAZÔNIA
BRASILEIRA****LYBIA KÁSSIA SANTOS SARRAFF**

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

Banca Julgadora:

Presidente

Membro

Membro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao Dono de toda ciência, ao meu Soberano Deus.

Dedico também ao meu amado esposo, Thicara Cardozo e minha filha Louise Cardozo, aos meus pais, Benedito Sarraff e Lindalva Sarraff, e ao meu irmão, Matheus Sarraff, meus fiéis incentivadores, sempre presentes nas alegrias e desafios do percurso acadêmico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amar e capacitar a viver um sonho que pedi a Ele.

Ao meu amado esposo, Thicara Cardozo e à minha amada filha Louise que fizeram tudo fazer ainda mais sentido nessa etapa acadêmica, além do amor incondicional e apoio constante.

Aos meus amados pais, Lindalva Sarraff e Benedito Sarraff, por serem o alicerce de toda a minha trajetória de vida, profissional e acadêmica.

Ao meu irmão, Matheus Sarraff, pela parceria e por se permitir ser instrumento de sabedoria em minha vida.

À minha querida orientadora Dra. Gisely Cardoso, por acreditar e ser a incentivadora da minha melhor versão, pelo apoio constante e oportunidade de crescimento na linha de pesquisa em Malária.

À minha querida coorientadora Dra. Anne Almeida, pela presença, cuidado e apoio constante em diferentes etapas deste trabalho e por sempre ensinar com atenção e paciência.

Aos alunos de iniciação científica, Kássio Lima e Manuela Crispim pela dedicação e suporte fundamental na execução deste trabalho.

Às amigas do grupo de pesquisa LATEFA: Me. Marielle Macêdo, Me. Gabrielly Santos, contemporâneas do período de mestrado, pelos trabalhos realizados na área de estudo com CYPs e G6PD e disposição em contribuir de forma direta e indireta com o andamento desse estudo.

Aos demais amigos do grupo de pesquisa LATEFA: Me. Laila Barbosa, Vanessa Castro, Márcia Viviana, Emanuelle Lira, Dr. Victor Irungu, Erika Gomez e Rebeca Netto pelo companheirismo e bons momentos compartilhados.

Ao Dr. Joabi Nascimento, pela disposição no suporte ao andamento desta pesquisa e ao Erick Frota pelo auxílio fundamental na fase inicial do estudo.

À gerente do laboratório, Dra. Larissa Brasil pela atenção e suporte na execução do projeto.

À gerente de Malária, Dra. Mônica Costa e à secretária Flávia Regina por sempre estarem à disposição.

Aos colegas e professores do Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical, bem como à secretaria do programa, pela disposição, atenção e paciência dedicadas a mim.

À Universidade do Estado do Amazonas pela oportunidade e à FMT-HVD por sediar a execução da pesquisa.

Às agências de fomento CAPES e FAPEAM (Programa Kunhã) pela concessão da bolsa de pesquisa e apoio financeiro ao estudo.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de pesquisa durante o período de execução deste mestrado acadêmico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, através do Programa Kunhã - C,T&I NO AMAZONAS. EDITAL N.º008/2022 (RESOLUÇÃO N.º 010/2022) -, pelo suporte financeiro na execução deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Mas, buscai primeiro o reino de Deus, e a sua justiça,
e todas estas coisas vos serão acrescentadas”

(Mateus 6:33 – Bíblia ACF)

RESUMO

A malária é uma hemoparasitose infecciosa, de transmissão vetorial, que possui grande relevância para a saúde global. No Brasil, a região Amazônica brasileira concentra cerca de 83% dos casos de malária por *Plasmodium vivax*. A primaquina (PQ) é o antimalárico disponível para prevenir recaídas de malária por *P. vivax* e atua após a sua biotransformação por enzimas hepáticas metabolizadoras como a CYP2D6. A CYP2D6 é uma enzima hepática que possui grande potencial polimórfico, o que afeta a farmacocinética da PQ. Além disso, a deficiência da enzima G6PD (G6PDd) em pacientes com malária faz com que as hemácias fiquem altamente vulneráveis ao estresse oxidativo e assim, mais suscetíveis à hemólise por PQ. Este trabalho teve como objetivo avaliar o risco de hemólise das variantes de CYP2D6 em deficientes de G6PD na Amazônia brasileira. Trata-se de um estudo caso controle. Foram incluídos como casos: deficientes de G6PD com teste baseado no resultado do *fluorescent spot test* que relataram sinais associados à hemólise e como controles participantes deficientes que não relataram sinais associados à hemólise no episódio de malária. Os dados epidemiológicos foram obtidos através do autorrelato de indivíduos do sexo masculino de diferentes locais da Amazônia em um questionário padronizado. Os testes de genotipagem para CYP2D6 (11 SNPS) e G6PD (variantes Africanas (A+ e A-) e Mediterrânea (B)) foram realizados por Real-time PCR. Os diplótipos de CYP2D6 foram determinados na plataforma R pelo pacote Haplostats e a identificação dos alelos estrela seguiu a nomenclatura atual no PharmVar. Os fenótipos preditos foram determinados por AS. Foram incluídos 97 casos e 140 controles. Os casos tiveram em média 3,5 episódios de malária prévia e os controles, média de 2 ($p < 0.05$). Quanto ao autorrelato de sinais de hemólise, 12.1% ($n=17$) dos controles não souberam dizer se tiveram icterícia e 5.2% ($n=5$) dos casos relatou necessitar de transfusão sanguínea prévia. Houve recorrência de malária em 2 casos (2.1%) e 2 controles (1.4%), confirmadas no SIVEP-Malária. A maioria dos deficientes de G6PD tinham atividade intermediária da enzima ($n=136; 57,4\%$) e possuíam a variante Africana A- (casos $n=40; 41,2\%$ e controles $n=54; 39,1\%$). Em relação a CYP2D6, o *2 (função enzimática normal) foi o mais frequente entre casos (25,2%) e controles (25%). Dentre alelos de função diminuída, *4 e *10 foram mais frequentes entre casos (10,3% e 7,7%, respectivamente), e controles (10% e 5,7%, respectivamente). A frequência de fenótipos de metabolização intermediária/lenta de

CYP2D6 entre os grupos estudados foi semelhante (gIM+gPM dos casos=21,6%; gIM+gPM dos controles=20,7%, $p>0.05$). Na análise de frequência alélica por estado, *4 e *29 de função diminuída foram mais frequentes no Amapá (20,4%, $p=0,034$; 13,6%, $p=0,041$). Não houve associação entre os fenótipos de *CYP2D6* e risco de hemólise em G6PDd (OR= <1). Até o momento, não foi encontrada influência das variantes de *CYP2D6* e risco de hemólise em deficientes de G6PD nos indivíduos avaliados. O estudo contribui com informações sobre variantes genéticas e deficiência de G6PD na Amazônia e com dados inéditos de frequência alélica e fenótipos de *CYP2D6* em estados endêmicos para malária no Brasil.

Palavras Chaves: *Plasmodium vivax*, malária, primaquina, deficiência de G6PD, CYP2D6.

ABSTRACT

Malaria is an infectious, vector-borne hemoparasitosis that is highly relevant to global health. In Brazil, the Brazilian Amazon region accounts for approximately 83% of cases of *Plasmodium vivax* malaria. Primaquine (PQ) is the antimalarial drug available to prevent relapses of *P. vivax* malaria and acts after its biotransformation by hepatic metabolizing enzymes such as CYP2D6. CYP2D6 is a hepatic enzyme with great polymorphic potential, which affects the pharmacokinetics of PQ. In addition, G6PD enzyme deficiency (G6PDd) in malaria patients makes red blood cells highly vulnerable to oxidative stress and thus more susceptible to hemolysis by PQ. This study aimed to evaluate the risk of hemolysis of CYP2D6 variants in G6PD-deficient individuals in the Brazilian Amazon. This is a case-control study. The following were included as cases: G6PD deficient individuals with a test based on the result of the fluorescent stain test indicating signs associated with hemolysis and as controls, deficient participants who did not present signs associated with hemolysis in the malaria episode. Epidemiological data were obtained through self-reporting of male individuals from different locations in the Amazon in a standardized questionnaire. Genotyping tests for CYP2D6 (11 SNPS) and G6PD (African (A+ and A-) and Mediterranean (B) variants) were performed by real-time PCR. CYP2D6 diplotypes were determined in the R platform by the Haplostats package and the identification of star alleles reached the current nomenclature in PharmVar. Predicted phenotypes were determined by AS. A total of 97 cases and 140 controls were included. Cases had an average of 3.5 previous malaria episodes and controls, an average of 2 ($p < 0.05$). Regarding self-reported signs of hemolysis, 12.1% ($n=17$) of controls were unable to say whether they had jaundice and 5.2% ($n=5$) of reported cases required prior blood transfusion. There was recurrence of malaria in 2 cases (2.1%) and 2 controls (1.4%), confirmed in SIVEP-Malaria. Most G6PD deficient individuals had enzymatic activity ($n=136$; 57.4%) and had the African A- variant (cases $n=40$; 41.2% and controls $n=54$; 39.1%). Regarding CYP2D6, *2 (normal enzymatic function) was the most frequent among cases (25.2%) and controls (25%). Among all those with decreased function, *4 and *10 were more frequent among cases (10.3% and 7.7%, respectively) and controls (10% and 5.7%, respectively). The frequency of CYP2D6 slow/metabolizing phenotypes among the studied groups was similar (gIM+gPM of cases=21.6%; gIM+gPM of controls=20.7%, $p > 0.05$). In the analysis of allele

frequency by state, *4 and *29 of decreased function were more frequent in Amapá (20.4%, $p=0.034$; 13.6%, $p=0.041$). There was no association between *CYP2D6* phenotypes and risk of hemolysis in G6PDd (OR= <1). To date, no influence of *CYP2D6* variants and risk of hemolysis in G6PD deficient individuals has been found in the individuals evaluated. The study contributes with information on genetic variants and G6PD deficiency in the Amazon and with unprecedented data on allele frequency and *CYP2D6* phenotypes in malaria-endemic states in Brazil.

Keywords: *Plasmodium vivax*, malaria, primaquine, G6PD deficiency, *CYP2D6*.

RESUMO LEIGO

A malária é uma doença transmitida por picada de mosquito infectado pelo parasita *Plasmodium vivax*, que possui grande relevância para a saúde da região Amazônica brasileira. A primaquina é o medicamento disponível para tratar a pessoa que está com malária e atua após a sua transformação pelo fígado. Tal transformação sofre grande variação na população, o que pode resultar em falha do tratamento. Além disso, há diferenças na tendência da população ao apresentar sinais de sangramento como urina escura e pele amarelada após o tratamento. Diante disso, nesse estudo foi mostrado que as variações genéticas não estavam associadas com maior risco de falha terapêutica e hemólise. No entanto, foi mostrado que algumas variações genéticas foram mais frequentes no estado do Amapá do que em outros estados da Amazônia brasileira e que novos estudos são necessários com o objetivo de esclarecer a influência da variação da transformação da primaquina pelo fígado em pessoas com resposta mais suscetível a sangramentos no tratamento da malária.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de ocorrência de malária no mundo.....	16
Figura 2 - Mapa de risco de malária por município de infecção.	18
Figura 3 - Ciclo biológico do <i>Plasmodium vivax</i>	20
Figura 4 - Fluxograma para testagem rápida de G6PD e interpretação dos resultados para administração de primaquina.	22
Figura 5. Tipos de recorrência por <i>P. vivax</i>	23
Figura 6 - Resumo do escore de atividade do fenótipo predito de <i>CYP2D6</i>	26
Figura 7. Exemplos de genótipos de <i>CYP2D6</i> associados a fenótipos preditos e atividade enzimática a partir do AS.....	27
Figura 8 - Farmacocinética predita da primaquina no tratamento de malária por <i>P. vivax</i>	29
Figura 9 - Via metabólica simplificada da enzima G6PD.	31
Figura 10 - Epidemiologia da deficiência de G6PD.	32
Figura 11 - Prevalência de G6PDd em seis estados da Amazônia brasileira.	33
Figura 12 - Genótipos e fenótipos da deficiência de G6PD.....	34
Figura 13 - Classificação da Organização Mundial da Saúde para as variantes de <i>G6PD</i>	35

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

AS – Escore de atividade (*activity score*)

CQ - Cloroquina

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*)

CPIC - *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*

CST – Teste *CareStart*

CYP2D6 – Enzima do Citocromo P450

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DPWG - *Dutch Pharmacogenetics Working Group*

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

FST – Teste de Ponto Fluorescente (*Fluorescent Spot Test*)

G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase

G6PDD – Deficiência da Glicose-6-fosfato desidrogenase

GSSH – Glutathiona reduzida

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

PCR – Reação da Cadeia da Polimerase

PharmVar - *Pharmacogene Variation*

PQ – Primaquina

SNP – Polimorfismo de um Único Nucleotídeo (*Single nucleotide polymorphism*)

TQ - Tafenoquina

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	16
1.1 Epidemiologia da malária no mundo	16
1.1.2 Epidemiologia da malária no Brasil.....	17
1.2 CICLO BIOLÓGICO.....	18
1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO	20
1.4 <i>Plasmodium vivax</i>	21
1.4.1 Tratamento	21
1.4.1.1 Primaquina.....	23
1.5 <i>CYP2D6</i>	25
1.6 DEFICIÊNCIA DE G6PD	30
1.7 DEFICIÊNCIA DE G6PD E <i>CYP2D6</i>	37
2. OBJETIVOS	39
3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO.....	40
4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS.....	62
5. CONCLUSÃO.....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
7. ANEXOS	72
7.1 PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO UTILIZADOS (POP'S) ...	72
7.1.1 Procedimento Operacional Padrão de detecção da deficiência de G6PD – técnica spot test.....	72
7.1.2 Procedimento Operacional Padrão – POP extração de DNA.....	74
7.1.3 Procedimento Operacional Padrão – POP genotipagem de SNPS.....	80
7.1.4 Procedimento Operacional Padrão para determinação de haplótipos do gene <i>CYP2D6</i>	95
7.2 INSTRUMENTOS DE COLETA DE DADOS.....	113
7.2.1 Formulário de coleta de dados	113
7.3 ASPÉCTOS ÉTICOS.....	114
7.3.1 Parecer Ético.....	114
7.3.2 Parecer ético – Emenda.....	125
7.3.3 Termo de Consentimento Livre E Esclarecido -TCLE.....	126
7.3.4 Termo de Assentimento Livre E Esclarecido -TALE.....	128

1.INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA NO MUNDO

A malária é uma hemoparasitose infecciosa, de transmissão vetorial, que possui grande relevância para a saúde global. É transmitida ao humano pelo repasto sanguíneo do mosquito do gênero *Anopheles* infectado com protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo seis espécies distintas: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium simium* (1,2).

Em 2022, ocorreram aproximadamente 249 milhões de casos e 608 mil mortes no mundo, principalmente em países africanos (3). A África é responsável por cerca de 95% dos casos e 96% das mortes em todo o mundo e, crianças menores de 5 anos representam 80% das mortes nesta região (3). Nas Américas, *P. vivax* é predominante representando 68,3% dos casos (4–6).

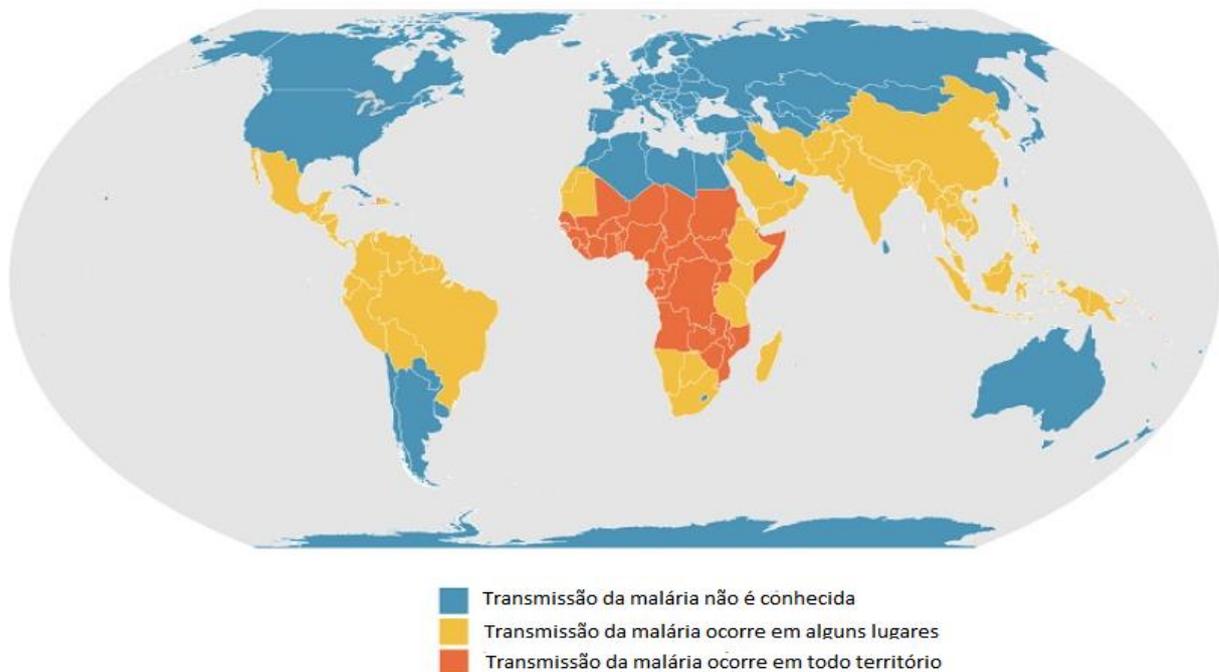


Figura 1 - Mapa de ocorrência de malária no mundo. Fonte: Adaptado de CDC, 2022 (7)

O *P. falciparum* é o principal parasita responsável pela morbidade e mortalidade da malária, contudo, a infecção causada pelo *P. vivax*, que a princípio não era considerada uma infecção fatal, passou a se destacar por sua ampla distribuição geográfica e por seu potencial de evoluir para malária grave e morte (4,6).

1.1.2 Epidemiologia da malária no Brasil

Em 2022, no Brasil, foram registrados 131.224 casos de malária. Dos casos autóctones, sendo 84,2% por *P. vivax* e 13,9% por *P. falciparum*. A malária mista foi presente em 1,8% dos casos (6,8). Na região extra-amazônica, 80% dos casos registrados são importados dos Estados da Amazônia legal e/ou do continente Africano, porém a transmissão residual ocorre principalmente em áreas de Mata Atlântica (SP, MG, RJ e ES) (8,9).

A transmissão ocorre principalmente pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles sp.*, sendo o *Anopheles darlingi*, o principal vetor da malária no país, cujos criadouros preferenciais são coleções de água limpa, quente, sombreada e de baixo fluxo, muito frequentes na Amazônia brasileira (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão), considerada a área endêmica do país para malária com 99% dos casos (8).

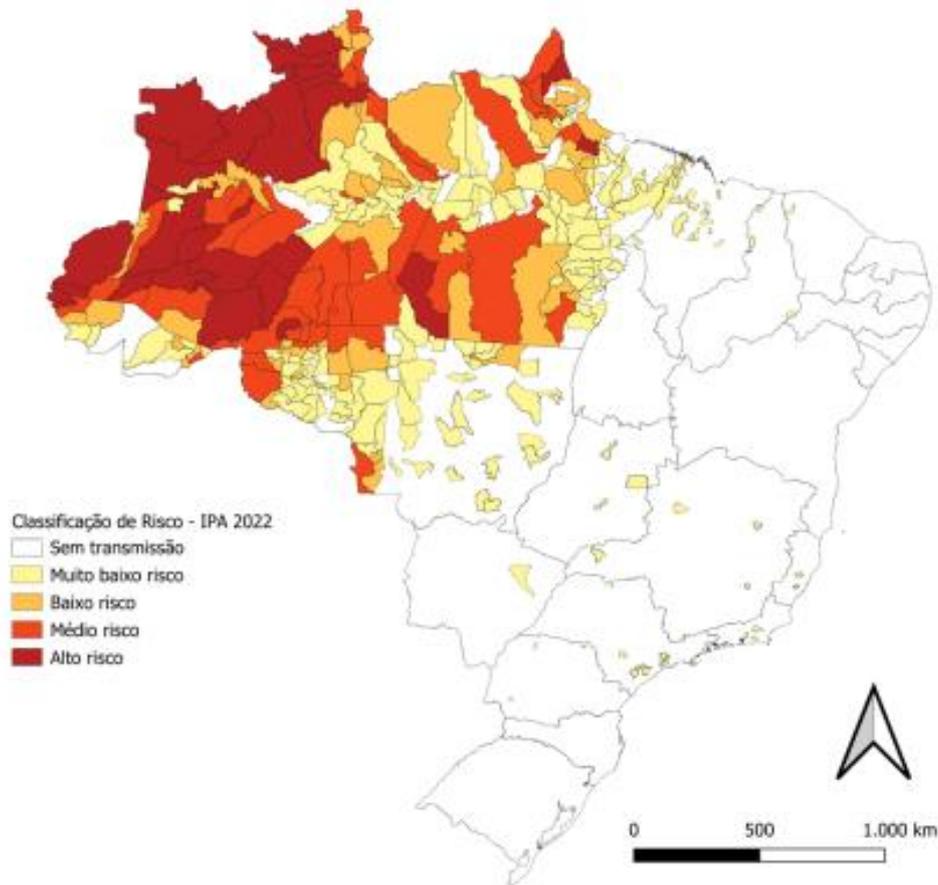


Figura 2 - Mapa de risco de malária por município de infecção. Dados do Sivep-Malária atualizados em 18/08/2023. Dados do Sinan atualizados em 12/09/2023. * Dados de 2022 são preliminares. Fonte: Ministério da Saúde, 2024 (2).

1.2 CICLO BIOLÓGICO

A infecção natural da malária ocorre após a inoculação dos esporozoítos na pele através da picada do mosquito vetor, os quais invadem os hepatócitos e lá se multiplicam dando origem a milhares de merozoítos que rompem os hepatócitos, vão para a corrente sanguínea e invadem os eritrócitos. Há ainda um período de desenvolvimento diferente nas células do fígado entre as espécies do parasita, o *P. falciparum* e *P. vivax* se desenvolvem por aproximadamente uma semana, e cerca de duas semanas nas infecções por *P. malariae*. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, parte dos parasitos se desenvolvem rapidamente e continuam o ciclo, enquanto outros se diferenciam em hipnozoítos e ficam latentes no fígado podendo causar recaídas da

doença após diferentes períodos de incubação, normalmente, dentro dos seis primeiros meses após o tratamento (8) (Figura 3).

A segunda fase do ciclo é chamada de esquizogonia sanguínea e se caracteriza pelo aparecimento dos sintomas da malária. Nesta fase os merozoítos formados rompem os eritrócitos infectados e invadem outros, com repetição desse ciclo a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* e a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae* (8). Algumas gerações de merozoítos se diferenciam em formas sexuadas, os gametócitos. O macrogameta é o gametócito feminino e o microgameta é o masculino. Esses gametas permanecem indivisíveis no interior dos eritrócitos até serem ingeridos pelo mosquito vetor para dar início ao ciclo sexuado onde irão se fecundar para a formação do esporozoíto, forma que é transmitida ao homem no momento da picada pelo inseto (Figura 3) (8).

No mosquito, é realizada a reprodução sexuada do parasito, o ciclo esporogônico. No início desse ciclo, o mosquito ingere os gametócitos, contudo, a presença de gametócitos no sangue periférico não resulta necessariamente em infecção do mosquito. Após a ingestão, a chance da infecção ser bem sucedida está relacionada à fatores como a maturidade do gametócito, a concentração de formas masculinas e femininas e a resposta imune do hospedeiro (10). Já dentro do estômago do mosquito, os microgametas penetram os macrogametas, gerando zigotos. Os zigotos se desenvolvem no lúmen do intestino médio do mosquito em oocinetos móveis que invadem a parede do intestino médio do mosquito, onde se desenvolvem em oocistos. Os oocistos crescem, rompem e liberam esporozoítos que se dirigem às glândulas salivares do mosquito. A continuidade do ciclo biológico se dá a partir da inoculação dos esporozoítos em um novo hospedeiro, e, se este ciclo for bem sucedido, chega a durar entre 10 a 18 dias (Figura 3) (11–13).

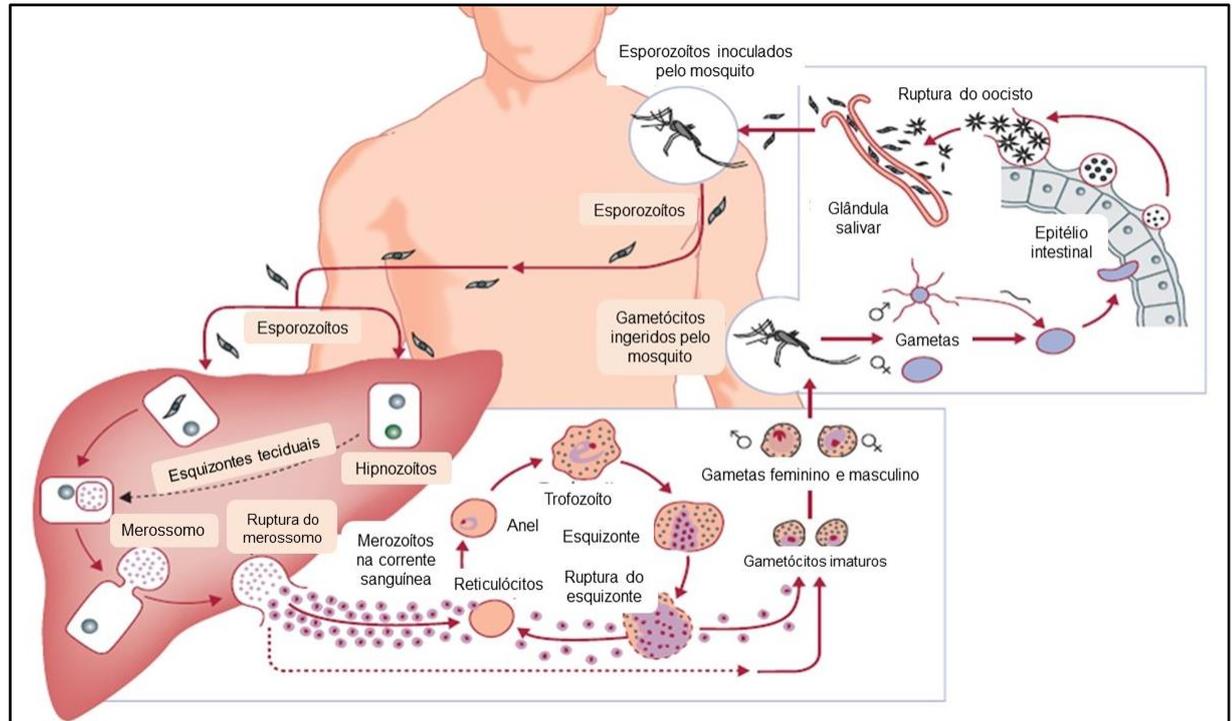


Figura 3 - Ciclo biológico do *Plasmodium vivax*. Fonte: Adaptado de Mueller, 2009 (14).

1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO

O período de incubação da malária pode variar de 8 a 30 dias de acordo com a espécie do parasita, no entanto, pode ocorrer após meses em condições especiais, no caso de *P. vivax* (8). A apresentação clínica da malária pode variar de manifestações oligossintomáticas até quadros graves e letais. Os sinais e sintomas iniciais são inespecíficos assemelhando-se a outras doenças febris agudas, sendo assim, necessária a confirmação laboratorial para o tratamento (8).

O acesso malárico caracteriza a crise aguda da malária, com a presença de calafrio, febre e sudorese. A duração é variável de 6 a 12 horas e pode cursar com temperatura igual ou superior a 40°C, contudo, nem sempre é possível observar esse padrão de febre a cada dois dias. Além disso, a fase aguda geralmente é acompanhada de cefaleia, mialgia, náuseas e vômitos. Nos casos em que o paciente apresente qualquer sinal de evolução para gravidade é importante que os profissionais de saúde estejam alertas e reconheçam os sinais de malária grave para que as medidas adequadas sejam instituídas imediatamente (8).

1.4 *Plasmodium vivax*

A malária por *P. vivax* é a mais prevalente na Amazônia brasileira, representando 86% dos casos (8). *P. vivax* apresenta algumas características biológicas como: desenvolvimento em temperaturas mais baixas durante a esporogonia, preferência pela invasão de reticulócitos e a capacidade dos gametócitos de *P. vivax* se desenvolverem precocemente, sendo observados na circulação periférica antes ou no início dos sintomas clínicos, e a capacidade do *P. vivax* de permanecer latente no fígado causando recaídas através dos hipnozoítos (14,15). A peculiaridade de recorrência do *P. vivax* é uma das principais razões para a transmissão global sustentada da malária após a ativação do período de latência dos hipnozoítos de maneira ainda não bem descrita na literatura (8).

1.4.1 Tratamento

O tratamento visa atingir o parasito em diferentes fases de seu ciclo evolutivo: (a) interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção; (b) destruição de formas latentes do parasito das espécies *P. vivax*, evitando assim as recaídas; (c) interrupção da transmissão do parasito, pelo uso de drogas que impedem o desenvolvimento de formas sexuadas dos parasitos (16). No Brasil, a combinação de cloroquina (CQ) e primaquina (PQ) ou tafenoquina (TQ) é utilizada como primeira linha de tratamento para casos não complicados de *P. vivax* (5).

