

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À
HEMATOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA

**RESPOSTA TERAPÊUTICA DA PRIMAQUINA EM MALÁRIA VIVAX:
INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS DE G6PD, CYP2C19, CYP2D6 E
CYP3A4**

MARIELLE MACHADO MACÊDO

MANAUS – AMAZONAS

2022

MARIELLE MACHADO MACÊDO

**RESPOSTA TERAPÊUTICA DA PRIMAQUINA EM MALÁRIA VIVAX:
INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS DE G6PD, CYP2C19, CYP2D6 E
CYP3A4**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia.

Orientadora: Prof^a Dra. Gisely Cardoso De Melo

Coorientadora: Prof^a Dra. Anne Cristine Gomes de Almeida

MANAUS - AMAZONAS

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

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

M334rr Macêdo, Marielle Machado
RESPOSTA TERAPÊUTICA DA PRIMAQUINA EM
MALÁRIA VIVAX: INFLUÊNCIA DE VARIANTES
GENÉTICAS DE G6PD, CYP2C19, CYP2D6 E CYP3A4 /
Marielle Machado Macêdo. Manaus : [s.n], 2022.
129 f.: il., color.; 30 cm.

Dissertação - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA -
Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2022.

Inclui bibliografia

Orientador: Gisely Cardoso De Melo

Coorientador: Anne Cristine Gomes de Almeida

1. Plasmodium vivax. 2. malária. 3. hemólise por
primaquina. 4. deficiência G6PD. 5. citocromo P450.

I. Gisely Cardoso De Melo (Orient.). II. Anne Cristine
Gomes de Almeida (Coorient.). III. Universidade do
Estado do Amazonas. IV. RESPOSTA TERAPÊUTICA
DA PRIMAQUINA EM MALÁRIA VIVAX:

INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS DE G6PD,
CYP2C19, CYP2D6 E CYP3A4

FOLHA DE JULGAMENTO



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À HEMATOLOGIA – UEA/HEMOAM



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 03/2022

Aos vinte e nove dias do mês de setembro do ano de 2022, às 15h00min, realizou-se remotamente, via plataforma Google Meet, a Defesa de Dissertação de Mestrado do discente **Marielle Machado Macêdo**, sob o título “Resposta terapêutica de primaquina em malária vivax: influência de variantes genéticas de G6PD, CYP2C19, CYP2D6 E CYP3A4.”, tendo como orientadora a Profa. Dra. **Gisely Cardoso de Melo** e coorientadora a Profa. Dra. **Anne Cristine Gomes Almeida**, segundo encaminhamento da Profa. Dra. **Andréa Monteiro Tarragô**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído ao discente o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Prof. Dr. George Allan Villarouxo da Silva – Presidente (FHMOAM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> (X) Reprovado(a) <input type="checkbox"/> ()	Assinatura: <i>George L. V. da Silva</i> CPF: 890.870.462-00
Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Soares – Membro Externo (UFTM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> (X) Reprovado(a) <input type="checkbox"/> ()	Assinatura: <i>Fernanda R. Soares</i> CPF: 072.919.436-12
Profa. Dra. Larissa Wanderley Brasil – Membro Externo (FMT-HVD)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> (X) Reprovado(a) <input type="checkbox"/> ()	Assinatura: <i>Larissa Brasil</i> CPF: 838.976.402-44

O parecer final da Defesa de Dissertação foi:

(X) Aprovado

() Não Aprovado

George L. V. da Silva

Presidente da Banca Examinadora

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação:

A Deus, por ser meu maior amparo e proteção divina durante este processo,

À minha mãe, Mariete Machado Macêdo por ser meu exemplo de força e persistência, e por seu amor incondicional,

Ao meu pai, Claudio Messias Muniz Macêdo, por ser meu porto seguro e exemplo de humildade,

Aos meus irmãos, Heverton, Messias e Antero, por sempre acreditarem e torcerem por mim,

Aos meus sobrinhos Zac, Sophia e Mirella, por serem meus bens mais preciosos,

A Profa. Dra. Gisely Cardoso de Melo e Profa. Dra. Anne Cristine Gomes de Almeida por serem pessoas inspiradoras no crescimento profissional de seus alunos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar possível este momento e ser o centro da minha vida. Por mais turbulento e difícil que seja, Ele é quem me dá forças e me impulsiona a seguir. Nunca me abandonará!

À Nossa Senhora e São José por intercederem por mim.

Aos meus pais, Mariete Machado Macêdo e Claudio Messias Muniz Macêdo, que sempre foram meus pilares mais firmes. Agradeço todo amor, educação, apoio e confiança depositada em mim.

Aos meus irmãos, Heverton, Messias e Antero, por cada troca de cuidado e amor, por acreditarem que eu seria capaz de realizar meus sonhos e vibrarem comigo a cada conquista.

Aos meus sobrinhos, Zac, Sophia e Mirella, por tantas vezes serem o motivo da minha alegria.

À minha cunhada, Gabriely Macêdo, por sua amizade e pelos diversos momentos de diálogo com conselhos valiosos.

À toda minha família, que apesar da distância, acompanharam minha jornada até aqui e sempre torceram por mim.

Ao meu noivo, Lucas Gabriel, por me impulsionar nesta caminhada e ser meu companheiro em todos os momentos. Sou grata por sua admirável paciência e compreensão. Amo você!

À minha amiga, Kamyly Sumaya, por estar sempre comigo, independente da distância e do tempo. Cada partilha, ligação e demonstração de cuidado fez toda diferença. Amo você!

À minha unidade Gen, por serem como irmãs para mim, por cada ato de amor, cada momento tão único e especial. Sem dúvidas, construímos uma unidade forte e com Jesus em meio!

Aos meus colegas do mestrado, especialmente a Ana Carolina, Augusto, Dania e Gláucia, por serem os melhores colegas de turma que eu poderia ter. Tenho muito orgulho de cada um. Vocês foram essenciais neste processo, obrigada!

À minha orientadora, Dra. Gisely Cardoso de Melo, por ter me acolhido em sua equipe de pesquisa, por ter confiado a mim a realização deste estudo e fazer-se sempre presente buscando melhorias.

À minha coorientadora, Dra. Anne Cristine Gomes de Almeida, por todos os ensinamentos que muito contribuíram para o andamento e conclusão deste mestrado.

A todos do grupo de pesquisa, especialmente à Gabrielly, Líbya, Amanda, Victor, Laila e Emanuelle, pelo apoio técnico, assistência e ensinamentos com experimentos laboratoriais ou coleta e análise de dados.

Ao sr. Arivan, pela gentileza e disposição em ajudar-me durante as longas idas e vindas no período de recrutamento de participantes para esta pesquisa.

À Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) e à Universidade do Estado do Amazonas (UEA) por contribuírem com minha vida acadêmica e profissional.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia (PPGH) pela oportunidade de integrar-me a este programa, que preza sempre por melhorias para seus discentes e docentes, contribuindo para um ensino de qualidade.

À Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB) por acolher-me e conceder-me a infraestrutura necessária para realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) por conceder-me bolsa de estudo, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

DECLARAÇÃO DE AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) que colaboraram financeiramente com a realização deste estudo.

RESUMO

Na Amazônia, a infecção por *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) é mais prevalente, e seu tratamento inclui a primaquina (PQ), uma droga hipnozoiticida. No entanto, seu uso é limitado pelo risco de anemia hemolítica aguda (AHA) em indivíduos deficientes da glicose-6-fosfato desidrogenase (dG6PD), com frequência de 4,5% a 10% na região Amazônica. A interação com enzimas hepáticas do citocromo P450 (CYP), de alguns farmacogenes como *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4* associados ao metabolismo da PQ podem intensificar ou reduzir significativamente sua biotransformação. Este estudo visa avaliar a influência das variantes de *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4* na hemólise em deficientes e não deficientes de G6PD, tratados com primaquina para *P. vivax*. Foram incluídos 18 pacientes de ambos os sexos, > 6 meses de idade tratados com PQ, com diagnóstico de malária vivax e hemólise. Foi realizada fenotipagem para G6PD através do SD Biosensor e genotipagem para G6PD e CYPs utilizando a técnica de real-time PCR. Destes, 55,6% apresentaram a variante Africana A- (G202A/A376G), 11,1% a Africana A+ (A376G), 5,6% a Mediterrânea (C563T) e 27,8% eram tipo selvagem. A genotipagem de *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4* não mostrou significância estatística na frequência de alelos estrela entre os grupos ($p > 0,05$). Níveis elevados de marcadores hepáticos e renais foram observados em metabolizadores normais (gNM), rápidos (gRM) e ultrarrápidos (gUM) de *CYP2C19* e *CYP2D6* em dG6PD ($p < 0,05$). O genótipo *1/*1B de *CYP3A4* teve maior impacto clínico em ambos os grupos, apesar de não significativo ($p > 0,05$). Esses achados reforçam a importância de estudos sobre o mapeamento da deficiência de G6PD e variantes genéticas de *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4*, que permitirão validar prevalência e determinar a influência das CYPs no processo hemolítico de indivíduos com malária vivax, e contribuirão com um esquema terapêutico mais adequado, evitando complicações ocasionadas pela metabolização da PQ em CYP.

Palavras- chave: *Plasmodium vivax*, malária, hemólise por primaquina, deficiência G6PD, citocromo P450.

ABSTRACT

In the Amazon, *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) infection is more prevalent, and its treatment includes primaquine (PQ), a hypnozoiticide drug. However, its use is limited by the risk of acute hemolytic anemia (AHA) in glucose-6-phosphate dehydrogenase (dG6PD) deficient individuals, with a frequency of 4.5% to 10% in the Amazon region. Interaction with cytochrome P450 (CYP) liver enzymes, some pharmacogenes such as CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 associated with PQ metabolism can significantly enhance or reduce its biotransformation. This study aims to evaluate the influence of CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 variants on hemolysis in G6PD-deficient and non-G6PD-deficient individuals treated with primaquine for *P. vivax*. We included 18 patients of both sexes, > 6 months of age treated with PQ, diagnosed with vivax malaria and hemolysis. Phenotyping for G6PD was performed using the SD Biosensor and genotyping for G6PD and CYPs using the real-time PCR technique. Of these, 55.6% had the African A- variant (G202A/A376G), 11.1% the African A+ (A376G), 5.6% the Mediterranean (C563T) and 27.8% were wild type. Genotyping of CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 did not show statistical significance in the frequency of star alleles between groups ($p > 0.05$). Elevated levels of hepatic and renal markers were observed in normal (gNM), rapid (gRM) and ultra-rapid (gUM) metabolizers of CYP2C19 and CYP2D6 in dG6PD ($p < 0.05$). CYP3A4 *1/*1B genotype had greater clinical impact in both groups, although not significant ($p > 0.05$). These findings reinforce the importance of studies on the mapping of G6PD deficiency and genetic variants of CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4, which will allow validating the prevalence and determining the influence of CYPs on the hemolytic process of individuals with vivax malaria, and will contribute to a more adequate, avoiding complications caused by the metabolism of PQ in CYP.

Keywords: *Plasmodium vivax*, malaria, primaquine hemolysis, G6PD deficiency, cytochrome P450.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de risco de malária por município de infecção. Brasil, 2019 (18).....	20
Figura 2: Ciclo biológico do <i>Plasmodium vivax</i> . Adaptado de Muller, 2009 (20).....	21
Figura 3: Mapa de municípios prioritários para malária no Brasil em 2019 e janeiro a junho de 2020 (18).....	23
Figura 4: Via metabólica simplificada da glicose-6-fosfato desidrogenase. Brasil, 2018 (31)	25
Figura 5: Distribuição global da deficiência de G6PD. Adaptado de Luzzato, 2016 (33).....	27
Figura 6: Genótipos e fenótipos da G6PDd. Adaptado de World Health Organization, 2018 (42)	28
CAPÍTULO I: Resposta terapêutica da primaquina em malária <i>vivax</i> : influência de variantes genéticas de G6PD, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4	
Figura 1: Fluxograma das etapas realizadas para inclusão de participantes.	51
Figura 2: Frequência de variantes de G6PD.....	54
Figura 3: Frequência de CYP2C19, CYP3A4 e CYP2D6 em deficientes e não deficientes de G6PD.	60

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: Resposta terapêutica da primaquina em malária *vivax*: influência de variantes genéticas de G6PD, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4

Tabela I: Perfil sociodemográfico, clínico e laboratorial em deficientes e não deficientes de G6PD tratados com PQ para *P. vivax* 54

Tabela II: Frequência alélica de CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 e G6PD, e fenótipo predito de CYP2C19 e CYP2D6 **Erro! Indicador não definido.**

Tabela III: Genotipagem de CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 e G6PD em casos e controles **Erro! Indicador não definido.**

Tabela IV: Aspecto hemolítico em deficientes de G6PD com fenótipos e genótipos de CYP.... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela V: Aspecto hemolítico em não deficientes de G6PD com fenótipos e genótipos de CYP 64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação de fenótipos preditos de <i>CYP2C19</i>	31
Quadro 2: Classificação de fenótipos preditos de <i>CYP2D6</i>	34
Quadro 3: Valores recomendados para dosagem de G6PD em homens.....	38
Quadro 4: Valores recomendados para dosagem de G6PD em mulheres.....	38
Quadro 5: Variantes selecionadas no gene G6PD	39
Quadro 6: Variantes selecionadas no gene <i>CYP2C19</i>	40
Quadro 7: Variantes selecionadas no gene <i>CYP2D6</i>	41
Quadro 8: Variantes selecionadas no gene <i>CYP3A4</i>	42

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

% - Porcentagem

< - Menor que

> - Maior que

\leq - Menor ou igual

\geq - Maior ou igual

6PG – 6-fosfogluconato

AS – Escore de atividade (activity score)

CNV – Variação no número de cópias

CQ – Cloroquina

CYP2C19 – Membro 19 da subfamília C, da família 2 do citocromo P450

CYP2D6 – Membro 6 da subfamília D, da família 2 do citocromo P450

CYP3A4 – Membro 4 da subfamília A, da família 3 do citocromo P450

CYP450 – Citocromo P450

CYPs – Enzimas do citocromo P450

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FDA – Food and Drug Administration

FMO-3 – Monooxigenase-3 contendo flavina

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

G6P – Glicose-6-fosfato

G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase

dG6PD – Deficiente de glicose-6-fosfato desidrogenase

gHb – Gramas de Hemoglobina

gIM – Metabolizador intermediário

gNM – Metabolizador normal

gPM – Metabolizador lento

gRM – Metabolizador rápido

GSH – Glutathiona reduzida

GSSG – Glutathiona oxidada

gUM – Metabolizador ultrarrápido

HGNC – Gene Nomenclature Committee

IM – Metabolizador intermediário

InDels – Inserção-Deleção

IPA – Incidência Parasitária Anual

kg – Quilograma

MAO – Enzima monoamina oxidase

mg – Miligramas

mL – Mililitros

MS – Ministério da Saúde

NADP – Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato

NADPH – Nicotinamida -adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzido

NM – Metabolizador extensivo

°C – Graus Celsius

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação da cadeia da polimerase

PM – Metabolizador lento

PQ – Primaquina

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único (Single nucleotide polymorphism)

SNV – Variação de nucleotídeo único

spp. – Espécies

SUS – Sistema Único de Saúde

UI – Unidades Internacionais

UM – Metabolizador ultrarrápido

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
REFERENCIAL TEÓRICO	19
1. MALÁRIA	19
1.1. MALÁRIA VIVAX	22
1.2. ANTIMALÁRICOS	23
1.2.1. PRIMAQUINA E G6PD	24
1.3. CITOCROMO P450	29
1.3.1. CYP2C19	30
1.3.2. CYP2D6	32
1.3.3. CYP3A4	34
2. OBJETIVOS	36
2.1. GERAL	36
2.2. ESPECÍFICOS	36
3. MÉTODOS	37
3.1. ASPECTOS ÉTICOS	37
3.2. TIPO DE ESTUDO	37
3.3. LOCAL DE ESTUDO	37
3.4. PARTICIPANTES DO ESTUDO	37
3.4.2. CRITÉRIO DE NÃO INCLUSÃO E EXCLUSÃO	38
3.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE G6PD	38
3.6. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	39
3.7. GENOTIPAGEM DE G6PD	39
3.8. GENOTIPAGEM DE CYPs	40
3.8.1. IDENTIFICAÇÃO DE CNVs	42
3.8.2. DETERMINAÇÃO DE ALELOS E DIPLÓTIPOS	42
3.8.3. DETERMINAÇÃO DOS FENÓTIPOS PREDITOS	43
3.9. ANÁLISE DE DADOS	43
3.10. EQUIPE DO PROJETO	44
3.11. FINANCIAMENTO	44
4. RESULTADOS	45

Capítulo I: **Resposta terapêutica da primaquina em malária vivax em deficientes e não deficientes de G6PD: influência de variantes genéticas de CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4.**

45

Tabela I: Perfil sociodemográfico, clínico e laboratorial em deficientes e não deficientes de G6PD tratados com PQ para <i>P. vivax</i>	51
Tabela II: Frequência alélica de <i>CYP2C19</i> , <i>CYP2D6</i> , <i>CYP3A4</i> e G6PD, e fenótipo predito de <i>CYP2C19</i> e <i>CYP2D6</i>	55
Tabela III: Genotipagem de <i>CYP2C19</i> , <i>CYP2D6</i> , <i>CYP3A4</i> e G6PD em deficientes e não deficientes	57
Tabela IV: Frequência alélica de <i>CYP2C19</i> , <i>CYP2D6</i> , <i>CYP3A4</i> e G6PD, e fenótipo predito de <i>CYP2C19</i> e <i>CYP2D6</i>	Erro! Indicador não definido.
Tabela V: Genotipagem de <i>CYP2C19</i> , <i>CYP2D6</i> , <i>CYP3A4</i> e <i>G6PD</i> em deficientes e não deficientes	Erro! Indicador não definido.
Tabela VI: Aspecto hemolítico em deficientes de G6PD com fenótipos e genótipos de CYP	63
Tabela VII: Aspecto hemolítico em não deficientes de G6PD com fenótipos e genótipos de CYP	64
5. CONCLUSÃO	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
7. ANEXOS E APÊNDICES	82
7.1. PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	82
7.2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	82
7.3. TERMO DE ASSENTIMENTO PARA O MENOR DE IDADE (TALE).....	82
7.4. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP EXTRAÇÃO DE DNA	82
7.5. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP GENOTIPAGEM DE G6PD.....	82
7.6. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP GENOTIPAGEM DE SNPS	82
7.1. PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	83
7.4. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP EXTRAÇÃO DE DNA	99
7.5. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP – GENOTIPAGEM DE G6PD.....	105

INTRODUÇÃO

A malária ainda é um importante problema de saúde pública que necessita de maior efetividade do seu controle (1). Seis espécies de protozoários do gênero *Plasmodium* são causadores de malária em humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium simium* (2,3). Na Amazônia, a infecção malárica mais prevalente é pelo *P. vivax*, que é responsável por produzir formas hipnozoítas nos hepatócitos do hospedeiro humano, levando a recaídas (1,3).

Para tratar as recaídas de malária, a primaquina (PQ) pode ser a droga ideal escolhida. Entretanto, esse medicamento apresenta restrição em pessoas que possuem a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), uma enzima relacionada com a proteção contra o estresse oxidativo dos eritrócitos (1,4). A deficiência de G6PD é uma herança recessiva ligada ao cromossomo X, e é mais frequente em pessoas com descendência mediterrânea, asiática e africana, devendo ser levada em consideração especialmente em áreas endêmicas de malária (5,6).

Indivíduos deficientes de G6PD têm uma capacidade reduzida para atenuar os danos celulares induzidos pela hemólise gerada pela PQ, além disso, as enzimas hepáticas do citocromo P450 (CYP) podem contribuir para toxicidade hemolítica em pessoas com deficiência de G6PD (7,8). A PQ é metabolizada pelas CYPs, essencialmente a CYP2D6, que é responsável pelo metabolismo de 20 a 25% das drogas de uso clínico (5). Dependendo da distribuição dos alelos no gene *CYP2D6*, os fenótipos podem ser classificados como metabolizadores lentos, intermediários, normais e ultrarrápidos (8,9).

O complexo de enzimas CYP450 compreende mais de 50 enzimas, sendo as famílias CYP1, CYP2 e CYP3 responsáveis pelo metabolismo de 70% a 80% dos medicamentos (10,11). O desfecho terapêutico de muitos fármacos depende das interações com as CYPs, podendo existir variações genéticas com perda de função da enzima, influenciando por exemplo, na redução da taxa de depuração e aumento da concentração plasmática da droga, ou variantes com ganho de função, resultando no aumento da depuração do medicamento e redução da concentração plasmática (11).

Nesse contexto, considerando as mais diversas propriedades funcionais das CYPs, sua relação com o metabolismo da PQ e a deficiência de G6PD, o objetivo desse estudo foi

determinar a influência dos polimorfismos de CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 na hemólise em deficientes e não deficientes de G6PD, tratados com primaquina para malária *vivax*.

REFERENCIAL TEÓRICO

1. MALÁRIA

A malária é considerada um importante problema de saúde pública que requer maior efetividade do seu controle, apesar de evitável e tratável (12). Nos seres humanos, seis espécies de protozoários do gênero *Plasmodium* são causadores de malária, entre eles: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium simium* (13–15).

De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve um aumento de casos de malária em 2020, quando comparado com 2019. Cerca de 241 milhões de casos de malária foram notificados em 85 países, resultando em 627 mil mortes no mundo todo, um aumento de 12% em relação ao ano de 2019 (16,17). A região Africana apresenta, atualmente, uma alta estimativa de casos por malária, com cerca de 95%. Nas Américas, os países Brasil, Colômbia e República Bolivariana da Venezuela representam 77% do total de casos(17).

No Brasil, a região denominada Amazônia Legal, correspondente aos estados: Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, é responsável por 99% dos casos de malária, o 1% restante, pertence à região extra-amazônica, que, embora apresente menor taxa de transmissão da doença, as ações de controle não devem ser negligenciadas, levando-se em consideração, o acesso rápido ao diagnóstico e tratamento (18). No ano de 2020, foram notificados 145.205 casos de malária, já no ano de 2021, houve uma redução de 4,1% com registros de 139.211 casos(16). Em relação às internações e óbitos, foram registradas 1.457 internações em 2020, e em 2021, 1.528, representando um aumento de 4,9% em relação ao ano anterior. Dois aumentos consecutivos foram observados quanto aos óbitos, 44 em 2020, 18,9% de aumento em comparação a 2019, e em 2021, foram 49 óbitos, 11,4% de aumento em relação a 2020(16). De acordo com a Incidência Parasitária Anual (IPA), indicador de risco para infecção por malária no Brasil, quatro categorias são estratificadas, incluindo: municípios em muito baixo risco (IPA < 1 caso/1.000 habitantes), baixo risco (IPA

entre 1 e 10 casos/1.000 habitantes), médio risco (IPA entre 10 e 50 casos/1.000 habitantes) e alto risco (IPA \geq 50 casos/1.000 habitantes), desde 2019 (19) (Figura 1).

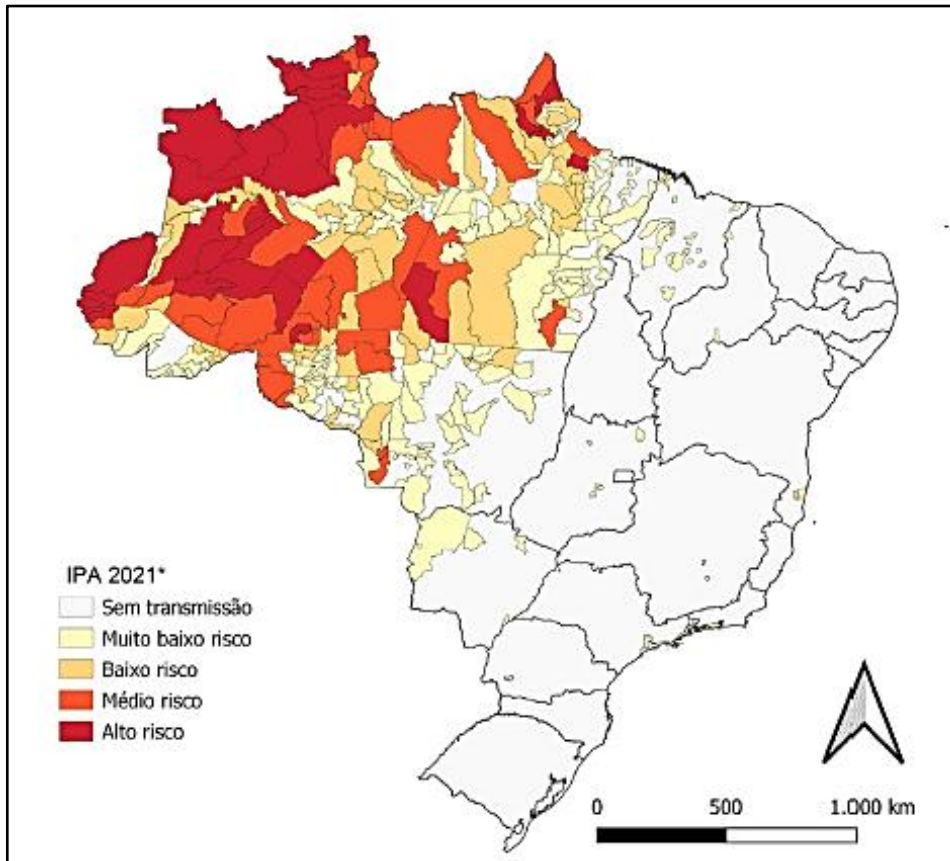


Figura 1: Mapa de risco de malária por município de infecção. Brasil, 2021 (16)

A transmissão da malária envolve, além do protozoário *Plasmodium* spp. e o hospedeiro humano, um mosquito vetor do gênero *Anopheles*, sendo que no Brasil, *Anopheles darlingi* é o principal vetor (19). No estômago do mosquito é onde acontece a formação e maturação do zigoto, dando origem às futuras formas de esporozoítos, que migram para as glândulas salivares do *Anopheles* spp. (20). O ciclo biológico inicia-se quando a fêmea do mosquito inocula os parasitos na pele humana. Esses, seguirão para o fígado, onde *P. falciparum* e *P. vivax* permanecem em torno de uma semana, e *P. malariae* aproximadamente duas semanas. Nos hepatócitos, as formas de esporozoítos irão se multiplicar e dar origem aos merozoítos, outros esporozoítos se transformam em hipnozoítos e permanecem no fígado de forma latente. As novas formas de merozoítos saem dos hepatócitos e invadem as hemácias na corrente sanguínea, dando início à segunda fase do ciclo. A partir desse momento, os sintomas de malária começam aparecer (18,20).

