MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MALÁRIA: CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL GENOTÍPICO DE ENZIMAS (CYP450) ENVOLVIDAS NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE DROGAS ANTIMALÁRICAS DE POPULAÇÃO DE ÁREA ENDÊMICA BRASILEIRA, RIO PRETO DA EVA - AM

LUISA RIEHL RAPOSO

Rio de Janeiro
Março de 2022

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LUISA RIEHL RAPOSO

Malária: caracterização do perfil genotípico de enzimas (CYP450) envolvidas na biotransformação de drogas antimaláricas de população de área endêmica brasileira, Rio Preto da Eva - AM

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientadora: Profª. Dra. Dalma Maria Banic

RIO DE JANEIRO
Março de 2022

Raposo, Luisa Riehl.

Malária: caracterização do perfil genotípico de enzimas (CYP450) envolvidas na biotransformação de drogas antimaláricas de população de área endêmica brasileira, Rio Preto da Eva - AM / Luisa Riehl Raposo. - Rio de Janeiro, 2022.
xvii,107 f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2022.

Orientadora: Dra. Dalma Maria Banic.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Malária. 2. CYP450. 3. Polimorfismo de Base Única. 4. Farmacogenética. I. Título.

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: LUISA RIEHL RAPOSO

Malária: caracterização do perfil genotípico de enzimas (CYP450) envolvidas na biotransformação de drogas antimaláricas de população de área endêmica brasileira, Rio Preto da Eva - AM

ORIENTADORA: Profª. Dr. Dalma Maria Banic

Aprovada em: 22/03/2022

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Lilian Rose Pratt Riccio **- Presidente** (IOC/Fiocruz)
Prof. Dr. Josué da Costa Lima Júnior (IOC/Fiocruz)
Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado (UFF)
Prof. Dra. Daiana de Souza Perce da Silva (UNIFASE)
Prof. Dra. Sylvia Lopes Maia Teixeira (IOC/Fiocruz)

Rio de Janeiro, 22 de março de 2022

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Biologia Parasitária de Luisa Riehl Raposo, sob orientação da Drª. Dalma Maria Banic. Ao vigésimo segundo dia do mês de março de dois mil e vinte e dois, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: **"Malária: caracterização do perfil genotípico de enzimas (CYP450) envolvidas na biotransformação de drogas antimaláricas de população de área endêmica brasileira, Rio Preto da Eva – AM"**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Imunologia e Patogênese de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Drª. Lilian Rose Pratt Riccio – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Josué da Costa Lima Junior – IOC/FIOCRUZ, Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado – UFF/RJ e como suplentes: Drª. Daiana Souza Perce da Silva - UNIFASE/RJ e Drª. Sylvia Lopes Maia Teixeira - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador do Programa Dr. André Luiz Rodrigues Roque, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 22 de março de 2022.

Drª. Lilian Rose Pratt Riccio (Presidente da Banca)

Dr. André Luiz Rodrigues Roque (Coordenador do Programa):

Dedicatória

Aos meus amados pais, **Tania Riehl Raposo** e **Ronaldo Rodrigues Raposo**, por todo amor, carinho e incentivo para que eu chegasse até aqui. Meus maiores exemplos.

Aos meus irmãos, **Raphael Riehl Raposo** e **Ronaldo Rodrigues Raposo Junior** por todo apoio e suporte ao longo da minha vida. Aos meus queridos sobrinhos, **Amora** e **Pedro** por serem tão importantes na minha vida.

A minha orientadora **Dra. Dalma Maria Banic** por todo incentivo, apoio, suporte em todas as fases do mestrado.

Amo vocês pra sempre e obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, nosso Pai Maior, por toda força que tem me dado até agora, na minha vida, para que eu pudesse chegar até aqui. Em especial aos seres extraordinários que me guiam e protegem.

À minha querida orientadora, Drª Dalma Maria Banic e a Drª Daiana de Souza Perce da Silva, por toda paciência, calma e incentivo. Foram vários percalços ao longo da caminhada, mas que conseguimos ultrapassar fortalecidas e juntas.