O esquema terapêutico recomendado consiste na administração de CQ por 3 dias (10mg base/kg no 1º e 7,5mg/kg no 2º e 3º dia) combinada com PQ por 7 dias (0,5mg/kg/dia) para o tratamento radical (8,17). Contudo, o status de G6PD deve servir como orientação para administração da PQ. Nestes casos, PQ deve ser administrada a 0,75 mg/kg semanalmente por 8 semanas, com supervisão médica para potencial hemólise induzida por PQ, pois um indivíduo com atividade de G6PD <30% do normal corre alto risco de apresentar hemólise grave após a administração de altas doses de PQ. Considera-se, assim, que a gravidade da anemia hemolítica

depende da dose de PQ e da variante *G6PD*. Quando o status G6PD é desconhecido deve ser feita uma avaliação dos riscos e benefícios da adição de PQ (18) (Figura 4).

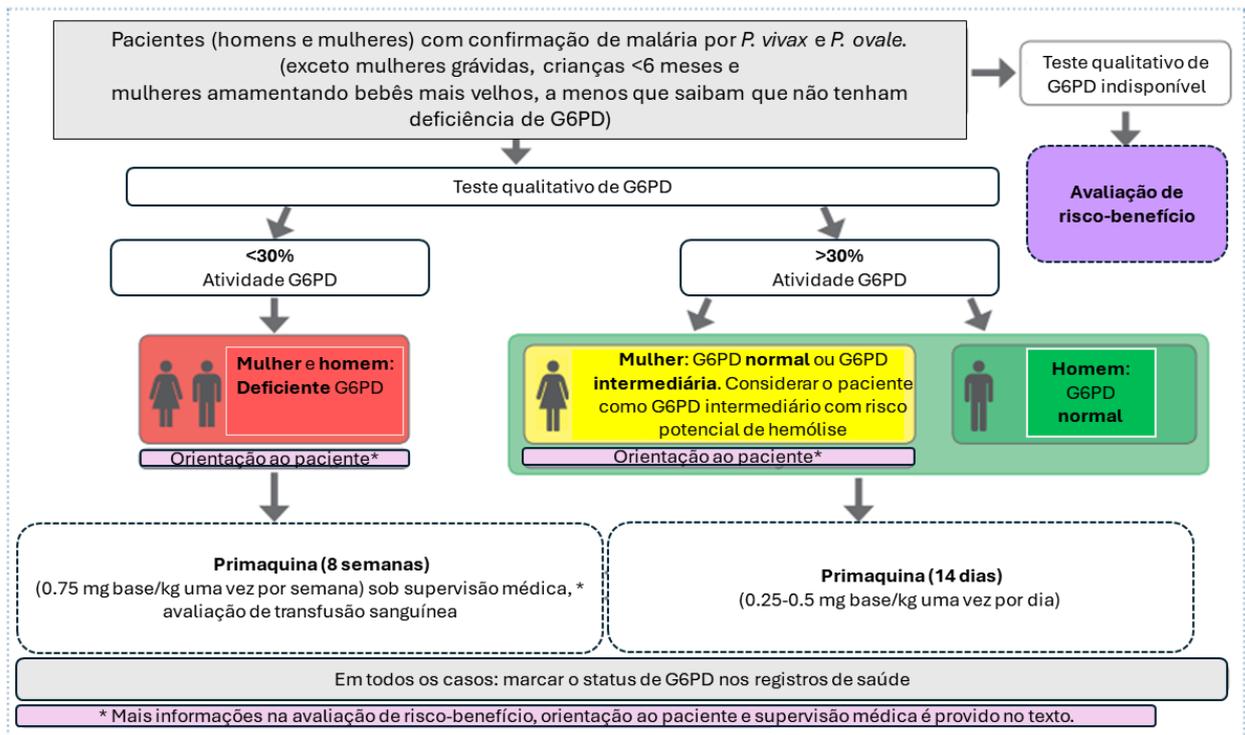


Figura 4 - Fluxograma para testagem rápida de G6PD e interpretação dos resultados para administração de primaquina. Fonte: Adaptado de WHO, 2018 (19)

Dessa forma, trabalhos demonstraram que o uso da PQ em indivíduos deficientes da enzima G6PD, mulheres grávidas e em fase de amamentação, além de crianças menores de seis meses e indivíduos que apresentam fenótipo de metabolismo prejudicado para o tratamento são limitações importantes para a eliminação eficiente e segura da malária por *P. vivax* (20,21).

O objetivo principal do tratamento da malária causada pelo *P. vivax* é a eliminação das formas sanguíneas e hepáticas do parasita para prevenir a recorrência da doença. Dessa maneira, os casos em que há detecção de um novo episódio de parasitemia após uma infecção prévia, são chamados de recorrências. A recorrência pode ocorrer por: reinfeção, através de uma nova picada do mosquito; recrudescência, devido um novo aparecimento de parasitas por falha terapêutica; e recaída, por reativação de hipnozoítos após seu estado de latência. Contudo, a distinção dos tipos de recorrência é limitada em áreas endêmicas (22,23) (Figura 5).

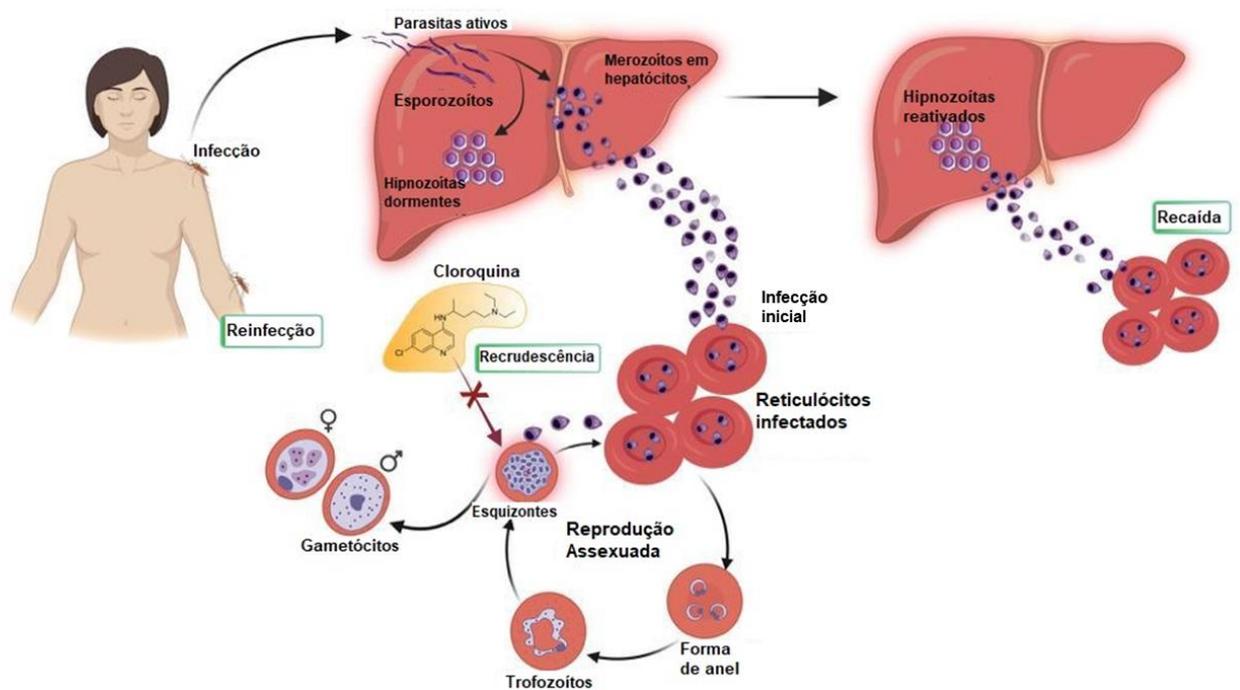


Figura 5. Tipos de recorrência por *P. vivax*. Fonte: Gisely Cardoso (coautora).

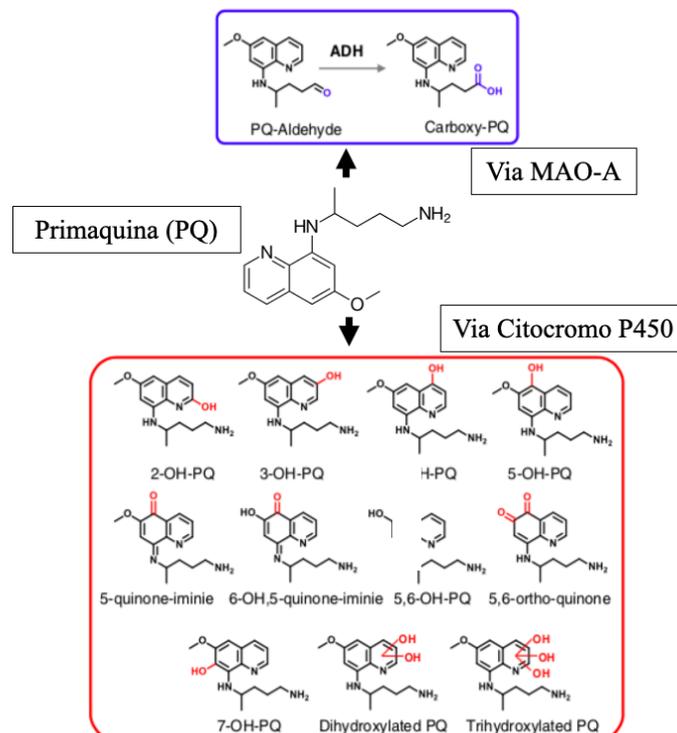
1.4.1.1 Primaquina

A PQ é o antimalárico disponível para prevenir recaídas de malária por *P. vivax*, e está associada a inativação dos hipnozoítos, os quais são formas latentes do parasito que podem persistir no fígado e ser ativados após semanas, meses ou anos após a primeira infecção (12,14).

O mecanismo de ação da PQ ainda não é totalmente compreendido. Contudo, sabe-se que ela pertence à classe das 8-aminoquinolina e que sua hidroxilação por reações de oxidação/ redução (fase I) por enzimas hepáticas metabolizadoras do citocromo P450 (CYP), dá origem a metabólitos instáveis que são responsáveis tanto pela sua eficácia quanto pela toxicidade hemolítica. Assim, as reações de oxidação-redução geradas por seus metabólitos formam espécies reativas de oxigênio que geram estresse oxidativo e dano celular no parasita (24,25).

A metabolização da PQ se inicia no trato gastrointestinal, onde é absorvida rapidamente e atinge picos de concentração em 1-4 h, com biodisponibilidade de 96% e meia-vida de eliminação de 4-6h (18). Dentro desse período, necessita ser biotransformada em metabólito ativo para exercer seu efeito antimalárico (26). (26). Foram identificados 3 metabólitos ativos de PQ, são a 8-(3-carboxil-1metilpropilamino)-6-metoxiquinolona, a 5-hidroxiprimaquina e a 5-hidroxi-6-desmetilprimaquina, contudo, o derivado carboxil é o principal metabólito encontrado no plasma humano (27).

Dois vias principais são responsáveis pela biotransformação da PQ: a via monoamina oxidase (MAO-A) e a via citocromo P-450 (Figura 5) (24). A MAO-A gera derivados de aldeídos, como a carboxiprimaquina, metabólito predominante, porém



inerte (28,29). A biotransformação mediada pelas enzimas do citocromo P450 é atribuída principalmente a enzima CYP2D6 (29).

Figura 5 – Metabólitos gerados pelas vias MAO-A e CYP2D6. Fonte: Adaptado de Marcisin *et al.*, 2016 (24).

A eficácia da PQ tem sido colocada à prova quando vários casos de recaída de *P. vivax* foram relatados em pacientes tratados com doses padrão (30,31). Associa-se a falta de eficácia da PQ a fenótipos metabolizadores prejudicados por polimorfismos no gene do citocromo P450 2D6 (*CYP2D6*) (20).

Estudos recentes demonstram que há uma variabilidade geográfica e étnica significativa associada aos fenótipos de metabolizadores de *CYP2D6*, com proporções altas de metabolizadores com atividade alterada em áreas endêmicas de *P. vivax* que podem repercutir no papel da PQ na eliminação de *P. vivax* (20).

1.5 CYP2D6

A *CYP2D6* é uma das enzimas integrantes do grupo das CYPs, responsável pela metabolização de cerca de 25% de todos os fármacos clinicamente utilizados, entre eles antidepressivos, beta-bloqueadores, neurolépticos, antiarrítmicos, antieméticos, anti-histamínicos e antivirais (32,33).

A enzima *CYP2D6* possui grande potencial polimórfico, o que afeta a farmacocinética de cerca de 50% dos fármacos que são substratos dela, dentre eles a PQ. Atualmente, mais de 100 variantes do gene *CYP2D6* já foram identificadas, as quais podem dar origem a alelos associados à atividade nula, reduzida, normal ou aumentada da enzima (32). Entre as variantes que possuem maior relevância estão *CYP2D6*2* (atividade normal), *CYP2D6*4* e *CYP2D6*5* (atividade nula), e *CYP2D6*10*, *CYP2D6*17* e *CYP2D6*41* (atividade reduzida) (32,33).

As variações genéticas em *CYP2D6* resultam em fenótipos classificados como metabolizadores ultrarrápidos, extensivos, intermediários e lentos. Os

metabolizadores ultrarrápidos (gUM) são aqueles com número de cópias aumentadas do gene de um mesmo alelo ativo, enquanto metabolizadores intermediários (gIM) e lentos (gPM) possuem um ou dois alelos com atividade diminuída ou nula. São chamados metabolizadores extensivos (gEM) ou normais (gNM) os indivíduos que possuem pelo menos um alelo com atividade normal da enzima (34,35).

Há um sistema elaborado por Gaedigk *et al.* (2007), atualizado por Caudle *et al.* (2020), capaz de traduzir o genótipo de um indivíduo em atividade predita de CYP2D6. Nesse sistema, cada alelo tem valor de atividade atribuído de acordo com a sua função enzimática, assim é possível obter um escore de atividade (AS) a partir da soma da atividade de cada alelo. Os alelos receberam então os seguintes valores: não funcionais – 0; função intermediária – 0,5 e 0,25; – normais – 1,0; função aumentada – 2,0. A combinação dos valores dos alelos permite que o fenótipo do indivíduo seja predito a partir do genótipo em gUM, gIM, gPM ou gEM (gNM) (32,36) (Figura 6).

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

Figura 6 - Resumo do escore de atividade do fenótipo predito de CYP2D6

Fonte: Adaptado de Baird *et al.*, 2018 (37) e atualizado de Caudle *et al.*, 2020 (38)

Atualmente, existem 133 alelos de CYP2D6 descritos, contudo, a distribuição alélica e atividade metabolizadora tem sido descrita da seguinte forma (39,40) (Figura 7):

Fenótipos preditos	AS	Genótipos (exemplos)	Atividade enzimática
Lentos (gPM)	0	*3/*4, *4/*4, *5/*5, *5/*6	Nula
Intermediários (gIM)	$0 < x < 1.25$	*4/*10, *4/*41, *10/*10, *10/*41, *41/*41, *1/*5	Reduzida
Extensivos (gEM)	$1.25 \leq x \leq 2.25$	*1/*10, *1/*41, *1/*9, *1/*1, *1/*2, *2x2/*10	Normal
Ultrarrápidos (gUM)	> 2.25	*1/*1xN, *1/*2xN, *2/*2xN, *1x2/*9	Aumentada

Figura 7. Exemplos de genótipos de CYP2D6 associados a fenótipos preditos e atividade enzimática a partir do AS. Fonte: Adaptado de Caudle *et al.*, 2020; Gaedigk *et al.*, 2007 (36); Ingelman-Sundberg *et al.*, 2005 (33).

Quanto as frequências fenotípicas de *CYP2D6* mundialmente, os metabolizadores extensivos (normais) possuem prevalência entre 67-90%. Os metabolizadores intermediários entre 0,4 a 11% e os metabolizadores lentos entre 0,4 e 5,4%. Já os metabolizadores ultrarrápidos entre 1 a 21% dos indivíduos (32). No Brasil, os metabolizadores extensivos são representados por 83,5% da população, seguidos de 3,7% de metabolizadores ultrarrápidos e 2,5% de metabolizadores lentos (41).

Estudos apresentam frequências alélicas de *CYP2D6* amplamente distribuídas entre os diferentes grupos étnicos (32,41). O alelo *CYP2D6*10* tem uma média de frequência de 45% na Ásia e menos frequente na Oceania (1,6%) e na Europa (2,6%). Enquanto que o alelo *CYP2D6*4* é prevalente entre judeus Ashkenazi (22%) e europeus (18%), em asiáticos a prevalência média é de 0,6%. O *CYP2D6*17* foi relatado na África (20%) e possui média de 18% entre afro-americanos (32). As variantes de *CYP2D6* tem ampla distribuição no Brasil, contudo, a *CYP2D6*1* e a *CYP2D6*2* são as mais frequentes, além disso, as variações de mais de duas cópias têm média de 6,3%, no Sul do Brasil a 10,2% no Norte do Brasil (41)

Vários estudos descreveram que a eficácia da PQ é comprometida por polimorfismos no gene do *CYP2D6* e que a diminuição ou ausência da atividade de *CYP2D6* contribui para a falha terapêutica da PQ (20,30,42–44). Marcsisin *et al.* (2016), mostraram que os resultados de estudos em humanos e ratos ajudam a traçar

um quadro do perfil farmacocinético e de metabólitos da PQ no contexto do metabolismo de CYP2D6. Dessa forma, foi demonstrado que os níveis de PQ não metabolizada em um metabolizador pobre seriam mais altos em comparação a outros metabolizadores (curva preta). No entanto, a atividade baixa ou nula de CYP2D6, não produziria um metabólito reativo eficiente (curva vermelha) (Figura 8A). O metabolizador intermediário de CYP2D6 apresentou níveis de PQ originais e metabólitos reativos que ficaram entre os níveis de metabolizadores pobres e extensivos nesse estudo, e o resultado clínico para este grupo é difícil de prever, pois há vários fatores de confusão a serem incluídos; gravidade da deficiência da enzima CYP2D6, peso corporal total e dose total administrada (Figura 8B) (24).

Assim, tanto para indivíduos metabolizadores pobres e intermediários de PQ, o tratamento é limitado, e os antimaláricos como cloroquina, artemeter/ lumefantrina são as alternativas a esse tratamento, associados à agentes profiláticos e educação do paciente para procurar tratamento médico se os sintomas da malária surgirem/retornarem. O metabolizador normal apresentou os níveis mais baixos de PQ não metabolizada e a maior produção de metabólitos reativos em comparação com os outros dois grupos discutidos (Figura 8C) (24). Um outro grupo é o de metabolizadores ultrarrápidos. Estes, exibem o maior metabolismo da PQ através da CYP2D6, no entanto, o resultado clínico da terapia com PQ neste grupo ainda precisa ser determinado, no entanto, sugere-se que o fenótipo ultrarrápido *CYP2D6* seja menos suscetível à recorrência e falha de PQ (24,43,45).

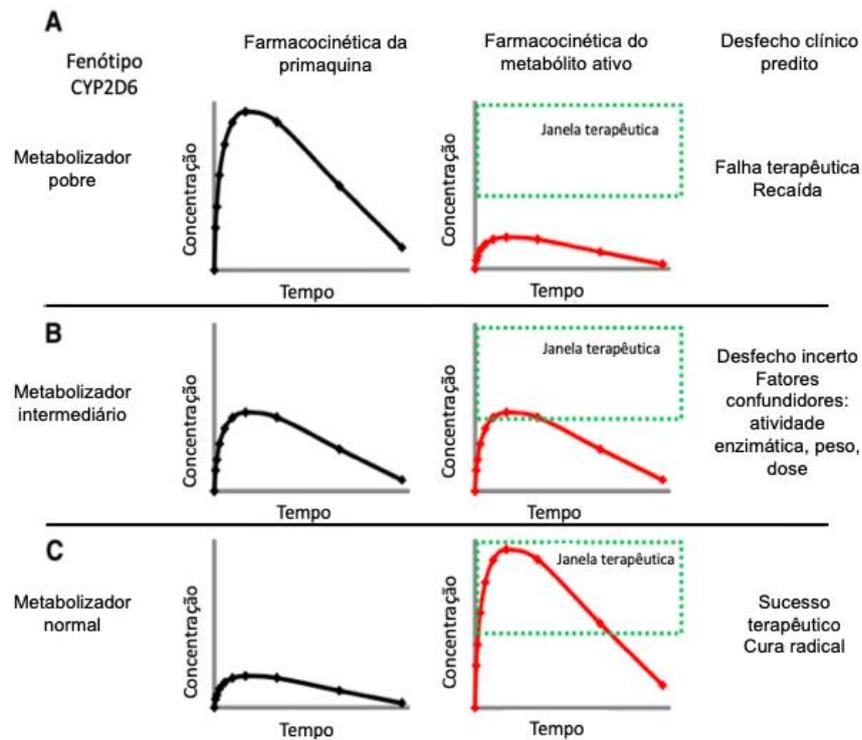


Figura 8 - Farmacocinética predita da primaquina no tratamento de malária por *P. vivax*. Fonte: Adaptado de Marcsisin *et al.*, 2016 (24).

A falha terapêutica na malária por *P. vivax* foi relatada por Bennet *et al.*, 2013 e Baird *et al.*, 2018 (20,30), atribuída aos polimorfismos de *CYP2D6*, que resultou em baixos níveis de metabólitos ativos por diminuição na metabolização da droga. Em um estudo realizado em Madagascar, 34,6% dos indivíduos foram preditos como metabolizadores intermediários (IM) com escore de atividade enzimática (AS) $\leq 1,0$; tanto o fenótipo IM quanto o AS $\leq 1,0$ foram associados à falha terapêutica da PQ (46).

Brasil *et al.*, 2018 associaram a reduzida metabolização da PQ por fenótipo *CYP2D6* gPM à recorrência (42). Cardoso *et al.*, 2022 descreveram que os pacientes com o fenótipo predito *CYP2D6* gUM foram menos suscetíveis a falha da PQ e identificados com maior frequência nos indivíduos sem recorrência, o que se relaciona com a biotransformação necessária para a ação antimalárica da PQ (43).

Há a hipótese de que indivíduos com o fenótipo *CYP2D6* gUM apresentem concentrações ideais de metabólitos ativos e com isso sejam menos suscetíveis à falha terapêutica. Contudo, a concentração de metabólitos da PQ em indivíduos com fenótipo *CYP2D6* UM ainda não foi determinada com precisão (43).

1.6 DEFICIÊNCIA DE G6PD

A deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase – G6PD - é uma alteração genética hereditária ligada ao cromossomo X e é encontrada particularmente em indivíduos com ascendência africana, asiática ou mediterrânea. Em pessoas com a deficiência na enzima G6PD (G6PDd), os eritrócitos têm redução na capacidade de defesa contra o estresse oxidativo causado por alguns medicamentos, incluindo a PQ, e se tornam altamente suscetíveis à hemólise (47–49).

O papel da enzima G6PD nos eritrócitos é proteger a célula do estresse oxidativo através da produção de NADPH. A G6PD é a única fonte de produção de NADPH disponível, e, por sua vez, o NADPH é a única forma de manter quantidade suficiente de glutatona reduzida (GSSH) para assim proteger a célula de danos oxidativos. Em condições normais, os eritrócitos possuem a razão entre glutatona oxidada e glutatona reduzida de 100:1. Se as concentrações de NADPH não podem ser mantidas, como na deficiência de G6PD, os níveis de GSSH caem e ocorre maior dano oxidativo na célula, seguido de hemólise ao haver exposição a agentes oxidantes (Figura 9) (50,51).

Nos eritrócitos, a enzima G6PD atua em cerca de 1 a 2% do seu potencial, e dispõe de um aporte redutor de reserva suficiente para proteger a célula em caso de dano oxidativo. Em eritrócitos que tem a deficiência da enzima, esse aporte reserva não está presente, assim, não há produção suficiente de NADPH ao haver dano oxidativo celular, levando aos desfechos patológicos (52).

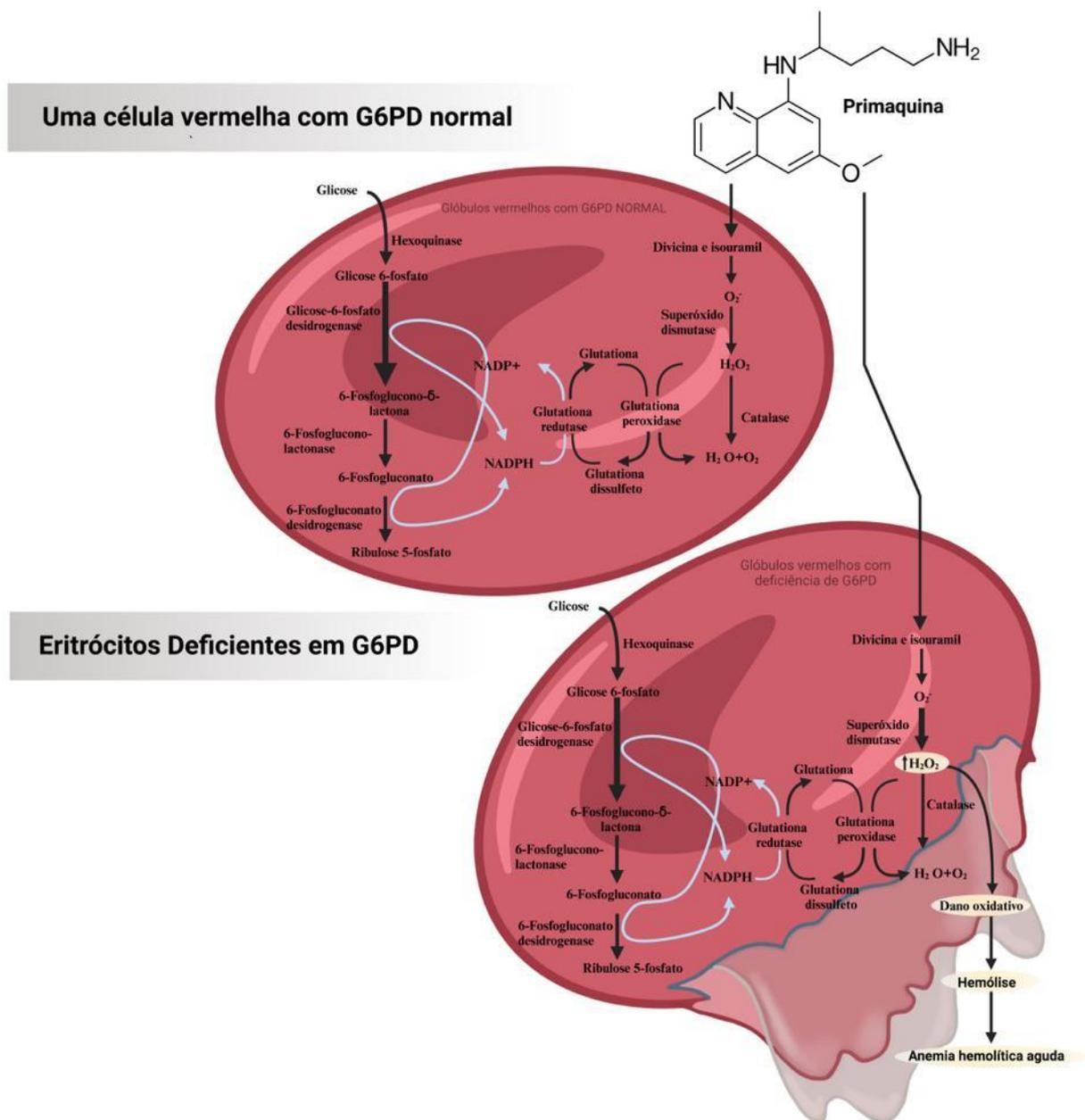


Figura 9 - Via metabólica simplificada da enzima G6PD. Fonte: Gisely Cardoso (coautora)

Atualmente, 200 variantes de *G6PD* são conhecidas, e aproximadamente metade são polimórficas. Uma estimativa atual é de que aproximadamente 500 milhões de pessoas sejam afetadas no mundo pela deficiência de G6PD, mas com diferenças na prevalência, que variam de 0 nas populações ameríndias originais a 20% ou mais em partes da África e da Ásia (Figura 10) (48).