No estágio eritrocitário, os merozoítos multiplicam-se assexuadamente nas hemácias, ocasionando o rompimento dessas células e liberando novos parasitos, responsáveis por dar continuidade a novos ciclos eritrocitários. Depois de sucessivas multiplicações, alguns merozoítos maturam para forma sexuada, chamada gametócitos. O ciclo se completa após a ingestão dos gametócitos pelo mosquito (18,20,21) (Figura 2).

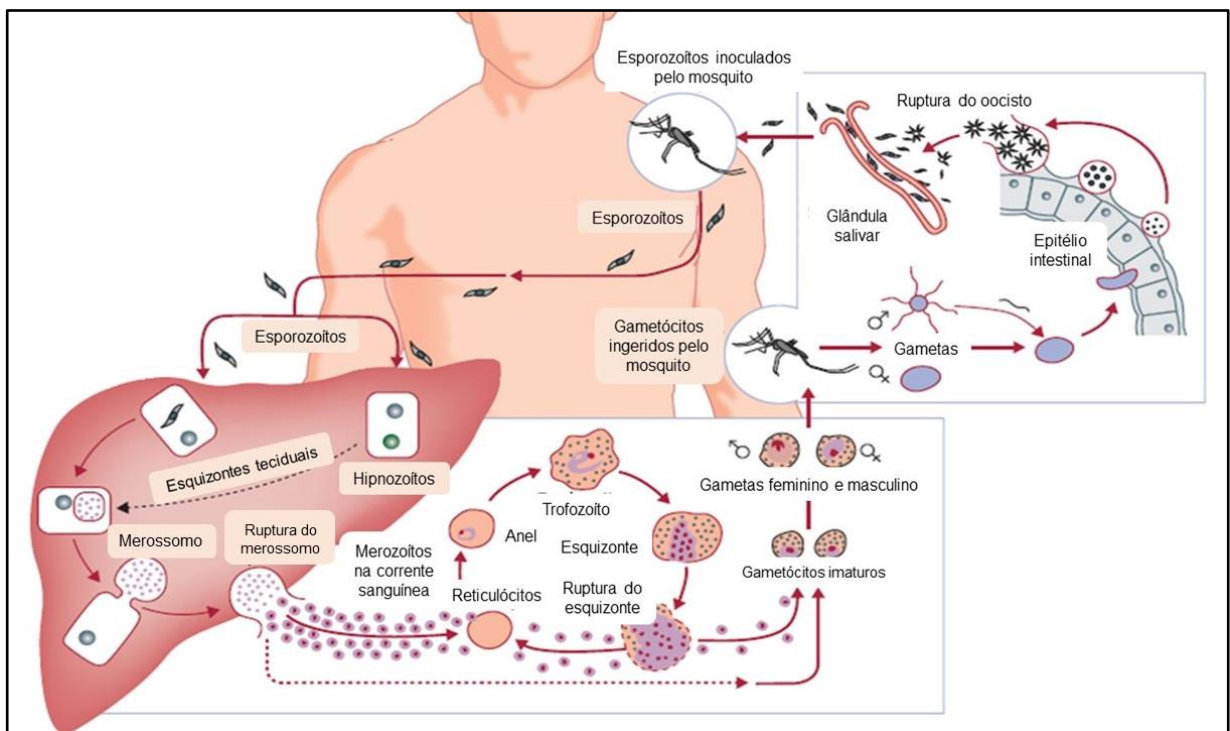


Figura 2: Ciclo biológico do *Plasmodium vivax*. Adaptado de Muller, 2009 (21)

Os sinais e sintomas provocados pelo *Plasmodium* nem sempre são específicos da doença, geralmente, são acompanhados de calafrios, febre alta (igual ou superior a 40°C) e sudorese, similares a outras doenças febris agudas. Entretanto, casos graves podem ocorrer a depender da espécie e quantidade do parasito circulante, do tempo da infecção e a resposta imunológica do paciente (18,20,22).

Para a rotina do diagnóstico da malária, a detecção e diferenciação do parasito deve ser realizada através da gota espessa, método reconhecido como padrão-ouro, seguido de testes rápidos imunocromatográficos, que apresentam vantagens devido ao custo relativamente baixo, fácil manuseio e resultados confirmados entre 15 e 20 minutos. O diagnóstico mediante testes moleculares como a PCR (reação em cadeia da polimerase), são menos solicitados

rotineiramente devido a necessidade de uma estrutura laboratorial mais tecnológica, com equipamentos considerados de alto custo e equipe profissional com habilidade para a técnica, dificultando assim, a emissão do resultado, porém, é um método amplamente utilizado na pesquisa por malária assintomática (18,23). Outra tecnologia alternativa que pode ser usada para o diagnóstico, é a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP), um teste molecular similar a PCR que detecta genes específicos no genoma do *Plasmodium*, tem se mostrado mais simples, rápido e de menor custo (24–27). A sorologia é apenas utilizada em estudos científicos que visam o rastreamento de anticorpos *anti-Plasmodium*, não solicitada para detecção de infecção ativa (18,24).

1.1. MALÁRIA VIVAX

Apesar da diminuição significativa nos casos graves ocasionados por *P. falciparum* nos últimos anos, a infecção que tem contribuído para prevalência da malária no Brasil, é o *P. vivax*, também responsável por produzir formas hipnozoítas nos hepatócitos do hospedeiro humano, levando à maioria dos casos de recaída (18). Durante a invasão dos eritrócitos na circulação, *vivax* apresenta entre suas características, a preferência por reticulócitos e ligação ao antígeno Duffy, além de uma estrutura ameboide e granulações de Schüffner (grânulos de coloração rósea no citoplasma da célula) (22).

A proporção global de casos por *Plasmodium vivax* de 2000 em comparação com 2020, reduziu cerca de 8% para 2%, respectivamente, segundo a OMS (17).

No Brasil, foi registrado 83,0% (114.449) de casos autóctones por *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* no ano de 2021, de acordo com o Ministério da Saúde (MS) (16). O Estado do Amazonas registrou 29.615 casos autóctones entre janeiro a junho de 2019 e 26.501 no mesmo período de 2020, com redução de 10,5%. Além disso, no ano de 2019, municípios considerados prioritários no Amazonas, Pará, Roraima, Amapá, Acre, Rondônia e Mato Grosso, concentraram cerca de 80% dos casos de malária (19) (Figura 3).

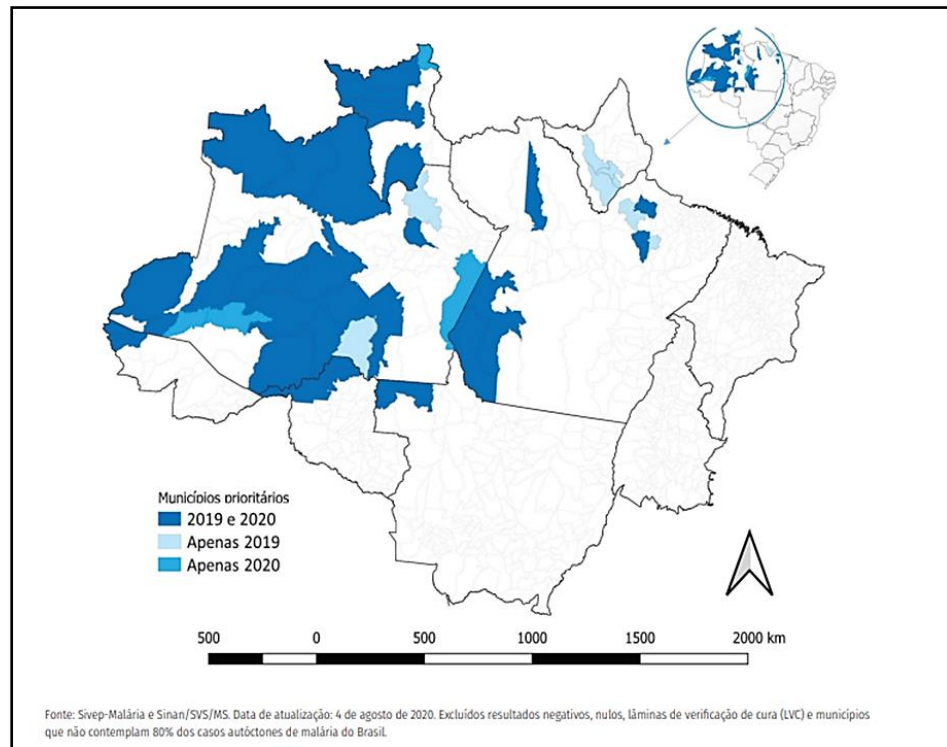


Figura 3: Mapa de municípios prioritários para malária no Brasil em 2019 e janeiro a junho de 2020 (18)

1.2. ANTIMALÁRICOS

O regime terapêutico para malária inclui processos importantes do ciclo biológico do parasito, entre eles: a interrupção da esquizogonia sanguínea, a destruição de hipnozoítos no fígado e a interrupção de formas sexuadas (18).

Em diversas áreas endêmicas para malária, a cloroquina (CQ) continua sendo a droga de escolha para *P. vivax*. A disponibilidade, baixo custo e tolerabilidade da CQ são essenciais para essa escolha. No Brasil, as orientações para o esquema terapêutico da malária não complicada são feitas em associação da CQ, visando eliminar as formas sanguíneas, e primaquina (PQ), que tem por objetivo a cura radical, sendo uma droga hipnozoitocida (12,18,28).

Para isso, recomenda-se o uso de 10 mg/kg de CQ no dia 1 e 7,5 mg/kg nos dias 2 e 3, em combinação, a PQ deve ser utilizada na dose de 0,5 mg/kg/dia, por 7 dias. Além disso, é recomendado considerar o grupo etário do paciente e ajustar a dose de acordo com o peso, para garantir a eficácia desejada e reduzir o risco de toxicidade no tratamento (18).

1.2.1. PRIMAQUINA E G6PD

Na década de 1940, durante a Segunda Guerra Mundial, foram os aumentos de infecções por malária grave entre os soldados americanos que estimularam a busca por uma 8-aminoquinolina, a PQ (29,30). Em 1956, 4 anos após o registro da PQ no U.S. Food and Drug Administration (FDA), as pesquisas visaram compreender o principal fator relacionado à toxicidade hemolítica causada por esta classe de medicamentos. Assim, buscaram elucidar a função da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) que parecia estar associada nesse processo (30).

O mecanismo de ação da PQ vem sendo estudado há décadas, mas ainda é complexo. Estudos recentes relatam que a biotransformação desse pró-fármaco envolve três vias principais: enzimas do citocromo P450 (CYP450) (CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4, CYP1A2), monoamina oxidase (MAO-A e B) e monooxigenase-3 contendo flavina (FMO-3) (31). A CYP2D6 apresenta maior eficiência catalítica no metabolismo da PQ, seguida da via MAO-A, CYP2C19 e CYP3A4 (8). Entre os metabólitos ativos mais abundantes e que são responsáveis tanto pela eficácia quanto pela toxicidade hemolítica, estão o 5-hidroxiprimaquina, oriundo da via CYP450, e carboxiprimaquina, da via MAO-A. O estresse oxidativo e consequente rompimento celular, é resultado da interação dos metabólitos instáveis através de reações de oxidação-redução, levando a espécies reativas de oxigênio provenientes da biotransformação, alcançando assim, o efeito antimalárico desejado (30,31).

Após a administração oral, a PQ é rapidamente metabolizada, atinge as concentrações máximas no plasma humano em torno de 1-2 h, e meia-vida curta de eliminação, entre 1/2- 4 h (8). Os efeitos tóxicos da PQ foram avaliados em estudo realizado por Ganesan *et al.* (2009), onde os eritrócitos deficientes de G6PD sofreram maior estresse oxidativo e depleção de tióis do que os eritrócitos normais. Os resultados também forneceram informações significativas sobre a contribuição variável das CYP2D6 e CYP3A4 na hemotoxicidade por PQ, sendo úteis no controle da toxicidade para aumentar a utilidade terapêutica (7).

Entretanto, o uso desse antimalárico utilizado para tratar as recaídas de malária, está associado ao crítico evento adverso, chamado hemólise, com repercussão clínica grave em pacientes com a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (18,29,32).

Devido a isso, esse medicamento apresenta restrição em pessoas que possuem a deficiência de G6PD. No citoplasma dos eritrócitos maduros com produção normal da enzima,

onde não há presença de núcleo e mitocôndrias, o processo responsável por fornecer energia às células se dá através da catálise da primeira etapa da via das pentoses fosfato e via glicolítica de Embden-Meyerhof. Nos eritrócitos, a via da pentose fosfato é extremamente necessária para transformar glicose em nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADP) em nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzido (NADPH). A enzima G6PD inicia o ciclo oxidando glicose-6-fosfato (G6P) em 6-fosfogluconato (6PG) transferindo hidrogênios para NADP, que consequentemente reduz em NADPH (30,32–34) (Figura 4).

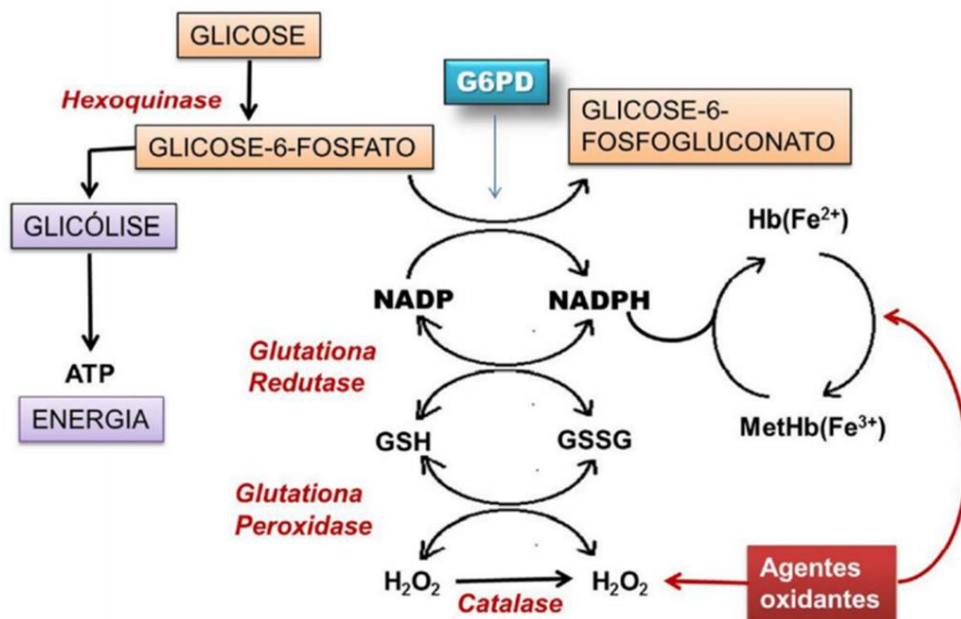


Figura 4: Via metabólica simplificada da glicose-6-fosfato desidrogenase. Brasil, 2018 (32)

O NADPH é uma coenzima que regula o status reduzido da célula, portanto, tem função de fornecer hidrogênio à glutatona oxidada (GSSG) para convertê-la em glutatona reduzida (GSH) por meio da enzima glutatona redutase. GSH é a defesa primária contra peróxidos de hidrogênio e radicais livres, sendo responsável pela restauração da hemoglobina para sua forma solúvel, uma vez que esta oxida durante o transporte de oxigênio. Desse modo, G6PD e NADPH estão relacionados com a proteção contra o estresse oxidativo dos eritrócitos, pois auxiliam na remoção de agentes oxidantes (32,33). Logo, em deficientes de G6PD (dG6PD) o baixo potencial redutor os tornam mais suscetíveis à hemólise após ingerir drogas e alimentos oxidantes, ou processos infecciosos e oxidativos, com crises hemolíticas leves a intensas, icterícia neonatal e anemia hemolítica não esferocítica crônica (30,33–36).

Com padrão de herança recessivo ligado ao cromossomo X, o gene G6PD está localizado na região telomérica do braço longo do cromossomo X (Xq28), contendo mais de 20.000 pares de bases com 13 exons e 12 introns, HGNC: 4057 (identificação exclusiva fornecida pelo Gene Nomenclature Committee (HGNC)) (37). O gene G6PD é considerado altamente polimórfico, tendo descritas mais de 200 variantes, todas relacionadas com deficiência enzimática de intensidade variável, porém, nenhuma apresenta perda completa de atividade, o gene normal ou selvagem é identificado como G6PD B (30,34,38). Demonstrando ampla distribuição geográfica, é conhecida como a enzimopatia mais comum no mundo todo, afetando cerca de 500 milhões de indivíduos, e mais frequentemente identificada em pessoas com descendência mediterrânea, asiática e africana, necessitando de validações genótípicas e fenotípicas especialmente em áreas endêmicas de malária, onde tem prevalência global de 8% (30,38).

Os dados de frequência da deficiência de G6PD (Figura 5) são provenientes de estudos populacionais com diversas metodologias, permitindo assim, uma margem de erro na seleção e classificação de amostras individuais (34). Na região Africana e nas Américas, incluindo o Brasil, a variante mais comum é descrita como A⁻ (G202A/A376G), variante de origem africana, que pode ter tido influência do contexto histórico de migração (39,40). Um estudo realizado na Tanzânia demonstrou que mulheres heterozigotas para a variante africana podem apresentar vantagem contra a malária grave (41).

Dados sobre a prevalência da deficiência de G6PD na América Latina, Howes *et al.* (2012) identificaram 5% a 10% da deficiência enzimática em toda região Amazônica, e 15-20% na Venezuela. Dados da África foram relativamente mais altos, em torno de 65,9% (42). Em 2013, Santana *et al.*, avaliaram a prevalência dessa enzimopatia entre homens de áreas endêmicas de malária na Amazônia brasileira resultando em um percentual de prevalência de 4,5% do total de 1.478 indivíduos, 56 apresentaram a variante A⁻ e 10 a variante mediterrânea (35). Dos estudos mais recentes sobre G6PD na região amazônica, a maior frequência observada foi no estado do Acre (8,3%), de 828 amostras genotipadas a Africana A⁺ representou 6,2%, Africana A⁻ 39,3% e 54,2% eram tipo selvagem (43).

Na Ásia e na Oceania existem diversas variantes descritas, algumas consideradas mais graves do que A-. Na Europa e Ásia Ocidental, a mediterrânea (C563T) é a mais prevalente entre Turquia, Arábia Saudita e Índia, apresentando aspecto mais grave da deficiência. A estimativa da deficiência genética de G6PD no sul do Paquistão teve um pico de 37%, o que apoia o mapeamento dessa enzimopatia nessa região para conclusão de dados de prevalência (33,40).

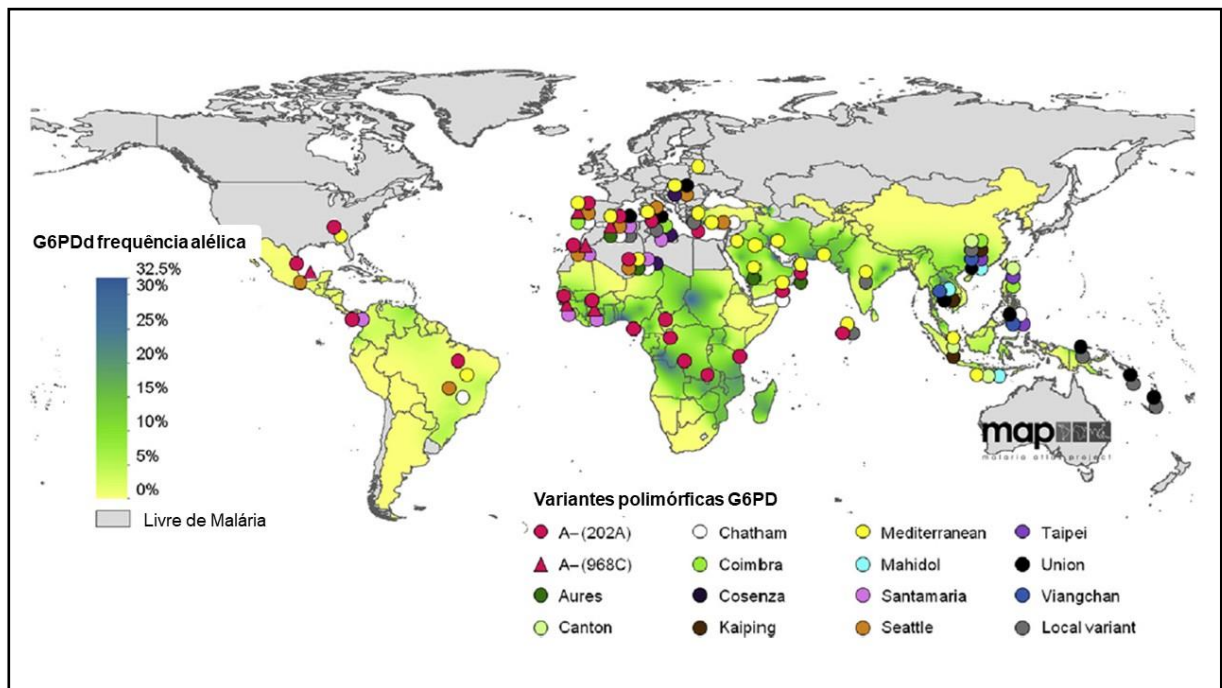


Figura 5: Distribuição global da deficiência de G6PD. Adaptado de Luzzato, 2016 (34)

O variável quadro de hemólise em pacientes com esta condição genética depende, sobretudo, da dosagem do medicamento, da variante G6PD envolvida, status genotípico do indivíduo (hemizigoto, homozigoto ou heterozigoto) (Figura 6), incluindo ainda, o mosaïcismo entre as mulheres heterozigotas e a condição de saúde do paciente em tratamento (30,44).

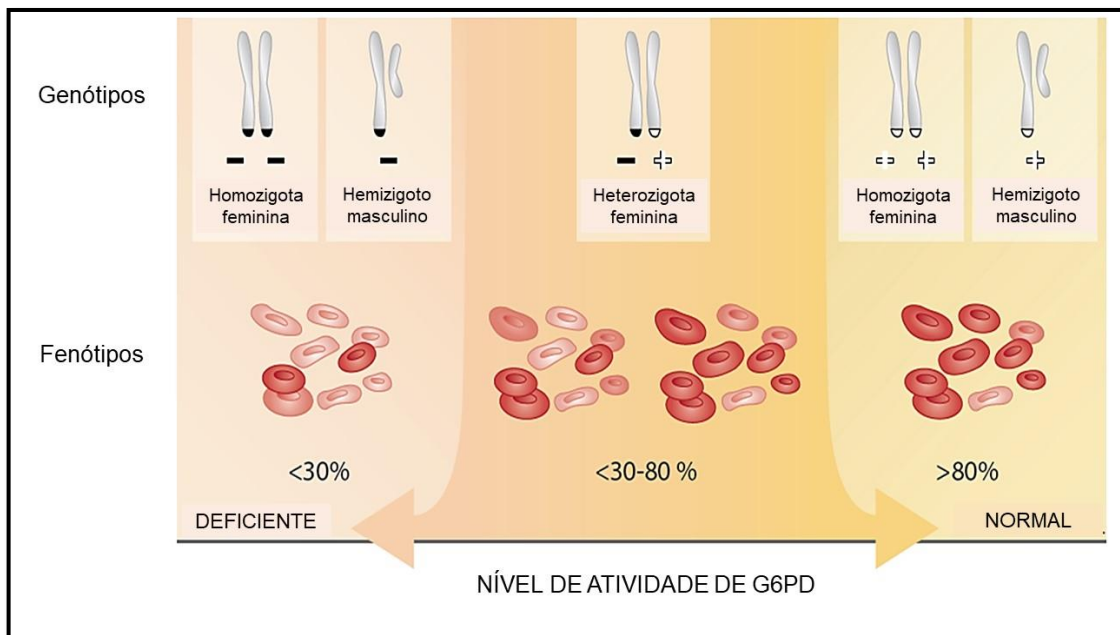


Figura 6: Genótipos e fenótipos da G6PDd. Adaptado de World Health Organization, 2018 (44)

Uma classificação para variantes G6PD foi estabelecida pela OMS, com base no grau de deficiência enzimática e manifestações clínicas, totalizando 5 classes. As classes I, II e III estão associadas à gravidade da anemia hemolítica, sendo que, a classe I: apresenta atividade <10% do normal, e consiste em uma anemia hemolítica não esferocítica crônica, menos comum; a classe II: apresenta deficiência enzimática grave <10%, inclui variante mediterrânea; a classe III: entre 10- 60% de atividade residual, inclui variante Africana variante (mais comum) e Seattle; classe IV: tem atividade normal de 60- 100%, e, a classe V: apresenta atividade aumentada (44,45).

Para avaliar o status de G6PD, o diagnóstico pode ser feito por genotipagem (detecção molecular para o gene G6PD) ou fenotipagem (detecção da atividade enzimática). O teste padrão-ouro é através de ensaio espectrofotométrico. Para melhor avaliação e gerenciamento de casos, a atividade enzimática expressa como concentração de hemoglobina (UI/gHb) ou contagem de eritrócitos detectada no sangue, deve ser escolhida. Testes rápidos para dosar a enzima podem ser suficientes para indivíduos com atividade $\geq 30\%$, porém, a maioria das mulheres heterozigotas necessitam de um teste quantitativo, como as tecnologias do Standard G6PD da SD Biosensor e o CareStartTM G6PD Biosensor da AccessBio (29,44).

Em situações onde o perfil da G6PD pelo teste fenotípico é incerto, a indicação é o teste genotípico, principalmente para auxiliar na identificação de mulheres heterozigotas ou homozigotas para a deficiência. A dosagem de atividade enzimática, nesses casos, pode ser repetida assim que a hemoglobina permanecer estável, entre 3 meses após uma transfusão de sangue ou 4 a 6 semanas depois um evento hemolítico (29,44).

Levando em consideração os pontos abordados entre a G6PD e a PQ, o guia de tratamento atual da malária no Brasil, do Ministério da Saúde (MS), traz recomendações visando a segurança e eficácia do esquema terapêutico para indivíduos com deficiência suspeita ou confirmada de G6PD. Portanto, atividade enzimática de G6PD < 30% deve-se administrar a PQ na dose semanal de 0,75 mg/dose durante 8 semanas (18,46). Elewa (2017), relata ainda outros antimaláricos como CQ e uma combinação de clorproguanil-dapsona-artesunato que podem levar a crises hemolíticas e diminuição dos níveis de hemoglobina em pacientes deficientes de G6PD, necessitando de monitoramento e ajuste terapêutico (47).

1.3. CITOCROMO P450

O complexo de enzimas CYP450 compreende mais de 50 enzimas, sendo as famílias CYP1, CYP2 e CYP3 responsáveis pelo metabolismo de grande parte dos medicamentos de uso clínico (10). É conhecido que os processos de absorção, distribuição, biotransformação ou excreção de drogas podem sofrer influência de interações medicamentosas, entretanto, a indução e inibição do complexo enzimático CYP se faz importante devido seu efeito potencial no desfecho terapêutico de muitos fármacos (48,49).