Aos meus amados pais, Tania Riehl Raposo e Ronaldo Rodrigues Raposo, por toda ajuda, conselho e suporte durante toda a minha trajetória. Sem vocês eu não conseguiria e não seria nada.

Aos meus irmãos, Ronaldo Rodrigues Raposo Junior e Raphael Riehl Raposo, por sempre torcerem por mim e por sempre cuidarem de mim como se fosse uma filha. Às minhas cunhadas, Jana Lourenço Arnaut e Thais Baptista Lino por todo carinho e suporte e aos meus sobrinhos/afilhados queridos, Pedro e Amora, que trouxeram mais amor e luz para minha vida.

Ao meu querido amigo Gabriel Barbosa de Abreu que, mesmo não estando mais entre nós, foi como se fosse um irmão mais novo, me ajudando e me incentivando em todos os momentos da Pós Graduação.

Aos meus colegas do laboratório de Imunologia Clínica (IOC/FIOCRUZ), por todo carinho, incentivo, acolhimento e suporte. Meu agradecimento especial a Drª Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira por todo carinho desde a minha Iniciação Científica.

Aos colaboradores, Drª Cynthia Cardoso Chester, a Mestre Camila de Almeida Velozo e a Técnica do Sequenciador Lídia, do Laboratório de Virologia Molecular, da UFRJ, por todo suporte e ajuda com os experimentos.

Ao Laboratório de Aids e Imunologia Molecular, em especial a Drª Monick Lindenmeyer, Drª Carmem Gripp, Drª Sylvia Teixeira e o Colaborador Carlos Silva pela ajuda, no momento da pandemia, em receber os reagentes do projeto, além de emprestar o polímero que estávamos precisando no momento crucial, conseguindo terminar meus experimentos.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao longo da caminhada, desde a faculdade, ao meu lado, virando membros da minha família.

A todos os laboratórios, que de alguma forma, ajudaram a realizar outros experimentos.

Ao pessoal da Pós Graduação em Biologia Parasitária, coordenadores, professores e alunos que me ajudaram a aprimorar meus conhecimentos e a descobrir novas coisas.

Aos voluntários do projeto, sem vocês o trabalho não teria sido realizado.

A CAPES, INOVA/FIOCRUZ, CNPq e FIOCRUZ pelo incentivo do projeto.

Aos meus outros amigos e aos conhecidos, que de alguma forma, entraram no meu caminho para que eu pudesse transformar-me e seguir a diante, sendo uma pessoa melhor.

Muito obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá)

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Malária: caracterização do perfil genotípico de enzimas (CYP450) envolvidas na biotransformação de drogas antimaláricas de população de área endêmica brasileira, Rio Preto da Eva – AM