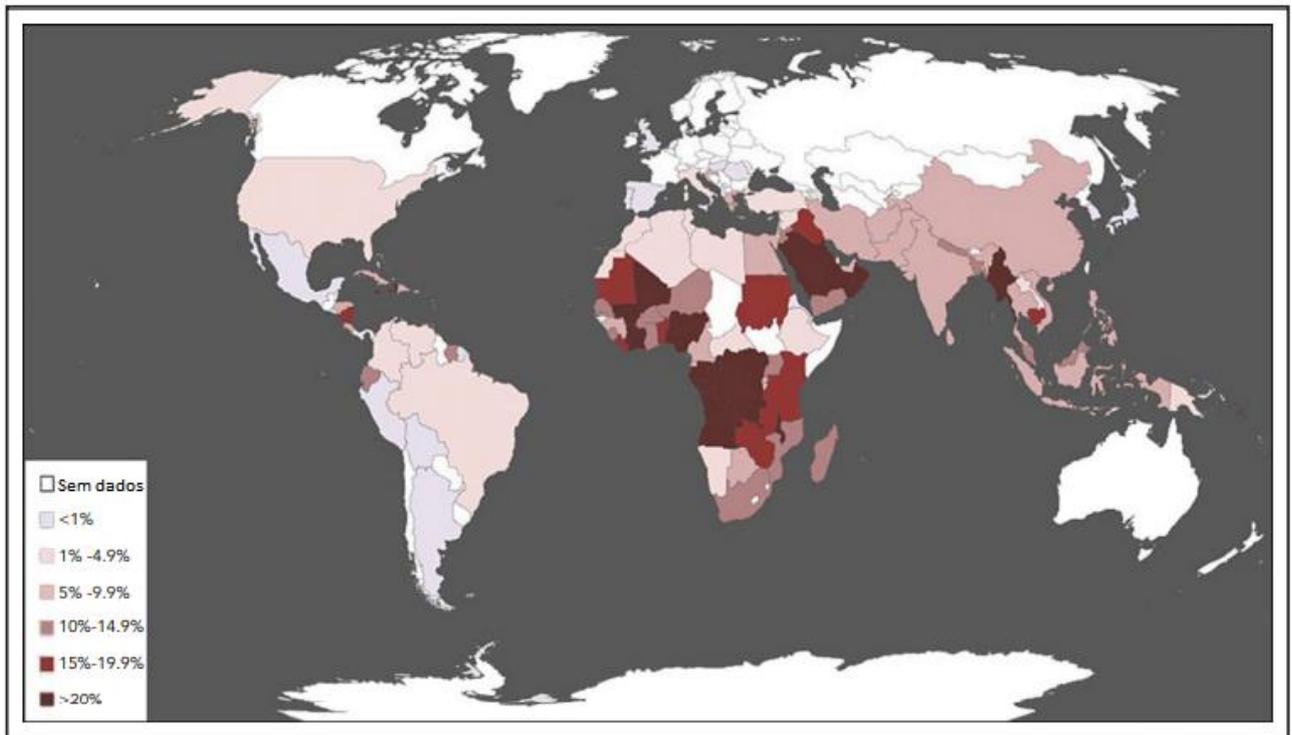


Figura 10 - Epidemiologia da deficiência de G6PD. Fonte: Luzatto *et al.*, 2020 (48)

No panorama global das regiões endêmicas para malária, as Américas apresentam a menor frequência de indivíduos com G6PDd. No Brasil, há uma frequência de 4,5 a 10% de G6PDd e a região Amazônica apresentou uma taxa de 5.6% de G6PDd em seis estados: Acre (8.3%), Amapá (5.8%), Pará (5.7%), Rondônia (5.4%), Roraima (4.2%) e Amazonas (4.0%) (53) (Figura 11).

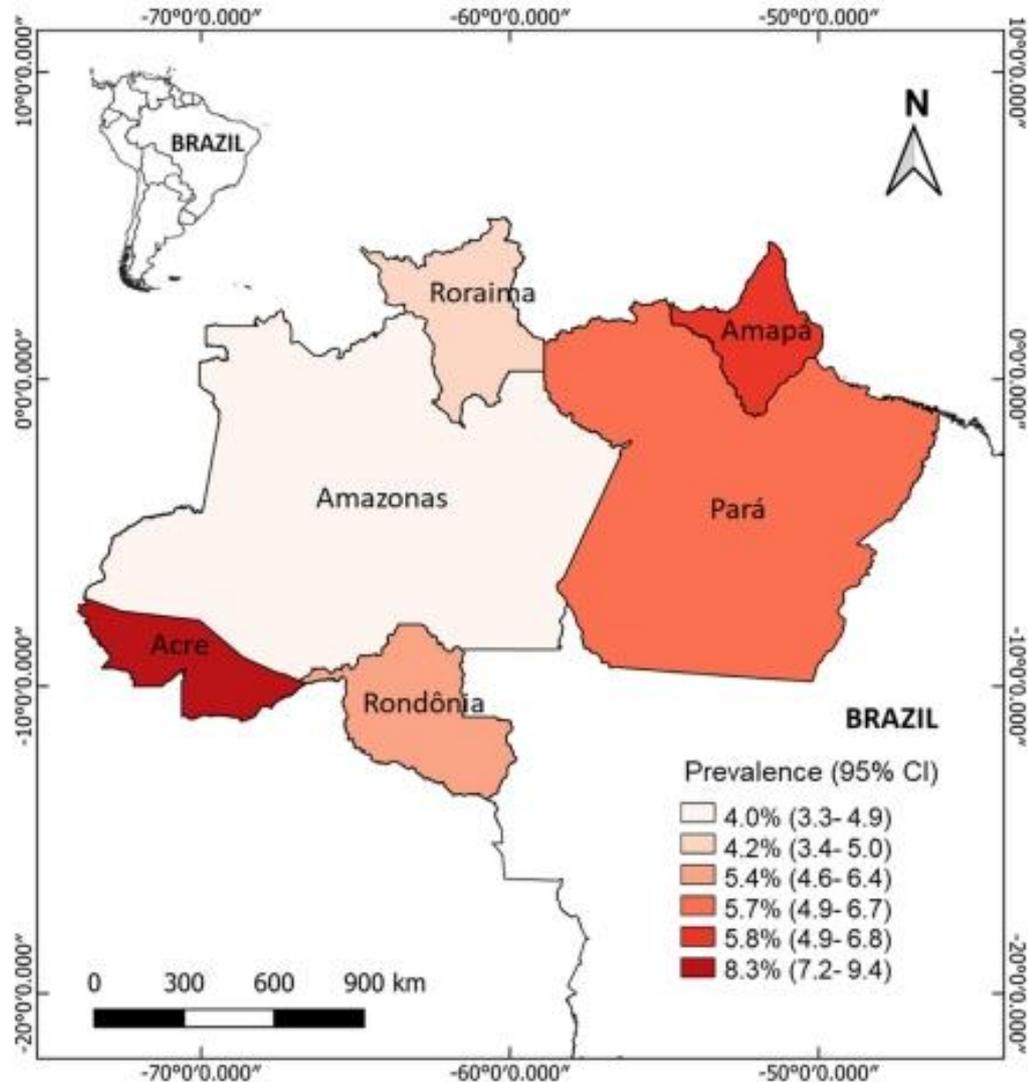


Figura 11 - Prevalência de G6PDd em seis estados da Amazônia brasileira. Fonte: Nascimento *et al.*, 2022 (53)

Na população brasileira, há o predomínio da variante Africana G6PD A⁻, apesar de existirem registros das variantes Mediterrânea, Seattle, Chatham, e alelos da Bahia e São Paulo (54–57). Na região Amazônica, a variante Africana A⁻ foi identificada em 39.3%, a Africana A⁺ em 6.2% e alguns estudos relataram a presença da variante Mediterrânea (45,53,55).

A variante Africana G6PD A⁻ possui atividade enzimática residual de cerca de 5-10% dos níveis normais e a toxicidade da PQ nesses indivíduos é relativamente leve e autolimitada, embora aparentemente menos grave não deve ser universalmente caracterizada como “leve”, pois isso pode resultar na confiança equivocada em uma aplicação relativamente descuidada da droga. A variante Mediterrânea de G6PD

apresenta atividade enzimática <1% e pode ocasionar anemia hemolítica aguda após tratamento com PQ. Já a variante Mahidol apresenta sensibilidade intermediária entre as variantes mencionadas (47).

O grau do quadro de hemólise em pacientes com G6PDd depende, portanto, da dosagem, da variante *G6PD* envolvida, condição de saúde do paciente em tratamento e status genotípico do indivíduo (hemizigoto, homocigoto ou heterocigoto). Uma vez que o gene *G6PD* está localizado no cromossomo X, os homens têm apenas uma cópia do alelo, enquanto que mulheres têm duas cópias de alelos. Dessa forma, homens podem ser hemizigotos *G6PD* normal ou hemizigotos com *G6PDd*, mas as mulheres podem ser homocigotas normais, homocigotas com *G6PDd* ou heterocigotas para *G6PD* (Figura 12) (58,59).

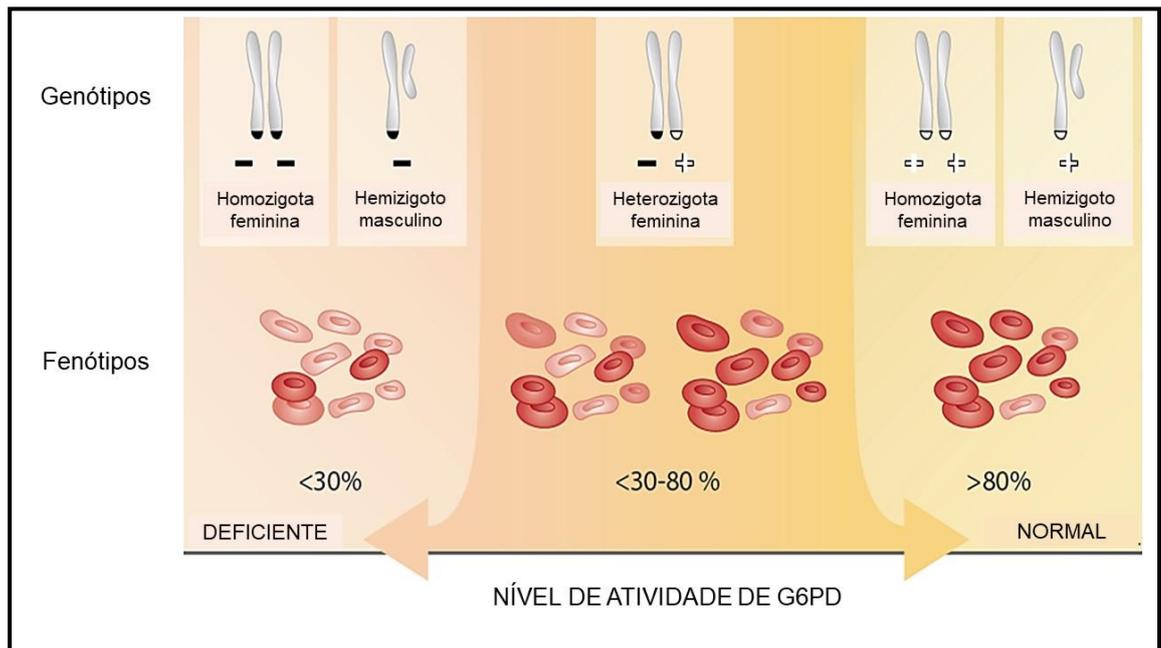


Figura 12 - Genótipos e fenótipos da deficiência de G6PD. Fonte:

Adaptado de WHO, 2018 (58)

A OMS estabeleceu uma classificação para variantes *G6PD* com base no grau de deficiência enzimática e manifestações clínicas relacionadas (Figura 13) (49,58). Nessa classificação, a variante Africana (mais comum) e a variante Seattle

correspondem à classe III, com atividade que varia de 10 a 60% da atividade enzimática normal. Já a variante Mediterrânea (comum) foi considerada da classe II, que corresponde a menos que 10% de atividade normal de G6PD (Figura 13) (49).

CLASSE	CARACTERÍSTICAS
I	<ul style="list-style-type: none"> • <10% da atividade normal de G6PD • Os pacientes podem ter hemólise sem estresse oxidativo • Associado à anemia hemolítica não esferocítica crônica • Muito raro
II	<ul style="list-style-type: none"> • <10% da atividade normal de G6PD • Sem hemólise no início ou anemia hemolítica não esferocítica crônica • Inclui variante Mediterrânea (comum) e variante Union
III	<ul style="list-style-type: none"> • 10% - 60% da atividade normal da G6PD • Inclui variante Africana (comum) e variante Seattle
IV	<ul style="list-style-type: none"> • 60% – 100% da atividade normal da G6PD
V	<ul style="list-style-type: none"> • Atividade de G6PD acima do normal <p>*Apenas 1 caso relatado</p>

Figura 13. Classificação da Organização Mundial da Saúde para as variantes de G6PD. Fonte: Adaptado de Belfied, K D; Tichy, E M, 2018 (49)

A recomendação da OMS é a realização do teste de G6PD antes do uso da PQ (60). Os testes disponíveis podem ser feitos por genotipagem (detecção molecular para o gene *G6PD*) ou fenotipagem (detecção da atividade enzimática). O ensaio espectrofotométrico é o teste padrão-ouro. Contudo, o diagnóstico da deficiência pode ser complicado e oneroso quando inclui espectrofotometria e coloração citoquímica, pois são testes que necessitam de laboratórios bem equipados e equipe técnica bem treinada (58,61,62).

Para melhor avaliação e gerenciamento de casos, assim como o tratamento da malária, deve ser escolhido um teste que expresse a atividade enzimática com a concentração de hemoglobina (UI/gHb) ou contagem de eritrócitos detectada no

sangue. Diante disso, os testes rápidos disponíveis para dosar a enzima podem ser suficientes para indivíduos com atividade menor que 30%, porém, a maioria das mulheres heterozigotas precisam de um teste quantitativo, como as tecnologias do *SD Biosensor Standard G6PD Analyser™* da SD Biosensor e o *CareStart G6PD Biosensor™* da Access Bio, que permitem a identificação da atividade intermediária de indivíduos (58,63,64).

Entre os testes de triagem, o *fluorescent spot test (FST)* é o teste qualitativo mais utilizado para G6PD. Embora este tipo de teste seja rápido e barato, requer refrigeração para armazenamento de reagentes, eletricidade para a leitura do teste, equipamento especial, incluindo uma luz ultravioleta (UV), um banho-maria ou bloco de calor, e uma sala escura para avaliar a fluorescência. O teste é positivo se o sangue não apresentar fluorescência sob luz UV e puder detectar amostras com menos de 20% de atividade normal de G6PD (49,65).

Os testes de diagnóstico rápido como o teste *CareStart – CST* (Access Bio) e o *BinaxNOW G6PD* (Alere) também são ferramentas de ensaios qualitativos disponíveis para a triagem de G6PD. O CST apresentou boa especificidade e boa sensibilidade para detectar a deficiência de G6PD em indivíduos com menos de 30% da atividade normal de G6PD em países endêmicos para malária (66,67). No estudo de Osorio *et al.* (2015), a detecção de indivíduos com G6PDd pelo *BinaxNOW G6PD* teve a sensibilidade de 54,5% e a especificidade de 100% , contudo, a pesquisa demonstrou que temperaturas ambientes caindo fora do intervalo necessário para realizar o teste rápido (18–25 °C), juntamente com a sutileza da mudança de cor e treinamento insuficiente, podem explicar parcialmente a baixa sensibilidade encontrada (68).

No estudo com 1.000 voluntários adultos saudáveis na região de Yangon, Mianmar, no Sudeste Asiático, o FST e o CST apresentaram desempenhos comparáveis com sensibilidade acima de 95% e especificidade acima de 90%, contudo, o FST teve melhor desempenho em indivíduos G6PDd. Além disso, ambos os testes tiveram melhor desempenho no sexo masculino (69,70). Em estudos realizados na Amazônia brasileira, o teste *SD Biosensor Standard™* G6PD teve um bom desempenho em comparação com o teste padrão de referência

espectrofotométrico e operacionalidade viável e recomendada antes da administração de 8-aminoquinolinas (71,72).

1.7 DEFICIÊNCIA DE G6PD E CYP2D6

A segurança e eficácia no uso da PQ está diretamente relacionada à G6PDd, atividade de enzimas CYP2D6 e a eliminação de hipnozoítos latentes, contudo, é necessário obter estimativas mais robustas da relação entre diferentes grupos populacionais com G6PDd e que possuem variantes do gene *CYP2D6*, a fim de elaborações de estratégias de tratamento com segurança e eficácia em populações de áreas endêmicas para *P. vivax* (37).

Aproximadamente 8% da população mundial é deficiente de G6PD e cerca de 14% da população que vive em risco de infecção por *P. vivax* contempla o grupo que tem limitação no alcance do tratamento por PQ devido ao complexo problema de toxicidade hemolítica (20,73). Enquanto mais de 20% dessa população apresenta comprometimento nos alelos de *CYP2D6* ligados ao risco de falha terapêutica com a PQ (37). Ademais, o alto potencial polimórfico tanto de *G6PD* quanto de *CYP2D6*, relacionado à variabilidade geográfica e interétnica de indivíduos, agrega complexidade ao uso da PQ (21).

Na região Amazônica, estudos anteriores relataram casos de hemólise induzida por PQ em indivíduos com G6PDd, anemia grave, lesão renal aguda (LRA) e transfusão de sangue (74,75). Entretanto, um estudo realizado em um hospital de referência na Amazônia Ocidental brasileira, não mostrou diferença estatística significativa na frequência de alelos estrela entre deficiente de G6PD tratados com PQ e com hemólise (45).

A compreensão da farmacogenética da PQ ainda é limitada para utilizar todo o seu potencial. A tradução precisa do genótipo-fenótipo da enzima CYP2D6 pode otimizar as estratégias de dosagem de PQ para metabolizadores com atividade afetada e expandir seu uso de maneira segura e eficaz (21).

1.8 RELEVÂNCIA

Na Amazônia brasileira, a espécie *P. vivax* é a mais prevalente na identificação dos casos de malária na região e possui a peculiaridade de possuir hipnozoítos, que podem causar recaídas em semanas ou meses após a infecção, causando assim, novos episódios de malária, se o episódio anterior não for tratado adequadamente (8,76). Dessa forma, a PQ e a TQ são os fármacos disponíveis para eliminar essas formas latentes do parasita.

Entretanto, a eficácia da PQ tem sido colocada à prova quando vários casos de recorrência de *P. vivax* foram relatados após pacientes terem sido tratados com doses padrão (30,31). Além disso, o uso dessas drogas pode apresentar o risco de anemia hemolítica aguda (AHA) em indivíduos com G6PDd (48,57) e a ação da PQ no organismo é influenciada pela variabilidade genética do gene *CYP2D6*, que, dependendo do fenótipo predito da enzima CYP2D6, pode resultar em falha terapêutica em indivíduos com malária vivax (42,43,45,77).

Associa-se a falta de eficácia da PQ a fenótipos metabolizadores prejudicados por polimorfismos no gene *CYP2D6*. Estudos recentes demonstram que há uma variabilidade geográfica e interétnica significativa associada aos fenótipos de metabolizadores de *CYP2D6*, com proporções altas de metabolizadores com atividade alterada em áreas endêmicas de *P. vivax* que podem repercutir no papel da PQ na eliminação de *P. vivax* (20).

A existência da influência de fatores genéticos de metabolização de drogas, no âmbito da farmacogenética, têm se mostrado cada vez mais relevante para o manejo do tratamento de pacientes com resposta terapêutica ineficaz. Assim, a descrição das frequências dos polimorfismos das CYPs se faz necessária para a elaboração de estratégias terapêuticas em indivíduos com metabolismo alterado. Portanto, este estudo pretende contribuir no conhecimento da influência das variantes de *CYP2D6* e a G6PDd em pacientes com autorrelato de hemólise na Amazônia brasileira, a fim de que o conhecimento nesse campo seja uma importante ferramenta para o manejo dos casos de malária na região, a mais endêmica do país.

1.9 HIPÓTESE

Indivíduos com G6PDd que tenham variantes do gene *CYP2D6* com fenótipo UM, têm maior risco de desenvolver hemólise em episódios de malária vivax.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Avaliar a influência das variantes do gene *CYP2D6* em indivíduos com deficiência de G6PD na Amazônia brasileira.

2.2 ESPECÍFICOS

- Investigar a frequência das variantes do gene *CYP2D6* em indivíduos com deficiência de G6PD;
- Verificar a frequência das variantes do gene *CYP2D6* nas diferentes regiões da Amazônia brasileira;
- Verificar a associação entre hemólise e metabolização de *CYP2D6*.

3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

3.1. Manuscrito científico – Modelo STROBE Statement

Avaliação da influência das variantes do gene CYP2D6 em indivíduos com deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase na Amazônia brasileira

Lybia Kássia Santos Sarraff¹; Laila Rowena Albuquerque Barbosa¹; Gabrielly Santos da Silva¹ Victor Irungu Mwangi¹; Manuela Crispim Morais² Joabi Rocha do Nascimento³; Jady Shayenne Mota Cordeiro¹; Anne Cristine Gomes de Almeida³ 4 ; Gisely Cardoso de Melo¹ 3

¹ Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas(PPGMT-UEA)

² Universidade Federal do Amazonas

³ Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado

⁴ Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas (PPGH-UEA)

Resumo

A primaquina é um antimalárico usado para prevenir recaídas de malária por *Plasmodium vivax* e atua após a sua biotransformação por enzimas hepáticas metabolizadoras como a CYP2D6. A enzima CYP2D6 é uma enzima hepática que possui grande potencial polimórfico, que afeta a farmacocinética da primaquina. Além disso, a deficiência da enzima G6PD (G6PDd) em pacientes com malária faz com que as células sanguíneas fiquem altamente vulneráveis ao dano oxidativo e assim, mais suscetíveis a hemólise por primaquina (PQ). Diante disso, este estudo caso controle avaliou a influência das variantes de *CYP2D6* em indivíduos com G6PDd em seis estados da Amazônia brasileira entre 2015 e 2018. Foram incluídos como casos: G6PDd com diagnóstico baseado no *fluorescent spot test* (R&D Diagnostics Ltd) que relataram sinais de hemólise e uso de PQ e como controles participantes com G6PDd que não relataram sinais de hemólise no episódio de malária. Os testes de genotipagem para *CYP2D6* foram realizados por Real-time PCR. Os resultados demonstraram que as frequências alélicas identificadas concordam com estudos

anteriores no Brasil e na região Amazônica. Foram incluídos 97 casos e 140 controles. Os casos tiveram em média 3,5 episódios de malária prévia e os controles, média de 2 episódios ($p < 0.05$). Quanto ao autorrelato de sinais de hemólise, 12.1% ($n=17$) dos controles não souberam dizer se tiveram icterícia e 5.2% ($n=5$) dos casos relatou necessidade de transfusão sanguínea prévia. Houve recorrência de malária em 2 casos (2.1%) e 2 controles (1.4%). A maioria dos indivíduos com G6PDd possuíam a variante Africana A- (casos 4.2% e controles 39.1%). Em relação a *CYP2D6*, o *2 (função enzimática normal) foi o mais frequente entre casos (25.2%) e controles (25%). Dentre alelos de função nula e diminuída, o alelo *4 e *10 foram mais frequentes entre casos (10.3% e 7.7%, respectivamente), e controles (10% e 5.7%, respectivamente). A frequência de fenótipos de metabolização intermediária/lenta de *CYP2D6* entre os grupos estudados foi semelhante (gIM+gPM dos casos=21,6%; gIM+gPM dos controles=20,7%, $p > 0.05$). Na análise de frequência alélica por estado, *4 e *29 foram mais frequentes no Amapá (20,4%, $p=0.034$; 13,6%, $p=0.041$). Não houve associação entre os fenótipos de *CYP2D6* e risco de hemólise em indivíduos com G6PDd (OR= <1). Este trabalho não encontrou influência das variantes de *CYP2D6* e risco de hemólise nos indivíduos avaliados com G6PDd. O estudo contribui com informações sobre variantes genéticas e deficiência de G6PD na Amazônia e com dados inéditos de frequência alélica e fenótipos de *CYP2D6* em estados endêmicos para malária no Brasil.

Introdução

A malária é uma hemoparasitose infecciosa, de transmissão vetorial, que possui grande relevância para a saúde global. É transmitida ao humano pelo repasto sanguíneo do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* infectado com protozoários do gênero *Plasmodium* (1). Em 2022, no Brasil, foram registrados 131.224 casos de malária, destes, 99,0% tiveram transmissão relatada dentro do país (casos autóctones). Do total, foram 84.2% por *P. vivax* e 13.9% por *P. falciparum*. A malária por *P. vivax* é a mais prevalente na Amazônia brasileira e a peculiaridade de recorrência do *P. vivax* é uma das principais razões para a transmissão global sustentada da malária após a ativação dos hipnozoítos. A eliminação de hipnozoítos é feita através da ação do grupo 8-aminoquinolina como a primaquina (PQ) ou a tafenoquina (TQ). O status de G6PD deve servir como orientação para administração da PQ ou TQ na prevenção de recaídas (2,3).

Dessa maneira, os casos em que há detecção de um novo episódio de malária após uma infecção prévia, são chamados de recorrência. A recorrência pode ocorrer por: reinfeção, através de uma nova picada do mosquito; recrudescência, devido um novo aparecimento de parasitas por falha terapêutica; e recaída, por reativação de hipnozoítos após seu estado de latência. Contudo, a distinção dos tipos de recorrência é feita de modo limitado em áreas endêmicas (4,5).

A eficácia da PQ tem sido colocada à prova quando vários casos de recaída de *P. vivax* foram relatados após pacientes terem sido tratados com doses padrão (6,7). Associa-se a falta de eficácia da PQ a fenótipos metabolizadores prejudicados por polimorfismos no gene do citocromo P450 2D6 (*CYP2D6*). Estudos recentes demonstram variabilidade geográfica e interétnica significativa associada à frequência dos fenótipos de metabolizadores de *CYP2D6*, com proporções altas de metabolizadores com atividade alterada em áreas endêmicas de *P. vivax* que podem repercutir no papel da PQ na eliminação de *P. vivax* (8).

A enzima *CYP2D6* possui grande potencial polimórfico, que afeta a farmacocinética de cerca de 50% dos fármacos que são substratos dela, dentre eles a PQ. Atualmente, mais de 100 variantes do gene *CYP2D6* já foram identificadas, as quais podem dar origem a alelos associados à atividade nula, reduzida, normal ou aumentada da enzima (9). Foi demonstrado que as variantes *CYP2D6*1* e *CYP2D6*2* foram as mais frequentes no Brasil. Os indivíduos apresentaram frequência de mais do que duas cópias, variando de 6.3% no sul a 10.2% no norte do Brasil, podendo assim, acelerar o metabolismo da droga (10). Em estudos realizados na região amazônica brasileira, o alelo *CYP2D6*2xN* e o fenótipo ultrarrápido de *CYP2D6* (gUM) foram mais frequentes em indivíduos sem recorrência e a incidência de recorrência foi maior em indivíduos com fenótipo lento *CYP2D6* (gPM) (11,12). Além disso, foi demonstrado um risco maior de recorrência para indivíduos com níveis reduzidos de atividade do *CYP2D6* (13).

A deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase – G6PD - é uma alteração genética hereditária ligada ao cromossomo X. Em pessoas com a deficiência na enzima G6PD (G6PDd), os eritrócitos têm redução na capacidade de defesa contra o

estresse oxidativo causado por alguns medicamentos, incluindo a PQ, e se tornam altamente suscetíveis à hemólise (14,15)

No panorama global das regiões endêmicas para malária, as Américas apresentam a menor frequência de indivíduos com G6PDd (16). No Brasil, há uma frequência de 4,5 a 10% de G6PDd e a região Amazônica apresentou uma frequência de 5.6% da G6PDd (n=828) em seis estados: Acre (8.3%), Amapá (5.8%), Pará (5.7%), Rondônia (5.4%), Roraima (4.2%) e Amazonas (4.0%) (17). Na população brasileira há o predomínio da variante africana G6PD A⁻, apesar de existirem registros das variantes mediterrânea, Seattle, Chatham, e alelos da Bahia e São Paulo (18–21). A variante africana G6PD A⁻ possui atividade enzimática residual de cerca de 5-10% dos níveis normais e a toxicidade da PQ nesses indivíduos é relativamente leve e autolimitada, embora aparentemente menos grave não deve ser universalmente caracterizada como “leve”, pois isso pode resultar na confiança equivocada em uma aplicação relativamente descuidada da droga (14). Neste contexto, considerando o elevado polimorfismo do gene *CYP2D6*, e a escassez de estudos sobre a PQ associada com a G6PDd, este estudo objetivou avaliar a influência das variantes de *CYP2D6* em indivíduos com a G6PDd na Amazônia brasileira.

MÉTODOS

Participantes

Entre 2015 e 2018, foi realizado um estudo para avaliar a prevalência da G6PDd em indivíduos do sexo masculino de 43 municípios dos estados com maior índice parasitário anual na Amazônia brasileira (Acre, Amazonas, Pará, Amapá, Rondônia e Roraima). Foi realizado um inquérito por meio de visitas domiciliares e em locais de grande circulação. Este projeto foi aprovado no CEP da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado sob CAAE 93843318.8.0000.0005 e parecer consubstanciado 3.889.719. Neste estudo, foi aplicado questionário padronizado acompanhado da coleta de sangue em indivíduos do sexo masculino de qualquer idade (17).

O presente estudo foi um caso controle. Foram incluídos indivíduos com resultado positivo da G6PDd pelo *fluorescent spot test* (FST) (R&D Diagnostic, Grécia) (22). Assim, os participantes foram alocados em dois grupos: casos foram os indivíduos

com deficiência de G6PD que autorrelataram sinais associados à hemólise (urina escura, icterícia e necessidade de transfusão), e um ou mais episódios de malária e uso de PQ, e controles foram os indivíduos com G6PDd, sem autorrelato de sinais associados à hemólise, um ou mais episódios de malária e uso de PQ. As amostras de participantes que estiveram indisponíveis ou inviáveis para a execução dos procedimentos laboratoriais e participantes controles que não se enquadraram no pareamento entre casos e controles foram excluídas do estudo. Os participantes casos e controles foram selecionados considerando 1 a 2 controles pareados em idade e etnia para cada caso.