No fígado, a expressão das CYPs 1A2, 2C8, 2C9, 2E1 e 3A4 ocorre em maior quantidade, enquanto as enzimas 2A6, 2D6, 2B6, 2C19 e 3A5 são menos expressas em tecido hepático, podendo ser sintetizadas no pulmão, placenta e intestino (10,11). As CYPs 2J2, 1A1 e 1B1 são expressas principalmente em tecidos extra-hepáticos (10). A expressão e função das enzimas CYP450 são influenciadas por fatores intrínsecos e extrínsecos, incluindo as variantes genéticas, influências epigenéticas e biológicas como sexo, idade e doenças preexistentes (10).

Muitas variantes de CYP interferem na atividade enzimática e podem intensificar ou reduzir significativamente o metabolismo da droga. Para serem considerados polimorfismos (variações na sequência do DNA) o alelo mais raro precisa ter frequência igual ou superior a 1% em determinada população. Essas alterações compreendem polimorfismos de nucleotídeo

único (SNP), variação de nucleotídeo único (SNV), bem como deleções e inserções (InDels), além de variação no número de cópias (CNV) (48,50,51).

Na farmacogenética, a genotipagem de enzimas envolvidas em determinadas terapias medicamentosas se tornou uma ferramenta útil, pois os pacientes com variantes genéticas podem ser classificados de acordo com diferentes fenótipos, dos quais, existem variações com perda de função da enzima ou variantes com ganho de função (48). Recentemente, um estudo realizado na Amazônia brasileira, com *CYP2C8*, *CYP3A4* e *CYP3A5* sobre recorrência precoce de *P. vivax*, identificou pouca influência das variantes genéticas na recorrência precoce, apesar da presença de alelos de baixa atividade enzimática em alguns indivíduos, podendo ser explicado pela semelhança na eficácia terapêutica de cloroquina e desetilcloroquina (52).

Para identificação de variantes clássicas do *CYP2D6* e *CYP2C19*, os indivíduos são diferenciados em: metabolizadores lentos (gPM) com ausência completa de função (alelos nulos); metabolizadores normais (gNM), referente ao fenótipo padrão, geralmente a maior frequência na população; metabolizadores intermediários (gIM) apresentam alelo normal ou funcionalmente deficiente; metabolizadores rápidos (gRM) com um alelo de função normal e um com ganho de função. Os ultrarrápidos (gUM) em *CYP2C19* são representados por dois alelos com ganho de função, em *CYP2D6* é necessária a análise de CNV para confirmar multiplicação entre os alelos (53–56).

Os genes da família 2 do citocromo P450 (*CYP2*), estão distribuídos por diferentes regiões cromossômicas e organizados em grupos de genes contendo uma ou várias subfamílias, são elas: *CYP2A*, *CYP2B*, *CYP2C* e *CYP2D*. Exemplos desses variados grupos de genes que pertencem à subfamília *CYP2C* (*CYP2C8*, *CYP2C9* e *CYP2C19*) localizam-se no cromossomo 10, e o gene funcional *CYP2D6*, situa-se no cromossomo 22. Já a família 3 do citocromo P450 (*CYP3*), é composta por uma única subfamília, a *CYP3A*, localizada no cromossomo 7(10).

1.3.1. *CYP2C19*

O gene *CYP2C19* é membro 19 da subfamília C, da família 2 do citocromo P450 (HGNC: 2621), consiste em 9 éxons mapeados na região 10q23.33. A enzima codificada é uma proteína de 490 aminoácidos que está presente principalmente no fígado, mas também pode ser encontrada no intestino. Está envolvida em aproximadamente 10% no metabolismo de diversos agentes terapêuticos, entre as classes de antidepressivos, inibidores da bomba de prótons,

inibidores seletivos da recaptação da serotonina, benzodiazepínicos, barbitúricos entre outros (37,54).

De acordo com os termos de consenso do Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) para o status funcional dos alelos e fenótipos preditos de *CYP2C19*, os indivíduos podem ser classificados de acordo com o Quadro 1 (57,58).

Quadro 1: Classificação de fenótipos preditos de *CYP2C19*

Fenótipo	Genótipo	Exemplos
Metabolizador lento (gPM)	dois alelos sem função	*2/*2, *3/*3, *2/*3
Metabolizador intermediário (gIM)	um alelo de função normal e um alelo sem função ou um alelo com função aumentada e um alelo sem função	*1/*2, *1/*3, *2/*17, *3/*17
Metabolizador normal (gNM)	dois alelos de função normal	*1/*1
Metabolizador rápido (gRM)	um alelo de função normal e um com ganho de função	*1/*17

Os alelos de *CYP2C19* estão presentes em diferentes populações com frequências alélicas étnicas variáveis, em média, entre 2- 23%. *CYP2C19**2 e *CYP2C19**3 são mais frequentes na Ásia (30,26% e 6,89%), do mesmo modo para Oceania (61,30% e 14,42%, respectivamente) (59). Um estudo recente sobre a distribuição global dos fenótipos de risco de *CYP2C19* que afetam a segurança e eficácia dos medicamentos, identificou que os metabolizadores ultrarrápidos e lentos foram considerados fenótipos de alto risco, além de sugerir que a população africana e europeia está sob risco particularmente maior de eventos adversos devido as combinações alélicas de *CYP2C19* *2, *3 e *17 (60).

*CYP2C19**1 está entre os alelos mais comuns para esse gene, representando o tipo selvagem, o primeiro alelo variante descrito. *CYP2C19**2A (681G>A) no éxon 5, resulta em defeito de splicing, e os alelos *2B e *2C também apresentam essa variação com perda completa da atividade enzimática (alelos nulos). Ainda entre os alelos de perda de função com importância clínica, *CYP2C19**3 (636G>A) é um dos mais estudados. Dois SNVs descritos no alelo *CYP2C19**17 (99C> T; 991A> G) geram uma substituição de aminoácidos (I331V) levando à expressão conhecida de fenótipo ultrarrápido para esse gene (54,61).

Ao investigar o impacto da malária *vivax* e do tratamento CQ-PQ na atividade das enzimas CYP2D6 e CYP2C19 em pacientes da Amazônia brasileira, Almeida et al. (2020), concluíram que a inibição de CYP2C19 é concedida por um nível mais alto de citocinas pró-inflamatórias circulantes, enquanto a supressão do CYP2D6 é devido a exposição à CQ (62).

Em uma pesquisa avaliando os efeitos da MAO-A e CYP450 no metabolismo da PQ em indivíduos saudáveis, Ariffin *et al.* (2019), demonstraram através da análise dos alelos e genótipos que os polimorfismos MAO-A (rs6323, 891G> T), *CYP2D6* (rs1065852, 100C> T) e *CYP2C19* (rs4244285, 19154G> A) influenciaram significativamente o metabolismo da PQ. Por outro lado, a *CYP1A2* (rs762551, -163C> A) não teve influência (63).

Outro estudo com pacientes tailandeses infectados com *P. vivax*, concluíram que a redução da atividade de CYP2C19, ABCG2 e UGT2B7 em combinação com metabolizador lento ou intermediário CYP2D6 pode expor os pacientes a maior risco de recorrência de *vivax*, sugerindo que mais investigações são necessárias para reforçar os achados (31).

1.3.2. CYP2D6

O gene *CYP2D6* é membro 6 da subfamília D, da família 2 do citocromo P450 (HGNC: 2625), consiste em 9 éxons e 8 introns mapeados na região 22q13.2. A enzima codificada é uma proteína de 497 aminoácidos, e pertence a um grupo contendo pseudogenes inativos altamente homólogos *CYP2D7P* e *CYP2D8P* (37,54).

Existem mais de 130 alelos *CYP2D6* descritos, e esse gene é reconhecido por ser altamente polimórfico. Uma vez que não sofre indução enzimática, suas variações genéticas são as responsáveis pela diversidade interindividual na expressão e atividade da enzima, dificultando muitas vezes, o alcance das concentrações terapêuticas ideais (50,54).

A metabolização da PQ ocorre através de enzimas hepáticas (CYP), essencialmente a CYP2D6, que é responsável por ativar 5-hidroxiprimaquina, 5,6-ortoquinona e outros metabólitos fenólicos, além de ser fundamental para o metabolismo de 20 a 25% das drogas usadas clinicamente, como antiarrítmicos, antagonistas dos receptores adrenérgicos e antidepressivos tricíclicos (31,64). Está presente principalmente no fígado, mas também pode ser encontrada em níveis mais baixos no intestino, rim, pulmão, placenta, mama e cérebro (54).

As variantes de *CYP2D6* podem agravar a hemólise em pessoas com deficiência enzimática de G6PD variando de leve a grave. A falha no tratamento da PQ é, portanto, associada ao metabolismo lento ou intermediário em indivíduos com variações de *CYP2D6*, levando à baixa eficácia e maior risco de recaída (8,30,49). O uso da farmacogenética como ferramenta na medicina de precisão para a cura radical do *P. vivax* é inviável atualmente, devido ao conhecimento insuficiente a respeito do papel da *CYP2D6* no metabolismo e eficácia da PQ(65).

As frequências alélicas para *CYP2D6* são amplamente distribuídas entre grupos étnicos. O alelo *CYP2D6**1, é considerado de referência para 2D6, tem função normal, juntamente com *CYP2D6**2. Entre os alelos de função reduzida estão: *CYP2D6**9, *CYP2D6**10, *CYP2D6**17, *CYP2D6**29 e *CYP2D6**41. Os alelos associados com perda de função são: *CYP2D6**3, *CYP2D6**4, *CYP2D6**5 e *CYP2D6**6, os alelos com ganho de função indicam a presença de multiplicações em *CYP2D6*, são eles: *CYP2D6* *1xN e *CYP2D6* *2xN (66). O alelo *CYP2D6**10 é mais prevalente na Ásia, com média de 45%, e menos frequente na Oceania (1,6%) e na Europa (2,6%). Em comparação, o alelo *CYP2D6**4 tem prevalência entre judeus Ashkenazi (22%) e europeus (18%), já em asiáticos a média de prevalência é 0,6%. A variante *CYP2D6**17 está melhor validada na África (20%) e entre afro-americanos é de 18% (67,68). No Brasil, as variantes de *CYP2D6* são bem distribuídas em diferentes regiões, *CYP2D6**1 e *CYP2D6**2 são mais frequentes, e as variações de mais de duas cópias têm média de 6,3% (no Sul do Brasil) a 10,2% (Norte do Brasil) (69).

As frequências fenotípicas de *CYP2D6* variam no mundo todo. Nas Américas o fenótipo normal é o mais prevalente (0,59%), seguido de metabolizador intermediário (0,25%) (68). No Brasil, 83,5% são metabolizadores normais, sendo 3,7% ultrarrápidos (gUM) e 2,5% lentos (gPM)(69). Em 2020, foi realizado um novo consenso recomendado em conjunto com Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) e Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) para classificação dos fenótipos preditos de *CYP2D6* (70) (Quadro 2).

Quadro 2: Classificação de fenótipos preditos de *CYP2D6*

Fenótipo	AS	Exemplos
Metabolizador lento (gPM)	0	*3/*4, *4/*4, *5/*5, *5/*6
Metabolizador intermediário (gIM)	$0 < x < 1.25$	*4/*10, 4/*41, *10/*10, *10/*41, 41/*41, *1/*5
Metabolizador normal (gNM)	$1.25 \leq x \leq 2.25$	*1/*10, *1/*41, *1/*9, *1/*1, *1/*2, *2x2/*10
Metabolizador ultrarrápido (gUM)	> 2.25	*1/*1xN, *1/*2xN, *2/*2xN, *1x2/*9

Brasil et al. (2018), investigou a associação de variantes em *CYP2D6* com recorrência da malária em pacientes da região norte do Brasil, e concluíram que a atividade enzimática reduzida de *CYP2D6* está associada ao aumento do risco de recorrência da malária vivax, após terapia combinada de CQ e PQ (71). Silvino *et al.* (2016), demonstrou que pacientes com variantes em *CYP2C8* apresentam recidiva precoce em menos de 42 dias e apresentam uma proporção maior de parasitas semelhantes, associando a possibilidade de recorrência devido à falha terapêutica de CQ (64).

1.3.3. CYP3A4

O gene *CYP3A4* é membro 4 da subfamília A, da família 3 do citocromo P450 (HGNC:2637), consiste de 13 éxons e 12 introns mapeados na região 7q22.1, com um tamanho de 27 kb, e a enzima codificada é uma proteína de 503 aminoácidos. A família CYP3 humana consiste em apenas uma subfamília, a *CYP3A*, composta por quatro genes *CYP3A4*, *3A5*, *3A7* e *3A43*. No entanto, *CYP3A4* e *3A5* são as enzimas mais abundantes expressas no intestino delgado e fígado. Tanto a *CYP3A4* do intestino quanto hepática, podem contribuir significativamente na biotransformação de mais de 50% dos medicamentos em uso clínico, incluindo ciclosporina, nifedipina, midazolam, verapamil, tacrolimo, antibióticos como a eritromicina, além de estar envolvido no metabolismo de hormônios esteroides (37,53,54).

A variabilidade interindividual na expressão e atividade da enzima *CYP3A4* ainda não está bem clara com sua relação farmacocinética-farmacodinâmica, mas alguns estudos já

realizados consideram que a segurança e eficácia dos fármacos metabolizados por essa CYP, possam ser afetados (72). Mesmo apresentando 38 variantes alélicas identificadas, sendo 17 localizadas na região promotora (5-UTR) e 21 distribuídas ao longo dos éxons de *CYP3A4*, associações clínicas para todas essas variantes ainda não estão bem definidas (73).

Zhou *et al.* (2019), avaliaram *in vitro* a atividade enzimática de variantes alélicas de *CYP3A4* em um antimalárico, a quinina. Resultando em variadas expressões, desde depuração intrínseca significativamente reduzida, aumentada, sem diferenças significativas e ainda sem expressão e atividade (74).

*CYP3A4*1* é o alelo tipo selvagem, portanto, expressa atividade enzimática normal (66). O alelo *CYP3A4*1B* (392A>G), é uma variante da região promotora do gene *CYP3A4*, destaca-se por ser o primeiro alelo variante descrito, mas a compreensão de sua real função ainda se faz necessária. Estudos *in vitro* relataram um possível aumento da transcrição, sendo esse processo não bem definido (66). López-García (2017), visando avaliar a influência de variantes genéticas de *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* e *CYP3A4* no metabolismo de drogas antiepilépticas em pacientes pediátricos com epilepsia refratária, demonstrou que o alelo *CYP3A4*1B* é um fator de risco importante para o desenvolvimento de resistência a medicamentos, afetando a resposta de antiepiléticos (75). *CYP3A4*1B* também elevou a taxa de depuração de docetaxel, com conseqüente redução da exposição ao medicamento em pacientes com câncer. Em pacientes adultos pós- transplantados renais, o *CYP3A4*1B* demonstrou associação com a farmacocinética do tacrolimos (76). *CYP3A4* apresenta-se como um biomarcador crítico para a determinação da disposição do tacrolimos, podendo auxiliar a terapia individualizada das concentrações e dosagens adequadas (77).

A frequência *CYP3A4*1B*, na população afro-americana varia entre 45% a 66,7%, enquanto é ausente na população asiática. Para a população europeia, a frequência estimada é 4,5%- 9,6% (78). No Sul do Brasil, *CYP3A4*1B* foi observado em maior frequência entre os afrodescendentes (0,379%) do que em europeus (0,098%)(79).

A *CYP3A4* está envolvida na metabolização dos principais componentes da terapia combinada de artemisinina (ACT) (mefloquina, artemeter, lumefantrina) (80). Alguns alelos são descritos para *CYP3A4*, mas não em estudos com antimaláricos, como o *CYP3A4*20* que representa o primeiro alelo com perda completa de função, essa variante contém um códon de parada prematuro que resulta em uma proteína truncada (73). O *CYP3A4*22* mostrou estar associado à diminuição da atividade enzimática, e apresenta frequência alélica de 0,08% em

européus, 0,04% em populações asiáticas e africanas (72). Além disso, o alelo *22 pode afetar a resposta à drogas como o metabolismo das estatinas, *in vivo* (81). A variante *CYP3A4**18 de ganho de função, foi associada à predisposição do desenvolvimento de osteoporose (82).

O uso da PQ para tratamento de *P. vivax* em dG6PD constitui o principal fator associado à hemólise grave, hospitalização e morte nessa população na América Latina. Portanto, torna fundamental estudar o papel das CYPs em indivíduos dG6PD, visto que, variantes de CYP têm interação no metabolismo da PQ e podem piorar o quadro de hemólise nesses pacientes.

Conseqüentemente, considerando as mais diversas propriedades funcionais das CYPs, o perfil epidemiológico da região norte do Brasil, especificamente o Amazonas, por se tratar de uma área endêmica de malária, torna-se indispensável traçar o perfil genotípico e fenotípico desses pacientes, contribuindo assim, com possíveis orientações de tratamento e administração da PQ.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

- Avaliar a influência das variantes de *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4* na hemólise em deficientes e não deficientes de G6PD, tratados com primaquina para malária *vivax*.

2.2. ESPECÍFICOS

- Investigar a frequência de variantes no gene G6PD em pacientes com hemólise por primaquina;
- Investigar a frequência de alelos variantes nos genes *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4* em pacientes com hemólise por primaquina;
- Descrever o perfil clínico e laboratorial em deficientes e não deficientes de G6PD;
- Descrever a comparação do perfil clínico e laboratorial em deficientes e não deficientes de G6PD com fenótipos de *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4*;

3. MÉTODOS

3.1. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), aprovado sob o número CAAE: 39179720.9.0000.0005, parecer substanciado número 4.613.995 (Anexo 7.1).

Inicialmente, foi elaborado um Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD) para acesso às informações dos prontuários de pacientes com hemólise por PQ e infecção por malária *vivax*. Os pacientes que preencheram os critérios de elegibilidade, foram convidados a participar deste estudo, sendo-lhes apresentado os objetivos e a importância do estudo. Todos aqueles que concordaram participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e/ou Termo de Assentimento para o menor de idade, assinado pelo responsável legal (Anexo 7.2 e 7.3).

3.2. TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo de série de casos.

3.3. LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi realizado na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), considerado centro de referência para o tratamento de enfermidades tropicais.

3.4. PARTICIPANTES DO ESTUDO

Para participação nesse estudo, a seleção foi baseada na identificação de pacientes que foram internados por complicações de malária *vivax* na FMT-HVD, no período de 2015 a 2021. O recrutamento utilizado foi a partir da busca de prontuários via sistema iDoctor, seguido do contato telefônico realizado pela equipe de pesquisa.

3.4.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes de ambos os sexos;
- Faixa etária > 6 meses de idade;
- Diagnóstico de malária *vivax*;
- Paciente hospitalizado com hemólise;
- Realizado tratamento com PQ no momento da hemólise.

3.4.2. CRITÉRIO DE NÃO INCLUSÃO E EXCLUSÃO

- Ausência de contato telefônico;
- Residência em outros municípios;
- Indisponibilidade de participar do estudo.

3.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE G6PD

Foi utilizado o kit biosensor com dispositivo de teste STANDARD G6PD e o STANDARD fita de verificação G6PD fabricada pela SD BIOSENSOR, para medir e determinar quantitativamente a concentração total de hemoglobina e a atividade enzimática da G6PD, em amostras de sangue total fresco baseado em um método enzimático colorimétrico in vitro. O biosensor STANDARD G6PD lê as características da fita teste usando um chip de código disponível em cada kit. Foi realizada assepsia no local de punção, e coletada uma amostra de 10 mL de sangue total em tubo de EDTA. Aproximadamente 10µL de sangue total fresco foi adicionado e homogeneizado a um tampão reagente, seguido de aplicação imediata no dispositivo teste.

Para interpretação, foram considerados os valores de hemoglobina total (T- Hb g/dL, limite de detecção 4- 25 g/dL) e atividade de G6PD (UI/g Hb, limite de detecção 0- 20 UI/g Hb), de acordo com os valores recomendados(83,84) (Quadro 1 e 2):

Quadro 3: Valores recomendados para dosagem de G6PD em homens

HOMEM		
G6PD DEFICIENTE	Atividade G6PD < 30% da mediana masculina	≤ 3.9 UI/gHb
G6PD NORMAL	Atividade G6PD > 30% da mediana masculina	≥ 4.0 UI/gHb

Quadro 4: Valores recomendados para dosagem de G6PD em mulheres

MULHER		
G6PD DEFICIENTE	Atividade G6PD < 30% da mediana feminina	≤ 3.9 UI/gHb

G6PD INTERMEDIÁRIO	Atividade G6PD de 30%-80% da mediana feminina	4.0 – 6.0 UI/gHb
G6PD NORMAL	Atividade G6PD > 80% da mediana feminina	≥ 6.0 UI/gHb

3.6. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Uma amostra de 10 mL de sangue total em tubo de EDTA foi coletada e identificada por códigos para garantir o caráter anônimo dos participantes. Em seguida, as amostras de sangue foram separadas em microtubos eppendorf de 1,5 mL e armazenadas a - 80°C em criobox de plástico devidamente identificada e numerada.

O DNA genômico foi extraído seguindo kit QIAmp® Blood Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com os procedimentos de extração descritos no POP_IPCCB_LB_003_v03D_PT (Anexo 7.4) do Laboratório da Gerência de Malária da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

3.7. GENOTIPAGEM DE G6PD

A caracterização molecular para as variantes Africana A+, Africana A- e Mediterrânea (Quadro 3), foi através do sistema Taqman e equipamento da Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR System. O preparo do mix de genotipagem teve volume total de 10µL (1 reação), sendo 3µL de Taqman® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, AB), AB), 0,15µL de sondas de genotipagem (específicas para cada variante), 4,85µL de água nuclease free e 2,0 µL de DNA. Os parâmetros de ciclagem para a PCR foram: leitura pré-PCR a 60°C por 60 segundos, desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguidos de 45 ciclos de desnaturação e extensão a 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos, respectivamente, finalizando com uma leitura pós-PCR 60°C por 60 segundos. Todos os procedimentos estão descritos no POP_IPCCB_LAB_030_v01_PT (Anexo 7.5) do Laboratório da Gerência de Malária da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

Quadro 5: Variantes selecionadas no gene G6PD

dbSNP ID	Variante	Alelos	Efeito
----------	----------	--------	--------

rs1050828	Africana A-	G202A	<i>Missense</i>
rs1050829	Africana A+	A376G	<i>Missense</i>
rs5030868	Mediterrânea	C563T	<i>Missense</i>

3.8. GENOTIPAGEM DE CYPs

A técnica de real-time PCR foi usada para a genotipagem das variantes em *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4* (Quadros 4, 5 e 6), utilizando sondas Taqman e equipamento da Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR System. O preparo do mix de genotipagem teve um volume total de 5µL (1 reação), sendo 2,5µL Taqman® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, AB), 0,25µL sondas de genotipagem (específicas para cada SNP) e 2,25µL de DNA. Os parâmetros de ciclagem para a PCR foram: leitura pré-PCR a 60°C por 30 segundos, desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguidos de 50 ciclos de desnaturação e extensão a 92°C por 15 segundos e 60°C por 01:30 segundos, respectivamente, finalizando com uma leitura pós-PCR 60°C por 30 segundos. Todos os procedimentos estão descritos no POP_IPCCB_LB_044_v01D_PT (Anexo 7.6) do Laboratório da Gerência de Malária da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

Quadro 6: Variantes selecionadas no gene *CYP2C19*

dbSNP ID	Variante	Alelos	Efeito	Fenótipo enzimático
Normal	Alelo referência	2C19*1	Normal	Normal
rs4244285	681G>A	2C19*2	<i>Synonymous Variant</i>	Nula
rs4986893	636G>A	2C19*3	<i>Transition Substitution</i>	Nula
rs12248560	-806C>T	2C19*17	<i>Upstream Variant</i>	Aumentada

Quadro 7: Variantes selecionadas no gene *CYP2D6*

dbSNP ID	Variante	Alelos	Efeito	Fenótipo enzimático
Normal	Alelo referência	2D6*1	Normal	Normal
rs35742686	2549delA	*3	<i>Frameshift</i>	Nula
rs1065852	100C>T	*4 e *10	<i>Missense</i>	-
rs3892097	1846G>A	*4	<i>Splicing defect</i>	Nula
rs1135840	4180G>C	*2, *4, *10, *17, *29, *35, *39 e *41	<i>Missense</i>	-
rs28371725	2988G>A	*41	<i>Splicing defect</i>	Diminuída
rs59421388	3183G>A	*29	<i>Missense</i>	Diminuída
rs1080985	-1584C>G	*2, *35 e *41	<i>Downstream Variant</i>	-
rs5030656	2615_2617delA AG	*9	<i>Inframe Deletion</i>	Diminuída
rs769258	31G>A	*35	<i>Missense</i>	Normal
rs28371706	1023C>T	*17	<i>Missense</i>	Diminuída
rs16947	2850C>T	*2, *17, *34, *29, *35, e *41	<i>Missense</i>	-

Quadro 8: Variantes selecionadas no gene *CYP3A4*

dbSNP ID	Polimorfismo	Alelos	Efeito	Fenótipo enzimático
Normal	Alelo referência	3A4*1	Normal	Normal
rs2740574	-392A> G	3A4*1B	<i>Transition Substitution</i>	Indeterminado

3.8.1. IDENTIFICAÇÃO DE CNVs

A identificação das variações alélicas de *CYP2D6* requer uma etapa extra para determinação de deleções e multiplicações dos alelos. A determinação do número de cópias do gene *CYP2D6* foi feita por CNV (variação do número de cópias), utilizando real-time PCR. O preparo do mix é constituído de 5µL de Taqman® Universal PCR Mix Master (AB), 0,5µL TaqMan® Copy Number Assay (AB), 0,5µL TaqMan® Copy Number Reference Assay, human, RNase P (AB), 2µL de água nuclease free (Invitrogen™) e 2µL DNA. Os parâmetros de ciclagem foram: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação e extensão a 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos, respectivamente. O produto da amplificação de CNV foi analisado no software CopyCaller da ThermoFisher. Todos os procedimentos estão descritos no POP_IPCCB_LB_044_v01D_PT (Anexo 7.6) do Laboratório da Gerência de Malária da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

3.8.2. DETERMINAÇÃO DE ALELOS E DIPLÓTIPOS

De acordo com o POP de genotipagem (Anexo 7.6), o software HaploStats 1.8.6, implementado na plataforma R, foi utilizado para inferir os diplótipos de *CYP2D6*, e a definição dos alelos foi feita seguindo a nomenclatura estabelecida para identificação dos alelos estrela (*) em Pharmacogene Variation (PharmVar) Consortium.