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Luisa Riehl Raposo

A malária é considerada um importante problema de saúde pública com grande impacto econômico e social em países tropicais e subtropicais onde a doença é endêmica. O diagnóstico precoce e o tratamento quimioterápico eficaz ainda constituem as principais ferramentas para o controle da doença. Entretanto, nos últimos anos, vários estudos têm relatado falha terapêutica em diferentes áreas endêmicas no mundo, incluindo a brasileira. Sabe-se que fatores genéticos do hospedeiro, principalmente os associados ao biometabolismo de fármacos, estão envolvidos na resposta terapêutica à diversos fármacos. As enzimas do sistema citocromo P450 (*CYP450*) envolvidas na metabolização de uma ampla variedade de fármacos, incluindo antimaláricos, são codificadas por genes polimórficos, caracterizados por diferentes polimorfismos de base única (*SNP*s). Estudos em diferentes populações de áreas endêmicas de malária, Africanas, Asiáticas e Americanas, incluindo regiões brasileiras, vêm demonstrando que a variabilidade genética das enzimas do sistema *CYP450*/famílias *CYP2 (2D6) e CYP3 (3A4 e 3A5)* está diretamente relacionada ao aparecimento de diferentes fenótipos de biotransformação, afetando a eficácia e a toxicidade dos antimaláricos. A definição de marcadores genéticos, em diferentes populações é de grande relevância na prevenção da falha terapêutica, intensificando a eficácia do tratamento e consequentemente do controle dessa endemia. Dentro deste contexto, a proposta do presente trabalho foi caracterizar o perfil genotípico de enzimas envolvidas no biometabolismo de medicamentos antimaláricos (*CYP2* e *CYP3*) de população de área endêmica brasileira, Rio Preto da Eva, Amazonas. Este estudo foi constituído por 368 indivíduos residentes do município de Rio Preto da Eva, Amazonas. Foram genotipados 8 *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphism*) dos *CYPs 2D6 e 3A4/3A5* pela técnica do "SnaPShot". As análises estatísticas foram realizadas no programa R. O teste qui-quadrado (χ^2) foi realizado para avaliar possíveis desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para os alelos *CYP2D6*4, CYP2D6*10* e *CYP2D6*17* (*SNP1023*) foram observadas baixas frequências para o homozigoto polimórfico. Para o *CYP2D6*17* (*SNP 2850*) foi observada a maior frequência para o heterozigoto polimórfico G/A. Para os alelos *CYP3A4*22*, *CYP3A5*3F* (*SNP31551*) e *CYP3A5*3K* foram observadas baixas frequências para o heterozigoto polimórfico, enquanto para o *CYP3A5*3F* (*SNP31611*) foi observada a maior frequência para o homozigoto polimórfico T/T. As frequências genotípicas dos *CYP2D6*10* e *CYP2D6*17* (*SNP1023*) não estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A maioria dos CYPs está seguindo as mesmas frequências alélicas quando comparados com outras populações. Os *CYPs 2D6*10* e *CYP2D6*4* possuem correlação muito forte entre eles, aumentando o Desequilíbrio de Ligação. Considerando que 64% dos indivíduos estudados carregam alelos polimórficos do *CYP2D6*17* (47%; G/A e 17%; A/A) e 58% do *CYP3A5*3F* (58%; T/T) associados aos fenótipos metabolizadores intermediário e fraco, respectivamente, podemos inferir que a presença desses alelos na população poderia interferir na eficácia do tratamento com cloroquina-primaquina (CQ-PQ) ou na terapia combinada a base de artemisinina (ACTs) e consequentemente no controle da malária em Rio Preto da Eva.

Palavras – chaves: Malária; CYP450; Polimorfismo de Base Única; Farmacogenética.

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Malaria: characterization of the genotypic profile of enzymes (CYP450) involved in the biotransformation of antimalarial drugs in a population of a Brazilian endemic area, Rio Preto da Eva – AM
ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Luisa Riehl Raposo

Malaria is considered an important public health problem with great economic and social impact in tropical and subtropical countries where the disease is endemic. Early diagnosis and effective chemotherapy treatment are still the main tools for disease control. However, in recent years, many studies have reported therapeutic failure in different endemic areas in the world, including Brazil. It is known that host genetic factors, especially those associated with drug biometabolism, are involved in the therapeutic response to various drugs, including antimalarials. The enzymes of the cytochrome P450 (*CYP450*) system are involved in the metabolism of a wide variety of drugs polymorphisms (SNPs). Studies in different populations from malaria-endemic areas, African, Asian and American, including Brazilian regions, have shown that the genetic variability of the enzymes of the *CYP450* system/*CYP2 (2D6)* and *CYP3* (*3A4* and *3A5*) families is directly related to the appearance of different biotransformation phenotypes, affecting the efficacy and toxicity of antimalarials. The definition of genetic markers in different populations is of great relevance in preventing therapeutic failure, in intensifying the effectiveness of the treatment, and consequently, the control of this endemic disease. Within this context, the purpose of the present study was to characterize the genotypic profile of enzymes involved in the biometabolism of antimalarial drugs (*CYP2* and *CYP3*) in a population from an endemic Brazilian area, Rio Preto da Eva, Amazonas. This study consisted of 368 individuals residing in the municipality of Rio Preto da Eva, Amazonas. Eight SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) of *CYPs 2D6* and *3A4/3A5* were genotyped using the “SnaPShot” technique. Statistical analyzes were performed using the R program. The chi-square test ($\chi 2$) was performed to assess possible deviations in the Hardy-Weinberg Equilibrium. For the *CYP2D6*4, CYP2D6*10* and *CYP2D6*17* (SNP1023) alleles, low frequencies were observed for the polymorphic homozygote. For the *CYP2D6*17* (SNP 2850) allele was observed the highest frequency for the polymorphic heterozygote G/A. For the *CYP3A4*22*, *CYP3A5*3F* (SNP31551) and *CYP3A5*3K* alleles were observed at low frequencies for the polymorphic heterozygote, while for *CYP3A5*3F* (SNP31611) allele was observed the highest frequency for the T/T polymorphic homozygote. The genotypic frequencies of *CYP2D6*10* and *CYP2D6*17* (SNP1023) are not in Hardy-Weinberg Equilibrium. Most CYPs are following the same allele frequencies when compared to other populations. Both *CYPs 2D6*10* and *CYP2D6*4* have a very strong correlation between them, increasing the Linkage Disequilibrium. Considering that 64% of the studied individuals carry polymorphic alleles of *CYP2D6*17* (47%; G/A and 17% A/A) and 58% of *CYP3A5*3F* (58%; T/T) associated with intermediate and poor metabolizer phenotypes, respectively, we can infer that the presence of these alleles in the population could interfere with the effectiveness of treatments with chloroquine-primaquine (CQ-PQ) and artemisinin based combination therapy (ACTs) and consequently affect malaria control in Rio Preto da Eva.