Coleta de amostras

As amostras de sangue total foram obtidas por punção digital e acondicionadas em microtubos de 1,5 ml contendo anticoagulante EDTA. Cerca de 500 µL foram armazenados à -20° C na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado para posterior tipagem molecular das amostras de indivíduos com G6PDd e polimorfismos genéticos de *CYP2D6*.

Procedimentos laboratoriais

O FST, teste qualitativo para fenotipagem de G6PD a partir do sangue total seco em papel filtro, foi realizado em ambiente laboratorial pela equipe do estudo conforme recomendações do fabricante (22). Foram utilizados 200 µL de sangue total para extração de DNA com o kit comercial pureLink® Pro 96 genomic DNA (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante (23).

A genotipagem de *G6PD* foi realizada por meio de ensaios de discriminação alélica, através do sistema Taqman (ThermoFisher scientific®, South San Francisco, CA, USA) para os SNPs G202A, A376G e C563T das variantes Africanas (A+ e A-) e Mediterrânea (B) da G6PDd, as mais prevalentes no Brasil. As análises foram feitas no software 7500 Fast Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante.

A genotipagem de *CYP2D6* foi realizada através da detecção dos 11 SNPs do gene: 2549delA [rs35742686], 100C>T [rs1065852], 1846G>A [rs3892097], 4180G>C [rs1135840], 2988G>A [rs28371725], 3183G>A [rs59421388], -1584C>G [rs1080985], 1023C>t [rs28371706], 2615_2617delAAG [rs5030656], 31G>A [rs769258], 2850C>T [rs16947]) (24,25). As reações e análises foram realizadas usando as sondas Taqman (ThermoFisher scientific®, South San Francisco, CA, USA) e a versão 7500 FastReal-time PCR 2.3 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações de amplificação e os parâmetros de ciclagem foram determinados de acordo com os protocolos do fabricante

Os diplótipos de *CYP2D6* foram determinados na plataforma R pelo pacote HaploStats e a identificação dos alelos estrela seguiu a nomenclatura atual no consórcio Pharmacogene Variation (PharmVar). Os fenótipos preditos foram determinados a partir do escore de atividade (24) (AS – *activity score*, onde o AS de um genótipo é a soma dos valores atribuídos a cada alelo: *1 (1,0); *2 (1,0); *3 (0,0); *4 (0,0); *9 (0,25); *10 (0,25); *17 (0,5); *29 (0,5); *34 (1,0); *35 (1,0); *39 (1,0); *41 (0,25). De acordo com as diretrizes do *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* (CPIC) e *Dutch Pharmacogenetics Working Group* (DPWG), o fenótipo foi traduzido da seguinte forma: metabolizador lento (gPM) AS= 0, metabolizador intermediário (gIM) AS= $0 < x < 1.25$, metabolizador normal (gNM) AS= $1.25 \leq x \leq 2.25$, metabolizador ultrarrápido (gUM) AS= > 2.25 (26).

A variação no número de cópias de *CYP2D6* (CNV) foi determinada através de real time duplex PCR no 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e utilizou a RNase P como gene de referência. O produto da amplificação de CNV foi analisado no software CopyCaller v2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A normalização das amostras para 5ug foi realizada através da quantificação de DNA no NanoDrop One[®] e NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmigton, DE, U.S.A.) (27).

Análise estatística

As variáveis socioepidemiológicas avaliadas incluíram idade, etnia, área e tempo de residência, nível educacional, número de episódios de malária, episódio de

malária nos últimos 15 dias, unidade da federação (UF), icterícia, transfusão e presença de alguma doença no momento da entrevista. Além disso, foi analisada a fenotipagem e genotipagem de G6PD. O número de recorrências dos participantes também foi avaliado neste estudo.

Foi utilizado o software Stata® 16.0 (StataCorp, College Station, TX, USA) para análise das variáveis. A amostragem foi inicialmente submetida ao t-test (média e desvio padrão (SD)) ou ao teste Wilcoxon–Mann–Whitney (mediana ou intervalo interquartil (IQR)). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis contínuas. O teste Qui quadrado ou o Exato de Fisher foi utilizado para significância estatística da frequência de distribuição (considerada a diferença estatística quando o valor foi de $p < 0.05$). As variáveis categóricas foram expressas em valores absolutos (n) e frequência relativa em porcentagem (%).

RESULTADOS

Um total de 14.838 participantes do sexo masculino foram incluídos no macroestudo. Destes, 819 participantes foram confirmados com G6PDd e 389 participantes relataram durante a entrevista um ou mais episódios de malária e uso de PQ. Os participantes que atenderam aos critérios de inclusão deste estudo foram divididos em 97 casos e 140 controles (Figura 1).

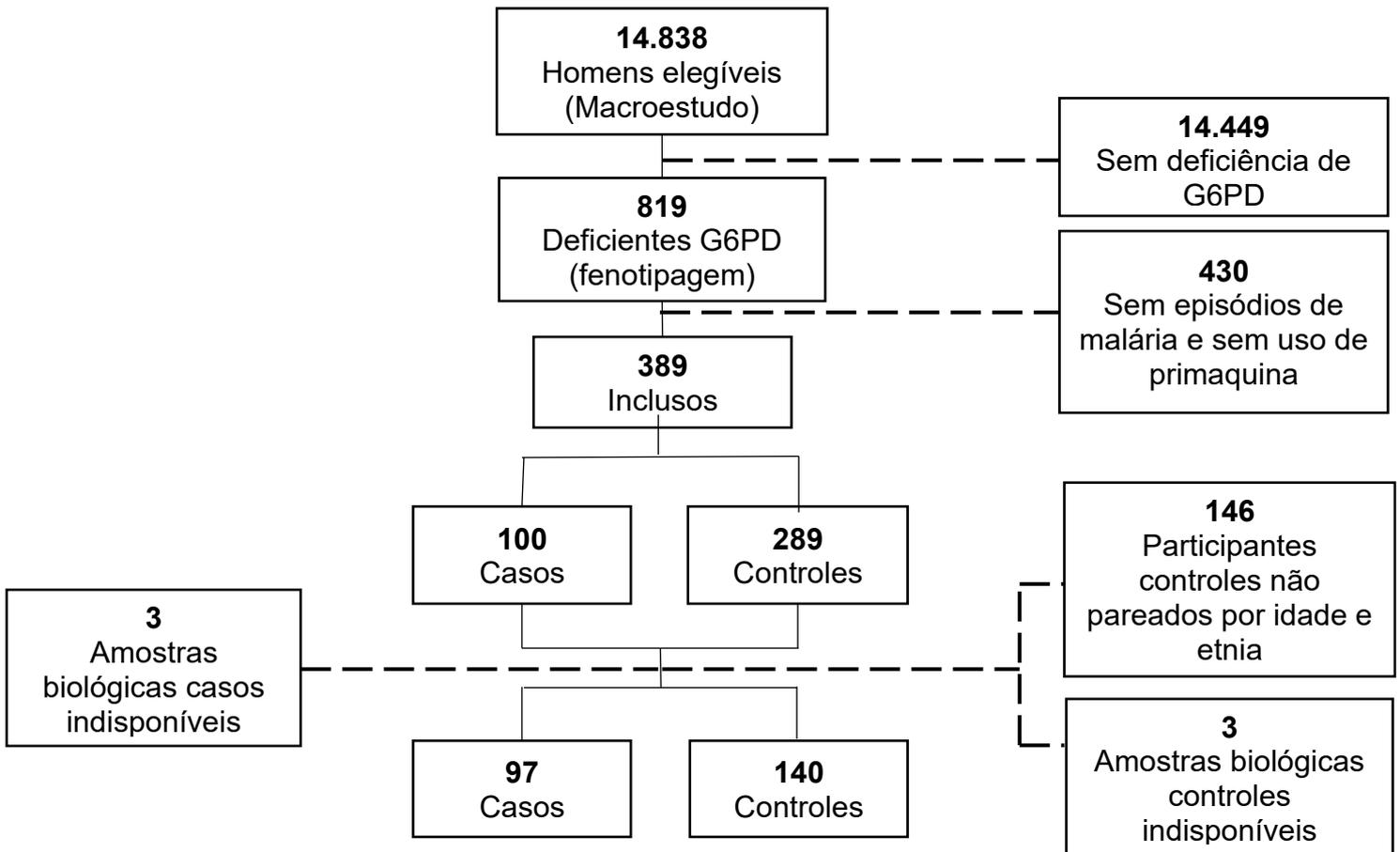


Figura 1 - Fluxograma de seleção dos casos e controles incluídos no estudo.

Quanto as características socioepidemiológicas, os casos e controles tiveram média de idade de 38.0 (IC95%, 30.0-47.0) e 36.0 (IC95%, 27.0-49.0), $p=0.53$. Com relação a etnia, área de residência e tempo de residência, não houve diferença significativa entre os grupos. Para o nível educacional, houve diferença estatística significativa sendo o nível médio mais comum entre os casos (48.5%) e o nível fundamental mais comum entre os controles (60.7%), $p=0.009$. Quanto ao número de episódios de malária, os casos tiveram média de 3,0 episódios e controles média de 2,0 episódios ($p=0.002$) (Tabela 1).

Dos participantes entrevistados, 87,9% do grupo controle não tiveram icterícia e 5,2% dos casos necessitou de transfusão sanguínea anteriormente (Tabela 1).

Figura 14. Características socioepidemiológicas autorrelatadas pelos participantes.

Descrição	Total (n=237)		Casos (n=97)		Controles (n=140)		p Value ⁴⁹
		%		%		%	
Idade	37.0 (29.0-47.0)		38.0 (30.0-47.0)	-	36.0 (27.0-49.0)	-	0.53
Etnia							0.77
Branca	43	18.1	16	16.5	27	19.3	
Pardo	119	50.2	48	49.5	71	50.7	
Preto	70	29.5	30	30.9	40	28.6	
Amarelo	5	2.1	3	3.1	2	1.4	
Área de residência							0.11
Rural	21	8.9	12	12.4	9	6.4	
Urbana	216	91.1	85	87.6	131	93.6	
Tempo de residência	23.0 (13.0-35.0)	-	21.0 (10.0-35.0)	-	24.5 (16.5-36.5)	-	0.29
Nível Educacional							0.009
Analfabeto	1	0.4	1	1.0	0	0.0	
Ensino Fundamental	126	53.2	41	42.3	85	60.7	
Ensino Médio	99	41.8	47	48.5	52	37.1	
Ensino Superior	11	4.6	8	8.2	3	2.1	
Numero de episódios de malária	3.0 (1.0-6.0)	-	3.0 (2.0-8.0)	-	2.0 (1.0-5.0)	-	0.002
Malária nos últimos 15 dias							0.64
Sim	5	2.1	3	3.1	2	1.4	
Não	230	97.5	93	96.9	137	97.9	
Não sabe/ não lembra	1	0.4	0	0.0	1	0.7	
UF							0.10
AC	99	41.8	37	38.1	62	44.3	

RO	54	22.8	25	25.8	29	20.7	
AM	30	12.7	17	17.5	13	9.3	
AP	22	9.3	5	5.2	17	12.1	
PA	17	7.2	5	5.2	12	8.6	
RR	15	6.3	8	8.2	7	5.0	
Icterícia ou colúria							<0.001
Sim	97	40.9	97	100	0	0.0	
Não	123	51.9	0	0.0	123	87.9	
Não lembra	17	7.2	0	0.0	17	12.1	
Transfusão							0.09
Sim	7	3.0	5	5.2	2	1.4	
Não	230	97.0	95	94.8	138	98.6	
Doente							0.12
Sim	11	4.6	7	7.2	4	2.9	
Não	226	95.4	90	92.8	136	97.1	

Os participantes com G6PDd, foram classificados como fenótipo intermediário em maior frequência em ambos os grupos, sendo a variante Africana A- identificada com maior frequência (casos= 41,2% e controles= 39,1%). Não houve indivíduos identificados com a variante Mediterrânea. Houve recorrência em 4 participantes (casos n=2.1% e controles n=1.4%) (Tabela 2).

Tabela 2. Características laboratoriais dos participantes incluídos no estudo.

	Total (n=237)		Casos (n=97)		Controles (n=140)		p Value
		%	n	%	n	%	
Fenotipagem G6PD							0.93
Deficiente	101	42.6	41	42.3	60	42.9	
Intermediário	136	57.4	56	57.7	80	57.1	

Genotipagem G6PD							0.68
Africana A+	11	4.7	3	3.1	8	5.8	
Africana A-	94	40.0	40	41.2	54	39.1	
Selvagem	130	55.3	54	55.7	76	55.1	
Recorrências	4	1.7	2	2.1	2	1.4	0.71

O genótipo de *CYP2D6* dos participantes apresentou maior frequência dos alelos de função normal *1 (21,10%), *2 (25,11%), *34 (15,19%) e *35 (6,33%), de função diminuída o alelo *10 (6,54%) e sem função o alelo *4 (10,13 %), em ambos os grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência alélica e fenótipo predito de *CYP2D6* em participantes com G6PDd casos e controles

Gene	Alelo	Total		Casos		Controles		p Value
		n=474	(%)	n=194	(%)	n=280	(%)	
<i>CYP2D6</i>	*1	100	21.10	39	20.10	61	21.79	0.659
	*2	119	25.11	49	25.26	70	25.00	0.949
	*3	4	0.84	1	0.52	3	1.07	0.648
	*4	48	10.13	20	10.31	28	10.00	0.913
	*9	6	1.27	4	2.06	2	0.71	0.232
	*10	31	6.54	15	7.73	16	5.71	0.382
	*17	13	2.74	3	1.55	10	3.57	0.256
	*29	19	4.01	7	3.61	12	4.29	0.712
	*34	72	15.19	31	15.98	41	14.64	0.690
	*35	30	6.33	14	7.22	16	5.71	0.509
	*39	2	0.42	0	0.00	2	0.71	0.515
	*41	19	4.01	8	4.12	11	3.93	0.915
	ND	11	2.32	3	1.55	8	2.86	0.537
Fenótipo predito de <i>CYP2D6</i>	gNM	123	51.90	46	47.42	77	55.00	0.251
	gIM	49	20.68	20	20.62	29	20.71	0.986
	gPM	1	0.42	1	1.03	0	0.00	0.409
	gUM	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.000
	ND	64	27.00	30	30.93	34	24.29	0.257

Na análise da frequência alélica por estado, o Amapá foi a unidade da federação que apresentou maior frequência do alelo *4, de função nula, e do alelo *29, de função diminuída ($p < 0.05$). Além disso, nos estados do Acre, Rondônia e Roraima, o alelo *10 (função diminuída) foi mais frequente (AC 8,08%; RO 5,56%; RR 13,33%;

p 0.468). Os estados de Rondônia e Roraima também tiveram frequência mais elevada do alelo de função diminuída, *41 (RO 5,56%; RR 6.67%; p 0.632). O fenótipo predito gNM foi o mais comum entre os estados (p 0.122) (Tabela 4 e Figura 1).

Neste estudo foi observada a presença dos seguintes alelos em todos os estados da federação: *CYP2D6*1*, *CYP2D6*2*, *CYP2D6*34* e *CYP2D6*35* (função normal); *CYP2D6*4* (função nula), *CYP2D6*10* e *CYP2D6*29* (função diminuída). Em seguida, os alelos *CYP2D6*17* e *CYP2D6*41*, também de função diminuída, foram os mais presentes nas unidades federais. Todavia, o *CYP2D6*9* (função diminuída) foi descrito somente nos estados de Acre, Pará e Rondônia e o *CYP2D6*39* esteve presente apenas no estado do Acre nesta amostra populacional (Tabela 4 e Figura 1).

Tabela 4. Frequência alélica e fenótipo predito de *CYP2D6* em participantes com G6PDd de casos e controles por estado da federação.

Gene	Alelo	Total		AC		AM		AP		PA		RO		RR		<i>p Value</i>
		n=47	%	n=19	%	n=60	%	n=44	%	n=34	%	n=10	%	n=30	%	
		4		8								8				
<i>CYP2D6</i>	*1	100	21.10	47	23.74	13	21.67	8	18.18	9	26.47	17	15.74	6	20.0	0.618
	*2	119	25.11	52	26.26	16	26.67	5	11.36	9	26.47	29	26.85	8	26.67	0.430
	*3	4	0.84	0	0.0	1	1.67	0	0.0	1	2.94	1	0.93	1	3.33	0.074
	*4	48	10.13	12	6.06	6	10.00	9	20.45	2	5.88	16	14.81	3	10.00	0.034
	*9	6	1.27	3	1.52	0	0.0	0	0.0	1	2.94	2	1.85	0	0.0	0.785
	*10	31	6.54	16	8.08	2	3.33	2	4.55	1	2.94	6	5.56	4	13.33	0.468
	*17	13	2.74	5	2.53	1	1.67	2	4.55	1	2.94	4	3.70	0	0.0	0.872
	*29	19	4.01	4	2.02	3	5.00	6	13.64	1	2.94	4	3.70	1	3.33	0.041
	*34	72	15.19	31	15.66	14	23.33	5	11.36	6	17.65	12	11.11	4	13.33	0.385
	*35	30	6.33	10	5.05	3	5.00	3	6.82	2	5.88	11	10.19	1	3.33	0.625
	*39	2	0.42	2	1.01	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.809
	*41	19	4.01	8	4.04	1	1.67	2	4.55	0	0.0	6	5.56	2	6.67	0.632
	ND	11	2.32	8	4.04	0	0.0	2	4.55	1	2.94	0	0.0	0	0.0	0.096
Fenótipo predito de <i>CYP2D6</i>	gNM	123	51.9	58	58.6	12	40.0	8	36.4	11	64.7	29	53.7	5	33.3	0.122
	gIM	49	20.7	11	11.1	8	26.7	7	31.8	1	5.9	16	29.6	6	40.0	
	gPM	1	0.4	1	1.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	
	gUM	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	
	ND	64	27.0	29	29.3	10	33.3	7	31.8	5	29.4	9	16.7	4	26.7	

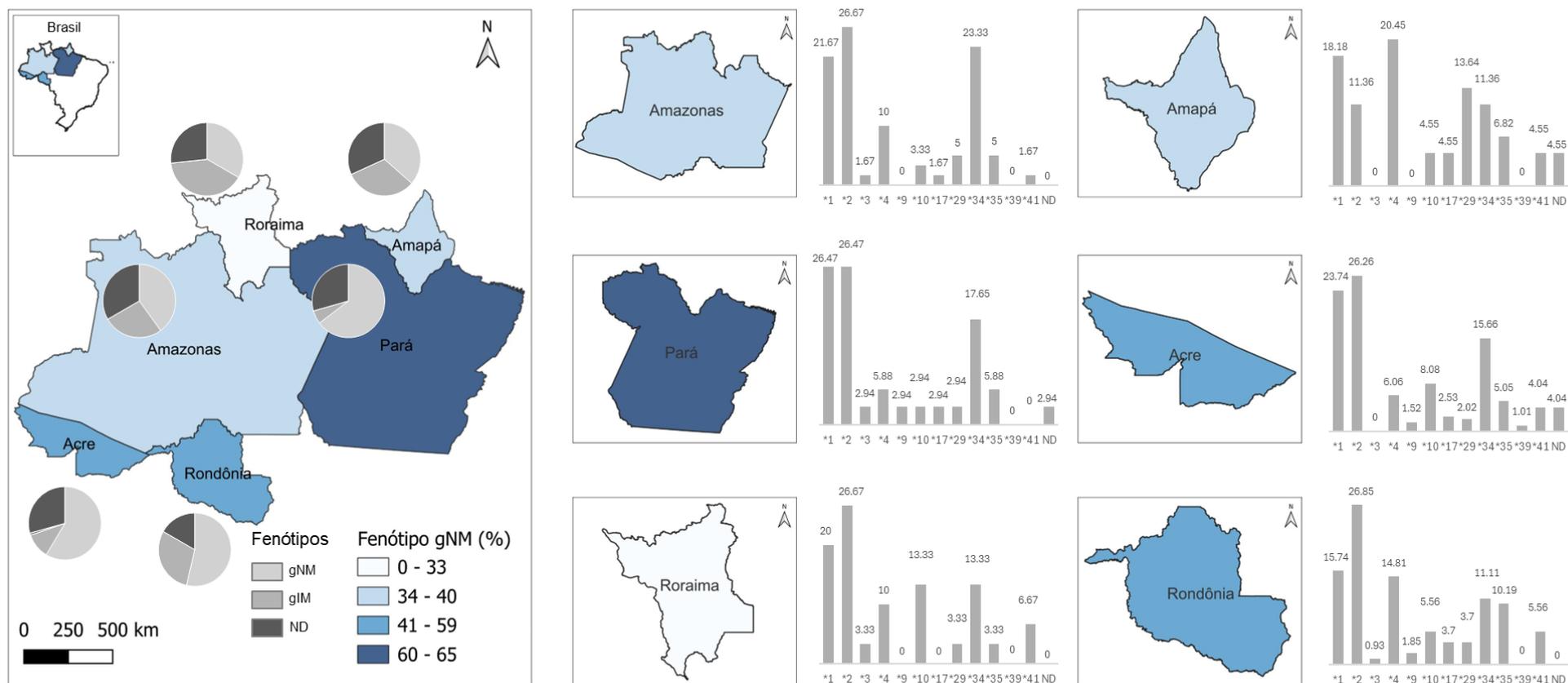


Figura 1 – Mapa geográfico das frequências alélicas e fenótipos preditos nas unidades federativas da Amazônia Legal.

Os fenótipos preditos dos participantes com recorrência foram gNM (50%) e gIM (50%), $p=0.194$ (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência alélica e fenótipo predito de *CYP2D6* em participantes com G6PDd de casos e controles por recorrência por malária vivax

Gene	Alelo	Total		Recorrência		Sem recorrência		<i>p</i> Value
		n=474	%	n=8	%	n=466	%	
<i>CYP2D6</i>	*1	100	21.10	0	0.0	100	21.46	0.213
	*2	119	25.11	3	37.50	116	24.89	0.420
	*3	4	0.84	0	0.00	4	0.86	>0.999
	*4	48	10.13	2	25.00	46	9.87	0.190
	*9	6	1.27	0	0.0	6	1.29	>0.999
	*10	31	6.54	0	0.0	31	6.65	>0.999
	*17	13	2.74	1	12.50	12	2.54	0.201
	*29	19	4.01	0	0.0	19	4.08	>0.999
	*34	72	15.19	2	25.00	70	15.02	0.349
	*35	30	6.33	0	0.0	30	6.44	>0.999
	*39	2	0.42	0	0.0	2	0.43	>0.999
	*41	19	4.01	0	0.0	19	4.08	>0.999
	ND	11	2.32	0	0.0	11	2.36	>0.999
	Fenótipo predito de <i>CYP2D6</i>	gNM	123	51.90	2	50.00	121	51.93
gIM		49	20.68	2	50.00	47	20.17	
gPM		1	0.42	0	0.0	1	0.43	
gUM		0	0.00	0	0.0	0	0.0	
ND		64	27.00	0	0.0	64	27.47	

A razão de chances entre fenótipos preditos de *CYP2D6* não apresentou associação com a hemólise em indivíduos com G6PDd (OR= <1) (Tabela 6).

Tabela 6 . Razão de chances para hemólise associada a fenótipos preditos de *CYP2D6* em indivíduos com G6PDd.

	Casos	Controles	OR	<i>p</i> Value
gPM	1	0	-	0,228
gIM	20	29	0,99	0,985
gNM	46	77	0,74	0,251
ND	30	34	1,40	0,257

DISCUSSÃO

Os antimaláricos PQ e TQ tem ação contra os hipnozoítos do *P. vivax* e agem prevenindo as recaídas. Entretanto, um obstáculo para a utilização dessas aminoquinolinas para malária vivax são indivíduos com G6PDd que podem ficar altamente suscetíveis à hemólise, devido a ação desses medicamentos em uma dose hipnozoitocida (28,29). Isso corresponde a mais de uma em cada três infecções potenciais por *P. vivax* sendo intratáveis ao combinar o metabolismo ineficaz da droga com a população excluída do tratamento (30).

Este estudo é o primeiro a avaliar o risco aumentado de hemólise em indivíduos com G6PDd e variantes do gene *CYP2D6* nos diferentes estados da Amazônia brasileira. Dentre os estados que participaram do estudo, o Amapá apresentou maior frequência dos alelos *4 (atividade nula) e *29 (atividade diminuída) ($p < 0.05$), um estado que destaca-se por 55.9% dos casos autóctones de malária adquirida em garimpos até o ano de 2022, além dos estados de Rondônia e Roraima, que também apresentaram maior frequência de alelos com função metabolizadora diminuída, contudo, não houve diferença estatística significativa ($p > 0.05$) (31–35). Deste modo, a função diminuída desses alelos tem impacto na metabolização da enzima *CYP2D6* e estudos adicionais seriam necessários, considerando um número maior de participantes com recorrência e genotipagem de *CYP2D6* para avaliar a influência em recorrências de malária nesses estados (31).

Este trabalho apresentou os alelos *CYP2D6* *2, *34 e *35 como os mais frequentes para a função normal da enzima *CYP2D6*, em concordância com outros trabalhos já realizados na região Amazônica (11–13). Os alelos *10, *29, *17, de função diminuída, e o alelo *4, de função nula, foram descritos entre todos os estados do estudo. Em outros trabalhos sobre a variabilidade genética de *CYP2D6* na população brasileira, o alelo de função nula *4 e o alelo de função diminuída *17 foram os mais comuns na região norte (10,36).

A função diminuída nos alelos de *CYP2D6* também foi encontrada por Silvino *et al.* (2020) (13) e Brasil *et al.* (2018), observaram que a frequência de recorrência foi maior em indivíduos com fenótipo de atividade diminuída de *CYP2D6* (RR ajustado = 1.89, 95% IC 1.01-3.70; $p = 0.049$) (11,13). Nosso estudo, todavia, apresentou um

número reduzido de 4 indivíduos com recorrência, e dentre esses foram descritos alelos com função normal e nula.

Outros estudos, também realizados na Amazônia brasileira, demonstraram que a proporção de alelos de função nula de *CYP2D6* (*4 e *5), função diminuída (*9, *10, *17, *29 e *41) e função normal (*1, *2, *34, *35 e *39) foram similares entre os grupos com recorrência e sem recorrência ($p > 0.05$). No entanto, esses estudos identificaram alelos ultrarrápidos de *CYP2D6* (*1xN and *2xN) em pacientes com recorrência ($p = 0.018$) (12,37). Este estudo, contudo, não identificou indivíduos com fenótipo ultrarrápido de *CYP2D6*.

Em relação ao metabolismo de *CYP2D6* em indivíduos com G6PDd na Amazônia, Macedo *et al.* (2023), identificaram um indivíduo com o fenótipo predito ultrarrápido (gUM) em um quadro de hemólise e anemia grave acompanhado de marcadores hepáticos e renais elevados. Além disso, o fenótipo gIM foi o mais frequente ($p = 0.044$), e não houve influência de *CYP2D6* na hemólise em pessoas com G6PDd e pessoas não deficientes de G6PD (37).

Nesse estudo, a variante G6PD Africana A- foi a mais frequente, presente em 40% dos indivíduos testados. A variante Africana A+ foi identificada em 4,7% das amostras, e a variante Mediterrânea não foi encontrada. Na região norte, a variante mais comum é a Africana A-, porém, a toxicidade referente a PQ é relativamente leve e autolimitada (14,17). Em indivíduos atendidos em um hospital de referência para malária em Manaus, foram identificadas as variantes G6PD: Africana A - (55.6%), Africana A+ (11.1%) e Mediterrânea (5.6%) (37). Outro estudo na Amazônia, identificou a variante Mediterrânea em 10 indivíduos (0,7%; IC 95% = 0,42-0,97) (19). Todavia, no estudo de Nascimento *et al.* (2022), a variante Mediterrânea não foi identificada nos indivíduos testados de municípios dos seis estados da Amazônia Brasileira (17).

Com relação ao nível educacional, o nível médio foi mais comum entre os casos (48,5%) e o nível fundamental mais comum entre os controles (60,7%) ($p < 0.0,5$). Um estudo de caráter descritivo e retrospectivo utilizou o Sistema de Vigilância Epidemiológica (SIVEP-Malária) para coleta de dados e demonstrou que indivíduos

com menores níveis de escolaridade possuíram maior prevalência de resultados positivos para malária (38). Por outro lado, um estudo na região Amazônica e outro na África Subsaariana, utilizaram intervenções educativas para melhorar o conhecimento sobre transmissão, prevenção e tratamento, demonstraram que o conhecimento aumentou significativamente após receber intervenções de educação em saúde em comparação com o grupo controle (39,40).

Nesse estudo houveram limitações. As informações foram autorrelatadas pelos participantes. Ademais, não foi possível prever o fenótipo de *CYP2D6* para uma importante parcela dos indivíduos. Nesta pesquisa os dados sobre episódios posteriores de malária foram retirados da plataforma SIVEP-Malária e o resultado apresentou apenas 4 indivíduos com recorrência dentre os participantes, à visto disso, pode haver subnotificação de casos de recorrência.