Os alelos e diplótipos das *CYP2C19* e *CYP3A4* foram inferidos com o auxílio do editor de planilhas Microsoft Office Excel 2019 e a identificação dos alelos estrela (*) foi feita por comparação com a nomenclatura vigente.

3.8.3. DETERMINAÇÃO DOS FENÓTIPOS PREDITOS

A determinação de fenótipo predito de *CYP2D6* foi feita pelo sistema de escore de atividade (AS – activity score), onde o AS de um genótipo é a soma dos valores atribuídos a cada alelo. Seguindo 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 (a exemplo os diplótipos *3/*4, *4/*4, *5/*5, *5/*6), metabolizador intermediário (gIM) AS= $0 < x < 1.25$ (*4/*10, 4/*41, *10/*10, *10/*41, 41/*41, *1/*5), metabolizador normal (gNM) AS= $1.25 \leq x \leq 2.25$ (*1/*10, *1/*41, *1/*9, *1/*1, *1/*2, *2x2/*10) e metabolizador ultrarrápido (gUM) AS= > 2.25 (*1/*1xN, *1/*2xN, *2/*2xN, *1x2/*9)(56,70). Utiliza-se o prefixo “g” para indicar que o fenótipo é predito a partir do genótipo(67).

O fenótipo predito de *CYP2C19* foi classificado em concordância com os termos de consenso do Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC), classificando os fenótipos em: metabolizadores lentos (gPM), aqueles com função enzimática marcadamente reduzida ou ausente (ex.:*2/*2); metabolizadores intermediários (gIM), resultando em diminuição da atividade enzimática, com presença de um alelo nulo (ex.:*1/*2); metabolizadores normais (gNM) com atividade enzimática normal (*1/*1); metabolizadores rápidos (gRM) diplótipos com um alelo de função normal e um com ganho de função (ex.: *1/*17), e os metabolizadores ultrarrápidos (gUM) aqueles com ganho de função (ex.: *17/*17)(57,58).

3.9. ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram organizados em planilhas com auxílio do programa Microsoft® Excel® 2019. O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para verificar a distribuição de variáveis contínuas, que foram expressas em média e desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil (IIQ). As variáveis categóricas foram expressas em valor absoluto (n) e frequência relativa (%). O Teste t e Wilcoxon-Mann-Whitney foram utilizados para análise de variáveis numéricas contínuas, até dois grupos. O teste de Qui- quadrado em conjunto com Exato de Fisher foi utilizado para análise de variáveis categóricas. Para comparar o perfil clínico dos pacientes que foram tratados com PQ e os fenótipos de *CYP2C19* e *CYP2D6* foi realizado o teste ANOVA e Kruskal-Wallis, quando necessário. As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism v.9.0.2 e Stata v.13. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.10. EQUIPE DO PROJETO

Nome	Carga Horária/Diária	Função	Atividade
Marielle Machado Macêdo	8 horas	Mestranda	Executora do projeto de pesquisa.
Dra. Gisely Cardoso de Melo	8 horas	Orientadora	Farmacêutica; Acompanhou a execução do projeto, análise e tabulação dos dados.
Dra. Anne Cristine Gomes Almeida	4 horas	Coorientadora	Farmacêutica; Acompanhou a execução do projeto, análise e tabulação dos dados.
Amanda Carvalho de Oliveira	4 horas	Colaboradora	Biomédica; Acompanhou a execução do projeto.
Gabrielly Santos da Silva	4 horas	Colaboradora	Biomédica; Acompanhou a execução do projeto.

3.11. FINANCIAMENTO

Este projeto foi financiado pelo Projeto Universal tendo como agência financiadora o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

4. RESULTADOS

Capítulo I:

Resposta terapêutica da primaquina em malária *vivax* em deficientes e não deficientes de G6PD: influência de variantes genéticas de *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4*.

Artigo original a ser submetido à revista *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*

Área: Ciências Biológicas, Ciências Da Saúde

Versão impressa ISSN: 0074-0276

Versão on-line ISSN: 1678-8060

Fator de Impacto: 2.743

Resposta terapêutica da primaquina em malária *vivax* em deficientes e não deficientes de G6PD: influência de variantes genéticas de *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4*.

Marielle M Macêdo^{1,3}, Anne CG Almeida^{2,3}, Gabrielly S da Silva^{2,3}, Amanda C de Oliveira^{2,3}, Gisely C Melo^{2,3}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brasil

³Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema. Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brasil

INTRODUÇÃO: Na Amazônia, a infecção por *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) é mais prevalente, e seu tratamento inclui a primaquina (PQ), uma droga hipnozoitocida. No entanto, seu uso é limitado pelo risco de anemia hemolítica aguda (AHA) em indivíduos deficientes da glicose-6-fosfato desidrogenase (dG6PD). A interação com enzimas hepáticas do citocromo P450 (CYP) de alguns farmacogenes como *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4* associados ao metabolismo da PQ podem intensificar ou reduzir sua biotransformação.

OBJETIVO: Este estudo visa avaliar a influência das variantes de *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4* na hemólise em deficientes e não deficientes de G6PD, tratados com primaquina para *P. vivax*.

MÉTODOS: Foram incluídos 18 pacientes de ambos os sexos, > 6 meses de idade tratados com PQ, com diagnóstico de malária *vivax* e hemólise. Foi realizada fenotipagem para G6PD através do SD Biosensor e genotipagem para G6PD e CYPs utilizando a técnica de real-time PCR.

RESULTADOS: Dos 18 pacientes incluídos, 55,6% apresentaram a variante Africana A- (G202A/A376G), 11,1% a Africana A+ (A376G), 5,6% a Mediterrânea (C563T) e 27,8% eram tipo selvagem. A genotipagem de *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4* não mostrou diferença estatisticamente significativa na frequência de alelos estrela entre os grupos ($p > 0,05$). Níveis elevados de marcadores hepáticos e renais nos dG6PD foram observados em gNM, gRM e gUM de *CYP2C19* e *CYP2D6* ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES: Esses achados reforçam a importância de estudos sobre o mapeamento da deficiência de G6PD e variantes genéticas de *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4*, que permitirão validar prevalência e determinar a influência das CYPs no processo hemolítico de indivíduos

com malária *vivax*, e contribuirão para escolha de um esquema terapêutico mais adequado, evitando complicações ocasionadas pela metabolização da PQ em CYP.

Palavras- chave: *Plasmodium vivax* - malária - hemólise por primaquina - deficiência de G6PD - citocromo P450.

INTRODUÇÃO

Na Amazônia, a infecção malárica mais prevalente é pelo *Plasmodium vivax*, que é responsável por produzir hipnozoítas nos hepatócitos do hospedeiro humano, ocasionando recaídas (1,2). A eliminação de hipnozoítos requer uma 8-aminoquinolina, como primaquina (PQ) ou tafenoquina (TQ), para alcançar a cura radical. No entanto, o uso desses medicamentos é limitado pelo risco de anemia hemolítica aguda (AHA) em deficientes da glicose-6-fosfato desidrogenase (dG6PD) (3–6).

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), é uma enzima relacionada com a proteção contra o estresse oxidativo dos eritrócitos (1,7). Essa enzimopatia eritrocítica tem padrão de herança recessivo ligada ao cromossomo X, e é frequentemente associada a indivíduos com descendência mediterrânea, asiática e africana (8–10). Atualmente, estudos relataram uma frequência de 4,5% a 10% de deficiência de G6PD na população brasileira (11,12). Algumas variantes já identificadas no Brasil são: variante Africana, Mediterrânea, Seattle, Chatham, Bahia, São Paulo (9,13–15), porém, a alteração alélica de origem africana é a mais comum, caracterizada como A⁻ (G202A/A376G) (16,17).

Além disso, enzimas que metabolizam a PQ, como a CYP2D6, estão associadas à falha da PQ devido ao metabolismo lento, comprometendo sua ativação e diminuindo a eficácia terapêutica (8,18,19). No Brasil, as variantes *CYP2D6*1* e *CYP2D6*2* são mais frequentes, e as variações de mais de duas cópias ativas, que podem acelerar o metabolismo do fármaco, têm frequência de 6,3% no sul e 10,2% no norte do país (20). Outros farmacogenes de interesse clínico como *CYP2C19* e *CYP3A4* também já foram avaliados na resposta terapêutica da PQ em pacientes infectados com *P. vivax* (21,22).

Apesar de estudos relatarem a hemólise grave induzida por PQ em deficientes de G6PD, pouco se conhece a respeito do papel das alterações genéticas em CYPs e as complicações clínicas na terapia com PQ nessa população.

Nesse contexto, considerando as mais diversas propriedades funcionais das CYPs, sua relação com o metabolismo da PQ e a deficiência de G6PD, o objetivo desse estudo foi avaliar a influência das variantes de *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4* na hemólise em deficientes e não deficientes de G6PD, tratados com PQ para malária *vivax*.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção de participantes

Trata-se de um estudo descritivo de série de casos de malária por *P. vivax*. O estudo foi realizado na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), centro de referência para diagnóstico e tratamento de enfermidades tropicais, localizada em Manaus, Estado do Amazonas, Brasil.

A seleção dos participantes internados com malária *vivax* no período de 2015 a 2021, foi baseada no recrutamento através de prontuários eletrônicos via sistema iDoctor. Foram incluídos os pacientes que preencheram os seguintes critérios de elegibilidade: ambos os sexos, > 6 meses de idade, hospitalizados, tratados com PQ, com diagnóstico de malária *vivax* e hemólise. Os pacientes selecionados foram convidados a participar do estudo por contato telefônico pelo pesquisador, apresentado os objetivos e a importância do estudo. Os critérios de exclusão foram: ausência de contato telefônico, residência em outros municípios e indisponibilidade de participar do projeto. Os participantes foram categorizados em 2 grupos de estudo: deficientes e não deficientes de G6PD. Grau de anemia e icterícia foram classificados em cruzes de acordo com a intensidade relatada em prontuário: +/2, +, ++ ou +++. A classificação de anemia seguiu as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS): crianças 6- 59 meses: anemia leve (10,0- 10,9 g/dL), anemia moderada (7,0- 9,9 g/dL), anemia grave (< 7 g/dL) e sem anemia (\geq 11 g/dL); crianças 5- 11 anos: anemia leve (11,0- 11,4 g/dL), anemia moderada (8,0- 10,9 g/dL), anemia grave (< 8 g/dL) e sem anemia (\geq 11,5 g/dL); crianças 12-14 anos e mulheres: anemia leve (11,0- 11,9 g/dL), anemia moderada (8,0- 10,9 g/dL), anemia grave (< 8 g/dL) e sem anemia (\geq 12 g/dL); homens: anemia leve (11,0-12,9 g/dL), anemia moderada (8,0-10,9 g/dL), anemia grave (< 8 g/dL) e sem anemia (\geq 13 g/dL). (23).

Procedimentos laboratoriais

Avaliação da atividade enzimática de G6PD

De cada participante, foram coletados 10 mL de sangue total em EDTA. Imediatamente após a coleta, 10µL de sangue total foi adicionado e homogeneizado a um tampão do kit biosensor STANDARD G6PD (SD BIOSENSOR, Republic of Korea), que quantifica a concentração total de hemoglobina e a atividade enzimática da G6PD. A classificação segue os valores recomendados pelo fabricante: mulheres: ≤ 3.9 UI/gHb (deficiente), 4.0 – 6.0 UI/gHb (intermediária), ≥ 6.0 UI/gHb (normal) e para homens: ≤ 3.9 UI/gHb (deficiente), ≥ 4.0 UI/gHb (normal).

Genotipagem de G6PD e CYPs

O DNA genômico foi extraído com QIAmp® Blood Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). A genotipagem das variantes de G6PD, *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4* foi realizada por Real-time PCR (Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR System). As variantes selecionadas para G6PD foram: G202A (rs1050828), A376G (rs1050829) e C563T (rs5030868). Onze variantes foram selecionadas para *CYP2D6*: 2549delA (rs35742686), 100C>T (rs1065852), 1846G>A (rs3892097), 4180G>C (rs1135840), 2988G>A (rs28371725), 3183G>A (rs59421388), 1584C>G (rs1080985), 1023C>T (rs28371706), 2615_2617delAAG (rs5030656), 31G>A (rs769258), 2850C>T (rs16947). Três variantes foram selecionadas em *CYP2C19*: 681G>A (rs4244285), 636G>A (rs4986893), -806C>T (rs12248560); e uma variante selecionada para *CYP3A4*: -392A>G (rs2740574). A determinação de diplótipos de *CYP2D6* foi realizada através do software HaploStats versão 1.8.6, implementado na plataforma R, e a identificação dos alelos estrela (*) seguiu a nomenclatura vigente em Pharmacogene Variation (PharmVar) Consortium (22,24,25). Utilizou-se o sistema de escore de atividade (AS – activity score) para determinação de fenótipo predito de *CYP2D6* (26).

Os alelos estrela (*) e diplótipos das *CYP2C19* e *CYP3A4* foram identificados por comparação no PharmVar, e a determinação de fenótipo predito de *CYP2C19* foi classificado em concordância com os termos de consenso do Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) (27,28). Para *CYP3A4* foi analisado somente ausência ou presença do alelo *1B (-392A>G, rs2740574) por não haver diretrizes que estabeleçam predição de fenótipo para esta CYP (22).

Análises estatísticas

Os dados foram organizados em planilhas com auxílio do programa Microsoft® Excel® 2019. O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para verificar a distribuição de variáveis contínuas, que foram expressas em média e desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil (IIQ). As variáveis categóricas foram expressas em valor absoluto (n) e frequência relativa (%). O Teste t e Wilcoxon-Mann-Whitney foram utilizados para análise de variáveis numéricas contínuas, até dois grupos. O teste de Qui-quadrado em conjunto com Exato de Fisher foi utilizado para análise de variáveis categóricas. Para comparar o perfil clínico dos pacientes que foram tratados com PQ e os fenótipos de *CYP2C19* e *CYP2D6* foi realizado o teste ANOVA e Kruskal-Wallis, quando necessário. As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism v.9.0.2 e Stata v.13. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) sob CAAE: 39179720.9.0000.0005, parecer consubstanciado 4.613.995. Todos aqueles que concordaram em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), ou Termo de Assentimento para o menor de idade, assinado pelo responsável legal.

RESULTADOS

Foi observado, em sistema de prontuário eletrônico, 406 pacientes diagnosticados e internados com malária *vivax* na FMT-HVD. Destes, 252 não apresentaram histórico de hemólise e 126 não apresentavam informações suficientes para contato telefônico, portanto, 28 foram selecionados. Dez residiam em outros municípios ou apresentaram indisponibilidade de participar do estudo, resultando em 18 participantes incluídos (Figura 1).

Após dosagem enzimática de G6PD, os participantes foram categorizados em deficientes e não deficientes. Treze (72,2%) apresentaram atividade enzimática abaixo do valor normal, e cinco (27,8%) apresentaram dosagem normal (2,5 UI/g Hb e 8,4 UI/g Hb; $p = 0,0013$), respectivamente. A média de idade entre os participantes foi 25,4 anos (grupo deficientes: 22,1 anos e grupo não deficientes: 34 anos; $p = 0,2269$). Houve predomínio do sexo masculino em ambos os grupos (72,2%), apesar da distribuição de gênero entre os grupos não ser estatisticamente significativa ($p = 0,567$). Dados sociodemográficos são descritos na tabela I.

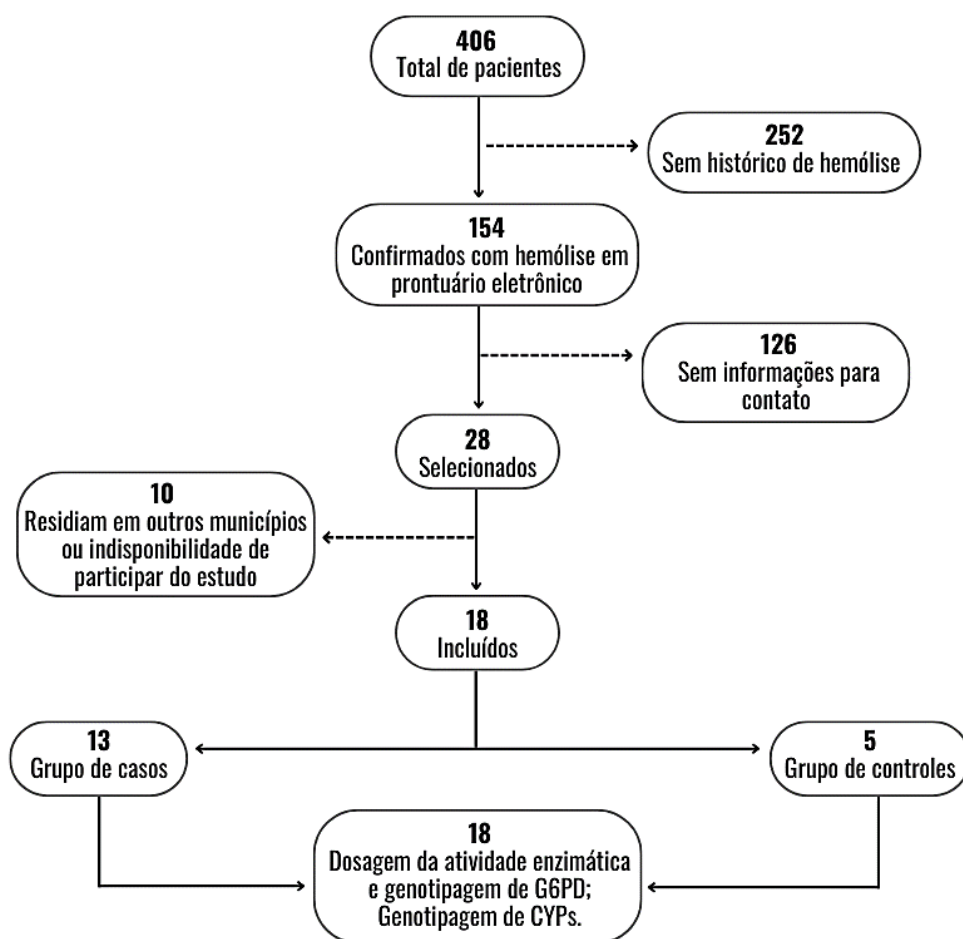


Figura 1: Fluxograma das etapas realizadas para inclusão de participantes.

Tabela I

Perfil sociodemográfico, clínico e laboratorial em deficientes e não deficientes de G6PD tratados com PQ para *P. vivax*

Características sociodemográficas	Total (N=18)	dG6PD (N=13)	Não dG6PD (N=5)	p valor
Idade, anos, média (DP)	25,4 (18,2)	22,1 (14,4)	34 (25,7)	0,2269
Sexo				
Feminino, n/N (%)	5 (27,8)	4 (30,8)	1 (20,0)	0,567
Masculino, n/N (%)	13 (72,2)	9 (69,2)	4 (80,0)	
Clínico e laboratorial				
Tempo de internação, dias, mediana (IIQ)	4 (3- 7)	4 (3- 14)	4 (4- 5)	0,6175
Dosagem G6PD (UI/g Hb), mediana (IIQ)	3,05 (2,2- 7,2)	2,5 (2- 3,1)	8,4 (7,8- 9,7)	0,0013

Grau de anemia, n/N (%)				
+2	2 (13,3)	1 (8,3)	1 (33,3)	0,446
+	3 (20,0)	2 (16,7)	1 (33,3)	
++	8 (53,3)	7 (58,3)	1 (33,3)	
+++	2 (13,3)	2 (16,7)	-	
Grau de icterícia, n/N (%)				
+2	-	-	-	0,345
+	2 (18,2)	1 (11,1)	1 (50,0)	
++	9 (81,8)	8 (88,9)	1 (50,0)	
+++	-	-	-	
Eritrócito (milhões/mm ³), média (DP)	2,7 (1,1)	2,6 (0,97)	3,6 (1,0)	0,0655
Ht (%), média (DP)	24,3 (7,2)	22,4 (6,3)	29,1 (7,7)	0,0716
Hb (g/dL), média (DP)	8,3 (2,1)	7,7 (1,8)	9,7 (2,4)	0,0661
Plaquetas (mm ³), mediana (IIQ)	81420 (65160- 315000)	194000 (70150- 353000)	71000 (47570- 73290)	0,1263
BT (mg/dL), mediana (IIQ)	2,3 (1,15- 4)	2,4 (1,15- 4)	1,9 (1,2- 7,2)	0,9516
BD (mg/dL), mediana (IIQ)	0,5 (0,4- 1,1)	0,5 (0,4- 1,1)	0,8 (0,4- 4)	0,6668
BI (mg/dL), mediana (IIQ)	1,4 (0,8- 3,2)	1,6 (0,8- 3,2)	1,2 (0,8- 3,2)	> 0,999
TGO (U/L), mediana (IIQ)	58,5 (35- 101)	62 (45- 101)	35 (33- 56)	0,2565
TGP (U/L), mediana (IIQ)	52 (36- 66)	59 (46- 66)	36 (30- 37)	0,1674
DHL (U/L), mediana (IIQ)	1337,5 (772- 2119)	1424 (859- 2422)	601 (414- 1613)	0,1391
Glicose (mg/dL), média (DP)	119,6 (28,6)	116,9 (28,6)	147 (-)	-
Creatinina (mg/dL), mediana (IIQ)	0,95 (0,5- 2,2)	1,0 (0,7- 1,6)	0,5 (0,4- 2,2)	0,3743
Ureia (mg/dL), mediana (IIQ)	42 (27- 69)	43 (28- 75)	36 (27- 49)	0,5873
Hemoglobinúria, n/N (%)	9 (81,8)	8 (80,0)	1 (100,0)	0,818
Proteinúria, n/N (%)	7 (63,6)	6 (60,0)	1 (100,0)	0,636
Bilirrubinúria, n/N (%)	3 (27,3)	3 (30,0)	-	0,727
Transfusão (CH), n/N (%)	9 (56,3)	9 (69,2)	-	0,062
LRA, n/N (%)	2 (12,5)	2 (15,4)	-	0,650
Diálise, n/N (%)	2 (12,5)	2 (15,4)	-	0,650

Abreviações: dG6PD= deficientes de G6PD, Ht= hematócrito, Hb= hemoglobina, BT= bilirrubina total, BD= bilirrubina direta, BI= bilirrubina indireta, DHL= desidrogenase láctica, CH= concentrado de hemácias, LRA= lesão renal aguda, DP= desvio padrão, IIQ= Intervalo interquartil.

A análise do perfil hematológico entre os participantes, evidenciou valores abaixo do normal em eritrócitos (deficientes: 2,6 milhões/mm³; não deficientes: 3,6 milhões/mm³; p= 0,0655), hematócrito (Ht) (deficientes: 22,4%; não deficientes: 29,1%; p= 0,0716), e hemoglobina (Hb) (deficientes: 7,7 g/dL; não deficientes: 9,7 g/dL; p= 0,0661). Trombocitopenia foi observada em não deficientes (deficientes: 194000/mm³; não deficientes: 71000/mm³; p= 0,1263). Em dG6PD, houve maior frequência de anemia e icterícia (intensidade ++) (58,3% e 88,9%), respectivamente.

Em relação ao perfil hepático e renal desses pacientes, observou-se aumento dos marcadores: bilirrubina total (BT) (deficientes: 2,4 mg/dL; não deficientes: 1,9 mg/dL; p= 0,9516), bilirrubina direta (BD) (deficientes: 0,5 mg/dL; não deficientes: 0,8 mg/dL; p= 0,6668), bilirrubina indireta (BI) (deficientes: 1,6 mg/dL; não deficientes: 1,2 mg/dL; p= >0,999), desidrogenase láctica (DHL) (deficientes: 1424 U/L; não deficientes: 601 U/L; p= 0,1391) e glicose (deficientes: 116,9 mg/dL; não deficientes: 147 mg/dL). Elevação nos níveis de transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP) foi observado apenas em dG6PD (deficientes: 62 U/L; não deficientes: 35 U/L; p= 0,2565) e (deficientes: 59 U/L; não deficientes: 36 U/L; p= 0,1674), respectivamente (Tabela I).

Além disso, hemoglobinúria (81,8%) e proteinúria (63,6%) foram observadas em ambos os grupos. Bilirrubinúria (27,3%), transfusão (CH) (56,3%), LRA (12,5%) e diálise (12,5%) foram relatadas somente no grupo de deficientes (Tabela I).

Ao analisar a genotipagem de G6PD, observou-se que a variante Africana A-(G202A/A376G) apresentou maior frequência (55,6%), Africana A+ (A376G) e a variante Mediterrânea (C563T) apresentaram frequências de 11,1% e 5,6%, respectivamente. Cinco (27,8%) participantes não apresentaram nenhuma das variantes analisadas, sendo classificados como tipo selvagem (Figura 2 e Tabela II). Os dados de dosagem enzimática de G6PD

mostraram status fenotípico variando desde deficientes (≤ 3.9 UI/gHb), intermediários (4.0 – 6.0 UI/gHb) até normais (≥ 4.0 UI/gHb homens, ≥ 6.0 UI/gHb mulheres) (Tabela III).

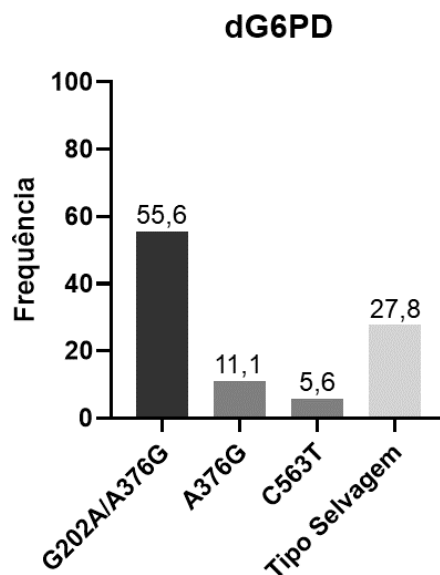


Figura 2: Frequência de variantes de G6PD. dG6PD= deficientes de G6PD; G202A/A376G= Africana A-; A376G= Africana A+; C563T= Mediterrânea.