Este estudo descreveu as variantes de *CYP2D6* e suas respectivas funções mais frequentes em seis estados da região Amazônica, identificados pelo Ministério da Saúde com o maior índice parasitário anual de malária. Não houve identificação da relação entre metabolizadores ultrarrápidos de *CYP2D6* e a G6PDd neste estudo. Deste modo, estudos adicionais seriam importantes, considerando um número maior de participantes com G6PDd e genotipagem de *CYP2D6* para avaliar a influência da hemólise e metabolizadores ultrarrápidos na G6PDd nesses estados (31).

CONCLUSÃO

As frequências das variantes genéticas de *CYP2D6* foram pesquisadas com o intuito de se determinar o perfil genético da população estudada dos diferentes Estados da Amazônia brasileira. As frequências alélicas apresentadas nesse estudo concordam com estudos anteriores realizados no Brasil e na região Amazônica, e demonstraram maior frequência dos alelos de função normal: *CYP2D6**2 e *CYP2D6**34; função diminuída: *CYP2D6**10; e sem função: *CYP2D6**4. O fenótipo predito de *CYP2D6* mais frequente foi o gNM, seguido do fenótipo IM. Houve apenas um registro de fenótipo gPM e o fenótipo gUM não foi inferido.

Os alelos *CYP2D6**4 (função nula) e *CYP2D6**29 (função diminuída) foram presentes com maior frequência no estado do Amapá, no grupo de casos ($p < 0.05$). Esta foi a primeira vez que esse achado foi registrado.

Os participantes com G6PDd deste estudo foram identificados com a variante Africana A- em sua maioria ($p > 0.05$). Contudo, não houve associação entre a hemólise e os fenótipos preditos de *CYP2D6*. Estudos adicionais seriam necessários, considerando um número maior de participantes com recorrência e genotipagem de *CYP2D6* para avaliar a influência em recorrências de malária nesses estados.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos os participantes que aceitaram colaborar em nosso estudo e aos colaboradores das instituições envolvidas nessa pesquisa, Dr Mônica Costa, gerente do Departamento de Malária na FMT-HVD pelo suporte técnico, CAPES pela concessão da bolsa, FAPEAM (Programa Kunhã C,T&I no Amazonas. Edital N.º 008/2022 (Resolução N.º 010/2022).) pelo apoio financeiro e PPGMT-UEA/FMT-HVD pelo suporte acadêmico e infraestrutura.

REFERÊNCIAS

1. WHO. Malaria [Internet]. 2022 [cited 2022 Jul 4]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
2. Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MPG, Lacerda M V. et al. Severe Plasmodium vivax Malaria, Brazilian Amazon. Emerg Infect Dis. 2010;16(10):1611–4.
3. Llanos-Cuentas A, Lacerda MVG, Hien TT, Vélez ID, Namaik-larp C, Chu CS, et al. Tafenoquine versus Primaquine to Prevent Relapse of Plasmodium vivax Malaria . N Engl J Med. 2019;380(3):229–41.
4. Battle KE, Karhunen MS, Bhatt S, Gething PW, Howes RE, Golding N, et al. Geographical variation in Plasmodium vivax relapse. Malar J. 2014;13(1):1–16.
5. White MT, Karl S, Koepfli C, Longley RJ, Hofmann NE, Wampfler R, et al. Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum infection dynamics: Re-infections, recrudescences and relapses. Malar J [Internet]. 2018;17(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2318-1>

6. Bennett JW, Pybus BS, Yadava A, Tosh D, Sousa JC, McCarthy WF et al. Primaquine failure and cytochrome P-450 2D6 in *Plasmodium vivax* malaria. *N Engl J Med*. 2013;369:1381–2.
7. Ingram RJ, Crenna - Darusallam C, Soebianto S, Noviyanti R BJ. The clinical and public health problem of relapse despite primaquine therapy: case review of repeated relapses of *Plasmodium vivax* acquired in Papua New Guinea. 2014;13:488.
8. Baird JK, Louisa M, Noviyanti R, Ekawati L, Elyazar I, Subekti D, et al. Association of Impaired Cytochrome P450 2D6 Activity Genotype and Phenotype with Therapeutic Efficacy of Primaquine Treatment for Latent *Plasmodium vivax* Malaria. *JAMA Netw Open*. 2018;1(4):1–12.
9. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Klein T, Steven Leeder J. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet Med*. 2017;19(1):69–76.
10. Friedrich DC, Genro P, Sortica VA, Suarez-kurtz G, Ribeiro K, Romano-silva MA, et al. Distribution of CYP2D6 Alleles and Phenotypes in the Brazilian Population. 2014;9(10):5–12.
11. Brasil LW, Rodrigues-Soares F, Santoro AB, Almeida ACG, Kühn A, Ramasawmy R, et al. CYP2D6 activity and the risk of recurrence of *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: A prospective cohort study. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2139-7>
12. Cardoso J, Salazar Y, Almeida A, Barbosa, LRA, Silva E, Rodrigues M, Rodrigues-Soares F, et al. Influence of CYP2D6, CYP3A4 and CYP2C19 Genotypes on Recurrence of *Plasmodium vivax*. 2022;3(March):1–11.
13. Silvino ACR, Kano FS, Costa MA, Fontes CJF, Soares IS, De Brito CFA, et al. Novel insights into *Plasmodium vivax* therapeutic failure: CYP2D6 activity and time of exposure to malaria modulate the risk of recurrence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(5):1–14.
14. Howes RE, Dewi M, Piel FB, Monteiro WM, Battle KE, Messina JP, et al. Spatial distribution of G6PD deficiency variants across malaria-endemic regions. *Malar J*. 2013;12(1):1–15.
15. Luzzatto L, Ally M, Notaro R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood*. 2020;136(11):1225–40.

16. Howes RE, Piel FB, Patil AP, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, et al. G6PD Deficiency Prevalence and Estimates of Affected Populations in Malaria Endemic Countries: A Geostatistical Model-Based Map. *PLoS Med.* 2012;9(11).
17. Nascimento JR, Brito-Sousa JD, Almeida ACG, Melo MM, Costa MRF, Barbosa LRA, et al. Prevalence of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency in highly malaria-endemic municipalities in the Brazilian Amazon: A region-wide screening study. *Lancet Reg Heal - Am* [Internet]. 2022;12:100273. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lana.2022.100273>
18. Oliveira RAG, Oshiro M, Hirata MH, Hirata RDC, Ribeiro GS, Medeiros TMD, et al. A novel point mutation in a class IV glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD São Paulo) and polymorphic G6PD variants in São Paulo State, Brazil. *Genet Mol Biol.* 2009;32(2):251–4.
19. Santana MS, Monteiro WM, Siqueiraa AM, Costa MF, Sampaio V, Lacerdaa M V., et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient variants are associated with reduced susceptibility to malaria in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107(5):301–6.
20. de Moura Neto JP, Dourado MV, dos Reis MG, Gonçalves MS. A novel c.197T → A variant among Brazilian neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Genet Mol Biol.* 2008;31(1):33–5.
21. Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2016;30(2):373–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2015.11.006>
22. R&D Diagnostics Ltd. Kit SQMMR1250. Detecção da deficiência de G6PD.
23. PureLink™ Pro 96. User manual: Genomic DNA Kit For purification of genomic DNA. 2009;(100007358). Available from: www.invitrogen.com
24. Caudle KE, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Swen JJ, Haidar CE, Klein TE, et al. Standardizing CYP2D6 Genotype to Phenotype Translation: Consensus Recommendations from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group. *Clin Transl Sci.* 2020;13(1):116–24.
25. Charity N, Amy J T, Katrin S, Michelle, Whirl-Carrillo. José AGA, John LB, Henry MD, et al. PharmVar GeneReview: CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther.* 2020;107(1):154–70.
26. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Klein T, Steven Leeder J. Prediction of

- CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet Med.* 2017;19(1):69–76.
27. Thermo Fisher Scientific. NanoDrop One. 2016;(October).
 28. Lo E, Zhong D, Raya B, Pestana K, Koepfli C, Lee MC, et al. Prevalence and distribution of G6PD deficiency: Implication for the use of primaquine in malaria treatment in Ethiopia. *Malar J* [Internet]. 2019;18(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2981-x>
 29. Olvany JM, Williams SM, Zimmerman PA. Global perspectives on CYP2D6 associations with primaquine metabolism and *Plasmodium vivax* radical cure. *Front Pharmacol.* 2022;13(November):1–8.
 30. Baird JK, Battle KE, Howes RE. Primaquine ineligibility in anti-relapse therapy of *Plasmodium vivax* malaria: The problem of G6PD deficiency and cytochrome P-450 2D6 polymorphisms. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):4–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2190-z>
 31. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. *Boletim Epidemiológico.* 2024;55.
 32. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, et al. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(4):414–7.
 33. Whirl-Carrillo M, Huddart R, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, Whaley R, et al. An Evidence-Based Framework for Evaluating Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clin Pharmacol Ther.* 2021;110(3):563–72.
 34. PharmGKB. CYP2D6 *4 [Internet]. Available from: <https://www.pharmgkb.org/haplotype/PA165816579>
 35. PharmGKB. CYP2D6 *29 [Internet]. Available from: <https://www.pharmgkb.org/haplotype/PA165948318>
 36. Rede Nacional de Farmacogenética - Refargen. Rede Nacional de Farmacogenética - Refargen [Internet]. Available from: https://www.refargen.org.br/rubrique.php?id_rubrique=56
 37. Macêdo MM, Almeida ACG, Silva GS, Oliveira AC, Mwangi VI, Shuan AC, et al. Association of CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 Genetic Variants on Primaquine Hemolysis in G6PD-Deficient Patients. *Pathogens.* 2023;12(7):1–11.
 38. Meireles AAV, Duarte FG da S, Cardoso RF. *Panorama Epidemiológico Da*

- Malária Em Um Estado Da Amazônia Brasileira / Epidemiological Overview of Malaria in a Brazilian Amazon State. *Brazilian J Dev.* 2020;6(10):75803–21.
39. Onyinyechi OM, Mohd Nazan AIN, Ismail S. Effectiveness of health education interventions to improve malaria knowledge and insecticide-treated nets usage among populations of sub-Saharan Africa: systematic review and meta-analysis. *Front Public Heal.* 2023;11(August).
40. Suárez-Mutis MC, Coura JR, Massara CL, Schall VT. Efeito de ação educativa participativa no conhecimento de professores do ensino básico sobre malária. *Rev Saude Publica.* 2011;45(5):931–7.

4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

Nesse estudo houveram limitações. As informações foram autorrelatadas pelos participantes, portanto, não houve um profissional de saúde confirmando as informações clínicas prestadas pelo participante. Ademais, não foi possível identificar o fenótipo predito de uma importante parcela dos indivíduos. Nesta pesquisa, os dados retirados do SIVEP-Malária registraram apenas 4 indivíduos com recorrência de todos os participantes, à visto disso, sugere-se a subnotificação de casos de recorrência.

Diante disso, ressalta-se a importância dos estudos de base populacional em áreas endêmicas para malária na região Amazônica brasileira, que considerem a população com G6PDd suscetível à hemólise por aminoquinolinas para avaliar a influência da metabolização de CYP2D6, a fim de obter dados de prevalência e incidência de hemólise, verificar os fatores gerais que influenciam na hemólise, e identificar a influência da metabolização rápida de CYP2D6 com a hemólise nessa população. Os dados da G6PDd apresentados nesse estudo associados à influência das variantes do gene *CYP2D6* e hemólise na Amazônia brasileira, são uma contribuição na descrição da epidemiologia e farmacogenética populacional da região estudada com o intuito de auxiliar, na elaboração de estratégias terapêuticas personalizadas à população futuramente. É essencial a continuidade deste trabalho de forma longitudinal, a fim de obter dados com mais precisão para entender às

necessidades específicas do tratamento para malária vivax de indivíduos com a G6PDd.

5. CONCLUSÃO

- As frequências alélicas apresentadas nesse estudo concordam com estudos anteriores realizados no Brasil e na região Amazônica, e, demonstraram maior frequência dos alelos de função normal: *CYP2D6**1, *CYP2D6**2 e *CYP2D6**34; função diminuída: *CYP2D6**10, e sem função: *CYP2D6**4. O fenótipo predito de *CYP2D6* mais frequente foi o gNM, seguido do fenótipo IM. Houve apenas um registro de fenótipo gPM e o fenótipo UM não foi inferido.
- Não foi observada diferença estatística significativa nos fenótipos preditos entres os grupos de casos e controles.
- Foi observada diferença estatística significativa nos alelos *4 (função nula) e *29 (função diminuída), presentes com maior frequência no estado do Amapá, no grupo de casos.
- Os participantes com G6PDd deste estudo foram identificados com a variante Africana A- em sua maioria e não houve associação de risco entre hemólise e e os fenótipos preditos de *CYP2D6* inferidos neste estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. Malaria [Internet]. 2022 [cited 2022 Jul 4]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
2. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Boletim Epidemiológico. 2024;55.
3. WHO. World malaria report 2023 [Internet]. 2023. 283 p. Available from: <https://www.wipo.int/amc/en/mediation/%0Ahttps://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023>
4. Bassat Q AP. Defying malaria: Fathoming severe Plasmodium vivax disease. Nat Med. 2011;17(1):48–49.
5. Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MPG, Lacerda M V. et al. Severe Plasmodium vivax Malaria, Brazilian Amazon. Emerg Infect Dis. 2010;16(10):1611–4.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Especial: Malária 2021., Ministério da Saúde. Brasília - DF. Nov. 2021. Boletim Epidemiológico da Malária 2021. 2021;1–100. Available from: www.saude.gov.br/svs
7. PREVENTION CODCA. Malaria [Internet]. 2022 [cited 2022 Jul 14]. Available from: <https://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html#>
8. BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de tratamento da malária no Brasil [Internet]. 2021. Available from: www.bvsmms.saude.gov.br.
9. Saúde M da. Saúde de A a Z. Malária [Internet]. 2022. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria>
10. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination. Clin Microbiol Rev. 2011;24(2):377–410.
11. BRASIL. Ministério da Saúde. Coleta de Sangue. Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais. Vol. 1ª edição. Brasília; 2010. 45 p.
12. Suh KN, Kain KC, Keystone JS. Malaria. Cmaj. 2004;170(11):1693–702.
13. Pimenta PFP, Orfano AS, Bahia AC, Duarte APM, Ríos-Velásquez CM, Melo FF, et al. An overview of malaria transmission from the perspective of amazon anopheles vectors. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(1):23–47.
14. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key

- gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2009;9(9):555–66. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X)
15. White MT, Shirreff G, Karl S, Ghani AC, Mueller I. Variation in relapse frequency and the transmission potential of *Plasmodium vivax* malaria. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2016;283(1827).
 16. BRASIL. Ministério da Saúde. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2010. 35 p.
 17. Daher A, Silva JCAL, Stevens A, Marchesini P, Fontes CJ, Ter Kuile FO, et al. Evaluation of *Plasmodium vivax* malaria recurrence in Brazil 11 Medical and Health Sciences 1117 Public Health and Health Services. *Malar J* [Internet]. 2019;18(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2644-y>
 18. World Health Organization. WHO Guidelines for malaria. 2022; Available from: <http://apps.who.int/bookorders>.
 19. World Health Organisation. Guide to G6PD deficiency rapid diagnostic testing to support *P. vivax*. 2018. 4–5 p.
 20. Baird JK, Louisa M, Noviyanti R, Ekawati L, Elyazar I, Subekti D, et al. Association of Impaired Cytochrome P450 2D6 Activity Genotype and Phenotype with Therapeutic Efficacy of Primaquine Treatment for Latent *Plasmodium vivax* Malaria. *JAMA Netw Open*. 2018;1(4):1–12.
 21. Stewart AGA, Zimmerman PA, McCarthy JS. Genetic Variation of G6PD and CYP2D6: Clinical Implications on the Use of Primaquine for Elimination of *Plasmodium vivax*. *Front Pharmacol*. 2021;12(November):1–9.
 22. Battle KE, Karhunen MS, Bhatt S, Gething PW, Howes RE, Golding N, et al. Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. *Malar J*. 2014;13(1):1–16.
 23. White MT, Karl S, Koepfli C, Longley RJ, Hofmann NE, Wampfler R, et al. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection dynamics: Re-infections, recrudescences and relapses. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2318-1>
 24. Marcsisin SR, Reichard G, Pybus BS. Primaquine pharmacology in the context of CYP 2D6 pharmacogenomics: Current state of the art. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2016;161:1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.011>

25. Brunton L CBK. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*. 12^a. AMGH Editora Ltda E, editor. Porto Alegre; 2012. 2080 p.
26. Puaprasert K, Chu C, Saralamba N, Day NPJ, Nosten F, White NJ, et al. Real time PCR detection of common CYP2D6 genetic variants and its application in a Karen population study 06 Biological Sciences 0604 Genetics. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):8–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2579-8>
27. Farmanguinhos. Farmanguinhos primaquina. Farmanguinhos fiocruz. p. 1–8.
28. Organization WH. *GUIDELINES FOR THE TREATMENT OF MALARIA*. 3rd ed. Vol. 3, World Health Organization. 2015. 313 p.
29. Pybus BS, Sousa JC, Jin X, Ferguson JA, Christian RE, Barnhart R, et al. CYP450 phenotyping and accurate mass identification of metabolites of the 8-aminoquinoline, anti-malarial drug primaquine. *Malar J*. 2012;11:1–9.
30. Bennett JW, Pybus BS, Yadava A, Tosh D, Sousa JC, McCarthy WF et al. Primaquine failure and cytochrome P-450 2D6 in *Plasmodium vivax* malaria. *N Engl J Med*. 2013;369:1381–2.
31. Ingram RJ, Crenna - Darusallam C, Soebianto S, Noviyanti R BJ. The clinical and public health problem of relapse despite primaquine therapy: case review of repeated relapses of *Plasmodium vivax* acquired in Papua New Guinea. 2014;13:488.
32. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Klein T, Steven Leeder J. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet Med*. 2017;19(1):69–76.
33. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): Clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J*. 2005;5(1):6–13.
34. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*. 2007;116(3):496–526.
35. Sim SC, Ingelman-Sundberg M. The human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature website: A peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum Genomics*. 2010;4(4):278–81.
36. Gaedigk A, Simon S, Pearce R, Bradford L, Kennedy M, Leeder J. The CYP2D6

- Activity Score: Translating Genotype Information into a Qualitative Measure of Phenotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2007 Feb;83(2):234–42.
37. Baird JK, Battle KE, Howes RE. Primaquine ineligibility in anti-relapse therapy of *Plasmodium vivax* malaria: The problem of G6PD deficiency and cytochrome P-450 2D6 polymorphisms. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):4–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2190-z>
 38. Caudle KE, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Swen JJ, Haidar CE, Klein TE, et al. Standardizing CYP2D6 Genotype to Phenotype Translation: Consensus Recommendations from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group. *Clin Transl Sci.* 2020;13(1):116–24.
 39. Santos SEB, Sp L, Zhou XY, Hu XX, Wang CC, Lu XR, et al. Open Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Front Pharmacol.* 2020;19(1):0–2.
 40. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, et al. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(4):414–7.
 41. Friedrich DC, Genro P, Sortica VA, Suarez-kurtz G, Ribeiro K, Romano-silva MA, et al. Distribution of CYP2D6 Alleles and Phenotypes in the Brazilian Population. 2014;9(10):5–12.
 42. Brasil LW, Rodrigues-Soares F, Santoro AB, Almeida ACG, Kühn A, Ramasawmy R, et al. CYP2D6 activity and the risk of recurrence of *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: A prospective cohort study. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2139-7>
 43. Cardoso J, Salazar Y, Almeida A, Barbosa, LRA, Silva E, Rodrigues M, Rodrigues-Soares F, et al. Influence of CYP2D6, CYP3A4 and CYP2C19 Genotypes on Recurrence of *Plasmodium vivax*. 2022;3(March):1–11.
 44. Silvino ACR, Costa GL, De Araújo FCF, Ascher DB, Pires DEV, Fontes CJF, et al. Variation in Human Cytochrome P-450 drug-metabolism genes: A gateway to the understanding of *plasmodium vivax* relapses. *PLoS One.* 2016;11(7):1–14.
 45. Macêdo MM, Almeida ACG, Silva GS, Oliveira AC, Mwangi VI, Shuan AC, et al. Association of CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 Genetic Variants on Primaquine Hemolysis in G6PD-Deficient Patients. *Pathogens.* 2023;12(7):1–

- 11.
46. Mehlotra RK, Gaedigk A, Howes RE, Rakotomanga TA, Ratsimbaoa AC, Zimmerman PA. CYP2D6 Genetic Variation and Its Implication for Vivax Malaria Treatment in Madagascar. *Front Pharmacol.* 2021;12(April):1–10.
47. Howes RE, Dewi M, Piel FB, Monteiro WM, Battle KE, Messina JP, et al. Spatial distribution of G6PD deficiency variants across malaria-endemic regions. *Malar J.* 2013;12(1):1–15.
48. Luzzatto L, Ally M, Notaro R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood.* 2020;136(11):1225–40.
49. Belfield KD, Tichy EM. Review and drug therapy implications of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Am J Heal Pharm.* 2018;75(3):97–104.
50. Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev.* 2007;21(5):267–83.
51. Pandolfi PP, Sonati F, Rivi R, Mason P, Grosveld F, Luzzatto L. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *EMBO J.* 1995;14(21):5209–15.
52. Gaetani GD, Parker JC, Kirkman HN. Intracellular restraint: a new basis for the limitation in response to oxidative stress in human erythrocytes containing low activity variants of glucose 6 phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71(9):3584–7.
53. Nascimento JR, Brito-Sousa JD, Almeida ACG, Melo MM, Costa MRF, Barbosa LRA, et al. Prevalence of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency in highly malaria-endemic municipalities in the Brazilian Amazon: A region-wide screening study. *Lancet Reg Heal - Am [Internet].* 2022;12:100273. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lana.2022.100273>
54. Oliveira RAG, Oshiro M, Hirata MH, Hirata RDC, Ribeiro GS, Medeiros TMD, et al. A novel point mutation in a class IV glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD São Paulo) and polymorphic G6PD variants in São Paulo State, Brazil. *Genet Mol Biol.* 2009;32(2):251–4.
55. Santana MS, Monteiro WM, Siqueiraa AM, Costa MF, Sampaio V, Lacerdaa M V., et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient variants are associated with reduced susceptibility to malaria in the brazilian amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107(5):301–6.

56. de Moura Neto JP, Dourado MV, dos Reis MG, Gonçalves MS. A novel c.197T → A variant among Brazilian neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Genet Mol Biol.* 2008;31(1):33–5.
57. Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2016;30(2):373–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2015.11.006>
58. Health Organization W. Guide to G6PD deficiency rapid diagnostic testing to support P. vivax radical cure Global Malaria Programme [Internet]. 2018. Available from: <http://apps.who.int/bookorders>.
59. Baird JK. 8-Aminoquinoline Therapy for Latent Malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(4):1–68.
60. WHO Malaria Policy Advisory Committee and Secretariat. Malaria Policy Advisory Committee to the WHO: conclusions and recommendations of seventh biannual meeting (March 2015). *Malar J.* 2015;14:295.
61. Blume KG, Kaplan JC, Löhr GW, Ramot B, Valentine WN. International Committee for Standardization in Haematology: Recommended Methods for Red-Cell Enzyme Analysis. *Br J Haematol.* 1977;35(2):331–40.
62. Van Noorden CJF, Vogels IMC. A sensitive cytochemical staining method for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes. *Br J Haematol.* 1985;60(1):57–63.
63. Chu CS, Freedman DO. Tafenoquine and g6pd: A primer for clinicians. *J Travel Med.* 2019;26(4):1–11.
64. Alam MS, Kibria MG, Jahan N, Thriemer K, Hossain MS, Douglas NM, et al. Field evaluation of quantitative point of care diagnostics to measure glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *PLoS One.* 2018;13(11):83–9.
65. Minucci A, Giardina B, Zuppi C, Capoluongo E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase laboratory assay: How, when, and why? *IUBMB Life.* 2009;61(1):27–34.
66. Beutler, Ernest; Mitchell M. Special for Modifications of the Fluorescent Screening Method for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. 1968;32(5):816–9.
67. Espino FE, Bibit JA, Sornillo JB, Tan A, Von Seidlein L, Ley B. Comparison of three screening test kits for G6PD enzyme deficiency: Implications for its use in the radical cure of vivax malaria in remote and resource-poor areas in the

- philippines. PLoS One. 2016;11(2):1–12.
68. Osorio L, Carter N, Arthur P, Bancone G, Gopalan S, Gupta SK, et al. Performance of binaxNOW G6PD deficiency point-of-care diagnostic in *P. vivax*-infected subjects. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;92(1):22–7.
 69. Baird JK, Dewi M, Subekti D, Elyazar I, Satyagraha AW. Noninferiority of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency diagnosis by a point-of-care rapid test vs the laboratory fluorescent spot test demonstrated by copper inhibition in normal human red blood cells. *Transl Res [Internet]*. 2015;165(6):677–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2014.09.009>
 70. Roca-Feltrer A, Khim N, Kim S, Chy S, Canier L, Kerleguer A, et al. Field trial evaluation of the performances of point-of-care tests for screening G6PD deficiency in Cambodia. *PLoS One*. 2014;9(12):1–16.
 71. Zobrist S, Brito M, Garbin E, Monteiro WM, Freitas SC, Macedo M, et al. Evaluation of a point-of-care diagnostic to identify glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis [Internet]*. 2021;15(8):1–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0009649>
 72. Brito M, Rufatto R, Murta F, Sampaio V, Balieiro P, Baía-Silva D, et al. Operational feasibility of *Plasmodium vivax* radical cure with tafenoquine or primaquine following point-of-care, quantitative glucose-6-phosphate dehydrogenase testing in the Brazilian Amazon: a real-life retrospective analysis. *Lancet Glob Heal*. 2024;12(3):e467–77.
 73. Howes RE, Piel FB, Patil AP, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, et al. G6PD Deficiency Prevalence and Estimates of Affected Populations in Malaria Endemic Countries: A Geostatistical Model-Based Map. *PLoS Med*. 2012;9(11).
 74. Brito-Sousa JD, Santos TC, Avalos S, Fontecha G, Melo GC, Val F, et al. Clinical Spectrum of Primaquine-induced Hemolysis in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency: A 9-Year Hospitalization-based Study from the Brazilian Amazon. *Clin Infect Dis*. 2019;69(8):1440–2.
 75. Monteiro WM, Moura-Neto JP, Recht J, Bassat Q, Lacerda MVG. Fatal Primaquine-Induced Hemolysis in a Patient with *Plasmodium vivax* Malaria and G6PD A(-) Variant in the Brazilian Amazon. *Clin Infect Dis*. 2016;62(9):1188.
 76. Nascimento TL do, Vasconcelos SP, Peres Y, Oliveira MJS de, Taminato M, Souza KMJ de. Prevalence of malaria relapse: Systematic review with meta-analysis. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2019;27.

77. Silvino ACR, Kano FS, Costa MA, Fontes CJF, Soares IS, De Brito CFA, et al. Novel insights into *Plasmodium vivax* therapeutic failure: CYP2D6 activity and time of exposure to malaria modulate the risk of recurrence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(5):1–14.

7. ANEXOS

7.1 Procedimentos operacionais padrão utilizados (POP's)

7.1.1 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DE DETECÇÃO DA DEFICIÊNCIA DE G6PD – TÉCNICA SPOT TEST

Kit SQMMR1250 – R&D Diagnostics Ltd

Amostra

- Sangue total seco em papel de filtro (armazenado até uma semana a 20-25°C)
ou
- 5 µl de sangue total (EDTA, Heparina, citrato, oxalato), pode ser armazenado até uma semana a 4°C.

Preparo da Solução Reagente

- 1) Adicionar 27.5 ml de Dilution buffer (vial RD7001) ao frasco contendo reagente liofilizado (Frasco reagente = RD7002), utilizando a seringa.
- 2) Preparar alíquotas (escrever data de preparação/vencimento!!!) em tubo Falcon (abrir o frasco com cuidado, vácuo!!!)
A solução preparada é estável por 4 semanas a 4°C, 2 meses a -20 °C .
- 3) Os controles Normal e Deficiente serão preparados adicionando 500 µl de Água deionizada (água de injeção) em cada frasco de controle liofilizado. Após a reconstituição, são estáveis por 1 semana a 4°C, 2 semanas a -20 °C.
- 4) Controles coletados (Amostras Normal e Deficiente) são estáveis por 1 semana a 4°C, 2 semanas a -20 °C

Preparo da Solução de Teste

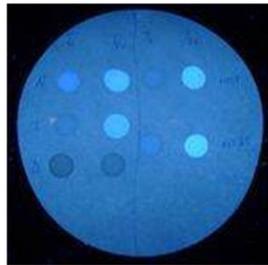
- 1) Misturar em tubo eppendorf, identificado com o código da amostra: 100 µl de reagente e 5 µl de sangue total (ou 5 mm de papel de filtro cortado)
- 2) Misturar bem, agitando o tubo com os dedos (o sangue tem que ser completamente lisado), incubar por 10 min a 25°C.
- 3) Aplicar 10 µl de solução de teste a um papel de filtro identificado com o código da amostra.
- 4) Deixar secar o papel de filtro por aprox. 1 hora.