Tabela II

Frequência alélica de *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4* e G6PD, e fenótipo predito de *CYP2C19* e *CYP2D6*

Gene	Alelo	Total (N= 18)		dG6PD (N= 13)		Não dG6PD (N= 5)		p valor
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	
<i>CYP2C19</i>	*1	28	77,8	19	73,1	9	90,0	0,269
	*2	4	11,1	4	15,4	-	-	0,254
	*17	4	11,1	3	11,5	1	10,0	0,695
	gNM	10	55,6	6	46,1	4	80,0	0,225
	gIM	4	22,2	4	30,8	-	-	0,234
	gRM	4	22,2	3	23,1	1	20,0	0,701
<i>CYP2D6</i>	*1	14	77,8	11	84,6	3	60,0	0,299
	*2	7	38,9	7	53,8	-	-	0,054
	*4	3	16,7	1	7,7	2	40,0	0,172
	*5	1	5,6	-	-	1	20,0	0,278
	*17	3	16,7	2	15,4	1	20,0	0,650
	*29	1	5,6	1	7,7	-	-	0,722
	*34	5	27,8	3	23,1	2	40,0	0,433
	*35	1	5,6	-	-	1	20,0	0,278
	*1x	1	5,6	1	7,7	-	-	0,722
	gNM	13	72,2	11	84,6	2	40,0	0,099
gIM	4	22,2	1	7,7	3	60,0	0,044	

CYP3A4	gUM	1	5,6	1	7,7	-	-	0,722
	*1	31	86,1	24	92,3	7	70,0	0,119
	*1B	5	13,9	2	7,7	3	30,0	0,119
G6PD	A+	2	11,1	2	15,4	-	-	-
	A-	10	55,6	10	76,9	-	-	-
	Mediterrâneo	1	5,6	1	7,7	-	-	-
	Selvagem	5	27,8	-	-	5	100,0	-

Abreviações: dG6PD= deficiente de G6PD, gNM= metabolizador normal, gIM= metabolizador intermediário, gRM= metabolizador rápido, gUM= metabolizador ultrarrápido, A+= variante Africana (A376G), A- = variante Africana (G202A/A376G), símbolo * é referente ao alelo estrela.

Tabela III

Genotipagem de *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4* e G6PD em deficientes e não deficientes

ID	Variante G6PD	Dosagem de G6PD	<i>CYP2C19</i>		<i>CYP2D6</i>		CNV	<i>CYP3A4</i> Genótipo
			Genótipo	Fenótipo	Genótipo	Fenótipo		
HPQ01	G202A/A376G	2.5	*1/*1	gNM	*1/*2	gNM	2	*1/*1B
HPQ02	G202A/A376G	5.0	*1/*17	gRM	*1/*29	gNM	2	*1/*1B
HPQ03	G202A/A376G	3.1	*1/*2	gIM	*1/*34	gNM	3	*1/*1
HPQ04	G202A/A376G	2.3	*1/*1	gNM	*1/*34	gNM	2	*1/*1
HPQ05	A376G	1.7	*1/*1	gNM	*1/*2	gNM	2	*1/*1
HPQ06	C563T	1.8	*1/*1	gNM	*1/*34	gNM	2	*1/*1
HPQ07	G202A/A376G	2.6	*1/*1	gNM	*2/*4	gIM	2	*1/*1
HPQ08	G202A/A376G	3.0	*1/*2	gIM	*2/*17	gNM	2	*1/*1
HPQ09	G202A/A376G	1.7	*1/*1	gNM	*1/*2	gNM	2	*1/*1
HPQ10	A376G	2.0	*1/*17	gRM	*1/*17	gNM	2	*1/*1
HPQ11	G202A/A376G	2.2	*1/*17	gRM	*1/*1x3	gUM	3	*1/*1
HPQ12	G202A/A376G	6.0	*1/*2	gIM	*1/*2	gNM	1	*1/*1

HPQ13	G202A/A376G	5.7	*1/*2	gIM	*1/*2	gNM	2	*1/*1
HPQ14	SELVAGEM	7.2	*1/*17	gRM	*1/*34	gNM	2	*1/*1
HPQ15	SELVAGEM	7.8	*1/*1	gNM	*1/*4	gIM	2	*1/*1
HPQ16	SELVAGEM	10.5	*1/*1	gNM	*1/*34	gNM	1	*1/*1B
HPQ17	SELVAGEM	9.7	*1/*1	gNM	*4/*17	gIM	2	*1/*1B
HPQ18	SELVAGEM	8.4	*1/*1	gNM	*5/*35	gIM	1	*1/*1B

Abreviações: G202A/A376G= Africana A-; A376G= Africana A+; C563T= Mediterrânea, CNV= variação do número de cópias, gNM= metabolizador normal, gIM= metabolizador intermediário, gRM= metabolizador rápido, gUM= metabolizador ultrarrápido, símbolo * é referente ao alelo estrela.

A genotipagem de *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4* não mostrou diferença estatisticamente significativa na frequência dos alelos entre os grupos ($p > 0,05$). O alelo *CYP2C19*1* (função normal) teve maior frequência (deficientes: 73,1%; não deficientes: 90%; $p = 0,269$). *CYP2C19*2* (função nula) esteve presente somente no grupo de dG6PD (15,4%) ($p = 0,254$), e *CYP2C19*17* (função aumentada) teve frequência de 11,5% e 10,0% ($p = 0,695$) em dG6PD e não dG6PD, respectivamente (Figura 3 e Tabela II). O alelo *3 não foi encontrado em nenhuma amostra (Tabela III).

Em *CYP2D6*, as frequências dos alelos de função nula (*4, *5), função diminuída (*17, *29) e função normal (*1, *2, *34, *35) foram semelhantes entre os grupos ($p > 0,05$), sendo *1 o alelo mais frequente (deficientes: 84,6%; não deficientes: 60,0%; $p = 0,299$). *CYP2D6*2* esteve presente somente no grupo de dG6PD (53,8%) ($p = 0,054$). A análise de CNV identificou 2 indivíduos (11,1%) com multiplicações (Tabela III), e a frequência de alelo ultrarrápido (*1xN) foi de 7,7%, observado apenas no grupo de deficientes ($p = 0,722$) (Figura 3 e Tabela II).

Em relação a frequência de *CYP3A4*, o alelo *1 (função normal) apresentou maior frequência entre os grupos (deficientes: 92,3%; não deficientes: 70,0%; $p = 0,119$), e *CYP3A4*1B* teve frequência de 7,7% e 30,0% ($p = 0,119$) em dG6PD e não dG6PD, respectivamente (Figura 3 e Tabela II).

As frequências de fenótipos preditos de *CYP2C19* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$). O metabolizador normal (gNM) teve frequência de 46,1% no grupo dG6PD e 80,0% no grupo não dG6PD ($p = 0,225$), e o metabolizador rápido (gRM) teve frequências de 23,1% e 20,0% ($p = 0,701$) em dG6PD e não dG6PD, respectivamente. O metabolizador intermediário (gIM) foi observado apenas em dG6PD (30,8%) ($p = 0,234$).

O fenótipo predito de *CYP2D6* mostrou diferença significativa apenas para gIM, com frequências de 7,7% e 60,0% ($p = 0,044$) em deficientes e não deficientes, respectivamente. O fenótipo gNM teve frequência de 84,6% em dG6PD e 40,0% em não dG6PD ($p = 0,099$), e o metabolizador ultrarrápido (gUM) foi encontrado somente em dG6PD (7,7%) ($p = 0,722$). Dados de frequências fenotípicas de CYP são relatados na figura 3 e tabela II.

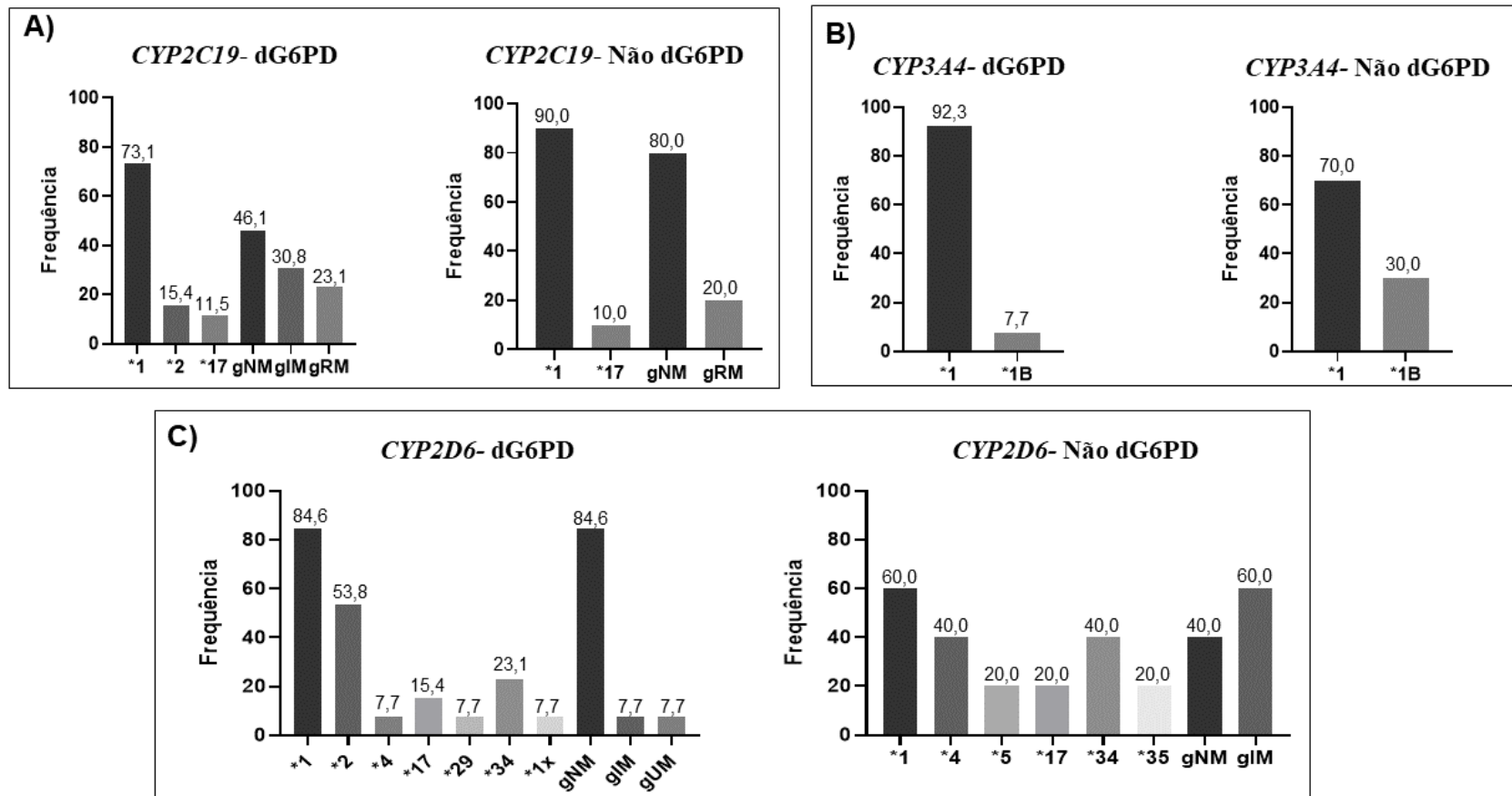


Figura 3: Frequência de *CYP2C19*, *CYP3A4* e *CYP2D6* em deficientes e não deficientes de G6PD. A) Frequência de alelos e fenótipos de *CYP2C19*; B) Frequência de alelos de *CYP3A4*; C) Frequência de alelos e fenótipos de *CYP2D6*; dG6PD= deficientes de G6PD; gNM= metabolizador normal; gIM= metabolizador intermediário; gRM= metabolizador rápido; gUM= metabolizador ultrarrápido; símbolo * é referente ao alelo estrela.

As comparações do perfil clínico e laboratorial em deficientes de G6PD e fenótipos de *CYP2C19*, *CYP2D6* e genótipo de *CYP3A4*, mostraram diferença estatisticamente significativa entre as variantes de G6PD, bilirrubina total e frações, TGP e ureia ($p < 0,05$) (Tabela IV).

O genótipo *1/*1 de *CYP3A4* esteve presente nos dG6PD com as variantes G202A/A376G e C563T (90,1% e 9,1%; $p = 0,013$), respectivamente. Já o genótipo *1/*1B, esteve presente somente em indivíduos com a variante A376G (100,0%; $p = 0,013$). Para *CYP2C19* e *CYP2D6*, as variantes de G6PD mostraram-se igualmente distribuídas ($p > 0,05$) (Tabela IV).

Entre os dG6PD com gRM de *CYP2C19* foi observado maior nível sérico de BT (gNM: 0,5 mg/dL; gIM: 0,3 mg/dL; gRM: 1,3 mg/dL; $p = 0,0494$). O mesmo foi observado em TGP (gNM: 57,5 U/L; gIM: 39 U/L; gRM: 154 U/L; $p = 0,0052$) (Tabela IV).

Pacientes dG6PD com gUM de *CYP2D6* apresentaram maior nível sérico de BT (gNM: 2,3 mg/dL; gIM: 0,8 mg/dL; gUM: 8,8 mg/dL; $p = 0,0048$), BD (gNM: 0,5 mg/dL; gIM: 0,3 mg/dL; gUM: 5,3 mg/dL; $p < 0,0001$) e BI (gNM: 1,6 mg/dL; gIM: 0,5 mg/dL; gUM: 5,3 mg/dL; $p = 0,0392$). O aumento de ureia foi observado em indivíduos com gUM de 2D6 (gNM: 43 mg/dL; gIM: 10 mg/dL; gUM: 277 mg/dL; $p = 0,0256$).

As comparações do perfil clínico e laboratorial em não deficientes de G6PD, não apresentaram diferença estatística significativa entre os fenótipos enzimáticos de *CYP2C19*, *CYP2D6* e genótipos de *CYP3A4* ($p > 0,05$), embora, tenha se observado aumento na maioria dos marcadores hepáticos e renais analisados (Tabela V).

Tabela IV

Aspecto hemolítico em deficientes de G6PD com fenótipos e genótipos de CYP

Características	CYP2C19 (N= 13)				CYP2D6 (N= 13)				CYP3A4 (N= 13)		
	gNM	gIM	gRM	p Valor	gNM	gIM	gUM	p Valor	*1/*1	*1/*1B	p Valor
A376G, n/N (%)	1 (16,7)	-	1 (25,0)		2 (18,2)	-	-		-	2 (100,0)	
G202A/ A376G, n/N (%)	4 (66,7)	4 (100,0)	2 (50,0)	0,860	8 (72,7)	1 (100,0)	1 (100,0)	>0,999	10 (90,9)	-	0,013
C563T, n/N (%)	1 (16,7)	-	-		1 (9,1)	-	-		1 (9,1)	-	
Anemia Leve (Hb), n/N (%)	-	-	-		-	-	-		-	-	
Anemia Moderada (Hb), n/N (%)	4 (66,7)	1 (25,0)	1 (33,3)	0,493	5 (45,4)	1 (100,0)	-	>0,999	5 (45,4)	1 (50,0)	0,731
Anemia Grave (Hb), n/N (%)	2 (33,3)	3 (75,0)	2 (66,7)		6 (54,5)	-	1 (100,0)		6 (54,5)	1 (50,0)	
BT (mg/dL), mediana (IIQ)	2,6 (1,5- 4,2)	1,1 (0,8- 1,7)	4,4 (2,4- 8,8)	0,0614	2,3 (1,2- 3,8)	0,8 (-)	8,8 (-)	0,0048	2,1 (1,0- 3,6)	3,5 (2,6- 4,4)	0,2827
BD (mg/dL), mediana (IIQ)	0,5 (0,3- 0,8)	0,3 (0,3- 0,8)	1,3 (1,0- 5,3)	0,0494	0,5 (0,4-1,0)	0,3 (-)	5,3 (-)	<0,0001	0,4 (0,3- 1,0)	0,9 (0,5- 1,3)	0,3277
BI (mg/dL), mediana (IIQ)	2,1 (1,1- 3,5)	0,7 (0,4- 1,0)	3,1 (1,4- 3,5)	0,0615	1,6 (0,8- 3,1)	0,5 (-)	5,3 (-)	0,0392	1,2 (0,6- 3,2)	2,6 (2,1- 3,1)	0,3902
TGO (U/L), mediana (IIQ)	53 (35,7- 83,2)	76,5 (34,7- 121,3)	99 (62- 120)	0,4295	62 (36- 114)	45 (-)	99 (-)	0,5901	61 (36- 101)	88 (62- 114)	0,4298
TGP (U/L), mediana (IIQ)	57,5 (44,7- 60,2)	39 (15,7- 61,5)	154 (69- 204)	0,0052	59 (41- 66)	56 (-)	154 (-)	0,5513	56 (41- 66)	64,5 (60- 96)	0,3237
DHL (U/L), mediana (IIQ)	2119 (878,5- 4555)	1251 (574- 2422)	1424 (772- 2044)	0,5023	1424 (835- 2786)	859 (-)	2044 (-)	0,7818	1251 (859- 2119)	3692 (1424- 5960)	0,2386
Glicose (mg/dL), média (DP)	106,4 (26,8)	128,5 (53,0)	126,7 (16,6)	0,5647	117,6 (28,1)	84 (-)	144 (-)	0,3689	117,5 (30,2)	111 (-)	0,8614
Creatinina (mg/dL), mediana (IIQ)	1,0 (0,7- 1,3)	2,3 (0,3- 5,9)	0,8 (0,7- 9,7)	0,9864	1,0 (0,7- 1,6)	0,5 (-)	9,7 (-)	0,0769	1,0 (0,7- 4,0)	1,0 (0,7- 1,3)	0,7669

Ureia (mg/dL), mediana (IIQ)	43,5 (33,2- 66)	92 (18- 212,5)	41 (28- 277)	0,4355	43 (28- 75)	10 (-)	277 (-)	0,0256	43 (18- 166)	58 (41- 75)	0,7665
Hemoglobinúria, n/N (%)	5 (83,3)	2 (100,0)	1 (50,0)	0,667	7 (77,8)	1 (100,0)	-	0,800	6 (75,0)	2 (100,0)	0,622
Proteinúria, n/N (%)	4 (66,7)	1 (50,0)	1 (50,0)	>0,999	6 (66,7)	-	-	0,400	4 (50,0)	2 (100,0)	0,333
Bilirrubinúria, n/N (%)	3 (50,0)	-	-	0,300	3 (33,3)	-	-	0,700	2 (25,0)	1 (50,0)	0,533

Abreviações: Hb= hemoglobina, BT= bilirrubina total, BD= bilirrubina direta, BI= bilirrubina indireta, DHL= desidrogenase láctica, G202A/A376G= Africana A-; A376G= Africana A+; C563T= Mediterrânea, gNM= metabolizador normal, gIM= metabolizador intermediário, gRM= metabolizador rápido, gUM= metabolizador ultrarrápido, DP= desvio padrão, IIQ= Intervalo interquartil. símbolo * é referente ao alelo estrela.

Tabela V

Aspecto hemolítico em não deficientes de G6PD com fenótipos e genótipos de CYP

Características	CYP2C19 (N= 5)				CYP2D6 (N= 5)				CYP3A4 (N= 5)		
	gNM	gIM	gRM	p Valor	gNM	gIM	gUM	P Valor	*1/*1	*1/*1B	p Valor
Selvagem, n/N (%)	4 (100,0)	-	1 (100,0)	-	2 (100,0)	3 (100,0)	-	-	2 (100,0)	3 (100,0)	-
Sem anemia (Hb), n/N (%)	1 (25,0)	-	-		-	1 (33,3)	-		1 (50,0)	-	
Anemia Leve (Hb), n/N (%)	1 (25,0)	-	-		-	1 (33,3)	-		-	1 (33,3)	
Anemia Moderada (Hb), n/N (%)	1 (25,0)	-	1 (25,0)	>0,999	1 (33,3)	1 (33,3)	-	>0,999	1 (50,0)	1 (33,3)	>0,999
Anemia Grave (Hb), n/N (%)	1 (25,0)	-	-		1 (33,3)	-	-		-	1 (33,3)	

BT (mg/dL), mediana (IIQ)	2,3 (1,5- 12,1)	-	0,9 (-)	0,1797	6,5 (0,9- 12,1)	1,9 (1,5- 2,3)	-	>0,999	1,2 (0,9- 1,5)	7,2 (2,3- 12,1)	0,1213
BD (mg/dL), mediana (IIQ)	1,0 (0,5- 7,0)	-	0,3 (-)	0,1797	3,6 (0,3- 7,0)	0,7 (0,5- 1,0)	-	>0,999	0,4 (0,3- 0,5)	4,0 (1,0- 7,0)	0,1213
BI (mg/dL), mediana (IIQ)	1,3 (1,0- 5,1)	-	0,6 (-)	0,1797	2,8 (0,6- 5,1)	1,1 (1,0- 1,3)	-	>0,999	0,8 (0,6- 1,0)	3,2 (1,3- 5,1)	0,1213
TGO (U/L), mediana (IIQ)	45,5 (32- 94)	-	33 (-)	0,4795	82,5 (33- 132)	35 (29- 56)	-	0,5637	44,5 (33- 56)	35 (29- 132)	>0,999
TGP (U/L), mediana (IIQ)	33,5 (28- 112,5)	-	36 (-)	>0,999	112 (36- 188)	30 (26- 37)	-	0,2482	33 (30- 36)	37 (26- 188)	0,5637
DHL (U/L), mediana (IIQ)	601 (414- 1613)	-	-	-	1613 (-)	507,5 (414- 601)	-	0,2207	-	601 (414- 1613)	-
Glicose (mg/dL), média (DP)	147 (-)	-	-	-	-	147 (-)	-	-	-	147 (-)	-
Creatinina (mg/dL), mediana (IIQ)	1,3 (0,45- 2,3)	-	0,4 (-)	0,2765	0,4 (0,4- 0,5)	2,2 (0,4- 2,4)	-	0,3743	0,4 (-)	2,2 (0,5- 2,4)	0,0756
Ureia (mg/dL), mediana (IIQ)	42,5 (31,5- 59)	-	20 (-)	0,1573	28 (20- 36)	49 (27- 69)	-	0,2482	23,5 (20- 27)	49 (36- 69)	0,0833
Hemoglobinúria, n/N (%)	1 (100,0)	-	-	-	-	1 (100,0)	-	-	-	1 (100,0)	-
Proteinúria, n/N (%)	1 (100,0)	-	-	-	-	1 (100,0)	-	-	-	1 (100,0)	-
Bilirrubinúria, n/N(%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abreviações: Hb= hemoglobina, BT= bilirrubina total, BD= bilirrubina direta, BI= bilirrubina indireta, DHL= desidrogenase láctica, gNM= metabolizador normal, gIM= metabolizador intermediário, gRM= metabolizador rápido, gUM= metabolizador ultrarrápido, DP= desvio padrão, IIQ= Intervalo interquartil. símbolo * é referente ao alelo estrela.

DISCUSSÃO

Os antimaláricos PQ e TQ são as únicas drogas eficazes que eliminam estágios hepáticos do *P. vivax* e evitam recaídas. No entanto, essa classe de 8-aminoquinolinas pode causar hemólise em indivíduos com baixa atividade da enzima G6PD(29). A prevalência da deficiência de G6PD na população masculina é relatada em diversos estudos ao redor do mundo e também na região Amazônica (11,16,30). O presente estudo encontrou maior frequência de dG6PD em homens (72,2%), em comparação com 27,8% em mulheres. A variante Africana A- (G202A/A376G) foi a mais comum, cerca de 55,6%, seguida da Africana A+ (A376G) (11,1%) e Mediterrânea (C563T) (5,6%).

O diagnóstico fenotípico em mulheres heterozigotas permanece um desafio, visto que pode ocorrer a inativação aleatória do cromossomo X (Lionização) resultando em mosaicismo, consequentemente, cerca de metade dos eritrócitos são normais e a outra metade são deficientes em G6PD (9,31). A maioria das mulheres identificadas em nosso estudo, apresentaram heterozigose para variação Africana A-, o que reforça a atividade enzimática de G6PD em valores mais elevados, classificando-as como deficientes intermediárias. Em contraste, a paciente com heterozigose para variante Africana A+ teve a atividade enzimática mais baixa, fator este que pode ter influenciado na gravidade do quadro de hemólise, juntamente com a presença de gRM de *CYP2C19*.

Em nosso estudo, a análise de frequência alélica em *CYP2C19*, mostrou que o alelo *1 (77,8%) apresentou maior frequência, corroborando com os achados de Biswas (2020), onde 37,9% (IC 95% 36–40%) apresentaram o alelo *1, dados obtidos de 26 populações do projeto 1000 Genomas Fase III (32). Em uma revisão sistemática realizada por Rodrigues-Soares (2018), os alelos *CYP2C19**2 e *CYP2C19**17 apresentam maior frequência em negros na população brasileira, 0,16% e 0,20%, respectivamente(33), e em nosso estudo, a frequência desses alelos foi de 11,1%.

Em *CYP2D6* o alelo *1, seguido do *2 apresentaram as maiores frequências, 77,8% e 38,9%, respectivamente. No Brasil, os alelos *1 e *2 são os mais frequentes e amplamente distribuídos em diferentes regiões geográficas (20,22). *CYP3A4**1 também teve maior frequência (86,1%), similar ao observado em um estudo de recorrência de *Plasmodium vivax* na Amazônia brasileira (84,7%) (22).

Estudos já relataram a anemia hemolítica aguda (AHA) após o uso da PQ em deficientes de G6PD (17,29,34). Na região Amazônica, achados relevantes sobre a hemólise induzida por PQ, incluindo deficientes de G6PD com anemia grave, lesão renal aguda (LRA) e transfusão de sangue foram relatados (35,36). Porém, pouco se conhece a respeito da influência de alterações genéticas em CYP e complicações clínicas na terapia com PQ nessa população.

O tratamento com PQ não é isento de riscos, sua bioativação via enzima CYP2D6 gera metabólitos instáveis que são capazes de iniciar ciclo redox e produzir estresse oxidativo. Especula-se então, se os metabólitos gerados, especialmente 5-hidroxiprimaquina, desempenham algum papel na toxicidade hemolítica de PQ, e se a mesma via metabólica responsável pela eficácia também é responsável pela toxicidade hemolítica. Em vista disso, os dG6PD estariam mais suscetíveis à hemólise induzida por PQ (18).

As crises hemolíticas frequentemente são relatadas com icterícia, dor abdominal, febre e urina escura, o exame de sangue mostra anemia moderada a muito grave, aumento dos níveis de DHL sérica e bilirrubina indireta (não conjugada), plaquetas geralmente normais e haptoglobina é baixa ou indetectável (10). Considerando esses parâmetros, os pacientes dG6PD analisados apresentaram o pior quadro hemolítico durante a internação, em comparação aos não dG6PD, com baixa significativa da série vermelha no hemograma (eritrócitos, Ht e Hb) e aumento dos marcadores hepáticos e renais, necessitando, inclusive, de transfusão de concentrado de hemácias e diálise. Logo, esses pacientes também apresentaram maiores complicações clínicas e laboratoriais quando comparado os fenótipos preditos em *CYP2C19*, *CYP2D6*, e genótipo de *CYP3A4*. BD e TGP mostraram significância estatística entre os fenótipos de *CYP2C19*. Entre os fenótipos de *CYP2D6*, houve significância estatística em BT, BD, BI e ureia. Já em *CYP3A4*, indivíduos com genótipo *1/*1B tiveram níveis mais elevados de todos os marcadores, exceto glicose e creatinina ($p > 0,05$). Esses achados ainda não permitem afirmar a devida influência dessas alterações genéticas no processo de hemólise, apesar dos metabolizadores rápidos e ultrarrápidos mostrarem maior impacto clínico.

Em estudos avaliando a farmacocinética da PQ com metabolizadores de CYP2D6, observou-se que a concentração da droga estaria mais elevada em gPM, e haveria pouca ou nenhuma produção de metabólitos ativos responsáveis pela eficácia, isso resultaria em recaída e falha. Em gIM, os metabólitos ativos não alcançariam a resposta desejada, e o cenário clínico dependeria da gravidade de deficiência enzimática de CYP2D6, peso corporal total e dose total administrada, levando à terapia alternativa e orientação ao paciente para procurar tratamento

médico caso os sintomas da malária reaparecessem(18). Em gUM, o desfecho clínico com PQ continua indeterminado(18), no entanto, sugere-se que o fenótipo ultrarrápido de *CYP2D6* seja menos suscetível à recorrência e falha da primaquina(22).

Vale ressaltar que esse trabalho apresentou algumas limitações como: baixo número de pacientes incluídos, já que a hemólise é um evento raro o que dificulta o seu estudo com grande número de participantes; os dados clínicos e laboratoriais foram coletados retrospectivamente o que muitas vezes dificultou acesso de informações necessárias para inclusão. Por outro lado, os resultados desse estudo sugerem que a farmacogenética tem potencial para auxiliar na correta administração da PQ, sendo uma das vantagens para os deficientes de G6PD que necessitam fazer uso deste medicamento.

Portanto, estratégias de dosagem personalizada e futura implementação de testes farmacogenéticos para o melhor manejo dos pacientes faz-se necessário, uma vez que já é conhecido que a metabolização da PQ por variados fenótipos enzimáticos das CYPs pode contribuir para hemólise grave, aumentando assim, os riscos de hospitalizações (6,8,22,37), além da importância de diagnosticar a enzimopatia eritrocitária (G6PD) antes do tratamento com PQ (3,38),

CONCLUSÃO

Nossos resultados indicaram a predominância da variante Africana A- (G202A/A376G) entre os deficientes de G6PD de uma área endêmica de malária, na região norte do Brasil. Os dG6PD apresentaram o pior quadro hemolítico durante a internação, e a comparação de fenótipo predito da *CYP2C19* e *CYP2D6* com o perfil clínico e laboratorial desses indivíduos, identificou gRM e gUM com os mais elevados níveis séricos de marcadores hepáticos e renais. O genótipo *1/*1B de *CYP3A4* teve maior impacto clínico nos dois grupos.

Esses achados reforçam a importância de estudos com maior número de participantes com deficiência de G6PD que permitirão validar sua prevalência e determinar a influência das variantes genéticas de *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4* no processo hemolítico de deficientes de G6PD com malária *vivax* na região amazônica.

AGRADECIMENTOS

A todos os participantes pela disposição em participar no estudo. Agradecimentos à Ana Carolina Shuan, Lybia Sarraff e Victor Irungu pela colaboração com o recrutamento, coleta e

análises de dados de participantes. Agradecemos também às agências financiadoras: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

CONFLITOS DE INTERESSES

Os autores declaram não possuir conflito de interesse.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

MMM - coleta de dados e amostras, procedimentos laboratoriais, análise e interpretação de dados e redação; GSS, ACO e ACGA - procedimentos laboratoriais, análise e interpretação de dados; ACGA e GCM – revisão crítica e edição do manuscrito. Todos os autores aprovaram esta versão do manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. 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.
2. Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Heal*. 2017;5(10):e1038–46.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização, Transmissíveis. e D. Guia de tratamento da malária no Brasil. 2.ed. Ministério da Saúde, organizador. Brasília; 2020. 75 p.
4. Chu CS, Freedman DO. Tafenoquine and g6pd: A primer for clinicians. *J Travel Med*. 2019;26(4):1–11.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência T e IE. Triagem neonatal para deficiência de enzima desidrogenase de glicose hepática (glicose-6- fosfato desidrogenase , G-6-PD). Comissão Nac Tecnol do SUS. 2018;36.
6. 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.
7. Krudsood S, Tangpukdee N, Wilairatana P, Phophak N, Baird JK, Brittenham GM, et al. High-dose primaquine regimens against relapse of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78(5):736–40.
8. Baird JK. 8-Aminoquinoline Therapy for Latent Malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(4):1–68.
9. Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2016;30(2):373–93. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2015.11.006>
10. Lucio Luzzatto, Mwashungi Ally RN. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Blood*. 2021;

11. 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).
12. Santana MS, Monteiroa 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.
13. 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;254:251–4.
14. Pereira J, Neto DM, Dourado MV, Galvão M, Gonçalves MS. A novel c . 197T → A variant among Brazilian neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Genet Mol Biol.* 2008;35:33–5.
15. Monteiro WM, Val FFA, Siqueira AM, Franca GP, Sampaio VS, Melo GC, et al. G6PD deficiency in Latin America: Systematic review on prevalence and variants. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(5):553–68.
16. Dombrowski JG, Souza RM, Curry J, Hinton L, Silva NRM, Grignard L, et al. G6PD deficiency alleles in a malaria-endemic region in the Western Brazilian Amazon. *Malar J.* 2017;16(1):1–9.
17. Recht J, Ashley EA, White NJ. Use of primaquine and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency testing: Divergent policies and practices in malaria endemic countries. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(4):1–27.
18. 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 at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.011>
19. Muh Akbar Bahar, Didik Setiawan EH& WB. Pharmacogenomics of drug–drug interaction and drug–drug–gene interaction: a systematic review on CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6. *Pharmacogenomics J.* 2017;39.

20. Genro P, Sortica VA, Suarez-kurtz G, Friedrich DC, Ribeiro K, Romano-silva MA, et al. Distribution of CYP2D6 Alleles and Phenotypes in the Brazilian Population. *PLoS One*. 2014;9(10):5–12.
21. Chamnanphon M, Gaedigk A, Puangpetch A, Pasomsab E, Chantratita W, Longley RJ, et al. Pharmacogene variation in Thai Plasmodium vivax relapse patients treated with a combination of primaquine and chloroquine. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2020;13:1–12.
22. Cardoso JLM SY, Almeida ACG, Barbosa LRA S EL, Rodrigues MGA R-SF, Sampaio VS SA, Lacerda MVG, Monteiro WM MG. Influence of CYP2D6 , CYP3A4 and CYP2C19 Genotypes on Recurrence of Plasmodium vivax. *Front Trop Dis*. 2022;3(March):1–11.
23. WHO WHO. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. *Vitam Miner Nutr Inf Syst [Internet]*. 2011;1–6. Available at: <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>, a
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;116–24.
25. Nofziger C, Turner AJ, Sangkuhl K, Whirl-carrillo M, José AG, Black JL, et al. *PharmVar GeneReview: CYP2D6*. 2021;107(1):154–70.
26. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-carrillo M, Klein T, Leeder JS. Open Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Am Coll Med Genet Genomics*. 2017;19(1).
27. Caudle KE, Dunnenberger HM, Freimuth RR, Peterson JF, Burlison JD, Whirl-carrillo M, et al. Open Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results : consensus terms from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). *Am Coll Med Genet Genomics Orig*. 2017;19(2):215–23.
28. Lima JJ, Thomas CD, Barbarino J, Desta Z, Driest SL Van, Rouby N El, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2C19 and Proton Pump Inhibitor Dosing. *Clin Pharmacol Ther*. 2020;0(0):1–7.

29. 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 at: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2981-x>
30. Howes RE, Battle KE, Satyagraha AW, Baird JK, Hay SI. G6PD Deficiency. Global Distribution, Genetic Variants and Primaquine Therapy [Internet]. Vol. 81, *Advances in Parasitology*. Elsevier; 2013. 133–201 p. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407826-0.00004-7>
31. Chu CS, Bancone G, Nosten F, White NJ, Luzzatto L. Primaquine-induced haemolysis in females heterozygous for G6PD deficiency. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):1–9. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2248-y>
32. Biswas M. Global distribution of CYP2C19 risk phenotypes affecting safety and effectiveness of medications. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2020; Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41397-020-00196-3>
33. Rodrigues-soares F, Kehdy FSG, Andrade JSPXC, Zolini CCC, Aquino MM, Barreto ML, et al. Genetic structure of pharmacogenetic biomarkers in Brazil inferred from a systematic review and population-based cohorts : a RIBEF / EPIGEN-Brazil initiative. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2018; Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41397-018-0015-7>
34. Monteiro WM, Franca GP, Melo GC, Queiroz ALM, Brito M, Peixoto HM, et al. Clinical complications of G6PD deficiency in Latin American and Caribbean populations : systematic review and implications for malaria elimination programmes. *Malar J* [Internet]. 2014;13(1):1–13. Available at: *Malaria Journal*
35. 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;69:1440–2.
36. 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.

37. Avalos S, Mejia RE, Banegas E, Salinas C, Gutierrez L, Fajardo M, et al. G6PD deficiency, primaquine treatment, and risk of haemolysis in malaria-infected patients. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):1–11. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2564-2>
38. World Health Organization. Testing for G6PD deficiency for safe use of primaquine in radical cure of *P. vivax* and *P. ovale* malaria. *Glob Malar Program*. 2016;

5. CONCLUSÃO

Nossos resultados indicaram a predominância da variante Africana A- (G202A/A376G) entre os deficientes de G6PD de uma área endêmica de malária, na região norte do Brasil. Os dG6PD apresentaram o pior quadro hemolítico durante a internação, e a comparação de fenótipo predito da *CYP2C19* e *CYP2D6* com o perfil clínico e laboratorial desses indivíduos, identificou gRM e gUM com os mais elevados níveis séricos de marcadores hepáticos e renais. O genótipo *1/*1B de *CYP3A4* teve maior impacto clínico nos dois grupos.

Esses achados reforçam a importância de estudos com maior número de participantes com deficiência de G6PD que permitirão validar sua prevalência e determinar a influência das variantes genéticas de *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4* no processo hemolítico de deficientes de G6PD com malária *vivax* na região amazônica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. Silvino ACR. Recorrências na malária por *Plasmodium vivax*: variabilidade na enzima do complexo citocromo P450 2D6 (CYP2D6) e sua influência na falha terapêutica por primaquina [Internet]. Vol. 6. 2019. Available at: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/35371>
3. Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Heal*. 2017;5(10):e1038–46.
4. Krudsood S, Tangpukdee N, Wilairatana P, Phophak N, Baird JK, Brittenham GM, et al. High-dose primaquine regimens against relapse of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78(5):736–40.
5. Brito MAM, Peixoto HM, de Almeida ACG, de Oliveira MRF, Romero GAS, Moura-Neto JP, et al. Validation of the rapid test Carestart™ G6PD among malaria vivax-infected subjects in the Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(4):446–55.
6. 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 at: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2981-x>
7. Ganesan S, Tekwani BL, Sahu R, Tripathi LM, Walker LA. Cytochrome P450-dependent toxic effects of primaquine on human erythrocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2009;241(1):14–22. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2009.07.012>
8. 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 at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.011>
9. Zhou S. Polymorphism of Human Cytochrome P450 2D6 and Its Clinical Significance. 2009;48(11):689–723.
10. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2013;138(1):103–41. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>
11. Lynch T, Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician*. 2007;76(3):391–6.

12. Lover AA, Kevin Baird J, Gosling R, Price RN. Malaria elimination: Time to target all species. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;99(1):17–23.
13. Escalante AA. MALARIA MOLECULAR EPIDEMIOLOGY: AN EVOLUTIONARY GENETICS PERSPECTIVE. 2020;7(4):1–26.
14. Anete D, Alvarenga M De, Cu R, Pina-costa A De, César J, Jr DS, et al. An assay for the identification of Plasmodium simium infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. 2018;(September 2017):1–10.
15. Garrido-cardenas JA, González-cerón L, Manzano-agugliaro F. Plasmodium genomics : an approach for learning about and ending human malaria. 2019;1–27.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil. 2022;53.
17. WHO WHO. World malaria report 2021. 2021.
18. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização, Transmissíveis. e D. Guia de tratamento da malária no Brasil. 2.ed. Ministério da Saúde, organizador. Brasília; 2020. 75 p.
19. BRASIL M da SS de V em S. Epidemiological Report – Malaria 2020. Ministério da Saúde Secr Vigilância em Saúde Dep Imunização e Doenças Transm – Deidt. 2020;Número Esp.
20. David E. Golan co-editor AHT, Jr. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 3. ed. Koogan G, organizador. Rio de Janeiro; 2014. 1889 p.
21. 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 at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X)
22. Milner DA. Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(1):1–11.
23. Cheaveau J, Mogollon DC, Mohon MAN, Golassa L, Yewhalaw D, Pillai DR. Asymptomatic malaria in the clinical and public health context. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2019;17(12):997–1010. Available at: <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1693259>
24. Baird JK, Valecha N, Duparc S, White NJ, Price RN. Diagnosis and treatment of plasmodium vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(Suppl 6):35–51.
25. Dea-Ayuela MA, Galiana-Roselló C, Lalatsa A, Serrano DR. Applying Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) in the Diagnosis of Malaria, Leishmaniasis and Trypanosomiasis as Point-of-Care Tests (POCTs). *Curr Top Med Chem.* 2018;18(16):1358–74.
26. Elisa Burdino, MD, Guido Calleri, MD, Valeria Ghisetti M. Added value of loop-mediated isothermal amplification technology (LAMP) in real life for the diagnosis of malaria in travellers. *J Travel Med.* 2019;26(7):8.

27. Serra-Casas E, Guetens P, Chiheb D, Gamboa D, Rosanas-Urgell A. A pilot evaluation of alternative procedures to simplify LAMP-based malaria diagnosis in field conditions. *Acta Trop* [Internet]. 2019;200(August):105125. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105125>
28. Plewes K, Leopold SJ, Kingston HWF, Dondorp AM. Malaria: What's New in the Management of Malaria? *Infect Dis Clin North Am*. 2019;33(1):39–60.
29. Chu CS, Freedman DO. Tafenoquine and g6pd: A primer for clinicians. *J Travel Med*. 2019;26(4):1–11.
30. Baird JK. 8-Aminoquinoline Therapy for Latent Malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(4):1–68.
31. Chamnanphon M, Gaedigk A, Puangpetch A, Pasomsub E, Chantratita W, Longley RJ, et al. Pharmacogene variation in Thai Plasmodium vivax relapse patients treated with a combination of primaquine and chloroquine. *Pharmgenomics Pers Med*. 2020;13:1–12.
32. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência T e IE. Triagem neonatal para deficiência de enzima desidrogenase de glicose hepática (glicose-6- fosfato desidrogenase , G-6-PD). Comissão Nac Tecnol do SUS. 2018;36.
33. Howes RE, Battle KE, Satyagraha AW, Baird JK, Hay SI. G6PD Deficiency. Global Distribution, Genetic Variants and Primaquine Therapy [Internet]. Vol. 81, *Advances in Parasitology*. Elsevier; 2013. 133–201 p. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407826-0.00004-7>
34. Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2016;30(2):373–93. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2015.11.006>
35. Santana MS, Monteiroa 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.
36. Monteiro WM, Val FFA, Siqueira AM, Franca GP, Sampaio VS, Melo GC, et al. G6PD deficiency in Latin America: Systematic review on prevalence and variants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(5):553–68.
37. HUGO-Gene Nomenclature Commitee. HGNC [Internet]. [citado 31 de março de 2021]. Available at: <https://www.genenames.org/>
38. Lucio Luzzatto, Mwashungi Ally RN. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Blood*. 2021;
39. Dombrowski JG, Souza RM, Curry J, Hinton L, Silva NRM, Grignard L, et al. G6PD deficiency alleles in a malaria-endemic region in the Western Brazilian Amazon. *Malar J*. 2017;16(1):1–9.
40. Recht J, Ashley EA, White NJ. Use of primaquine and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency testing: Divergent policies and practices in malaria endemic countries. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(4):1–27.

41. Manjurano A, Sepulveda N, Nadjm B, Mtove G, Wangai H, Maxwell C, et al. African Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Alleles Associated with Protection from Severe Malaria in Heterozygous Females in Tanzania. *PLoS Genet.* 2015;11(2):1–14.
42. 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).
43. Nascimento JR, Brito-sousa JD, Gomes C, Melo MM, Carvalho P, Gomes F, et al. Articles 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 at: <https://doi.org/10.1016/j.lana.2022.100273>
44. World Health Organisation. Guide to G6PD deficiency rapid diagnostic testing to support P . vivax. 2018. 4–5 p.
45. Belfield KD, Tichy EM. Review and drug therapy implications of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Am J Heal Pharm.* 2018;75(3):97–104.
46. Chu CS, Bancone G, Nosten F, White NJ, Luzzatto L. Primaquine-induced haemolysis in females heterozygous for G6PD deficiency. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):1–9. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2248-y>
47. Elewa H, John K, Wilby KJ. A Review of Pharmacogenetics of Antimalarials and Associated Clinical Implications. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2017;
48. Kamiya C, Inui N, Hakamata A, Miyakawa S, Tanaka S, Uchida S, et al. Effect of co-administered inducer or inhibitor on omeprazole pharmacokinetics based on CYP2C19 genotype. *J Pharmacol Sci* [Internet]. 2019;139(4):361–6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2019.03.001>
49. Muh Akbar Bahar, Didik Setiawan EH& WB. Pharmacogenomics of drug–drug interaction and drug–drug–gene interaction: a systematic review on CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6. *Pharmacogenomics J.* 2017;39.
50. Taylor C, Crosby I, Yip V, Maguire P, Pirmohamed M, Turner RM. A Review of the Important Role of CYP2D6 in Pharmacogenomics. 2020;
51. Alcarás ICD. Descrição de marcadores InDel ligados ao cromossomo X com uso possível de primers internos [Internet]. 2018. Available at: <https://doi.org/10.11606/D.17.2019.tde-30052019-163246>
52. Carolina A, Silvino R, Kano S, Costa A, Fernandes J, Soares S. Novel Insights into Plasmodium vivax Therapeutic Failure : CYP2D6 Activity and Time of Exposure to Malaria Modulate the Risk of Recurrence. 2020;64(5):1–14.
53. Ahmed S, Zhou Z, Zhou J, Chen SQ. Pharmacogenomics of Drug Metabolizing Enzymes and Transporters: Relevance to Precision Medicine. Vol. 14, Genomics, Proteomics and Bioinformatics. 2016. p. 298–313.
54. Zhou SF, Liu JP, Chowbay B. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev.* 2009;41(2):89–295.

55. Meyer UA. Pharmacogenetics - Five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev Genet.* 2004;5(9):669–76.
56. Nofziger C, Turner AJ, Sangkuhl K, Whirl-carrillo M, José AG, Black JL, et al. *PharmVar GeneReview: CYP2D6.* 2021;107(1):154–70.
57. Caudle KE, Dunnenberger HM, Freimuth RR, Peterson JF, Burlison JD, Whirl-carrillo M, et al. Open Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results : consensus terms from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). *Am Coll Med Genet Genomics Orig.* 2017;19(2):215–23.
58. Lima JJ, Thomas CD, Barbarino J, Desta Z, Driest SL Van, Rouby N El, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2C19 and Proton Pump Inhibitor Dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2020;0(0):1–7.
59. I Fricke-Galindo, C Céspedes-Garro, F Rodrigues-Soares, MEG Naranjo DÁ, F DA, M L-L, Peñas-Lledó E, LLerena A. Interethnic variation of CYP2C19 alleles , ‘ predicted ’ phenotypes and ‘ measured ’ metabolic phenotypes across world populations. 2016;(July 2015):113–23.
60. Biswas M. Global distribution of CYP2C19 risk phenotypes affecting safety and effectiveness of medications. *Pharmacogenomics J [Internet].* 2020; Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41397-020-00196-3>
61. Sim SC, Risinger C, Dahl M. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. 2006;103–13.
62. Almeida AC, Beatriz A, Elias R, Marques MP, Melo C De, Guimarães A, et al. Impact of *Plasmodium vivax* malaria and antimalarial treatment on cytochrome P450 activity in Brazilian patients Authors. 2020;0–2.
63. Ariffin NM, Islahudin F, Kumolosasi E, Makmor-Bakry M. Effects of MAO-A and CYP450 on primaquine metabolism in healthy volunteers. *Parasitol Res.* 2019;118(3):1011–8.
64. 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.
65. 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.
66. Mcdonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, Altman RB, et al. *Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine.* 2012;92(4):414–7.
67. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-carrillo M, Klein T, Leeder JS. Open Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Am Coll Med Genet Genomics.* 2017;19(1).
68. 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.

69. Genro P, Sortica VA, Suarez-kurtz G, Friedrich DC, Ribeiro K, Romano-silva MA, et al. Distribution of CYP2D6 Alleles and Phenotypes in the Brazilian Population. *PLoS One*. 2014;9(10):5–12.
70. 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;116–24.
71. 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 at: <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2139-7>
72. Werk AN, Cascorbi I. Functional gene variants of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther*. 2014;96(3):340–8.
73. Westlind-Johnsson A, Hermann R, Huennemeyer A, Hauns B, Lahu G, Nassr N, et al. Identification and characterization of CYP3A4*20, a novel rare CYP3A4 allele without functional activity. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;79(4):339–49.
74. Zhou XY, Hu XX, Wang CC, Lu XR, Chen Z, Liu Q, et al. Enzymatic activities of CYP3A4 allelic variants on quinine 3-hydroxylation in vitro. *Front Pharmacol*. 2019;10(MAY).
75. López-García MA, Feria-Romero IA, Serrano H, Rayo-Mares D, Fagiolino P, Vázquez M, et al. Influence of genetic variants of CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 on antiepileptic drug metabolism in pediatric patients with refractory epilepsy. *Pharmacol Reports* [Internet]. 2017;69(3):504–11. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2017.01.007>
76. Shi W, Tang H, Zhai S. Effects of the CYP3A4 Δ 1B Genetic Polymorphism on the Pharmacokinetics of Tacrolimus in Adult Renal Transplant Recipients : A Meta-Analysis. 2015;1–14.
77. Cai N, Zhang X, Zheng C, Zhu L, Zhu M, Cheng Z, et al. A novel random forest integrative approach based on endogenous CYP3A4 phenotype for predicting tacrolimus concentrations and dosages in Chinese renal transplant patients. 2019;(September):1–6.
78. Świechowski R, Jeleń A, Mirowski M, Talarowska M, Gałecki P, Pietrzak J, et al. Estimation of CYP3A4*1B single nucleotide polymorphism in patients with recurrent Major Depressive Disorder. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(6):1–7.
79. Fabiana B. Kohlrausch AC, Hutz MH. Characterization of CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4 and CYP3A5 polymorphisms in South Brazilians. *Mol Biol Rep*. 2014;1453–60.
80. Gil P, Piedade R. The pharmacogenetics of antimalaria artemisinin combination therapy. 2011;1185–200.
81. Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J*. 2011;11(4):274–86.

82. Kang YS, Park SY, Yim CH, Kwak HS, Gajendrarao P, Krishnamoorthy N, et al. The CYP3A4*18 genotype in the cytochrome P450 3A4 gene, a rapid metabolizer of sex steroids, is associated with low bone mineral density. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;85(3):312–8.
83. STANDARD™. G6PD test [Internet]. 2019. Available at: www.sdbiosensor.com
84. LTDA ED. G6PD STRIP ECO Teste - TR.0054 [Internet]. 2019. p. 6–8. Available at: www.ecodiagnostica.com.br
85. 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;254:251–4.
86. Pereira J, Neto DM, Dourado MV, Galvão M, Gonçalves MS. A novel c . 197T → A variant among Brazilian neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Genet Mol Biol.* 2008;35:33–5.
87. Cardoso JLM SY, Almeida ACG, Barbosa LRA S EL, Rodrigues MGA R-SF, Sampaio VS SA, Lacerda MVG, Monteiro WM MG. Influence of CYP2D6 , CYP3A4 and CYP2C19 Genotypes on Recurrence of Plasmodium vivax. *Front Trop Dis.* 2022;3(March):1–11.
88. WHO WHO. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. *Vitam Miner Nutr Inf Syst* [Internet]. 2011;1–6. Available at: <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>, a
89. Monteiro WM, Franca GP, Melo GC, Queiroz ALM, Brito M, Peixoto HM, et al. Clinical complications of G6PD deficiency in Latin American and Caribbean populations : systematic review and implications for malaria elimination programmes. *Malar J* [Internet]. 2014;13(1):1–13. Available at: Malaria Journal
90. 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;69:1440–2.
91. 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.
92. World Health Organization. Testing for G6PD deficiency for safe use of primaquine in radical cure of P. vivax and P. ovale malaria. *Glob Malar Program.* 2016;
93. Avalos S, Mejia RE, Banegas E, Salinas C, Gutierrez L, Fajardo M, et al. G6PD deficiency, primaquine treatment, and risk of haemolysis in malaria-infected patients. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):1–11. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2564-2>

7. ANEXOS E APÊNDICES

- 7.1. PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
- 7.2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
- 7.3. TERMO DE ASSENTIMENTO PARA O MENOR DE IDADE (TALE)
- 7.4. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP EXTRAÇÃO DE DNA
- 7.5. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP GENOTIPAGEM DE G6PD
- 7.6. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP GENOTIPAGEM DE SNPS

7.1. PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito de CYP e a resposta aos antimaláricos

Pesquisador: MARIELLE MACHADO MACEDO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 39179720.9.0000.0005

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

Patrocinador Principal: CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.613.995

Apresentação do Projeto:

A Amazônia, o Sudeste Asiático e a África são as áreas tropicais e subtropicais do planeta mais afetadas pela malária. Essa doença apresenta-se, até o momento, como um importante problema de saúde pública que necessita de maior efetividade do seu controle. Na Amazônia, o tipo de infecção mais prevalente é pelo protozoário *Plasmodium vivax*, que também é responsável por produzir formas hipnozoítas nos hepatócitos do hospedeiro humano, levando à maioria dos casos de recaída. Para tratar as recaídas de malária, a primaquina (PQ) pode ser a droga ideal escolhida. Entretanto, esse medicamento apresenta restrição em pessoas que possuem a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), uma enzima relacionada com a proteção contra o estresse oxidativo dos eritrócitos. A metabolização da PQ ocorre através de enzimas hepáticas do citocromo P450 (CYP), que compreende mais de 50 enzimas, sendo as famílias CYP1, CYP2 e CYP3 responsáveis pelo metabolismo de 70% a 80% dos medicamentos de uso clínico. Indivíduos deficientes de G6PD têm uma capacidade reduzida para atenuar os danos celulares induzidos por hemólise gerada pela PQ. Os polimorfismos de CYP podem agravar a hemólise em pessoas com deficiência de leve a fatal de G6PD. Considerando as mais diversas propriedades funcionais das CYPs, a região norte do Brasil, especificamente o Amazonas, por se tratar de uma área endêmica de malária, torna-se indispensável traçar o perfil genotípico e fenotípico desses pacientes, buscando possíveis orientações de tratamento e administração da PQ. Além disso, mais estudos relacionando polimorfismo de CYP com deficiência de G6PD são

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

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 4.613.995

necessários.