- 5) Avaliar em luz UV (Cuidado: proteger os olhos).
- 6) A cada dia incluir um controle normal e um controle deficiente.

Registro dos resultados

- Preencher resultado na tabela (normal- fluorescência forte / deficiente– nenhuma fluorescência / intermediário– pouca fluorescência).
- Salvar os dados com a data da coleta, backup.

Papel filtro



7.1.2 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP EXTRAÇÃO DE DNA

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

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

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

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

1. OBJETIVOS

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

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica.

3. APLICÁVEL A

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

4. RESPONSABILIDADES

Pessoal encarregado da coleta das amostras da pesquisa.

Equipe do laboratório de biologia molecular.

5. POP'S RELACIONADOS

- Seguimento dos participantes no estudo “Epidemiologia da Malária no Município do Careiro, Amazonas” (versão atual do POP_IPCCB_TC_002).
- Caracterização da Malária Grave por *Plasmodium vivax* na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Brasil (versão atual do POP_IPCCB_HO_001).
- Procedimento para a realização de PCR em tempo real para detecção de plasmódio (versão atual do POP_IPCCB_LB_002).

- Procedimento para realização de PCR em tempo real para detecção de DNA de plasmódio (Qpcr) – versão atual do POP_PCCB_LB_021.

6. PROCEDIMENTOS

a. Recursos necessários

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

- ii. Materiais

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

6.1.3 Equipamentos

1. Centrífuga
2. Vortex
3. Banho Maria

6.1.4 Reagentes

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

6. Tampão de Lavagem 2 (Tampão AW2)	Temperatura ambiente
7. Tampão de Eluição (Tampão AE)	Temperatura ambiente

6.2 Obtenção de sangue total

6.2.1 Em papel de filtro

1. Abrir o envelope que contém o papel de filtro.
2. Realizar a punção digital utilizando lanceta estéril descartável depois de limpar a área.
3. Limpar a primeira gota obtida após a punção e coletar no papel de filtro quantidade suficiente para saturação do papel de filtro.
4. Secar em Temperatura ambiente. Fechar o envelope. Armazenar entre 2°C a 8°C.
5. No laboratório de biologia molecular, os papéis de filtro serão armazenados seguindo a mesma ordem que as lâminas. Isto é, seguindo a numeração das caixas de lâminas: cada caixa de papéis de filtro terá no máximo 50 amostras, seguindo a ordem das lâminas.

6.2.2 Por punção endovenosa

1. Obter 5 ml de sangue venoso em tubo de EDTA identificado.
2. Centrifugar a 14000 rpm por 10 min.
3. Desprezar o soro e colocar a papa de hemácias em criotubo identificado.
4. Armazenar os criotubos a – 20°C em caixa de plástico ou papelão identificada e numerada.
5. No laboratório de biologia molecular, os criotubos serão armazenados seguindo a mesma ordem que as lâminas.

6.3 Extração do DNA

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

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

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

6.3.2 Procedimento para extração do DNA a partir de tubo

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

6.3.3 Procedimento comum para extração do DNA

1. Adicionar 200 µL de Etanol absoluto (96 a 100%) e agitar no vórtex imediatamente. Remover as bolhas por centrifugação.
2. Cuidadosamente transferir o conteúdo do tubo para o tubo filtro. Tampar e centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Descartar o filtrado com o tubo. Colocar o tubo filtro em um novo tubo coletor.
3. Cuidadosamente adicionar 500 µL de tampão AW1 e centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Descartar o filtrado com o tubo. Colocar em um novo tubo coletor.
4. Cuidadosamente adicionar 500 µL de tampão AW2 e centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos.

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

6. Colocar o tubo filtro em um tubo eppendorf de 1,5 MI 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. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.

7. Armazenar por -20°C.

6.4 Biossegurança

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

7. REFERÊNCIAS

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

8. REGISTRO DOS ANEXOS

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

9. DECLARAÇÃO

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

7.1.3 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP GENOTIPAGEM DE SNPs

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

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

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

1. OBJETIVOS

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

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 ligado em um cromossomo.
- Diplótipo: É a combinação específica dos dois haplótipos.
- Genótipo: é a constituição genética de um indivíduo proveniente de ancestrais comuns.
- Fenótipo: é o produto direto da informação proveniente no DNA, representa formas alternativas de expressão de um mesmo caráter que pode ser controlado por um ou vários genes.

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 vivax* spp. a partir de sangue total, utilizando o QIAmp 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=5 μ L)

Mastermix universal	2,5 μ L
Sonda de genotipagem	0,25 μ L

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

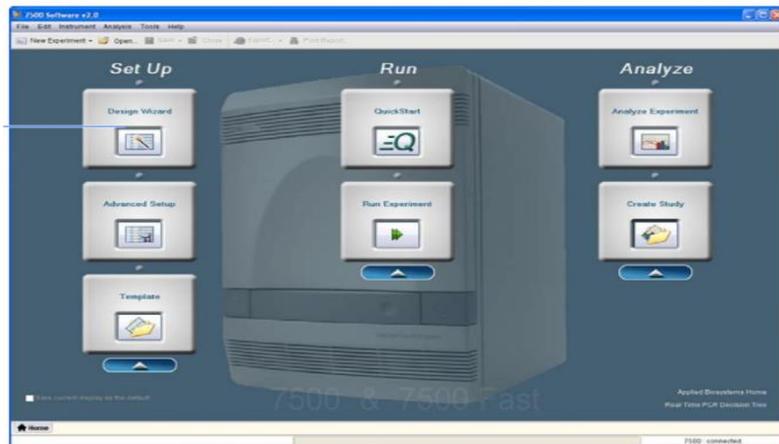
- f. Centrifugar o mix e pipetar 2,75 μ L em cada poço da microplaca;
- g. Cobrir a microplaca e seguir para a bancada de manipulação de DNA.

7.3. Montagem da placa de genotipagem

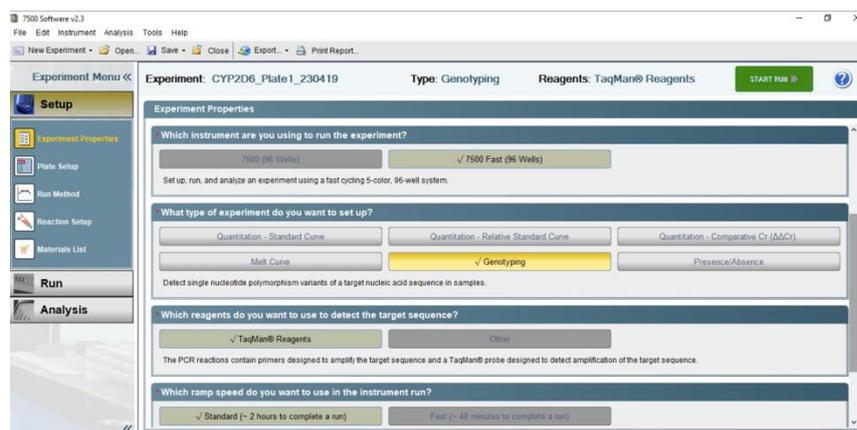
- a. Vortexar e/ou centrifugar todos os tubos e microplacas de armazenamento de DNA;
- b. Pipetar 2,25 μ L de DNA em cada poço da microplaca de genotipagem contendo o mix de genotipagem;
- c. Os controles negativos devem ser feitos misturando 2,25 μ L de água (miliQ/água para injeção/água nuclease free)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

7.4. Reação de PCR real time

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

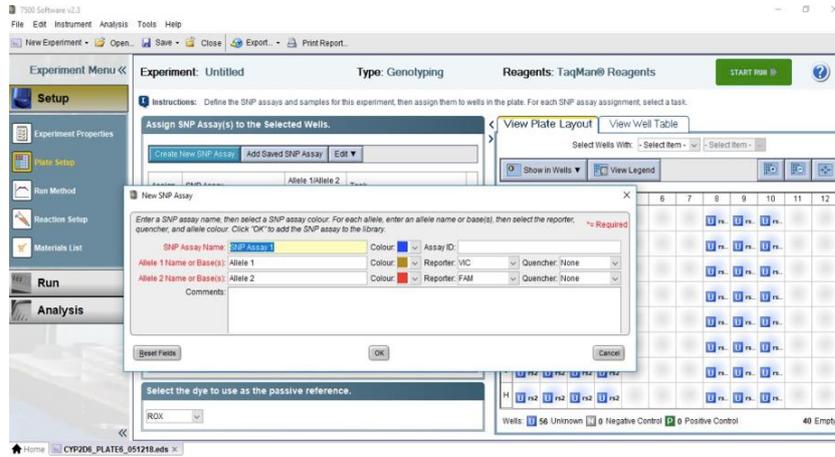


- Instrumento de corrida: 7500 fast (96wells);
- Tipo de experimento: Genotyping;
- Reagente: TaqMan® Reagents;
- Velocidade: Standard (~2 hours to complete run).



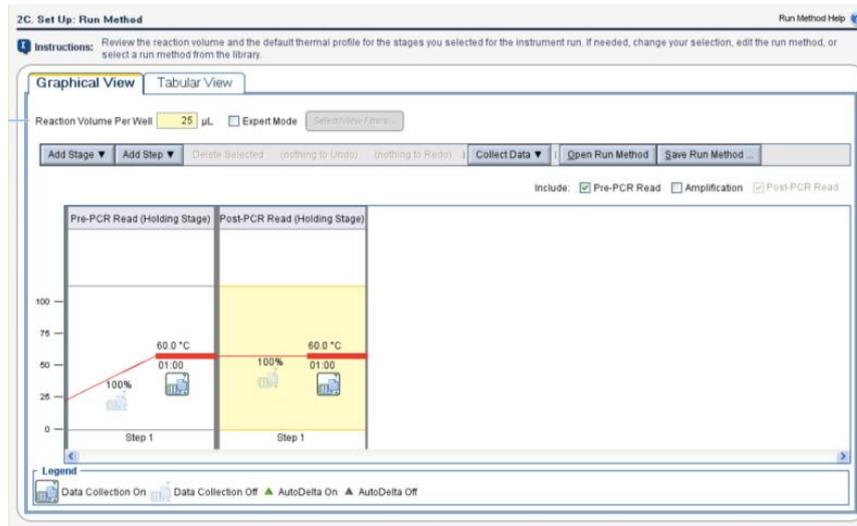
- d. No Experiment Menu -> SETUP -> Plate setup
 - Atribuir SNP assay;
 - Criar novo SNP assay;
 - Identificar o SNP assay;
 - Definir alelo 1 ou base e selecionar VIC.
 - Definir alelo 2 ou base e selecionar FAM;

- No Plate layout, selecionar os poços e definir o SNP assay.



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

- Para configurar a corrida, preencha a quantidade de μL da reação.
A reação pode ter entre 10 e 30 μL ;



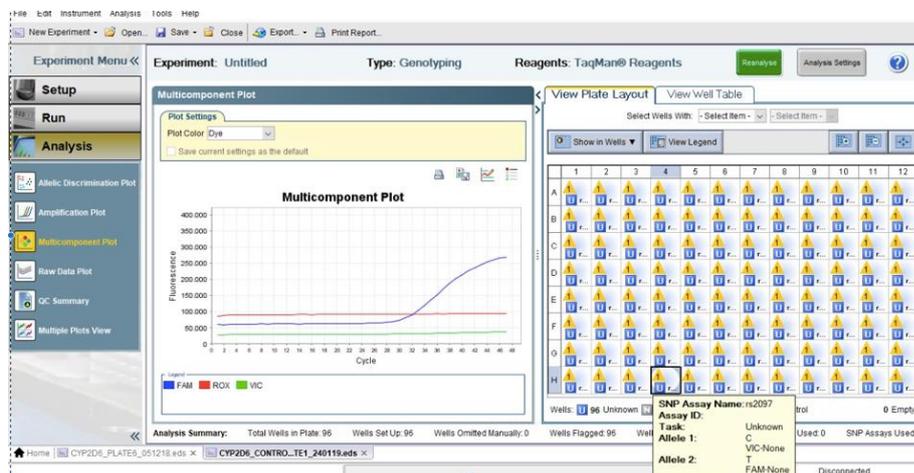
- Na aba Tabular View selecione os tempos e temperatura da reação, bem como o número de ciclos.

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

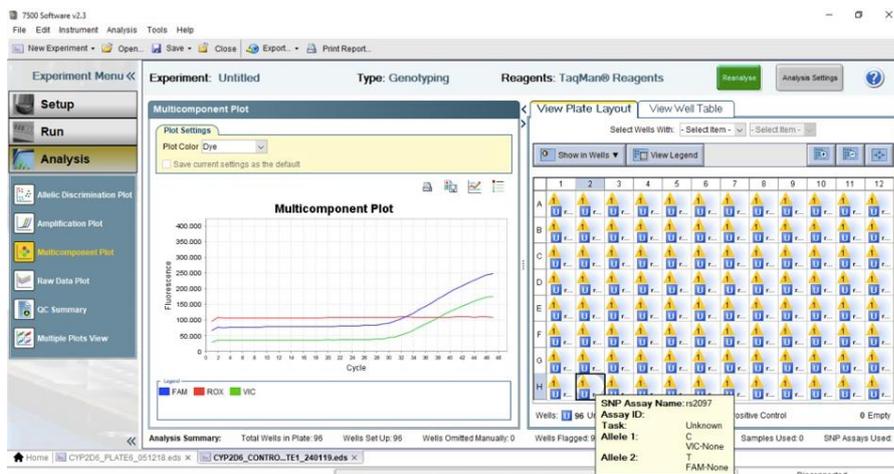
- f. Após configurar PCR, conferir o Plate layout e salvar a reação;
- Em seguida, clicar no botão START RUN.
 - O desenho da reação pode ser salvo como template para as demais análises;
 - No Experiment Menu -> ANALYSIS -> Multicomponent plot;
 - Analisar o resultado da curva de genotipagem.

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.

8. CYP2D6

- A enzima CYP2D6 requer etapas extras para realização da genotipagem

8.1. Definição do diplótipo para CYP2D6

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

8.2. Reação CNV

8.2.1. Concentração de DNA

- a. É necessário que a concentração de DNA das amostras seja igual a 5ng/μL;
- b. Com o auxílio do equipamento Nanodrop, dosar a concentração de DNA;
- c. As amostras com concentração maior que 5ng/μL devem ser diluídas com água nuclease free e, é preciso proceder nova extração das amostras com concentração menor.

8.2.2. Preparação do Mix

- a. O mix deve ser preparado e distribuído na microplaca para PCR na área apropriada (capela de fluxo laminar VECO CFLV estéril para preparo de reagentes PCR);

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

1x (VF=5 μ L)

Mastermix universal	5 μ L
TaqMan® copy number assay	0,5 μ L
RNase P	0,5 μ L
Água nuclease Fre	2 μ L

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

8.2.3. Montagem da placa de PCR

- a. Vortexar e/ou centrifugar todos os tubos e microplacas de armazenamento de DNA;
- b. Pipetar 2 μ L de DNA em cada poço da microplaca contendo o mix;
- c. As amostras deverão ser amplificadas em triplicata;
- d. É necessário ter uma amostra de controle positivo;
- e. Os controles negativos devem ser feitos misturando 2 μ L de água nuclease free em cada poço selecionado como controle negativo;
- f. Aplicar o adesivo óptico para vedar a microplaca, evitando tocar em sua área central;
- g. Centrifugar a microplaca;

8.2.4. Reação de PCR real time

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

- Reagente: TaqMan® Reagents;
- Velocidade: Standard (~2 hours to complete run).

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

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

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

- Para configurar a corrida, preencha a quantidade de μL da reação;
- Na aba Tabular View selecione os tempos e temperatura da reação.

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

Define Biological Replicate Groups

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

Add Biological Group **Delete Biological Group**

Biological Group Name	Color	Comments

Assign Targets and Samples

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

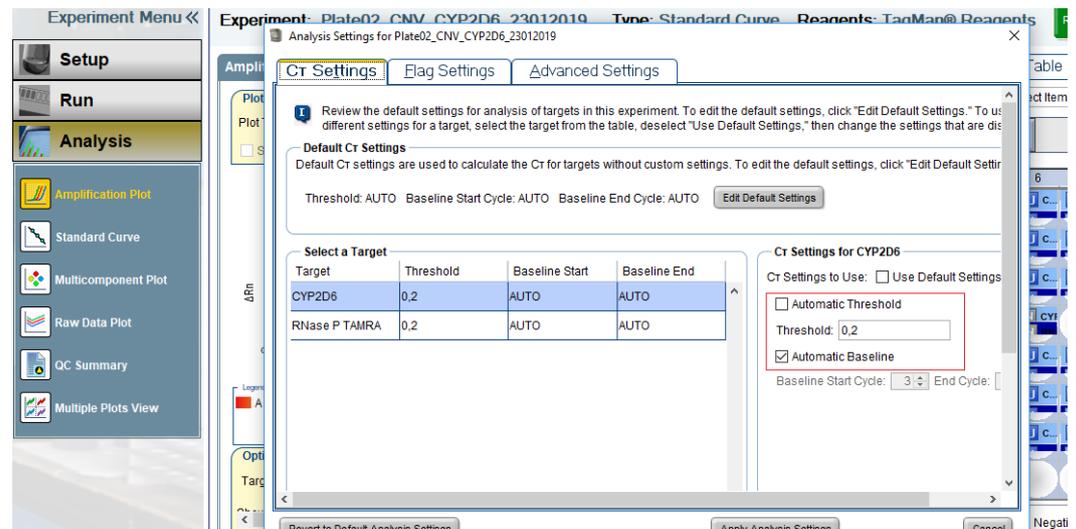
- Em seguida, clicar no botão START RUN.
- O desenho da reação pode ser salvo como template para as demais análises;

8.2.5. Análise do resultado

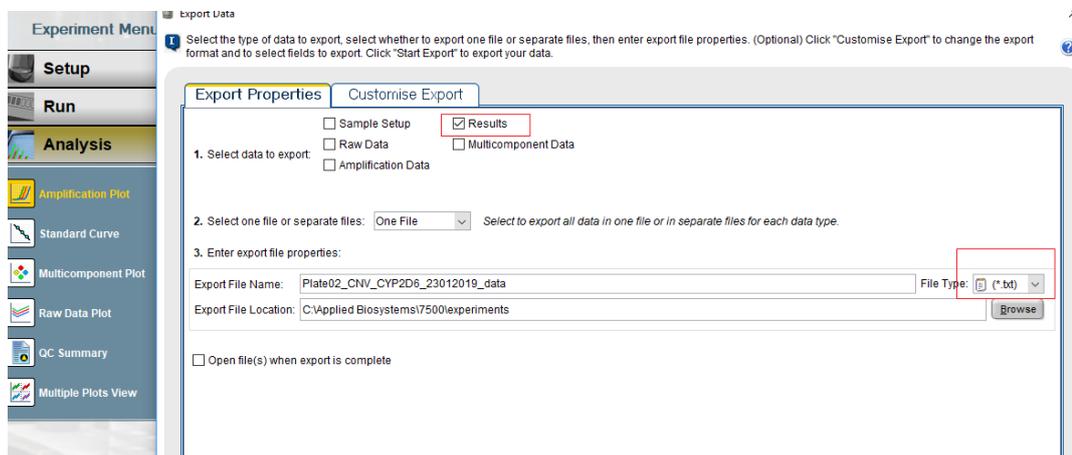
- a. Após o término da reação, analisar primeiramente o arquivo de resultado “.eds”, no software do equipamento. Verificar se houve

amplificação das amostras e controles, analisando a “Amplification plot” ou “Multicomponent plot”.

- b. Clicar em “Analysis settings”. Na janela “Ct settings” modificar os parâmetros de CT threshold e Baseline. Para cada alvo (CYP2D6 e RNase P), desmarcar a opção “Auto Threshold” e configurar o CT threshold para 0.2. Para cada alvo, deixar selecionada a opção Automatic Baseline. Clicar em “Apply Analysis settings” para aplicar as novas configurações.



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



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

9. REFERÊNCIAS

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

1. APÊNDICE

Tabela 1 - Polimorfismos CYP2D6, alelos inferidos e atividade enzimática estimada.

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

*nucleotídeos em negrito são polimórficos

** ND – não definido

Quadro 1 – Polimorfismos CYP2C19

Polimorfismo	SNP ID	Tipo	Alelos	Localização	Contexto VIC/FAM
681G>A	rs4244285	A/G, Transition Substitution	*2	Chr.10:94781 859	TTCCCACTATCATTG ATTATTTCCC[A/G] GGAACCCATAACAAA TACTTAAAA
636G>A	rs4986893	A/G, Transition Substitution	*3	Chr.10:94780 653	ACATCAGGATTGTAA GCACCCCTG[A/G] ATCCAGGTAAGGCCA AGTTTTTTGC
-806C/T	rs12248560	C/T, Transition Substitution	*17	Chr.10:94761 900	AAATTTGTGTCTTCT GTTCTCAAAG[C/T]AT CTCTGATGTAAGAGA TAATGCGC

Quadro 2 – Polimorfismo CYP3A4

Polimorfismo	SNP ID	Tipo	Alelos	Localização	Contexto VIC/FAM
-392A>G	rs2740574	C/T, Transition Substitution	*1B	Chr.7:997844 73	TAAAATCTATTA ATCGCCTCTCTC[C/T] TGCCCTTGTCTC TATGGCTGTCCT C

Quadro 3 – Polimorfismos CYP2D6

Polimorfismo	SNP ID	Tipo	Alelos	Localização	Contexto VIC/FAM
2549delA	rs35742686	T/-, Insertion/Deletion	*3	Chr.22:421282 42	GGCTGGGCTGG GTCCCAGGTCAT CC[T/-] GTGCTCAGTTAG

					CAGCTCATCCAG C
100C>T	rs1065852	A/G, Transition Substitution	*4 e *10	Chr.22:421306 92	CCGGGCAGTGGC AGGGGGCCTGGT G[A/G] GTAGCGTGCAGC CCAGCGTTGGCG C
1846G>A	rs3892097	C/T, Transition Substitution	*4	Chr.22:421289 45	AGACCGTTGGGG CGAAAGGGGCGT C[C/T] TGGGGGTGGGA GATGCGGGTAAG GG
4180G>C	rs1135840	C/G, Transversion Substitution	*2, *4, *10, *17, *29, *35, *39 e *41	Chr.22:421266 11	AGCACAAAGCTC ATAGGGGGATGG G[C/G] TCACCAGGAAAG CAAAGACACCAT G
2988G>A	rs2837172 5	C/T, Transition Substitution	*41	Chr.22:421278 03	TTCATGGGCCCC CGCCTGTACCCT T[C/T] CTCCCTCGGCCC CTGCACTGTTTC C
3183G>A	rs5942138 8	C/T, Transition Substitution	*29	Chr.22:421276 08	TCTGGTCGCCGC ACCTGCCCTATC A[C/T] GTCGTCGATCTC

					CTGTTGGACACG G
-1584C>G	rs1080985	G/C, Transversion Substitution	*2, *35 e *41	Chr.22:421323 75	TAATTTTGTATTT TTTGTAGAGACC[G/C] GGTTCTTCCAAG TTGTCCAGGCTG G
2615_2617 delAAG	rs5030656	CTT/-, Insertion/Deleti on	*9	Chr.22:421281 75	CCCCACCGTGGC AGCCACTCTCAC[CTT/-] CTCCATCTCTGC CAGGAAGGCCTC
31G>A	rs769258	C/T, Transition Substitution	*35	Chr.22:421307 61	AGGAGCAGGAAG ATGGCCACTATC A[C/T] GGCCAGGGGCA CCAGTGCTTCTA GC
1023C>T	rs2837170 6	G/A, Transition Substitution	*17	Chr.22:421297 70	ACGCGGCCCGAA ACCCAGGATCTG G[G/A] TGATGGGCACAG GCGGGCGGTCTG GC
2850C>T	rs16947	A/G, Transition Substitution	*2, *17, *34, *29, *35, e *41	Chr.22:421279 41	GAGAACAGGTCA GCCACCACTATG C[A/G] CAGGTTCTCATC ATTGAAGCTGCT C

7.1.4 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE HAPLÓTIPOS DO GENE *CYP2D6*.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

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

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

OBJETIVOS

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

DEFINIÇÕES

Alelo: Uma de duas ou mais formas alternativas de um gene que afetam a mesma característica de modo diferente.

Alelo estrela (*): é definido por variações de sequências específicas dentro do locus do gene.

Variação no número de cópias (CNV): um segmento de DNA em que um número variável daquele segmento tem sido encontrado.

Haplótipo: uma série de alelos encontrados em um locus ligado em um cromossomo.

Diplótipo: É a combinação específica dos dois haplótipos.

Genótipo: é a constituição genética de um indivíduo proveniente de ancestrais comuns.

Fenótipo: é o produto direto da informação proveniente no DNA, representa formas alternativas de expressão de um mesmo caráter que pode ser controlado por um ou vários genes.

Score de atividade enzimática (AS): ferramenta que permite a tradução do genótipo em uma medida qualitativa do fenótipo que pode ser utilizada pra predizer a atividade de *CYP2D6*.

APLICAÇÃO

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

RESPONSABILIDADES

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

POP'S RELACIONADOS

Procedimento para extração de DNA de *Plasmodium* spp. a partir de sangue total, utilizando o QIAmp DNA kit (Qiagen®) - POP_IPCCB_LB_003_v03D_PT

Procedimento para realização da genotipagem de SNPs de enzimas do citocromo P450 (CYPs) utilizando sistema TaqMan® - POP_IPCCB_LB_044_v01D_PT

RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1. Instalar o R e Rstudio

O R é um software livre para computação estatística e construção de gráficos que pode ser baixado e distribuído gratuitamente.

● Como baixar o R para o Windows:

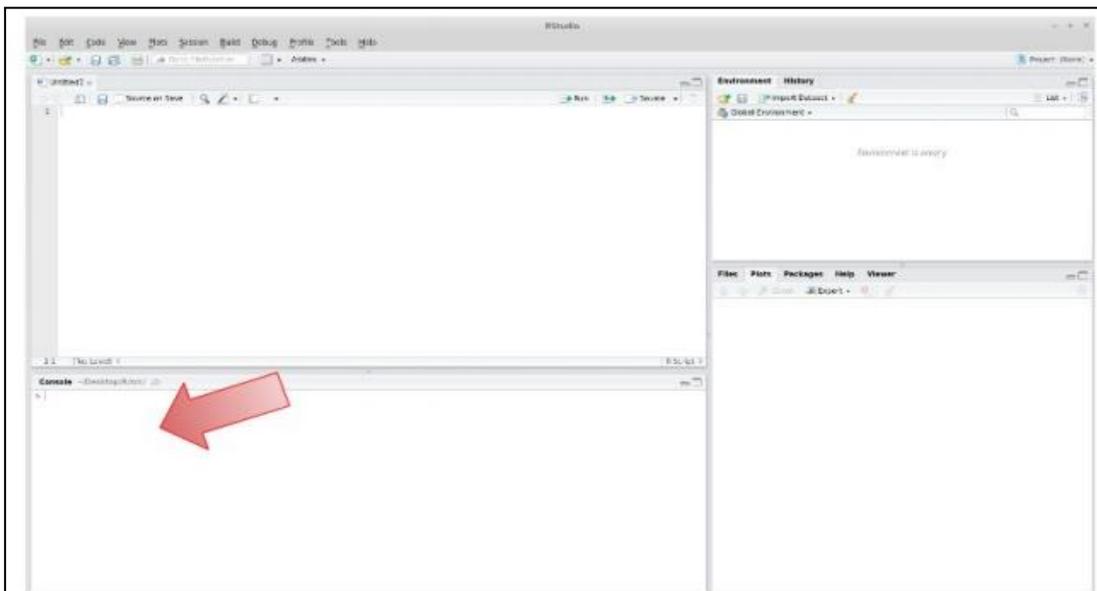
- Para baixar o R para o Windows entre no site do R www.r-project.org
- Clique em CRAN (Comprehensive R Archive Network);
- Escolha o espelho de sua preferência (CRAN mirrors);
- Clicar em Windows 95 or later;
- Clicar em base e salve o arquivo do R para Windows. Em seguida, executar o arquivo.

Como baixar o Rstudio para o Windows:

- Acessar <https://www.rstudio.com/products/rstudio/download/preview/>
- Em Desktop Version - Installers, clicar em Windows 7+;
- Seguir os passos da instalação.

Ao instalar o R, apenas as configurações mínimas para seu funcionamento básico são instaladas (pacotes que vem na instalação “base”). Para análise de haplótipos de CYP2D6 será necessário instalar o pacote adicional (packages) denominado Haplostats.

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



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

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

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	1584C>G		31G>A		100C>T		1023C>T		1846G>A		2549delA	
2	C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
3	C	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
4	G	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
5	C	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
6	C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
7	C	G	G	G	C	T	C	C	G	A	A	A
8	C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
9	C	C	G	G	T	T	C	C	G	A	A	A
10	C	G	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
11	C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A
12	C	C	G	G	C	C	C	C	G	G	A	A

As posições onde não foi possível determinar o alelo pela genotipagem, devem ser preenchidas na Tabela com “NA” (Não se aplica).