Trata-se de um estudo cujo o título é " Efeito de CYP e a resposta aos antimaláricos", sendo a pesquisadora responsável MARIELLE MACHADO MACEDO. É um estudo transversal, prospectivo com utilização de informação de projetos anteriores para identificação dos possíveis participantes da pesquisa. Amostra=38 participantes que tiveram identificação G6PD/malária vivax, de qualquer faixa etária. Será realizada coleta de sangue, com avaliação quantitativa para G6PD e realização de genotipagem para CYPs.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Determinar a influência dos polimorfismos de CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 na hemólise em deficientes de G6PD.

Objetivo Secundário:- Investigar a frequência de polimorfismos dos genes CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4; Determinar a influência dos genótipos na hemólise por primaquina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Durante a coleta de sangue, a punção será feita por profissionais capacitados, porém, pode causar um pequeno desconforto no local onde foi retirado o sangue. Para garantir a segurança dos participantes, estes serão monitorados após a coleta de sangue até que se certifique que o sangramento local cessou. Os participantes serão instruídos para que entrem em contato com os responsáveis do estudo em caso de hematomas ou infecções no local da inserção da agulha. Nestes casos, se necessário, os indivíduos receberão tratamento. O paciente pode sentir, de alguma forma, constrangimento, medo ou estresse ao ser convidado para participar do projeto, mas para minimizar esses riscos, a equipe de pesquisa irá trabalhar de forma profissional, seguindo todas as normas éticas estabelecidas e as amostras serão identificadas por códigos, para garantir o anonimato do participante, assim como todos os dados referentes a ele serão sigilosos.

Benefícios: A pesquisa irá contribuir para uma compreensão mais profunda sobre as diversas variantes genéticas das CYPs que influenciam na gravidade da hemólise em deficientes de G6PD,

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

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 4.613.995

trazendo assim, possíveis orientações de tratamento e administração da primaquina em pacientes com deficiência de G8PD da nossa região, atendidos na FMT- HVD, além de trazer uma melhora na qualidade de vida desses pacientes.

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 da CONEP; 2. Projeto gerado na Plataforma Brasil (PB); 3. Termo de Compromisso e Utilização de Dados (TCUD); 4. Lattes dos participantes do projeto; 5. Regulamento interno para armazenamento e análise de amostra biológica; 6. Projeto detalhado; 7. Orçamento estimado em R\$ 15.000,00; 8. Cronograma de atividades com início previsto para o dia 02/11/2020 (coleta de dados de pacientes) e término em 30/11/2021. A folha de rosto está devidamente preenchida e assinada. O TCLE e o TALE necessitam de readequação/inclusão de informações.

Recomendações:

Recomendamos aprovação do protocolo da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Diante do exposto, sugere-se que o protocolo de pesquisa seja APROVADO considerando que a pesquisadora atendeu conforme as solicitações.

S. M. J. É o parecer.

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios, parciais e o final, do estudo conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 28 de Março de 2021

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador(a))

7.2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Estudo: Efeito de CYP e a resposta aos antimaláricos: aumento dos efeitos colaterais.

Centro de Pesquisa: Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD)

Pesquisadora responsável: Marielle Machado Macêdo

Pesquisadora principal: Dra. Gisely Cardoso de Melo

Telefone de contato: (92) 99400-5244

Dados sobre a pesquisa:

1. Introdução

Vimos por meio deste informá-lo(a) sobre um estudo de pesquisa que você está sendo convidado a participar.

O estudo e este termo foram aprovados pela Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado.

Neste termo são fornecidas as informações corretas e suficientes para que você possa avaliar e julgar se tem interesse ou não em participar deste estudo. Para tanto, leia este documento cuidadosamente e esclareceremos quaisquer dúvidas que possam surgir após a explicação. Além disso, você pode consultar as pessoas que julgar convenientes.

Você ou seu responsável legal deverá assinar esse termo em duas vias, uma ficará com você e outra conosco. Todas as páginas, exceto a última, devem ser rubricadas por você ou por seu responsável legal e pelo pesquisador responsável deste estudo, ou conter impressão datiloscópica se necessário.

2. Participação Voluntária

A participação é voluntária, se você ou seu familiar não quiser mais fazer parte do estudo, poderá retirar seu consentimento a qualquer momento. Essa decisão não prejudicará de forma alguma o seu tratamento na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

3. Descrição Geral do Estudo

Durante o tratamento para malária você foi medicado com a Primaquina (PQ), esse medicamento deve ser evitado para pessoas que possuem uma deficiência chamada glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). A G6PD é uma enzima que ajuda a proteger as células vermelhas do sangue. Foi verificado em momento prévio que você apresenta deficiência de G6PD.

O paciente com essa deficiência tem um risco maior de ter uma rápida destruição de suas células vermelhas ao tomar a primaquina, sendo prejudicial à vida. Para que a primaquina tenha efeito satisfatório no tratamento, ela precisa passar pelo fígado, onde será transformada pela ação de enzimas com função normal.

Essa pesquisa tem o objetivo de determinar se diferentes enzimas do fígado (CYP), influenciam na destruição prematura de células vermelhas do sangue, em deficientes de G6PD.

Caso o você ou a pessoa por quem é responsável participe da pesquisa, será necessário fazer a coleta de uma amostra de sangue da veia (10 mL, equivalente a uma colher de sopa). Esse procedimento levará alguns minutos, e a amostra será identificada por códigos para garantir o caráter anônimo do participante. Para tanto, você ou seu familiar deverá comparecer na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) para fazer a coleta de sangue.

4. Benefícios e Riscos Derivados de sua Participação no Estudo

Benefícios: A pesquisa irá contribuir para uma compreensão mais profunda sobre as diversas variantes genéticas das enzimas (CYPs) que influenciam na gravidade da rápida

destruição de células vermelhas em deficientes de G6PD. Trazendo assim, uma melhora na qualidade de vida dos participantes, buscando possíveis orientações de tratamento e administração da primaquina em pacientes com deficiência de G6PD da nossa região, atendidos na FMT- HVD.

Riscos: Alguns incômodos e desconfortos podem ocorrer enquanto você estiver participando do estudo. Estes desconfortos podem ser:

Risco de origem psicológica, intelectual e emocional: Pode ser que o participante sinta, de alguma forma, constrangimento, medo ou estresse ao ser convidado para participar do projeto, mas para minimizar esses riscos, a equipe de pesquisa irá trabalhar de forma profissional, seguindo todas as normas éticas estabelecidas e as amostras serão identificadas por códigos ao invés do nome, para garantir o caráter anônimo do participante, assim como todos os dados referentes a ele serão sigilosos.

Coleta de sangue: A punção será feita por profissionais capacitados, porém, pode causar um pequeno desconforto no local onde será retirado o sangue. Após a remoção da agulha, o sangramento localizado será eficientemente estancado com uma pequena bandagem (do tipo band-aid/ adesivo). Se a agulha atravessar o vaso, há um risco de sangramento local que pode resultar em um pequeno machucado de aproximadamente 1 cm. Para garantir a segurança dos participantes, estes serão monitorados após a coleta de sangue até que se certifique que o sangramento local cessou. Os participantes serão instruídos para que entrem em contato com os responsáveis do estudo em caso de machucados ou inflamação no local onde foi colocada a agulha. Nestes casos, se necessário, receberão tratamento.

Riscos desconhecidos: Outros efeitos colaterais ainda não conhecidos neste momento podem acontecer durante o estudo. Enquanto durar a pesquisa, você será informado sobre quaisquer novas informações que possam afetar sua decisão de permanecer no estudo.

5. Acompanhamento e Assistência

Se você sofrer algum dano ou intercorrência, deverá falar para alguém da equipe de pesquisa imediatamente ou em caso de emergência, poderá contatar diretamente **Dra. Gisely Cardoso de Melo** (Farmacêutica- bioquímica, telefone: 92 991598604, e-mail: cardosogisely@gmail.com) e **Marielle Machado Macêdo** (Biomédica, telefone 92 994005244, e-mail: marielle.mcd09@gmail.com), no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema- Gerência de Malária- FMT-HVD, de segunda-feira a sexta-feira, das 08h às 17h.

Nós lhe daremos toda assistência integral e gratuita e que for necessária para garantir seu bem-estar. A responsável pelo estudo irá garantir que você receba assistência imediata caso tenha quaisquer tipos de danos, diretos ou indiretos, imediatos ou tardios, sofridos no decorrer de sua participação na pesquisa, previsto ou não neste documento.

6. Confidencialidade

Todas as informações coletadas no estudo que possam ferir a sua privacidade serão anonimizadas (isto é, ocultadas) e, caso seja necessário encaminhamento de suas informações para o patrocinador ou empresas que colaborem com ele, eles jamais saberão nada sobre sua identidade. Sob nenhuma circunstância serão feitas cópias de seu prontuário médico. Todas as pessoas que terão acesso ao seu prontuário têm a obrigação de garantir a confidencialidade inerente a sua profissão.

As informações sobre a sua participação neste estudo serão associadas a você através de um número de identificação individual. Apenas a equipe da pesquisa poderá relacionar tal número com você em qualquer momento.

7. O que ocorre com as informações obtidas no estudo

Se decidir por participar no estudo, é possível que informações relevantes sejam obtidas na análise das amostras biológicas. De acordo com as leis atuais, você tem o direito de ser informado dos dados obtidos no decorrer do estudo. Caso seja solicitado, poderemos lhe fornecer informações sobre o estudo no que diz respeito ao uso dos dados.

8. Armazenamento de Material Biológico

O material biológico (sangue) coletado de você ou da pessoa por quem é responsável, será utilizado exclusivamente para atender aos objetivos desta pesquisa e, caso haja sobra, sob seu consentimento, será devidamente armazenado por no máximo 5 anos em laboratório, especificamente no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema- Gerência de Malária-FMT-HVD, conforme regulamento e normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais.

Você será informado caso o material biológico armazenado e os dados gerados a partir dele, forem solicitados para utilização em futuros estudos, contribuindo também para o avanço das pesquisas da nossa região relacionadas à malária, assim como a qualidade de vida dos nossos pacientes.

9. Ressarcimento

Os exames e procedimentos realizados exclusivamente com fins de pesquisa não implicarão qualquer custo para você. Se necessário, você receberá um ressarcimento pelos gastos relacionados à sua participação no estudo, como crédito telefônico ou transporte.

Apesar de não haver compensação financeira, ao assinar este termo de consentimento você não abrirá mão de nenhum dos seus direitos legais, garantidos na regulamentação brasileira de pesquisa envolvendo seres humanos, sendo um de seus direitos a solicitação de indenização.

10. Contato

Para obter mais informações sobre este estudo ou para qualquer informação adicional sobre os seus direitos como participante, ou se você quiser fazer uma reclamação, por favor, entre em contato com os pesquisadores responsáveis do estudo: Dra Gisely Cardoso de Melo, telefone (92) 99159-8604; e-mail: cardosogisely@gmail.com; ou Marielle Machado Macêdo, telefone (92) 94005244; e-mail: marielle.mcd09@gmail.com, no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema- Gerência de Malária- FMT-HVD, endereço Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus – AM, de segunda-feira a sexta-feira, das 08h às 17h.

Em caso de dúvidas, denúncias ou reclamações sobre a sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado; e-mail: cep@fmt.am.gov.br; endereço: na Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM; telefone: (92) 2127-3572. O horário de funcionamento do CEP é de 08h às 14 h, de segunda a sexta-feira.

Este documento terá duas vias originais. Uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o participante, sendo assim, será assinado duas vezes.

Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu (nome completo), _____

Tive a oportunidade de tirar dúvidas sobre o estudo.

Recebi informações suficientes sobre o estudo.

Serei informado regularmente sobre qualquer informação que possa afetar a minha disponibilidade em continuar a minha participação no estudo.

Autorizo o acesso às minhas informações confidenciais.

Autorizo o processamento de minhas informações e amostras.

Entendo que receberei uma via deste termo.

Entendo que a minha participação é voluntária.

Entendo que posso retirar o meu consentimento e concluir a minha participação:

Em qualquer momento

Sem dar qualquer explicação

Sem que prejudique meu tratamento posterior

Ofereço livremente o meu acordo para participar deste estudo e dou o meu consentimento para acessar e usar os meus dados nas condições descritas neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

() SIM () NÃO

Concordo que as amostras serão armazenadas para um biorrepositório e autorizo contato, caso necessário, para futuros estudos que possam ocorrer.

() SIM () NÃO

Participante da Pesquisa ou responsável legal

Pesquisador ou pessoa por ele delegada

Nome: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Assinatura: _____

Data: _____

Data: _____

<p><u>Impressão datiloscópica do Participante da Pesquisa</u> (se necessário)</p>	<p><u>Impressão datiloscópica do Responsável Legal</u> (se necessário)</p>
--	---

<p style="text-align: center;">Testemunha imparcial (se aplicável)</p> <p>Nome: _____</p> <p>Assinatura: _____</p> <p>Data: _____</p>	<p>Impressão datiloscópica</p>
--	---------------------------------------

7.3. TERMO DE ASSENTIMENTO PARA O MENOR DE IDADE (TALE)

TERMO DE ASSENTIMENTO PARA O MENOR DE IDADE

(6 a 10 anos)



Olá! Como vai?

Você está sendo convidado a participar de um estudo sobre a avaliação de efeitos não desejados no tratamento para malária, em pessoas G6PD.

Você não é obrigado a participar, e se não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento mesmo que seu responsável permita sua participação.

Essa decisão não prejudicará de forma alguma o seu tratamento na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).



Por que queremos fazer este estudo?

Nesta pesquisa estamos buscando saber se ao tomar um medicamento usado para tratar malária, as células vermelhas do sangue do paciente podem ser destruídas mais rápido por causa de alguns defeitos.

Caso tenha alguma pergunta, pode fazer para a pessoa que está te entrevistando, ela está aqui para ajudar você.



Depois de compreender do que se trata o estudo e se concordar em participar dele você pode assinar este documento. Nós te asseguramos que você terá todos os seus direitos respeitados e receberá todas as informações sobre o estudo, por mais simples que possam parecer.

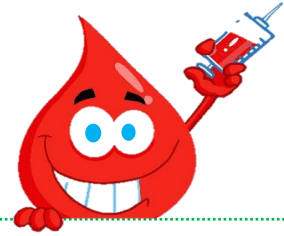


Caso você participe da pesquisa, um profissional treinado irá coletar uma amostra de sangue de 10 mL, a quantidade de uma colher de sopa.

Esse procedimento levará alguns minutos, e a amostra será identificada por números e/ou letras para garantir que seu nome ou qualquer informação sua não sejam reveladas.

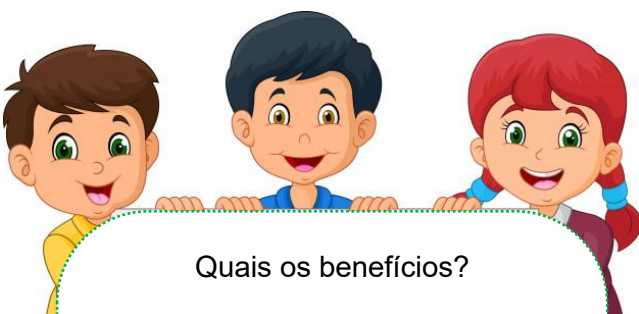


Principalmente, pacientes com deficiência de G6PD, pois essa deficiência deixa a célula vermelha fraca, e pode ser ruim para a vida.



Quais os riscos?

Durante a coleta você poderá sentir uma dor leve no local onde foi retirado o sangue. Um pequeno machucado e sangramento podem acontecer também, mas você será acompanhado pela responsável do estudo até que tudo fique bem.



Quais os benefícios?

Participando da pesquisa você irá contribuir para um maior conhecimento sobre os efeitos colaterais no tratamento para malária, em deficientes de G6PD. Melhorando assim, a saúde dos pacientes com essa deficiência na nossa região.



Você e seu responsável não gastarão com exames ou procedimentos realizados, nem ganharão dinheiro por participar desta pesquisa. Mas, se necessário, receberão ajuda pelos gastos com crédito telefônico ou transporte.

Apesar de não haver compensação financeira, ao assinar este termo de consentimento você não abrirá mão de nenhum dos seus direitos legais, garantidos na regulamentação brasileira de pesquisa envolvendo seres humanos, sendo um de seus direitos a solicitação de indenização.

Se você sofrer algum dano ou não se sentir bem após a coleta de sangue, deverá falar para alguém da equipe de pesquisa imediatamente, em caso de necessidade, poderá contatar **Dra. Gisely Cardoso de Melo** (Farmacêutica- bioquímica, telefone: (92) 99159-8604, e-mail: cardosogisely@gmail.com) e **Marielle Machado Macêdo** (Biomédica, telefone)92) 99400-5244, e-mail: marielle.mcd09@gmail.com), no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema- Gerência de Malária- FMT-HVD, de segunda-feira a sexta-feira, das 08h às 17h. E poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-HVD se achar necessário, pelo e-mail: cep@fmt.am.gov.br; endereço: Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM; telefone: (92) 2127-3572; horário de funcionamento do CEP é de 8 às 14 horas, de

Nós gostaríamos de sua permissão para guardar o restante da amostra de sangue para ser usado em estudos sobre malária no futuro. Ele poderá ser armazenado por até 5 anos em nosso laboratório no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema- Gerência de Malária- FMT-HVD. Para isso, será guardado sem identificar seu nome. Você será informado caso o sangue armazenado e os dados gerados a partir dele, forem solicitados para utilização em futuros estudos, contribuindo também para o avanço das pesquisas da nossa região relacionadas à malária, assim como a qualidade de vida dos nossos pacientes.

Este documento terá duas vias originais. Uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o participante, sendo assim, será assinado duas vezes.

Assinatura do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

Eu (nome completo), _____

Participante da pesquisa ou Responsável legal

Pesquisador ou pessoa por ele delegada

Nome: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Assinatura: _____

Data: _____

Data: _____

Tive a oportunidade de tirar dúvidas sobre o estudo.

Recebi informações suficientes sobre o estudo.

Serei informado regularmente sobre qualquer informação que possa afetar a minha disponibilidade em continuar a minha participação no estudo.

Autorizo o acesso às minhas informações confidenciais.

Autorizo o processamento de minhas informações e amostras.

Entendo que receberei uma via deste termo.

Entendo que a minha participação é voluntária.

Entendo que posso retirar o meu consentimento e concluir a minha participação:

Em qualquer momento

Sem dar qualquer explicação

Sem que prejudique meu tratamento posterior

Ofereço livremente o meu acordo para participar deste estudo e dou o meu assentimento para acessar e usar os meus dados nas condições descritas neste Termo de Assentimento Livre e Esclarecido.

() SIM () NÃO

Concordo que as amostras serão armazenadas para um biorrepositório e autorizo contato, caso necessário, para futuros estudos que possam ocorrer.

() SIM () NÃO

<p><u>Impressão datiloscópica do Participante da Pesquisa</u> (se necessário)</p>	<p><u>Impressão datiloscópica do Responsável Legal</u> (se necessário)</p>
--	---

Testemunha imparcial (se aplicável)	Impressão datiloscópica
Nome: _____	
Assinatura: _____	
Data: _____	

TERMO DE ASSENTIMENTO PARA O MENOR DE IDADE

(de 11 a 17 anos)

Estudo: Efeito de CYP e a resposta aos antimaláricos: aumento dos efeitos colaterais.

Centro de Pesquisa: Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD)

Pesquisadora responsável: Marielle Machado Macêdo

Pesquisadora principal: Dra. Gisely Cardoso de Melo

Telefone de contato: (92) 99400-5244

Dados sobre a pesquisa:

1. Introdução

Nós, Dra. Gisely Cardoso de Melo e Marielle Machado Macêdo convidamos você a participar do estudo: Efeito de CYP e a resposta aos antimaláricos: aumento dos efeitos colaterais. O estudo e este termo foram aprovados pela Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado.

Neste termo são fornecidas as informações corretas e suficientes para que você e seu familiar possa avaliar e julgar se tem interesse ou não em participar deste estudo. Para tanto, leia este documento cuidadosamente e esclareceremos quaisquer dúvidas que possam surgir. Além disso, você pode consultar as pessoas que julgar convenientes.

Esse termo deverá ser assinado em duas vias, uma ficará com você e outra conosco. Todas as páginas, exceto a última, devem ser rubricadas por você ou por seu responsável legal e pelo pesquisador responsável deste estudo, ou conter impressão datiloscópica se necessário.

2. Participação Voluntária

A participação é voluntária, se você não quiser mais fazer parte do estudo, poderá retirar seu assentimento a qualquer momento. Essa decisão não prejudicará de forma alguma o seu tratamento na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). Mesmo que o seu responsável permita a

sua participação na pesquisa, você não é obrigado a participar da mesma se não quiser.

3. Descrição Geral do Estudo

Nesta pesquisa estamos buscando saber se ao tomar a primaquina, um medicamento usado para tratar malária, alguns defeitos nas células podem levar a uma destruição mais grave das células vermelhas do sangue. Principalmente em paciente com deficiência de G6PD, o que pode ser ruim para a vida. Foi verificado anteriormente que você foi diagnosticado com deficiência por G6PD. Por isso a importância de estudar esses defeitos, para trazer melhores orientações de tratamento e uso da primaquina, contribuindo com a saúde dos participantes, além de trazer mais conhecimento sobre o tema abordado.

Caso você participe da pesquisa, será necessário fazer a coleta de uma amostra de sangue de 10 mL, quantidade igual a uma colher de sopa. Esse procedimento levará alguns minutos, e a amostra será identificada por números e/ou letras para garantir que seus dados não sejam mostrados. Para tanto, você e seu familiar deverá comparecer na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) para fazer a coleta de sangue.

4. Benefícios e Riscos Derivados de sua Participação no Estudo

Benefícios: participando da pesquisa você irá contribuir para uma compreensão mais profunda sobre o aumento dos efeitos indesejados após o uso da primaquina em deficientes de G6PD. Trazendo assim, uma melhora na qualidade de vida dos participantes, buscando possíveis orientações de tratamento e administração da primaquina em pacientes com deficiência de G6PD da nossa região, atendidos na FMT- HVD.

Riscos: Alguns riscos podem ocorrer enquanto você estiver participando do estudo. Estes riscos podem ser:

Risco de origem psicológica, intelectual e emocional: Pode ser que o paciente sinta, de alguma forma, constrangimento, medo ou estresse ao ser

convidado para participar do projeto, mas para diminuir esses riscos, a equipe de pesquisa irá trabalhar de forma profissional, seguindo corretamente os procedimentos estabelecidos e as amostras serão identificadas por números e/ou letras ao invés do seu nome, para garantir que seus dados não sejam mostrados.

Coleta de sangue: A coleta será feita por profissionais capacitados, porém, poderá sentir uma dor leve no local onde foi retirado o sangue (conforme mostra imagem abaixo). Após a retirada da agulha, o sangramento localizado será eficientemente estancado com uma pequena bandagem (do tipo band-aid/ adesivo). Se a agulha atravessar o vaso, há um risco de sangramento local que pode resultar em um pequeno machucado de aproximadamente 1 cm. Para garantir a segurança dos participantes, estes serão acompanhados após a coleta de sangue até que se certifique que o sangramento local parou. Os participantes serão informados para que entrem em contato com os responsáveis do estudo em caso de machucados no local onde foi colocada a agulha. Nestes casos, se necessário, os participantes receberão tratamento.

Riscos desconhecidos: Outros efeitos ainda não conhecidos neste momento podem acontecer durante o estudo. Enquanto durar a pesquisa, você será informado sobre quaisquer novas informações que possam afetar sua decisão de permanecer no estudo.



8. Acompanhamento e Assistência

Se você sofrer algum dano ou não se sentir bem após a coleta de sangue, deverá falar para alguém da equipe de pesquisa imediatamente, em caso de necessidade, poderá contatar diretamente **Dra. Gisely Cardoso de Melo** (Farmacêutica- bioquímica, telefone: (92) 99159-8604, email: cardosogisely@gmail.com) e **Marielle Machado Macêdo** (Biomédica, telefone (92) 99400-5244, email: marielle.mcd09@gmail.com), no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema- Gerência de Malária- FMT-HVD, de segunda-feira a sexta-feira, das 08h às 17h.

Nós lhe daremos toda assistência integral e gratuita e que for necessária para garantir seu bem-estar. A responsável pelo estudo irá garantir que você receba assistência imediata caso tenha quaisquer tipos de danos, diretos ou indiretos, imediatos ou tardios, sofridos no decorrer de sua participação na pesquisa, previsto ou não neste documento.

9. Confidencialidade

Todas as informações coletadas no estudo que possam ferir a sua vida particular serão ocultadas e caso seja necessário encaminhamento de suas informações para o patrocinador ou empresas que colaborem com ele, eles jamais saberão nada sobre sua identidade. Sob nenhuma circunstância serão feitas cópias de seu prontuário médico. Todas as pessoas que terão acesso ao seu prontuário têm a obrigação de garantir a confidencialidade ligado a sua profissão.

As informações sobre a sua participação neste estudo serão associadas a você através de números ou letras de identificação individual. Apenas a equipe da pesquisa poderá relacionar tal identificação com você em qualquer momento.

10. O que ocorre com as Informações Obtidas no Estudo

Se decidir por participar no estudo, é possível que informações importantes sejam obtidas na análise do sangue. De acordo com as leis atuais, você tem o direito de ser informado dos dados obtidos no decorrer do estudo. Caso seja solicitado, poderemos lhe fornecer informações sobre o estudo no que diz respeito ao uso dos dados.

11. Armazenamento de Material Biológico

O material biológico (sangue) coletado de você, será utilizado exclusivamente para atender aos objetivos desta pesquisa e, caso haja sobra, sob seu consentimento, será devidamente armazenado por no máximo 5 anos em laboratório, especificamente no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema- Gerência de Malária- FMT-HVD, conforme regulamento e normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais.

Você será informado caso o material biológico armazenado e os dados gerados a partir dele, forem solicitados para utilização em futuros estudos, contribuindo também para o avanço das pesquisas da nossa região relacionadas à malária, assim como a qualidade de vida dos nossos pacientes.

12. Ressarcimento

Os exames e procedimentos realizados exclusivamente com fins de pesquisa não implicarão qualquer custo para você. Se necessário, você receberá um ressarcimento pelos gastos relacionados à sua participação no estudo, como crédito telefônico ou transporte.