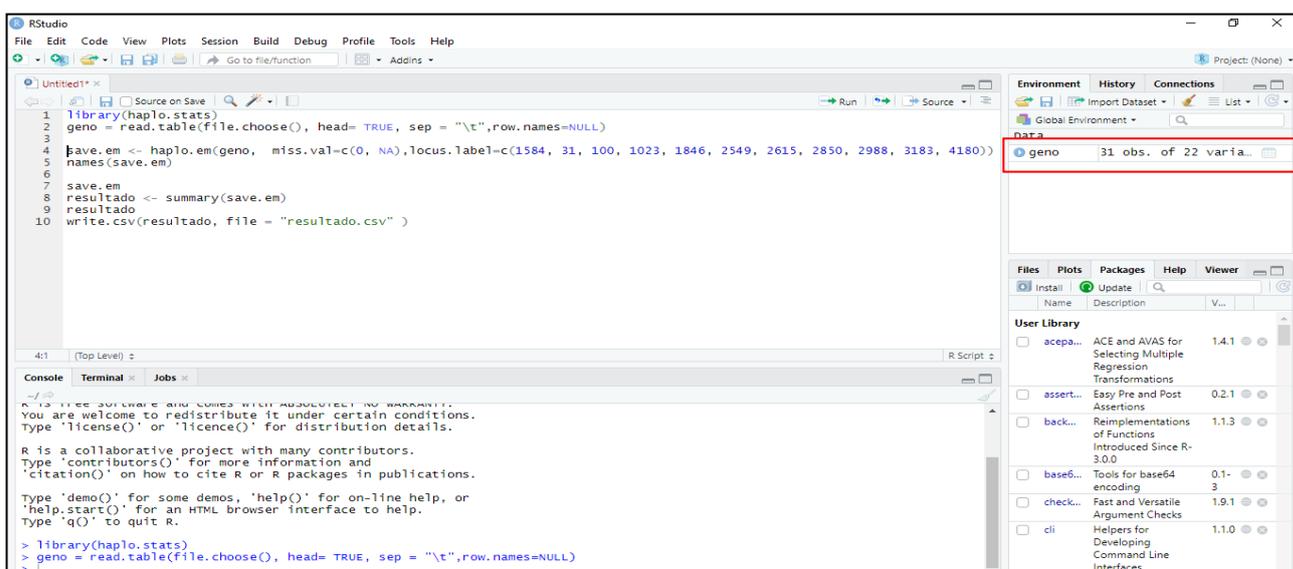
Salvar a Tabela com alelos no formato de arquivo de texto (.txt).

Abrir o arquivo de texto para modificação da referência dos SNP (primeira linha). A referência de cada SNP deve estar como no exemplo: “N*1584,1” (que corresponderia ao SNP -1584C>G). A tabela deve ficar como no modelo a seguir:

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

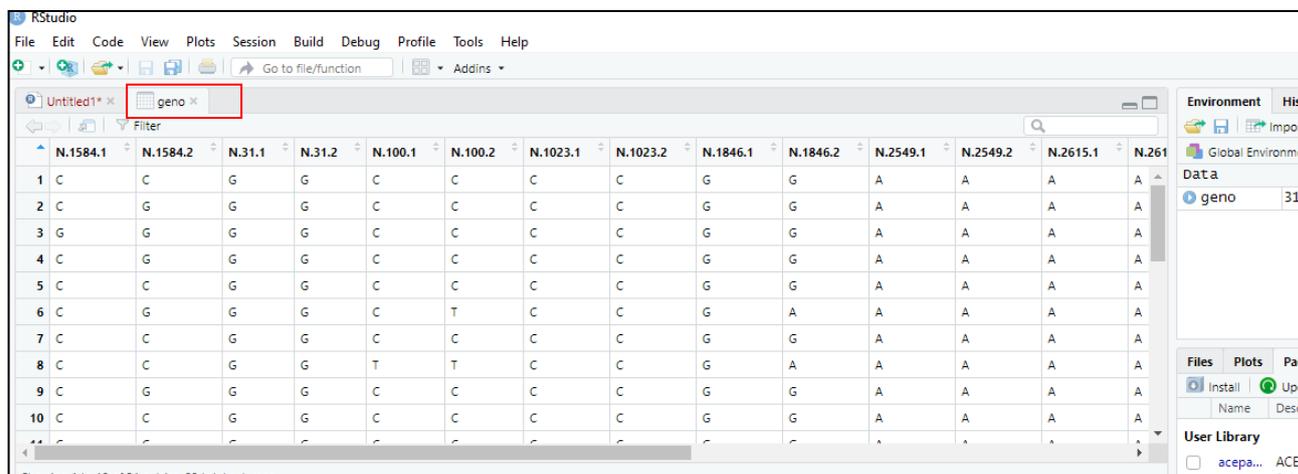


Ao clicar o segundo comando (*geno = read.table ...*), o programa irá solicitar a escolha da tabela a ser lida. Localizar o arquivo de texto com a tabela e clicar em ABRIR. Verificar se o comando foi executado com sucesso. No canto direito da tela deverá aparecer a informação com numero de observações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



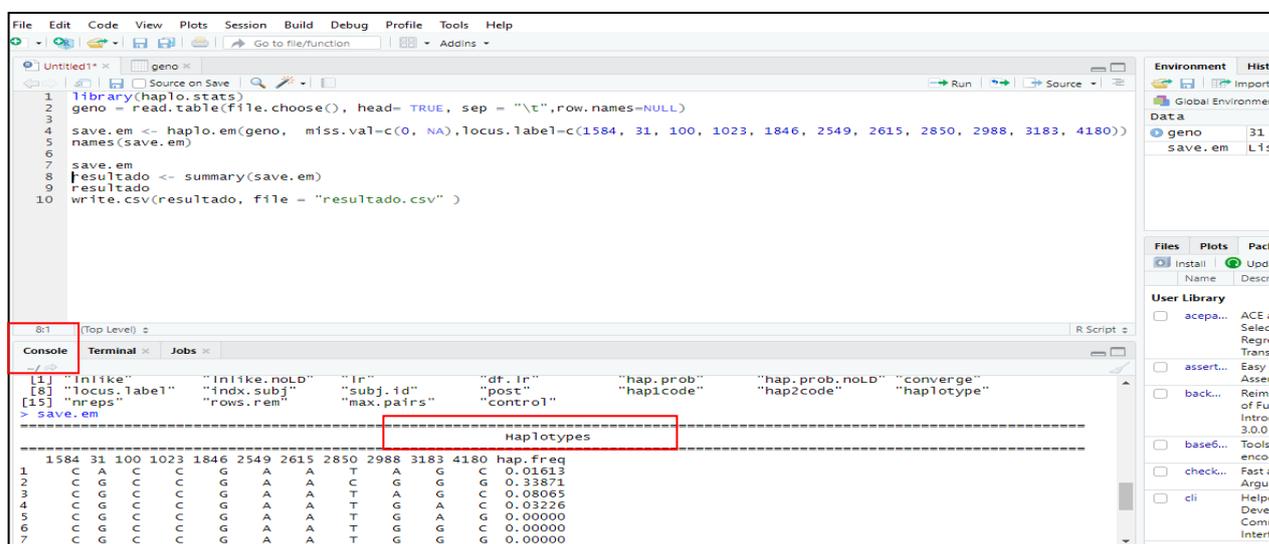
Clicar no campo destacado na figura acima. Uma aba “*geno*” será aberta onde poderá se verificar se a tabela com alelos foi lida corretamente (observar o número de linhas,

colunas, SNPs, quantidade de variáveis). Se corretas as informações, retornar para aba “Untitled 1*”.



Rodar o terceiro comando (`save.em <- haplo.em...`), seguido do quarto comando (`names(save.em)`) e quinto comando (`save.em`).

Após rodar o quinto comando, aparecerá a tabela “Haplotypes” com haplótipos e frequências (determinados pelos dados contidos na tabela de alelos) na janela inferior, aba “Console”:



A tabela com haplótipos pode ser copiada para outro tipo de arquivo (Word, Excel, Power Point).

Rodar o sexto comando (`resultado <- summary(save.em)`) e sétimo comando e (`resultado`). Na aba “Console” aparecerá a tabela “Subjects: Haplotype Codes and Posterior Probabilities”, contendo os diplótipos por indivíduo/amostra e suas probabilidades.

A segunda coluna desta tabela, “Subj..id”, corresponde ao número da amostra.

Observação: Uma amostra pode ter mais de uma probabilidade de diplótipo. Nesse caso, selecionar o diplótipo do indivíduo considerando a probabilidade maior e a coerência do resultado.

A tabela com os diplótipos pode ser copiada para outro tipo de arquivo (Word, Excel, Power Point).

```

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

```

9:1 (Top Level) R Script

Console Terminal Jobs

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

 Subjects: Haplotype Codes and Posterior Probabilities

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

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

6.3 Determinação de Alelo Estrela

A partir dos haplótipos obtidos pela análise no ambiente R (tabela “Haplotypes”), deve ser feita a comparação dos mesmos com bases de dados/artigos para determinação do alelo estrela correspondente a cada haplótipo.

Esta comparação pode ser feita utilizando as tabelas de SNPs disponíveis no site da *PharmGKB*, *PharmVar* e, no caso de alelos existentes na população brasileira, pode-

se utilizar diretamente a tabela do artigo de *Fridrich et al., 2014* (dados da Rede Nacional de Farmacogenética), que consta nos Apêndices deste POP.

Após a identificação do alelo estrela, deve-se determinar o diplótipo de cada indivíduo (Ex: Amostra 1 = *1/*2; Amostra 2 = *1/*4, etc) utilizando os dados da tabela “Subjects: Haplotype Codes and Posterior Probabilities”.

Após determinação dos diplótipos, deve-se seguir para as etapas de predição do fenótipo de CYP2D6, utilizando o *score de atividade* (AS), como descrito nos tópicos a seguir.

Caso se faça determinação de CNV (*copy number variation*) de CYP2D6, as deleções, duplicações ou multiplicações do gene devem ser consideradas da determinação do diplótipo final.

PREDIÇÃO DE FENÓTIPO A PARTIR DO GENÓTIPO

7.1 Variação do número de cópias

A predição de fenótipo é realizada somente após a determinação de diplótipos e análise da variação do número de cópias de *CYP2D6* conforme descrito no item 8 de POP_IPCCB_LB_044_v01D_PT.

7.2 Score de atividade enzimática (AS)

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

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

ATIVIDADE ENZIMÁTICA VALOR ATRIBUÍDO	
Aumentada	<2,25
Normal	1,25 – 2,25
Intermediária	0,25 – 1,0
Não funcional	0

7.2.1 Multiplicações

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

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

7.2.2 Deleções

As deleções devem ser reportadas somente em casos de homozigose.

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

7.3 Cálculo de AS

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

Os valores dos alelos presentes no diplótipo de um indivíduo serão somados conforme apresentado na tabela 2;

O fenótipo é determinado a partir do valor obtido para o AS.

Tabela 2. Exemplos de determinação de AS a partir do genótipo.

DIPLÓTIPO	CNV	SOMA	AS
*1/*1	2	1 + 1	2
*2/*2 ^a	1	1 + 0	1
*2/*4	2	1 + 0	1
*1/*10	3	1 + 0,25 + 0,25	1,5
*2/*17	3	1 + 1 + 0,5	2,5
*4/*4	2	0 + 0	0

^a O alelo *2 é substituído por *5 (não funcional). O diplótipo final seria: *2/*5.

7.4 Predição do fenótipo

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

Tabela 3. Determinação de fenótipo a partir do AS.

AS	Fenótipo
----	----------

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

8. REFERÊNCIAS

1. WHO. Malaria [Internet]. 2022 [cited 2022 Jul 4]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
2. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Boletim Epidemiológico. 2024;55.
3. WHO. World malaria report 2023 [Internet]. 2023. 283 p. Available from: <https://www.wipo.int/amc/en/mediation/%0Ahttps://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023>
4. Bassat Q AP. Defying malaria: Fathoming severe Plasmodium vivax disease. Nat Med. 2011;17(1):48–49.
5. Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MPG, Lacerda M V. et al. Severe Plasmodium vivax Malaria, Brazilian Amazon. Emerg Infect Dis. 2010;16(10):1611–4.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Especial: Malária 2021., Ministério da Saúde. Brasília - DF. Nov. 2021. Boletim Epidemiológico da Malária 2021. 2021;1–100. Available from: www.saude.gov.br/svs
7. PREVENTION CODCA. Malaria [Internet]. 2022 [cited 2022 Jul 14]. Available from: <https://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html#>
8. BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de tratamento da malária no Brasil [Internet]. 2021. Available from: www.bvsms.saude.gov.br.
9. Saúde M da. Saúde de A a Z. Malária [Internet]. 2022. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria>
10. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination. Clin Microbiol Rev. 2011;24(2):377–410.
11. BRASIL. Ministério da Saúde. Coleta de Sangue. Diagnóstico e monitoramento

- das DST, Aids e Hepatites Virais. Vol. 1ª edição. Brasília; 2010. 45 p.
12. Suh KN, Kain KC, Keystone JS. Malaria. *Cmaj*. 2004;170(11):1693–702.
 13. Pimenta PFP, Orfano AS, Bahia AC, Duarte APM, Ríos-Velásquez CM, Melo FF, et al. An overview of malaria transmission from the perspective of amazon anopheles vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(1):23–47.
 14. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2009;9(9):555–66. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X)
 15. White MT, Shirreff G, Karl S, Ghani AC, Mueller I. Variation in relapse frequency and the transmission potential of *Plasmodium vivax* malaria. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2016;283(1827).
 16. BRASIL. Ministério da Saúde. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2010. 35 p.
 17. Daher A, Silva JCAL, Stevens A, Marchesini P, Fontes CJ, Ter Kuile FO, et al. Evaluation of *Plasmodium vivax* malaria recurrence in Brazil 11 Medical and Health Sciences 1117 Public Health and Health Services. *Malar J* [Internet]. 2019;18(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2644-y>
 18. World Health Organization. WHO Guidelines for malaria. 2022; Available from: <http://apps.who.int/bookorders>.
 19. World Health Organisation. Guide to G6PD deficiency rapid diagnostic testing to support *P. vivax*. 2018. 4–5 p.
 20. Baird JK, Louisa M, Noviyanti R, Ekawati L, Elyazar I, Subekti D, et al. Association of Impaired Cytochrome P450 2D6 Activity Genotype and Phenotype with Therapeutic Efficacy of Primaquine Treatment for Latent *Plasmodium vivax* Malaria. *JAMA Netw Open*. 2018;1(4):1–12.
 21. Stewart AGA, Zimmerman PA, McCarthy JS. Genetic Variation of G6PD and CYP2D6: Clinical Implications on the Use of Primaquine for Elimination of *Plasmodium vivax*. *Front Pharmacol*. 2021;12(November):1–9.
 22. Battle KE, Karhunen MS, Bhatt S, Gething PW, Howes RE, Golding N, et al. Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. *Malar J*. 2014;13(1):1–16.
 23. White MT, Karl S, Koepfli C, Longley RJ, Hofmann NE, Wampfler R, et al. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection dynamics: Re-

- infections, recrudescences and relapses. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2318-1>
24. Marcsisin SR, Reichard G, Pybus BS. Primaquine pharmacology in the context of CYP 2D6 pharmacogenomics: Current state of the art. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2016;161:1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.011>
 25. Brunton L CBK. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*. 12^a. AMGH Editora Ltda E, editor. Porto Alegre; 2012. 2080 p.
 26. Puaprasert K, Chu C, Saralamba N, Day NPJ, Nosten F, White NJ, et al. Real time PCR detection of common CYP2D6 genetic variants and its application in a Karen population study 06 Biological Sciences 0604 Genetics. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):8–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2579-8>
 27. Farmanguinhos. Farmanguinhos primaquina. Farmanguinhos fiocruz. p. 1–8.
 28. Organization WH. *GUIDELINES FOR THE TREATMENT OF MALARIA*. 3rd ed. Vol. 3, World Health Organization. 2015. 313 p.
 29. Pybus BS, Sousa JC, Jin X, Ferguson JA, Christian RE, Barnhart R, et al. CYP450 phenotyping and accurate mass identification of metabolites of the 8-aminoquinoline, anti-malarial drug primaquine. *Malar J*. 2012;11:1–9.
 30. Bennett JW, Pybus BS, Yadava A, Tosh D, Sousa JC, McCarthy WF et al. Primaquine failure and cytochrome P-450 2D6 in *Plasmodium vivax* malaria. *N Engl J Med*. 2013;369:1381–2.
 31. Ingram RJ, Crenna - Darusallam C, Soebianto S, Noviyanti R BJ. The clinical and public health problem of relapse despite primaquine therapy: case review of repeated relapses of *Plasmodium vivax* acquired in Papua New Guinea. 2014;13:488.
 32. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Klein T, Steven Leeder J. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet Med*. 2017;19(1):69–76.
 33. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): Clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J*. 2005;5(1):6–13.
 34. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic,

- pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacol Ther.* 2007;116(3):496–526.
35. Sim SC, Ingelman-Sundberg M. The human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature website: A peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum Genomics.* 2010;4(4):278–81.
 36. Gaedigk A, Simon S, Pearce R, Bradford L, Kennedy M, Leeder J. The CYP2D6 Activity Score: Translating Genotype Information into a Qualitative Measure of Phenotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2007 Feb;83(2):234–42.
 37. Baird JK, Battle KE, Howes RE. Primaquine ineligibility in anti-relapse therapy of *Plasmodium vivax* malaria: The problem of G6PD deficiency and cytochrome P-450 2D6 polymorphisms. *Malar J [Internet].* 2018;17(1):4–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2190-z>
 38. Caudle KE, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Swen JJ, Haidar CE, Klein TE, et al. Standardizing CYP2D6 Genotype to Phenotype Translation: Consensus Recommendations from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group. *Clin Transl Sci.* 2020;13(1):116–24.
 39. Santos SEB, Sp L, Zhou XY, Hu XX, Wang CC, Lu XR, et al. Open Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Front Pharmacol.* 2020;19(1):0–2.
 40. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, et al. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(4):414–7.
 41. Friedrich DC, Genro P, Sortica VA, Suarez-kurtz G, Ribeiro K, Romano-silva MA, et al. Distribution of CYP2D6 Alleles and Phenotypes in the Brazilian Population. 2014;9(10):5–12.
 42. Brasil LW, Rodrigues-Soares F, Santoro AB, Almeida ACG, Kühn A, Ramasawmy R, et al. CYP2D6 activity and the risk of recurrence of *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: A prospective cohort study. *Malar J [Internet].* 2018;17(1):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2139-7>
 43. Cardoso J, Salazar Y, Almeida A, Barbosa, LRA, Silva E, Rodrigues M, Rodrigues-Soares F, et al. Influence of CYP2D6, CYP3A4 and CYP2C19 Genotypes on Recurrence of *Plasmodium vivax*. 2022;3(March):1–11.

44. Silvino ACR, Costa GL, De Araújo FCF, Ascher DB, Pires DEV, Fontes CJF, et al. Variation in Human Cytochrome P-450 drug-metabolism genes: A gateway to the understanding of plasmodium vivax relapses. *PLoS One*. 2016;11(7):1–14.
45. Macêdo MM, Almeida ACG, Silva GS, Oliveira AC, Mwangi VI, Shuan AC, et al. Association of CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 Genetic Variants on Primaquine Hemolysis in G6PD-Deficient Patients. *Pathogens*. 2023;12(7):1–11.
46. Mehlotra RK, Gaedigk A, Howes RE, Rakotomanga TA, Ratsimbaoa AC, Zimmerman PA. CYP2D6 Genetic Variation and Its Implication for Vivax Malaria Treatment in Madagascar. *Front Pharmacol*. 2021;12(April):1–10.
47. Howes RE, Dewi M, Piel FB, Monteiro WM, Battle KE, Messina JP, et al. Spatial distribution of G6PD deficiency variants across malaria-endemic regions. *Malar J*. 2013;12(1):1–15.
48. Luzzatto L, Ally M, Notaro R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood*. 2020;136(11):1225–40.
49. Belfield KD, Tichy EM. Review and drug therapy implications of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Am J Heal Pharm*. 2018;75(3):97–104.
50. Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev*. 2007;21(5):267–83.
51. Pandolfi PP, Sonati F, Rivi R, Mason P, Grosveld F, Luzzatto L. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *EMBO J*. 1995;14(21):5209–15.
52. Gaetani GD, Parker JC, Kirkman HN. Intracellular restraint: a new basis for the limitation in response to oxidative stress in human erythrocytes containing low activity variants of glucose 6 phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974;71(9):3584–7.
53. Nascimento JR, Brito-Sousa JD, Almeida ACG, Melo MM, Costa MRF, Barbosa LRA, et al. Prevalence of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency in highly malaria-endemic municipalities in the Brazilian Amazon: A region-wide screening study. *Lancet Reg Heal - Am* [Internet]. 2022;12:100273. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lana.2022.100273>
54. Oliveira RAG, Oshiro M, Hirata MH, Hirata RDC, Ribeiro GS, Medeiros TMD, et

- al. A novel point mutation in a class IV glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD São Paulo) and polymorphic G6PD variants in São Paulo State, Brazil. *Genet Mol Biol.* 2009;32(2):251–4.
55. Santana MS, Monteiro WM, Siqueiraa AM, Costa MF, Sampaio V, Lacerdaa M V., et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient variants are associated with reduced susceptibility to malaria in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107(5):301–6.
56. de Moura Neto JP, Dourado MV, dos Reis MG, Gonçalves MS. A novel c.197T → A variant among Brazilian neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Genet Mol Biol.* 2008;31(1):33–5.
57. Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2016;30(2):373–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2015.11.006>
58. Health Organization W. Guide to G6PD deficiency rapid diagnostic testing to support P. vivax radical cure Global Malaria Programme [Internet]. 2018. Available from: <http://apps.who.int/bookorders>.
59. Baird JK. 8-Aminoquinoline Therapy for Latent Malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(4):1–68.
60. WHO Malaria Policy Advisory Committee and Secretariat. Malaria Policy Advisory Committee to the WHO: conclusions and recommendations of seventh biannual meeting (March 2015). *Malar J.* 2015;14:295.
61. Blume KG, Kaplan JC, Löhr GW, Ramot B, Valentine WN. International Committee for Standardization in Haematology: Recommended Methods for Red-Cell Enzyme Analysis. *Br J Haematol.* 1977;35(2):331–40.
62. Van Noorden CJF, Vogels IMC. A sensitive cytochemical staining method for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes. *Br J Haematol.* 1985;60(1):57–63.
63. Chu CS, Freedman DO. Tafenoquine and g6pd: A primer for clinicians. *J Travel Med.* 2019;26(4):1–11.
64. Alam MS, Kibria MG, Jahan N, Thriemer K, Hossain MS, Douglas NM, et al. Field evaluation of quantitative point of care diagnostics to measure glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *PLoS One.* 2018;13(11):83–9.
65. Minucci A, Giardina B, Zuppi C, Capoluongo E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase laboratory assay: How, when, and why? *IUBMB Life.*

- 2009;61(1):27–34.
66. Beutler, Ernest; Mitchell M. Special for Modifications of the Fluorescent Screening Method for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. 1968;32(5):816–9.
 67. Espino FE, Bibit JA, Sornillo JB, Tan A, Von Seidlein L, Ley B. Comparison of three screening test kits for G6PD enzyme deficiency: Implications for its use in the radical cure of vivax malaria in remote and resource-poor areas in the philippines. *PLoS One*. 2016;11(2):1–12.
 68. Osorio L, Carter N, Arthur P, Bancone G, Gopalan S, Gupta SK, et al. Performance of binaxNOW G6PD deficiency point-of-care diagnostic in *P. vivax*-infected subjects. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;92(1):22–7.
 69. Baird JK, Dewi M, Subekti D, Elyazar I, Satyagraha AW. Noninferiority of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency diagnosis by a point-of-care rapid test vs the laboratory fluorescent spot test demonstrated by copper inhibition in normal human red blood cells. *Transl Res [Internet]*. 2015;165(6):677–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2014.09.009>
 70. Roca-Feltre A, Khim N, Kim S, Chy S, Canier L, Kerleguer A, et al. Field trial evaluation of the performances of point-of-care tests for screening G6PD deficiency in Cambodia. *PLoS One*. 2014;9(12):1–16.
 71. Zobrist S, Brito M, Garbin E, Monteiro WM, Freitas SC, Macedo M, et al. Evaluation of a point-of-care diagnostic to identify glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis [Internet]*. 2021;15(8):1–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0009649>
 72. Brito M, Rufatto R, Murta F, Sampaio V, Balieiro P, Baía-Silva D, et al. Operational feasibility of *Plasmodium vivax* radical cure with tafenoquine or primaquine following point-of-care, quantitative glucose-6-phosphate dehydrogenase testing in the Brazilian Amazon: a real-life retrospective analysis. *Lancet Glob Heal*. 2024;12(3):e467–77.
 73. Howes RE, Piel FB, Patil AP, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, et al. G6PD Deficiency Prevalence and Estimates of Affected Populations in Malaria Endemic Countries: A Geostatistical Model-Based Map. *PLoS Med*. 2012;9(11).

74. Brito-Sousa JD, Santos TC, Avalos S, Fontecha G, Melo GC, Val F, et al. Clinical Spectrum of Primaquine-induced Hemolysis in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency: A 9-Year Hospitalization-based Study from the Brazilian Amazon. *Clin Infect Dis*. 2019;69(8):1440–2.
75. Monteiro WM, Moura-Neto JP, Recht J, Bassat Q, Lacerda MVG. Fatal Primaquine-Induced Hemolysis in a Patient with *Plasmodium vivax* Malaria and G6PD A(-) Variant in the Brazilian Amazon. *Clin Infect Dis*. 2016;62(9):1188.
76. Nascimento TL do, Vasconcelos SP, Peres Y, Oliveira MJS de, Taminato M, Souza KMJ de. Prevalence of malaria relapse: Systematic review with meta-analysis. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2019;27.
77. Silvino ACR, Kano FS, Costa MA, Fontes CJF, Soares IS, De Brito CFA, et al. Novel insights into *Plasmodium vivax* therapeutic failure: CYP2D6 activity and time of exposure to malaria modulate the risk of recurrence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(5):1–14.

7.2 INSTRUMENTOS DE COLETA DE DADOS

7.2.1 Formulário de coleta de dados

	<p>Projeto: “INQUÉRITO DE BASE POPULACIONAL PARA ESTIMATIVA DE DEFICIÊNCIA DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PD) NA AMAZÔNIA BRASILEIRA, E ESTUDO DE CUSTO-EFETIVIDADE DO TESTE RÁPIDO PARA DETECÇÃO DE G6PD EM PACIENTES COM MALÁRIA: PREENCHENDO LACUNAS VISANDO À ELIMINAÇÃO DA MALÁRIA NO BRASIL”</p>
--	---

INFORMAÇÃO PESSOAL

1. Data (DD/MM/AA) / /
2. Número de identificação permanente ETIQUETA
3. Nome
4. Nome da Mãe
5. Data de Nascimento / / ou Idade
6. Naturalidade
7. Nome da Escola
8. Em que área reside? (1=Rural, 2=Urbana) Há quanto tempo reside na área?
9. Raça (1=branca, 2=mestiço, 3= negra, 4=indígena, 5=amarela)
10. Nível educacional(1=analfabeto, 2=ensino fundamental, 3=ensino médio, 4=ensino superior)
11. Já teve malária? (1=sim, 2=não, 3=não sabe/não lembra) Quantas vezes?
12. Quando ficou doente de malária tomou primaquina? (1=sim, 2=não,3=não sabe/não lembra)
(Comprimido pequeno e amarelo/laranja)
13. Já teve icterícia ou colúria?(Ficou pálido, amarelo, (1=sim, 2=não, 3=não sabe/não lembra)
lábio roxo, urina cor de Coca-Cola)
14. Teve malária nos últimos 15 dias? (1=sim, 2=não, 3=não sabe/não lembra)
15. Já recebeu transfusão de sangue? (1=sim, 2=não, 3=não sabe/não lembra)
16. A pessoa se sente doente hoje? (1=sim, 2=não, 3=não sabe/não lembra)

INCLUSÃO NO ESTUDO

17. Resultado da fenotipagem G6PD / teste rápido (1=normal, 2=deficiente, 3=Intermediário)
18. Assinatura _____ Data / /
19. Resultado PCR (1=Negativo 2=*P. vivax*, 3=*P. falciparum*, 4=Mista)
20. Resultado genotipagem g6pd Código

7.3 ASPÉCTOS ÉTICOS

7.3.1 Parecer Ético

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Inquérito de base populacional para estimativa de deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) na Amazônia Brasileira, e estudo de custo-efetividade do teste rápido para detecção de G6PD em pacientes com malária: preenchendo lacunas visando à eliminação da malária no Brasil.

Pesquisador: Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda

ÁREA TEMÁTICA:

Versão: 3

CAAE: 28307814.7.0000.0005

Instituição Proponente: Diretoria de Ensino e Pesquisa - DENPE

Patrocinador Principal: Secretaria de Vigilância em Saúde

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 625.574

Data da Relatoria: 25/04/2014

APRESENTAÇÃO DO PROJETO:

Na Amazônia brasileira, as infecções maláricas são causadas com maior frequência pelo *Plasmodium vivax*. Apesar de sua baixa mortalidade, os aspectos de gravidade relacionados a essa espécie de malária abordados neste estudo, consistem no possível risco de hemólise desenvolvido a partir da utilização do antimalárico primaquina, em indivíduos geneticamente deficientes da G6PD. Há também escassez de estudos sobre o tema da deficiência da G6PD e malária, principalmente pelo fato do foco de atenção em saúde pública mundial estar voltado às vastas regiões endêmicas da África, onde a maior parte das infecções são causadas pelo *P. falciparum*. Cerca de 400 milhões de pessoas da população mundial são afetadas pela deficiência da G6PD, com maior morbidade em indivíduos do sexo masculino, devido ao caráter recessivo da herança ligada ao sexo. Considerando-se também que a deficiência da G6PD, é determinada pela etnia, constitui elemento útil para o estudo da composição

genética das comunidades brasileiras, que foram incorporando ao longo de sua história, povos de várias origens e com diversos graus de miscigenação. No Brasil, mais de 99% dos casos de malária são notificados na Região Amazônica, sendo que mais de 85% dos casos da doença são causados por *Plasmodium vivax*. Esta espécie apresenta uma característica peculiar no seu ciclo biológico que é o desenvolvimento de formas latentes hepáticas denominadas hipnozoítos, responsáveis por recaídas meses ou anos após um episódio de malária vivax. Esta característica traz uma dificuldade adicional no controle e eliminação desta espécie parasitária, pois uma parcela de indivíduos torna-se portadores crônicos de *P. vivax*, contribuindo para a manutenção do ciclo de transmissão. Atualmente, a única droga disponível para a eliminação dos hipnozoítos é a primaquina. A tafenoquina é outra droga do mesmo grupo que está sendo avaliada em ensaios clínicos, inclusive já no Brasil (Manaus e Porto Velho). Um fator impeditivo do uso generalizado destas drogas é a G6PDd, uma deficiência genética relativamente comum que predispõe os indivíduos à hemólise. O presente estudo visa estimar a prevalência da G6PDd em áreas endêmicas para malária na Amazônia Brasileira através um estudo transversal, com amostragem por conglomerados realizada em 2 níveis (município e, posteriormente, por localidade), envolvendo municípios da Amazônia Legal com transmissão ativa de malária com indivíduos do sexo masculino. A proposta visa também determinar a frequência relativa das variantes deficientes; levantar os custos de testes rápidos para detectar deficiência de G6PD; construir um modelo de análise de decisão para o uso de testes rápidos destinados a detecção de deficiência G6PD - considerando os casos novos de malária vivax, em região endêmica, em comparação com ausência do teste, na rotina do programa de malária; determinar os custos da introdução do teste rápido para detecção de casos novos de deficiência de G6PD em áreas endêmicas para malária; determinar a razão de custo-efetividade adicional por caso de deficiência detectada comparando os diferentes testes disponíveis com a rotina atual do Programa Nacional de Controle de Malária.

Trata-se de protocolo referente ao Projeto de Pesquisa intitulado " Inquérito de base populacional para estimativa de deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) na Amazônia Brasileira, e estudo de custo-efetividade do teste rápido para detecção de G6PD em pacientes com malária: preenchendo lacunas visando à eliminação da malária no Brasil. No Amazonas, o pesquisador responsável é Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda, e compoendo a equipe de pesquisadores Welton

Marcelo Monteiro, Marly Marques de Melo, Vanderson Sampaio, Joabi Rocha do Nascimento e Marcelo Augusto Mota Brito, e como assistente Mônica Regina Farias Costa. O estudo é nacional e se enquadra no Grupo III, portanto, não se refere à Áreas Temáticas Especiais e nem devendo ser apreciado pela CONEP. É um estudo transversal, analítico e prospectivo, em indivíduos do sexo masculino, com amostragem por conglomerados realizada em 2 níveis (município e, posteriormente, por localidade), envolvendo municípios da Amazônia Legal, com transmissão ativa de malária, e os inquéritos serão realizados nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Roraima e Rondônia. Tendo como critério de inclusão: Pacientes de todas as idades, do sexo masculino, com malária vivax, diagnosticada pela gota espessa, e como critério de exclusão: Pacientes do sexo feminino, pacientes do sexo masculino com co-morbidades.

OBJETIVO DA PESQUISA:

Objetivo Primário:

Estimar a prevalência da G6PDd em áreas endêmicas para malária na Amazônia Brasileira.

Objetivo Secundário:

Determinar a frequência relativa das variantes deficientes; 2. Levantar os custos de testes rápidos para detectar deficiência de G6PD; 3. Construir um modelo de análise de decisão para o uso de testes rápidos destinados a detecção de deficiência G6PD - considerando os casos novos de malária vivax, em região endêmica, em comparação com ausência do teste, na rotina do programa de malária; 4. Determinar os custos da introdução do teste rápido para detecção de casos novos de deficiência de G6PD em áreas endêmicas para malária; 5. Determinar a razão de custo-efetividade adicional por caso de deficiência detectada comparando os diferentes testes disponíveis com a rotina atual do Programa Nacional de Controle de Malária.

AValiação DOS RISCOS E BENEFÍCIOS:

Riscos:

No momento da coleta o dedo poderá ficar dolorido ou com uma mancha avermelhada ou roxa que desaparecerá em curto espaço de tempo.

Benefícios:

Os benefícios deste estudo serão evidenciados a médio e longo prazo para toda a comunidade que vive nas áreas endêmicas para malária e para a comunidade científica. Os resultados do estudo pode preencher a lacuna científica sobre o tema, compreendendo a deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com malária pelo Plasmodium vivax, prevenindo assim crises hemolíticas decorrentes do uso de primaquina nestes indivíduos, sendo essas alterações como um dos possíveis desfechos a serem analisados, já que essa é uma das complicações mais frequente entre os pacientes com malária vivax da Amazônia Brasileira. Além disso os resultados podem favorecer no desenho de estudos com novas drogas, nas ações cooperativas com o Sistema Único de Saúde, já que o estudo permitirá melhorar a atenção à saúde de pacientes que residem em áreas endêmicas para malária na America Latina e no planejamento das estratégias de controle da malária vivax.

COMENTÁRIOS E CONSIDERAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

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

CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TERMOS DE APRESENTAÇÃO OBRIGATÓRIA:

O protocolo deste estudo traz a documentação seguinte: 1. folha de rosto; projeto de pesquisa da PB; 3. termo de consentimento livre e esclarecido; 4. termo de assentimento; 5. memorando no. 28/2014 - GM (Gerência de Malária) ao Chefe do CEP da FMT-HVD encaminhando o projeto e ressaltando a anuência para a execução do projeto; 6. Ofício no. 002077/MS/SE/FNS, Brasília - DF, de 21 de fevereiro de 2014, assinado pelo Diretor Executivo do Fundo Nacional de Saúde; 7. projeto básico; 8. cronograma de execução com início previsto para 02/06/2014 e término para 31/05/2015, e 9. orçamento estimado em R\$ 500.000,00.

RECOMENDAÇÕES:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

PENDÊNCIA 1. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi apresentado em linguagem de fácil entendimento, porém necessitando de readequações/inclusões, para atender o item II, II.5 e II.23, e ainda o item II, II.7, da Resolução no. 466/2012, CONEP.

1.a) o TCLE foi apresentado em forma de pedido e não como convite. Solicitamos readequação do TCLE para forma de convite.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: A readequação foi realizada, conforme solicitação do relator. Vide a frase "Por isso convidamos você para participar deste estudo." adicionada no final do segundo parágrafo.

ANÁLISE: observou-se a readequação da informação no TCLE. Diante disso, PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.b) no TCLE, página 1, parágrafo 3, menciona " Este estudo sobre a deficiência da enzima glicose 6 fosfato desidrogenase será realizado com pessoas dos estados da Amazônia (Amazonas, Acre, Rondônia, Roraima, Pará, Amapá) atendidas nos postos de saúde onde se realiza exame para malária e na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado em Manaus". E também, no parágrafo 4, foi mencionado "Se você tiver malária vivax e aceitar participar do estudo, precisaremos retirar do seu dedo mais um pouco de sangue para realizar um teste para verificar se você apresenta a deficiência da enzima. Entretanto, foi informado na metodologia do projeto que "A seleção dos indivíduos em cada município será realizada através de amostragem por conglomerados (setores censitários), através de visitas domiciliares, incluindo-se um indivíduo do sexo masculino por residência. Diante disso, solicita-se esclarecimento e/ou readequação das referidas informações no TCLE.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: De fato, não será utilizada a estrutura dos postos de microscopia para malária e nenhum outro serviço de saúde local para o recrutamento de sujeitos para a pesquisa. Serão recrutados todos os indivíduos que aceitarem participar e não apenas indivíduos com malária, conforme foi colocado equivocadamente na primeira versão dos termos. Todos os procedimentos serão realizados por meio de visitas domiciliares. Esta informação foi adicionada no terceiro parágrafo do TCLE e TALE:

"Este estudo sobre a deficiência da enzima glicose 6 fosfato desidrogenase será realizado com pessoas dos estados da Amazônia (Amazonas, Acre, Rondônia, Roraima, Pará, Amapá) por meio de visitas que serão feitas pela equipe da pesquisa diretamente nas casas. Ao passar pelas casas, a equipe convidará as pessoas

residentes para participar do estudo. Você não precisará sair da sua casa para nenhum procedimento do estudo. Você receberá o resultado do teste para a enzima glicose 6 fosfato desidrogenase já neste momento, bem como as orientações caso o resultado seja positivo.”

Conforme se observa no orçamento da pesquisa (Total de 500.000 reais), a grande maioria do recurso é destinada para o pagamento de diárias e passagens para o deslocamento de técnicos a serem selecionados e treinados na FMT-HVD pela equipe de farmacêuticos-bioquímicos da Gerência de Malária, incluindo todos os aspectos éticos, da realização do teste, de biossegurança e controle de qualidade.

ANÁLISE: observou-se readequação das informações e esclarecimentos conforme solicitado. Diante disso, PENDÊNCIA ATENDIDA na página 3, do TCLE está mencionado o seguinte "Se você tiver pergunta ou dúvida sobre esse estudo, procure um dos nossos pesquisadores ...". Solicita-se informar quais os nomes dos pesquisadores, locais, dias, horários e forma de contato, para que possam ser encontrados.

1.c) RESPOSTA DO PESQUISADOR: Foram informados os nomes de mais 3 pesquisadores, com locais, dias, horários e forma de contato.

ANÁLISE: o pesquisador atendeu a solicitação. Sendo assim, PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.d) no TCLE não foi mencionada indenização. Solicita-se a inclusão dessa informação.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: Foi mencionada a indenização no Segundo

parágrafo da página 2. ANÁLISE: verificou-se a inclusão da informação

conforme solitação. Portanto, PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 2. O termo de assentimento se apresenta como uma síntese do TCLE. Diante disso, solicita-se readequação para as faixas etárias envolvidas no estudo, em linguagem simples e com ilustrações de forma que fique mais esclarecedor o conteúdo desse documento aos participantes da pesquisa (adolescentes e

crianças), para atender o item II, II.2 e II.24, a Resolução no. 466/2012, CONEP.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: Foram inseridas figuras e a linguagem do TALE foi adequada.

ANÁLISE: observou-se que as readequações no Termo de Assentimento foram feitas conforme a solicitação. Diante disso, PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 3. No item metodologia proposta, no projeto gerado pela PB é mencionado que a pesquisa será no Amazonas e em outros Estados da Amazônia Legal. Sendo assim, solicita-se esclarecimento se haverá uma apresentação prévia por parte dos pesquisadores, informando os objetivos do projeto aos Gestores de Saúde dos municípios selecionados para a realização dos inquéritos, para que possam ter conhecimento da presença da Equipe e do momento da execução das atividades. RESPOSTA DO PESQUISADOR: Esclarecemos que haverá uma apresentação prévia por parte dos pesquisadores, informando os objetivos do projeto aos Gestores de Saúde dos municípios selecionados para a realização dos inquéritos, para que possam ter conhecimento da presença da Equipe e do momento da execução das atividades. Esta informação foi adicionada à seção Outras informações, justificativas ou considerações a critério do Pesquisador, na PB.

ANÁLISE: o pesquisador fez esclarecimento de acordo com a solicitação. Sendo assim, PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 4. No projeto não ficou claro se a leitura das lâminas (amostras) serão realizadas nos Estados envolvidos na pesquisa ou na FMT-HVD, e ainda se haverá transporte de amostras. Diante disso, solicita-se esclarecimento.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: Equivocadamente, foi colocado no TCLE que seriam feitas as gotas espessas para malária. Porém este exame não faz parte do protocolo. Essa inconsistência foi corrigida no protocolo. Quanto ao transporte de amostras, esclarecemos que um microtubo, no qual será coletado, também por punção digital, 2-3 gotas de sangue, com auxílio de uma lanceta estéril de alto fluxo, será encaminhado a Manaus para o teste de RFLP que permite saber a variante deficiente de G6PD. As amostras serão conservadas com preservante que previne

qualquer alteração da sua qualidade. Esta informação foi adicionada à seção Outras informações, justificativas ou considerações a critério do Pesquisador, na PB.

ANÁLISE: o pesquisador atendeu conforme solicitação. Portanto, PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 5. Na metodologia proposta consta a informação seguinte: "uma vez realizado o teste, a informação do resultado é registrada para consulta oportuna durante qualquer contato do paciente com o sistema de saúde e outro cenário que é compatível com a realidade atual onde o teste tem que ser repetido a cada vez que o paciente apresenta o risco de ser exposto aos efeitos tóxicos de drogas associados à deficiência de G6PD. Diante disso, solicita-se esclarecimento dos meios e procedimentos para as consultas e/ou acompanhamento dos participantes da pesquisa em caso de necessidade.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: Este trecho se refere ao estudo de custo-efetividade e não ao inquérito populacional. É uma informação utilizada no modelo matemático para estimar a custo-efetividade do teste rápido para G6PD, envolvendo dados da literatura e não intervenções em seres humanos. Para maiores detalhes Vide resposta à Pendência 7.

PENDÊNCIA 6. Esclarecer se haverá armazenamento e/ou descarte do material biológico, e se houver o armazenamento, fazer adequações necessárias referentes a resolução 441/2011 e/ou como será realizado o descarte desse material.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: Conforme TCLE e Metodologia, não haverá armazenamento de amostras para estudos futuros. O material será descartado seguindo as normas de biossegurança, na FMT-HVD. A informação foi adicionada ao TCLE e Metodologia na PB.

ANÁLISE: foi verificada que a informação foi mencionada no TCLE e no Termo de Assentimento. Diante disso, considera-se PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 7. Esclarecer como serão mensuradas o custo-efetividade do teste rápido para a detecção de G6PD em pacientes com malária.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: Este procedimento já havia sido descrito no projeto submetido na PB, de forma resumida. Ressaltamos que este procedimento

não envolve nenhuma intervenção adicional com seres humanos, mas apenas dados secundários de custos do teste e do service, bom como a prevalência obtida no inquérito. Segue, porém, a metodologia mais detalhada:

- a) Modelo analítico: a partir de coorte hipotética, árvores de decisão serão construídas e as probabilidades dos eventos serão consideradas para uma dada coorte populacional, em uma perspectiva temporal linear. A árvore de decisão será desenvolvida a partir de paciente ambulatorial diagnosticado com malária vivax em unidades de saúde ou em laboratórios de diagnóstico parasitológico do SUS. Os parâmetros epidemiológicos considerarão as áreas endêmicas selecionadas na Amazônia Legal, que notificaram casos nos anos selecionados para o estudo.
- b) Estratégias avaliadas: Serão avaliados testes rápidos (TR) para detectar a deficiência de G6PD - BinaxNOW® G6PD e CareStart™ G6PD - em comparação com a sua não detecção, em pacientes portadores de P. vivax.
- c) Perspectiva da análise: os custos considerados e mensurados na análise serão aqueles assumidos pelo sistema público de saúde brasileiro; a análise será realizada sob essa perspectiva, uma vez que o SUS é o provedor e financiador do diagnóstico e tratamento dos casos de malária nos serviços de saúde.

ANÁLISE: o pesquisador atendeu a solicitação com esclarecimento detalhado sobre o que foi mencionado na referida pendência. Diante disso, PENDÊNCIA ATENDIDA.

Diante do exposto, o voto dessa relatoria é pela APROVAÇÃO deste protocolo.

S.M.J. É o parecer.

SITUAÇÃO DO PARECER:

Aprovado

NECESSITA APRECIÇÃO DA CONEP:

Não

CONSIDERAÇÕES FINAIS A CRITÉRIO DO CEP:

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a

Resolução CNS nº 466/2012, utilizando os modelos disponíveis em nossa homepage, na aba “Modelos de Documentos”. Se houver qualquer tipo de dúvida o pesquisador deve entrar em contato com o CEP/FMT-HVD, que lhe oferecerá as orientações necessárias.

MANAUS, 25 de Abril de 2014

**ASSINADO POR:
MARIA PAULA GOMES MOURÃO
(COORDENADOR)**

7.3.2 – Parecer ético - Emenda

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: Inquérito sobre a prevalência da deficiência de G6PD no Amazonas: resolvendo uma lacuna para a segurança da cura radical da malária pelo Plasmodium vivax usando PRIMAQUINA

Pesquisador: Wuelton Marcelo Monteiro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 93843318.8.0000.0005

Instituição Proponente: Diretoria de Ensino e Pesquisa - DENPE

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.889.719

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa", "Avaliação dos Riscos e Benefícios" e "Comentários e Considerações sobre a Pesquisa" foram copiadas do arquivo PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1175643.pdf

7.3.3 Termo de Consentimento Livre E Esclarecido -TCLE

1



Inquérito de base populacional para estimativa de deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) na Amazônia Brasileira, e estudo de custo-efetividade do teste rápido para detecção de G6PD em pacientes com malária: preenchendo lacunas visando à eliminação da malária no Brasil

TERMO DE CONSENTIMENTO

A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) está fazendo um estudo com o objetivo de estimar a prevalência de G6PDd (Glicose 6 fosfato desidrogenase) em áreas endêmicas para malária na Amazônia Brasileira. Quem tem essa deficiência não pode tomar diversos medicamentos, pois se tomarem poderão desenvolver anemia. Para isso, é preciso que seja feita a retirada de amostra de sangue do paciente para realizar os exames que dizem se o paciente possui a deficiência desta enzima, ou seja, será estudado se esta enzima que está no sangue da pessoa funciona ou não funciona bem.

O indivíduo que apresenta essa deficiência não pode tomar alguns medicamentos, entre eles alguns que são usados para tratar malária, porque pode ter uma anemia muito forte e às vezes até ficar internada no hospital por causa disso. Os pesquisadores querem saber também os custos de testes rápidos para detectar a deficiência de G6PD. Para nos ajudar a entender esse problema, precisamos realizar estes exames em 14.838 homens, de qualquer idade. Por isso convidamos você para participar deste estudo.

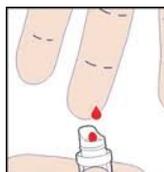
Este estudo sobre a deficiência da enzima glicose 6 fosfato desidrogenase será realizado com pessoas dos estados da Amazônia (Amazonas, Acre, Rondônia, Roraima, Pará, Amapá) por meio de visitas que serão feitas pela equipe da pesquisa diretamente nas escolas municipais e/ou estaduais. Ao passar pelas escolas, a equipe convidará os estudantes para participar do estudo. Você não precisará sair da sua escola para nenhum procedimento do estudo. Você receberá posteriormente o resultado do teste para a enzima G6PD, bem como as orientações caso o resultado seja positivo.

Você não vai precisar fazer nada de especial para participar. Se você aceitar participar do estudo, precisaremos retirar do seu dedo umas duas gotas de sangue para realizar um teste para verificar se você apresenta a deficiência da enzima e mais duas gotas para um teste para saber o tipo da deficiência, a ser realizado em Manaus, que é uma informação para a pesquisa, porém que não afetará o primeiro resultado.

COLETA DE SANGUE



Aplicação de Termo de Consentimento



Coleta de Sangue



Contribuição para o estudo

Todo o procedimento de coleta será feito por uma pessoa da nossa equipe treinada para isso. O material é descartável e procedimento de coleta será realizado com total higiene. A coleta de sangue será do dedo (punção digital), podendo ocorrer um desconforto e dor no momento da picada da lanceta. A quantidade de sangue a ser coletada é pequena e não representa risco para a saúde, mesmo em crianças. O risco de infecção no local é pequeno, pois os procedimentos serão feitos com higiene.

A participação neste estudo não levará a riscos futuros para a saúde. Mesmo assim, se ocorrer qualquer dano ou prejuízo à sua saúde por causa desse estudo, você terá direito à indenização.

A partir do seu sangue coletado será possível realizar um teste para verificar se você apresenta a deficiência de G6PD e através disso será possível alcançar o objetivo do estudo, que é estimar a prevalência dessa deficiência na Amazônia Brasileira. Assim que o sangue for coletado, ele será guardado com um código, sem colocar seu nome. Seu nome nunca será usado em público, somente os pesquisadores envolvidos no estudo terão acesso aos seus dados e aos resultados dos exames, lembrando que sempre será utilizado um código ao invés do seu nome.

Rubrica do voluntário

Rubrica do pesquisador

O restante do sangue que não for utilizado no estudo será jogado fora da maneira correta para não poluir o meio ambiente nem contaminar as pessoas.

O principal benefício em participar desse estudo é o recebimento de mais informações sobre a malária e sobre a deficiência de G6PD, o que irá melhorar o tratamento da malária evitando complicações, além de buscar novas formas para o controle dessa doença. Entretanto, você não receberá nenhum incentivo financeiro. Se tiver algum prejuízo em participar desta pesquisa, converse com um de nossos pesquisadores para que ele possa lhe ajudar. Se você não quiser participar do estudo ou quiser se retirar em qualquer momento, você poderá fazer isso sem qualquer prejuízo. Você não terá nenhum custo e não receberá qualquer vantagem financeira ao participar deste estudo.

Se você tiver alguma pergunta ou dúvida sobre esse estudo, procure um de nossos pesquisadores para que eles possam tirar sua dúvida, na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (de segunda a sexta feira, das 8 às 12 horas e das 14 às 18 horas), na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro ou nos seguintes telefones:

Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda	(92) 9114-7633 (qualquer dia e horário)
Dra. Monica Costa	(92) 8128-7050 (qualquer dia e horário)
Dr. Wuelton Monteiro	(92) 9165-2486 (qualquer dia e horário)
Dra. Marly Melo	(92) 9243-3857 (qualquer dia e horário)

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado também poderá tirar dúvidas ou receber qualquer reclamação a respeito desta pesquisa, em Manaus (de segunda a sexta feira, das 9 às 14 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro) ou pelo telefone (92) 2127 3572 (de segunda a sexta feira, das 9 às 14 horas). Este TCLE foi elaborado em duas vias iguais, sendo que uma via assinada ficará guardada com o pesquisador responsável e a outra com você.

Eu _____, entendi tudo sobre o estudo **“Inquérito de base populacional para estimativa de deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) na Amazônia Brasileira, e estudo de custo-efetividade do teste rápido para detecção de G6PD em pacientes com malária: preenchendo lacunas visando à eliminação da malária no Brasil”** e aceito participar do estudo.

Consentimento do responsável pelo menor: _____

Polegar direito

Nome do menor: _____

Data: / /

Endereço: _____

Telefone: ()-.....

Assinatura do pesquisador que conversou com o voluntário _____

Data: / /

Rubrica do voluntário

Rubrica do pesquisador

7.3.4 Termo de Assentimento Livre E Esclarecido -TALE



Inquérito de base populacional para estimativa de deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) na Amazônia Brasileira, e estudo de custo-efetividade do teste rápido para detecção de G6PD em pacientes com malária: preenchendo lacunas visando à eliminação da malária no Brasil

1

TERMO DE ASSENTIMENTO

A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) está fazendo um estudo com o objetivo de estimar a prevalência de G6PD em áreas endêmicas para malária na Amazônia Brasileira. Quem tem essa deficiência não pode tomar diversos medicamentos, pois se tomar pode desenvolver anemia. Para isso, é preciso que seja feita a retirada de amostra de sangue de uma pessoa para realizar os exames que dizem se ela possui a deficiência desta enzima, ou seja, será estudado se esta enzima que está no sangue da pessoa funciona ou não funciona bem.

O indivíduo que apresenta essa deficiência não pode tomar alguns medicamentos, entre eles alguns que são usados para tratar malária, porque pode ter uma anemia muito forte e icterícia (ficar amarela) e às vezes até ficar internada no hospital por causa disso. Os pesquisadores querem saber também os custos de testes rápidos para detectar a deficiência de G6PD. Para nos ajudar a entender esse problema, precisamos realizar estes exames em 14.838 homens, de qualquer idade. Por isso convidamos você para participar deste estudo.

Este estudo sobre a deficiência da G6PD será realizado com pessoas dos estados da Amazônia (Amazonas, Acre, Rondônia, Roraima, Pará, Amapá) por meio de visitas que serão feitas pela equipe da pesquisa diretamente nas escolas municipais e/ou estaduais. Ao passar pelas escolas, a equipe convidará os estudantes para participar do estudo. Você não precisará sair da sua escola para nenhum procedimento do estudo. Você receberá posteriormente o resultado do teste para a enzima G6PD, bem como as orientações caso o resultado seja positivo. **REGIÃO NORTE DO BRASIL, MOSTRADA EM VERMELHO, ONDE SERÁ FEITO O ESTUDO.**

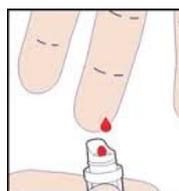


Você não vai precisar fazer nada de especial para participar. Se você aceitar participar do estudo, precisaremos retirar do seu dedo umas duas gotas de sangue para realizar um teste para verificar se você apresenta a deficiência da enzima e mais duas gotas para um teste para saber o tipo da deficiência, a ser realizado em Manaus, que é uma informação para a pesquisa, porém que não afetará o primeiro resultado.

COLETA DE SANGUE



Aplicação de Termo de Consentimento



Coleta de Sangue



Contribuição para o estudo

Todo o procedimento de coleta será feito por uma pessoa da nossa equipe treinada para isso. O material é descartável e procedimento de coleta será realizado com total higiene. A coleta de sangue será do dedo (punção digital), podendo ocorrer um desconforto e dor no momento da picada da lanceta. A quantidade de sangue a ser coletada é pequena e não representa risco para a saúde, mesmo em crianças. O risco de infecção no local é pequeno, pois os procedimentos serão feitos com higiene.

A participação neste estudo não levará a riscos futuros para a saúde. Mesmo assim, se ocorrer qualquer dano ou prejuízo à sua saúde por causa desse estudo, você terá direito à indenização.

A partir do seu sangue coletado será possível realizar um teste para verificar se você apresenta a deficiência de G6PD e através disso será possível alcançar o objetivo do estudo, que é estimar a porcentagem dessa deficiência na Amazônia Brasileira. Assim que o sangue for coletado, ele será guardado com um código, sem colocar seu nome. Seu nome nunca será usado em público, somente os pesquisadores envolvidos no estudo terão acesso aos seus dados e aos resultados dos exames, lembrando que sempre será utilizado um código ao invés do seu nome.

Rubrica do voluntário

Rubrica do pesquisador

O restante do sangue que não for utilizado no estudo será jogado fora da maneira correta para não poluir o meio ambiente nem contaminar as pessoas.

O principal benefício em participar desse estudo é o recebimento de mais informações sobre a malária e sobre a deficiência de G6PD, o que irá melhorar o tratamento da malária evitando complicações, além de buscar novas formas para o controle dessa doença. Entretanto, você não receberá nenhum incentivo financeiro. Se tiver algum prejuízo em participar desta pesquisa, converse com um de nossos pesquisadores para que ele possa lhe ajudar. Se você não quiser participar do estudo ou quiser se retirar em qualquer momento, você poderá fazer isso sem qualquer prejuízo. Você não terá nenhum custo e não receberá qualquer vantagem financeira ao participar deste estudo.

Se você tiver alguma pergunta ou dúvida sobre esse estudo, procure um de nossos pesquisadores para que eles possam tirar sua dúvida, na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (de segunda a sexta feira, das 8 às 12 horas e das 14 às 18 horas), na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro; ou nos seguintes telefones:

Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda	(92) 9114-7633 (qualquer dia e horário)
Dra. Monica Costa	(92) 8128-7050 (qualquer dia e horário)
Dr. Wuelton Monteiro	(92) 9165-2486 (qualquer dia e horário)
Dra. Marly Melo	(92) 9243-3857 (qualquer dia e horário)

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado também poderá tirar dúvidas ou receber qualquer reclamação a respeito desta pesquisa, em Manaus (de segunda a sexta feira, das 9 às 14 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro) ou pelo telefone (92) 2127 3572 (de segunda a sexta feira, das 9 às 14 horas). Este TALE foi elaborado em duas vias iguais, sendo que uma via assinada ficará guardada com o pesquisador responsável e a outra com você.

Eu _____, entendi tudo sobre o estudo **“Inquérito de base populacional para estimativa de deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) na Amazônia Brasileira, e estudo de custo-efetividade do teste rápido para detecção de G6PD em pacientes com malária: preenchendo lacunas visando à eliminação da malária no Brasil”** e aceito participar do estudo.

Nome do menor: _____

Polegar direito

Assinatura do menor: _____

Consentimento do responsável pelo menor: _____



Data: / /

Endereço: _____

Telefone: ()-.....

Assinatura do pesquisador que conversou com o voluntário _____

Data: / /

Rubrica do voluntário

Rubrica do pesquisador