Apesar de não haver compensação financeira, ao assinar este termo de consentimento você não abrirá mão de nenhum dos seus direitos legais, garantidos na regulamentação brasileira de pesquisa envolvendo seres humanos, sendo um de seus direitos a solicitação de indenização.

13. Contato

Para obter mais informações sobre este estudo ou para qualquer informação adicional sobre os seus direitos como participante, ou se você quiser fazer uma reclamação, por favor, entre em contato com os pesquisadores responsáveis do estudo: Dra Gisely Cardoso de Melo, telefone (92) 99159-8604; e-mail: cardosogisely@gmail.com; ou Marielle Machado Macêdo, telefone (92) 94005244; e-mail: marielle.mcd09@gmail.com, no Instituto de Pesquisa Clínica

Carlos Borborema- Gerência de Malária- FMT-HVD, endereço Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus – AM, de segunda-feira a sexta-feira, das 08h às 17h.

Em caso de dúvidas, denúncias ou reclamações sobre a sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado; e-mail: cep@fmt.am.gov.br; endereço: na Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM; telefone: (92) 2127-3572. O horário de funcionamento do CEP é de 08h às 14 h, de segunda a sexta-feira.

Este documento terá duas vias originais. Uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o participante, sendo assim, será assinado duas vezes.

Assinatura do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

Eu (nome completo), _____

Tive a oportunidade de tirar dúvidas sobre o estudo.

Recebi informações suficientes sobre o estudo.

Serei informado regularmente sobre qualquer informação que possa afetar a minha disponibilidade em continuar a minha participação no estudo.

Autorizo o acesso às minhas informações confidenciais.

Autorizo o processamento de minhas informações e amostras.

Entendo que receberei uma via deste termo.

Entendo que a minha participação é voluntária.

Entendo que posso retirar o meu consentimento e concluir a minha participação:

Em qualquer momento

Sem dar qualquer explicação

Sem que prejudique meu tratamento posterior

Ofereço livremente o meu acordo para participar deste estudo e dou o meu assentimento para acessar e usar os meus dados nas condições descritas neste Termo de Assentimento Livre e Esclarecido.

() SIM () NÃO

Concordo que as amostras serão armazenadas para um biorrepositório e autorizo contato, caso necessário, para futuros estudos que possam ocorrer.

() SIM () NÃO

<p><u>Impressão datiloscópica do Participante da Pesquisa (se necessário)</u></p>	<p><u>Impressão datiloscópica do Responsável Legal (se necessário)</u></p>
--	---

Testemunha imparcial (se aplicável)	Impressão datiloscópica
<p data-bbox="229 360 331 398">Nome:</p> <hr data-bbox="229 421 775 432"/> <p data-bbox="229 465 395 504">Assinatura:</p> <hr data-bbox="229 526 715 537"/> <p data-bbox="229 571 660 609">Data: _____</p>	

7.4. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP EXTRAÇÃO DE DNA

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

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

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

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

1. OBJETIVOS

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

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica.

3. APLICÁVEL A

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

4. RESPONSABILIDADES

Pessoal encarregado da coleta das amostras da pesquisa.

Equipe do laboratório de biologia molecular.

5. POP'S RELACIONADOS

- Seguimento dos participantes no estudo “Epidemiologia da Malária no Município do Careiro, Amazonas” (versão atual do **POP_IPCCB_TC_002**).
- Caracterização da Malária Grave por *Plasmodium vivax* na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Brasil (versão atual do **POP_IPCCB_HO_001**).
- Procedimento para a realização de PCR em tempo real para detecção de plasmódio (versão atual do **POP_IPCCB_LB_002**).
- Procedimento para realização de PCR em tempo real para detecção de DNA de plasmódio (Qpcr) – versão atual do **POP_PCCB_LB_021**.

6. PROCEDIMENTOS

a. Recursos necessários

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

ii. Materiais

1. Pipetas automáticas de 10 μ L, 100 μ L e 1000 μ L
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 102media-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 ML novo. Descartar o filtrado e o tubo coletor. Adicionar cuidadosamente 150 µL de tampão AE ou água destilada e incubar à temperatura ambiente por 1 minuto. 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			Data e assinatura

9. DECLARAÇÃO

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

7.5. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP – GENOTIPAGEM DE
G6PD

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP		POP_IPCCB_LAB_030_v01_PT	
Título		Procedimento para realização da genotipagem de G6PD utilizando sistema TaqMan®	
Idioma da versão original		PT	
Elaborado por: Laila R. A. Barbosa	Revisado por: Gisely C 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

OBJETIVO

Descrever o procedimento de realização da PCR em tempo real para genotipagem alélica da enzima glicose 6-fostato desidrogenase com sistema TaqMan.

CAMPO DE APLICAÇÃO

Análise no laboratório de biologia molecular de amostras relacionadas à pesquisa clínica. Genotipagem das variantes Africana A+, Africana A- e Mediterrânea.

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.

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.

RESPONSABILIDADES

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

MATERIAIS

- Pipetas automáticas de 10µL, 100µL e 1000 µL
- Ponteiras com filtro para pipetas automáticas
- Pipeta multicanal
- Multipipetador
- Ponteiras para multipipetador (0,5 ml)
- Tubos eppendorf de 1,5 e 2,0 mL

- Microplacas de 0,1mL, com 96 poços, para sistema de PCR em Tempo Real
- Adesivo óptico para vedar as microplacas 6.1.2.

EQUIPAMENTOS

- Vortex
- Centrífuga
- Termociclador de PCR em tempo real

REAGENTES

- Mastermix universal
- Sondas genotipagem: rs1050828 (Africana A-), rs1050829 (Africana A+) e rs5030868 (Mediterrânea)
- Água nuclease free

PROCEDIMENTOS

8.1. Obtenção de DNA

- A extração do DNA deve ser feita de acordo com o POP_IPCCB_LB_003_v03D_PT;
- As amostras devem ser armazenadas em tubo eppendorf ou microplaca e devem ser mantidas em câmara fria a 4°C.

8.2. Preparação do Mix de genotipagem

- O mix de genotipagem deve ser preparado e distribuído na microplaca para PCR na área apropriada (capela de fluxo laminar VECO CFLV estéril para POP_IPCCB_LB_044_PT_D Página 4 de 15 preparo de reagentes PCR);
- Ligar a luz UV (germicida) da capela de fluxo laminar cerca de 30 minutos antes do início do preparo. Após esse período desligar;
- Com o fluxo laminar da cabine em operação, proceder o preparo do mix de genotipagem;
- Centrifugar as sondas;

- Em um tubo eppendorf, pipetar os reagentes nas seguintes proporções:

	<i>Ix</i>
<i>Mastermix universal</i>	3 μ L
<i>Sonda de genotipagem</i>	0,15 μ L
<i>Água nuclease free</i>	4,85 μ L
<i>Volume final do mix</i>	8,0 μ L
<i>Volume de DNA</i>	2,0 μ L

Obs1: Segue a mesma proporção para os três SNP's, sendo preparado um eppendorf para cada sonda.

Obs2: Pode-se utilizar também os reagentes e volumes (mix de genotipagem e DNA template) recomendados pelo fabricante das sondas de genotipagem, a ThermoFisher Scientific.

Centrifugar o mix de genotipagem e pipetar 8 μ L do mix em cada poço da microplaca;

Cobrir a microplaca e seguir para a bancada de manipulação de DNA.

8.3 Montagem da placa de genotipagem

- Vortexar e/ou centrifugar todos os tubos/microplacas de armazenamento de DNA;
- Pipetar 2,0 μ L de DNA em cada poço da microplaca de genotipagem contendo o mix de genotipagem;
- Os controles negativos devem ser feitos misturando 2 μ L de água (miliQ/água para injeção/água nuclease free) em cada poço previamente selecionado;
- Aplicar o adesivo óptico para vedar a microplaca, evitando tocar em sua área central;
- Centrifugar a microplaca;

8.4 Reação de PCR real time

- A reação de PCR real time utiliza o software Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR System;
- Selecionar Advanced Setup na tela inicial;

- No Experiment Menu -> SETUP -> Experiment properties:

Identificar o nome do experimento;

Instrumento de corrida: 7500 fast (96wells);

Tipo de experimento: Genotyping;

Reagente: TaqMan® Reagents;

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

- No Experiment Menu -> SETUP -> Plate setup

Atribuir SNP assay;

Criar novo SNP assay;

Identificar o SNP assay;

Definir alelo 1 ou base e selecionar VIC.

Definir alelo 2 ou base e selecionar FAM;

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

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, bem como o número de ciclos.

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.

8.4 Análise da reação

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

- Verificar a presença da curva (fluoróforo- VIC ou FAM) correspondente ao o SNP pesquisado;
- Presença de 2 curvas (VIC e FAM) -> amostra heterozigota para o alelo o SNP pesquisado;
- Com o resultado das genotipagem construir uma tabela como as bases definidas para SNP.

Referências

Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-time PCR System. Genotyping Experiments. Part Number 4387784. Revision C. Applied Biosystems. Thermo Fisher Scientific.

Taqman® Copy Number Assays. User Guide. Publication 4397425. Revision E. Applied Biosystems. Thermo Fisher Scientific

LISTA DE ANEXOS

Polimorfismo (SNP)	ID	Localização	Alelos- Base	VIC/FAM	TIPO
rs1050828	Africana A-	G202A	ALELO 1 - C	VIC	SELVAGEM
			ALELO 2- T	FAM	VARIANTE
rs1050829	Africana A+)	A376G	ALELO 1- C	VIC	VARIANTE
			ALELO 2 – T	FAM	SELVAGEM
rs5030868	Mediterrânea	C563T	ALELO 1- A	VIC	VARIANTE
			ALELO 2- G	FAM	SELVAGEM

7.6 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/MM/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* 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=5µL)

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

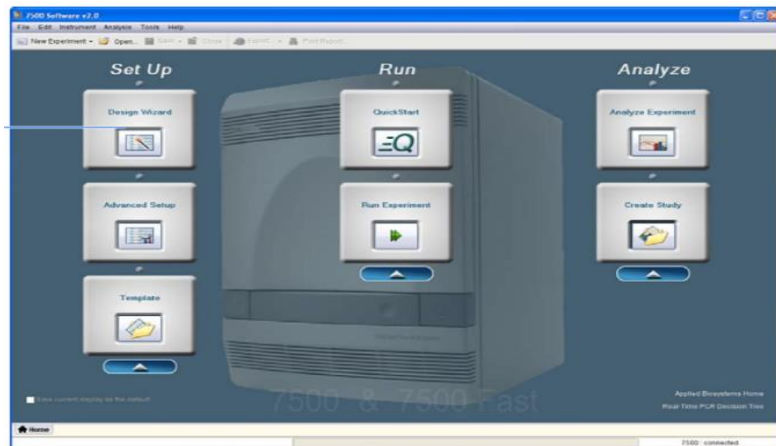
Obs: Pode-se utilizar também os reagentes e volumes (mix de genotipagem e DNA template) recomendados pelo fabricante das sondas de genotipagem, a *ThermoFisher Scientific*

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

7.3. Montagem da placa de genotipagem

- a. Vortexar e/ou centrifugar todos os tubos e microplacas de armazenamento de DNA;
- b. Pipetar 2,25µL de DNA em cada poço da microplaca de genotipagem contendo o mix de genotipagem;

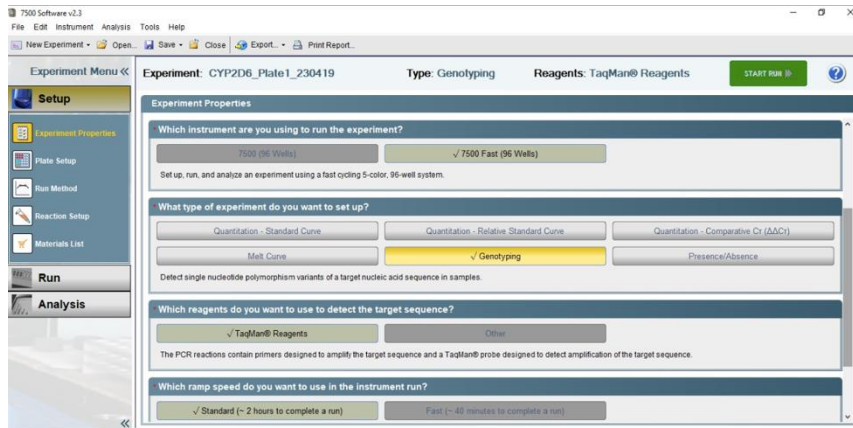
- c. Os controles negativos devem ser feitos misturando 2,25 μ L de água (miliQ/água para injeção/água nuclease free) em cada poço selecionado como controle negativo;
- d. Aplicar o adesivo óptico para vedar a microplaca, evitando tocar em sua área central;
- e. Centrifugar a microplaca;



7.4. Reação de PCR real time

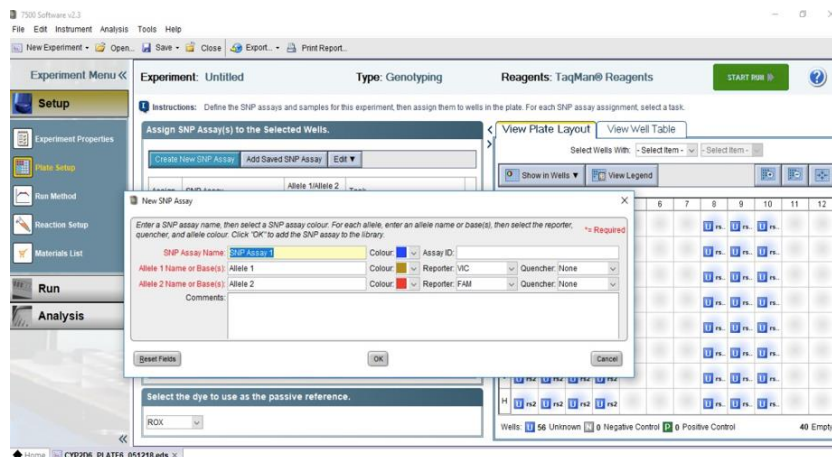
- a. A reação de PCR real time utiliza o software Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR System;
- b. Selecionar Advanced Setup na tela inicial;
- c. No Experiment Menu -> SETUP -> Experiment properties:
 - Identificar o nome do experimento;
 - Instrumento de corrida: 7500 fast (96wells);
 - Tipo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

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



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

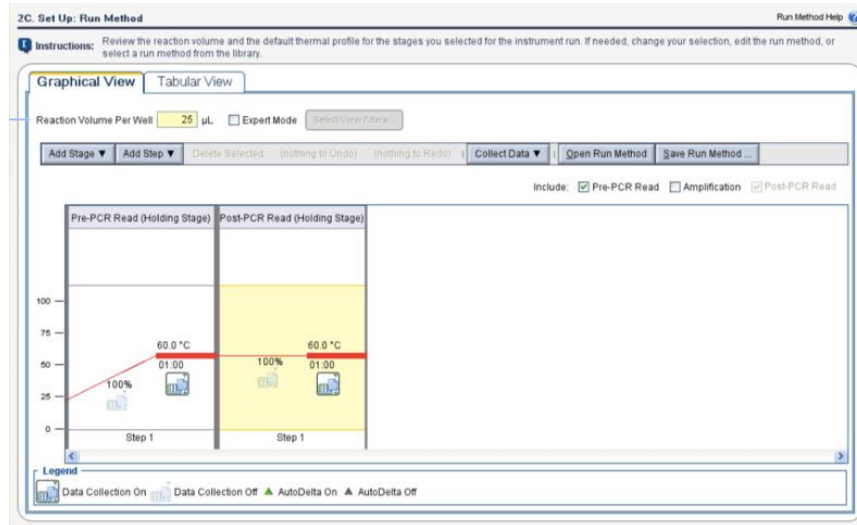
- Atribuir SNP assay;
- Criar novo SNP assay;
- Identificar o SNP assay;
- Definir alelo 1 ou base e selecionar VIC.
- Definir alelo 2 ou base e selecionar FAM;
- No Plate layout, selecionar os poços e definir o SNP assay.



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.

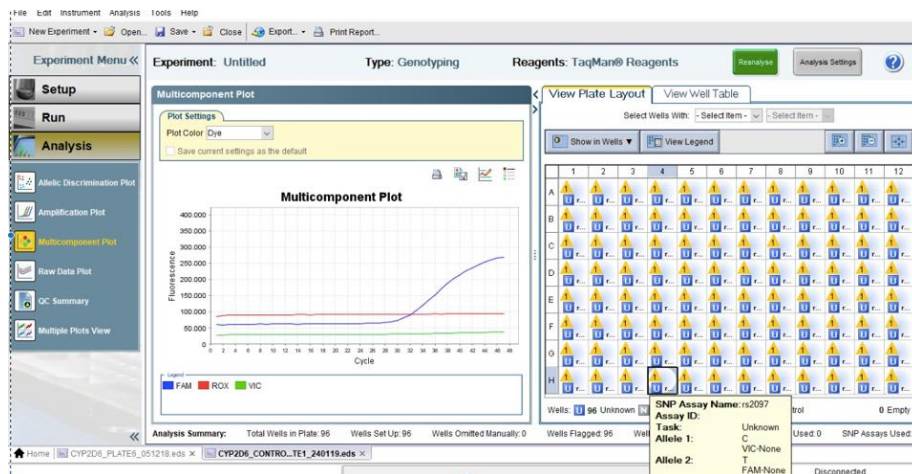
Stage/Step	Pre-PCR Read	Thermal Cycling (Performed on a dedicated thermal cycler)			Post-PCR Read
	Holding Stage	Holding Stage	Cycling (50 cycles)		Holding Stage
			Denature	Anneal/Extend	
Temperature	60 °C	95 °C	92 °C	60 °C	60 °C
Time (mm:ss)	00:30	10:00	00:15	01:30	00:30
Data Collection	Yes	No	No	Yes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

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

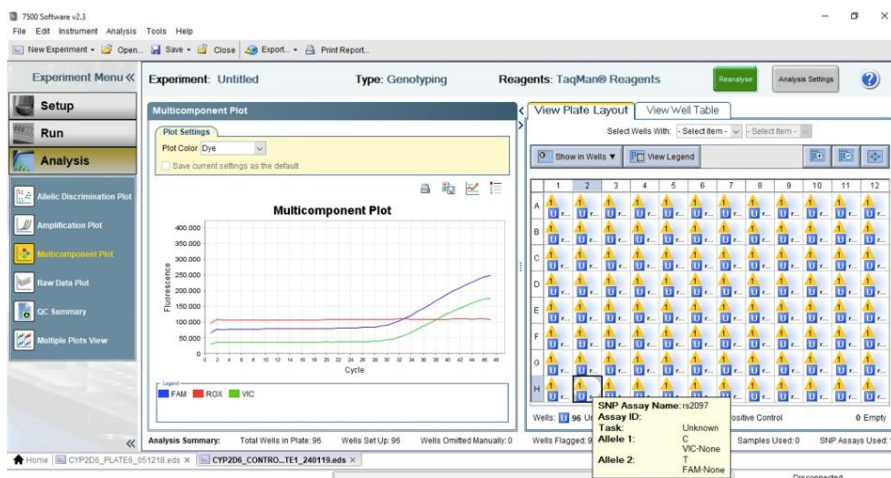
7.5. Análise da reação e definição do haplótipo

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

b. Curva 1, curva de amostra heterozigoto para o alelo o SNP 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=5μL)

Mastermix universal	5μL
----------------------------	-----

TaqMan® copy number assay	0,5µL
RNase P	0,5µL
Água nuclease Fre	2µL

- f. Centrifugar o mix e pipetar 8µL 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 2µL 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 2µL 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 Targets

Target Name | Reporter | Quencher | Colour

RNase P TAMRA | VIC | TAMRA | Blue

CYP2D6 | FAM | NFQ-MGB | Blue

Define Samples

Sample Name | Colour

COA28 | Green

COA15 | Blue

COA19 | Green

Define Biological Replicate Groups

Biological Group Name | Color | Comments

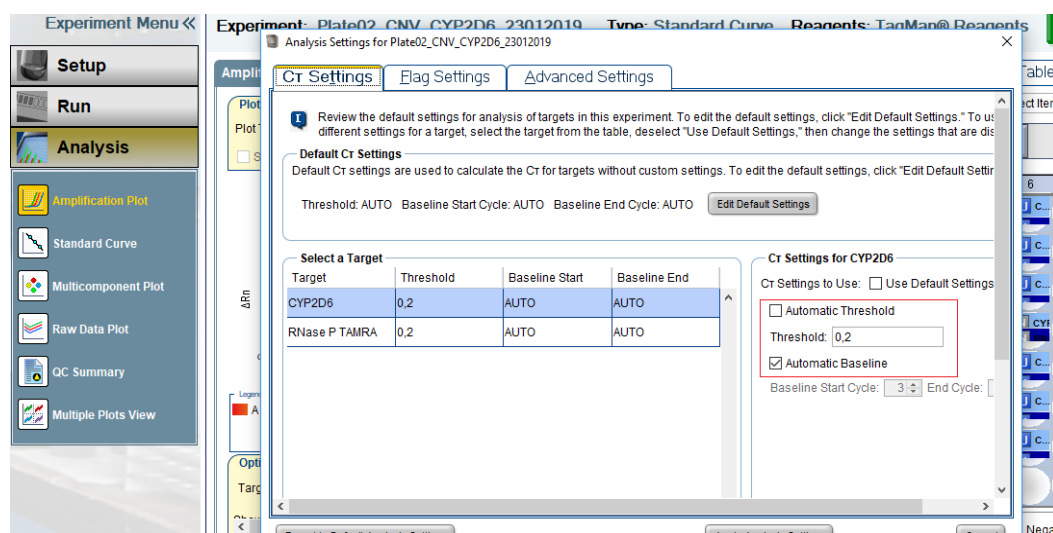
Assign Targets and Samples

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

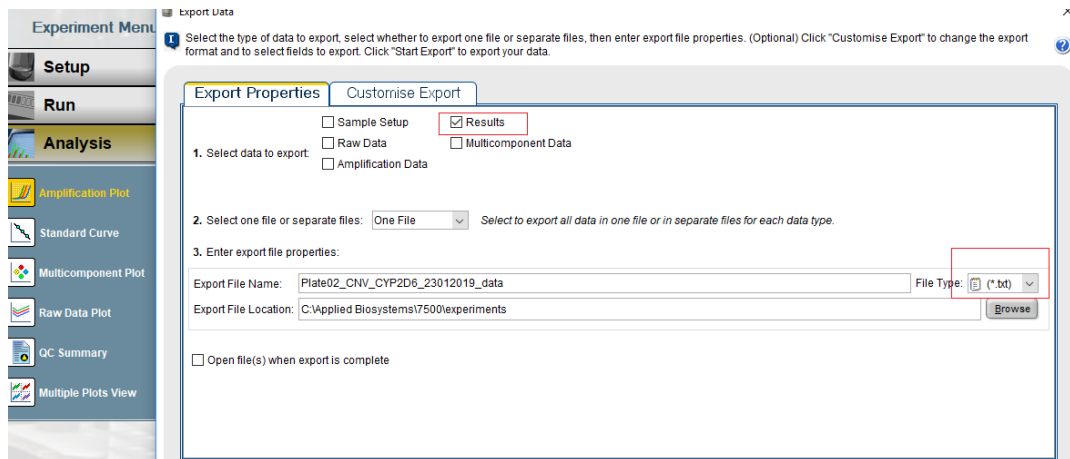
- Em seguida, clicar no botão START RUN.
- O desenho da reação pode ser salvo como template para as demais análises;

8.2.5. Análise do resultado

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



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



- 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

9. 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.10:94781859	TTCCCACTATCATTGATTA TTTCCC[A/G] GGAACCCATAACAAATTA CTTAAAA
636G>A	rs4986893	A/G, Transition Substitution	*3	Chr.10:94780653	ACATCAGGATTGTAAGCA CCCCCTG[A/G] ATCCAGGTAAGGCCAAGT TTTTTGC
-806C/T	rs12248560	C/T, Transition Substitution	*17	Chr.10:94761900	AAATTTGTGTCTTCTGTTC TCAAAG[C/T]ATCTCTGAT GTAAGAGATAATGCCG

Quadro 2 – Polimorfismo CYP3A4

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

Quadro 3 – Polimorfismos CYP2D6

Polimorfismo	SNP ID	Tipo	Alelos	Localização	Contexto VIC/FAM
2549delA	rs35742686	T/-, Insertion/Deletion	*3	Chr.22:42128242	GGCTGGGCTGGGTCC CAGGTCATCC[T/-] GTGCTCAGTTAGCAG CTCATCCAGC
100C>T	rs1065852	A/G, Transition Substitution	*4 e *10	Chr.22:42130692	CCGGGCAGTGGCAGG GGGCCTGGTG[A/G] GTAGCGTGCAGCCCA GCGTTGGCGC
1846G>A	rs3892097	C/T, Transition Substitution	*4	Chr.22:42128945	AGACCGTTGGGGCGA AAGGGGCGTC[C/T] TGGGGGTGGGAGATG CGGGTAAGGG
4180G>C	rs1135840	C/G, Transversion Substitution	*2, *4, *10, *17, *29, *35, *39 e *41	Chr.22:42126611	AGCACAAAGCTCATA GGGGGATGGG[C/G] TCACCAGGAAAGCAA AGACACCATG
2988G>A	rs28371725	C/T, Transition Substitution	*41	Chr.22:42127803	TTCATGGGCCCCCGC CTGTACCCTT[C/T] CTCCCTCGGCCCTG CACTGTTTCC
3183G>A	rs59421388	C/T, Transition Substitution	*29	Chr.22:42127608	TCTGGTCGCCGCACC TGCCCTATCA[C/T]

					GTCGTCGATCTCCTGT TGGACACGG
-1584C>G	rs1080985	G/C, Transversion Substitution	*2, *35 e *41	Chr.22:42132375	TAATTTTGTATTTTT GTAGAGACC[G/C] GGTTCTTCCAAGTTGT CCAGGCTGG
2615_2617del AAG	rs5030656	CTT/-, Insertion/Deletion	*9	Chr.22:42128175	CCCCACCGTGGCAGC CACTCTCAC[CTT/-] CTCCATCTCTGCCAG GAAGGCTC
31G>A	rs769258	C/T, Transition Substitution	*35	Chr.22:42130761	AGGAGCAGGAAGAT GGCCACTATCA[C/T] GGCCAGGGGCACCAG TGCTTCTAGC
1023C>T	rs28371706	G/A, Transition Substitution	*17	Chr.22:42129770	ACGCGGCCCGAAACC CAGGATCTGG[G/A] TGATGGGCACAGGCG GGCGGTCGGC
2850C>T	rs16947	A/G, Transition Substitution	*2, *17, *34, *29, *35, e *41	Chr.22:42127941	GAGAACAGGTCAGCC ACCACTATGC[A/G] CAGGTTCTCATCATT GAAGCTGCTC