Keywords: Malaria; CYP450; Single Nucleotide Polymorphism; Pharmacogenetics.

ÍNDICE

RESUMO **IX**

ABSTRACT **X**

1 INTRODUÇÃO **18**

1.1 Revisão Bibliográfica **20**

1.1.1 Malária no Brasil: aspectos históricos 20

1.1.2 Malária no Brasil: situação atual 24

1.1.3 Ciclo biológico do *Plasmodium* spp. 25

1.1.4 Tratamento da malária 27

1.1.5 Metabolismo e Mecanismo de Ação dos Antimaláricos .. 29

1.1.6 Citocromo P-450 (CYP450) 37

1.1.7 Farmacogenética das principais isoformas do CYP envolvidas no metabolismo de antimaláricos, abordados neste estudo 46

1.2 Justificativa **48**

1.3 Hipóteses: **49**

2 OBJETIVOS **50**

2.1 Objetivo Geral **50**

2.2 Objetivos Específicos **50**

3 MATERIAL E MÉTODOS **51**

3.1 Área de estudo **51**

3.2 Voluntários e Aspectos Éticos de Pesquisa **52**

3.2.1 Critérios de Elegibilidade 52

3.3 Coleta de sangue **53**

3.4 Diagnóstico parasitológico e Avaliação da parasitemia **54**

3.5 Padronização e Genotipagem dos CYPs **54**

3.5.1 Extração do DNA genômico 54

3.5.2 Quantificação do DNA extraído 56

3.5.3 Amplificação do DNA genômico por *PCR Multiplex* 56

3.5.4 Reação por SnaPShot® 58

3.5.5 Banco de dados e Análise estatística 61

4 RESULTADOS 62

4.1 Características Epidemiológicas 62

4.2 Padronização da Genotipagem 64

4.2.1 *PCR Multiplex* 64

4.2.2 Reação por SnaPShot® 65

4.3 Genotipagem das amostras de Rio Preto da Eva 66

4.3.1 Análises das frequências genotípicas, alélicas e do Equilíbrio de Hardy Weinberg nos SNPs estudados..... 66

4.3.2 Comparação das frequências alélicas do município de Rio Preto da Eva com as de outras populações do mundo .. 69

4.3.3 Análise de Desequilíbrio de ligação 72

5 DISCUSSÃO 74

6 CONCLUSÕES 79

7 PERSPECTIVAS 80

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 81

ANEXO I – REGISTRO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA DA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA 97

ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO(TCLE) 102

ANEXO III – QUESTIONÁRIO DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS 106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa global de casos de malária em 2020 19
Figura 2 - Série histórica de casos de malária de 1959-2020 23
Figura 3 – Mapa de risco por município no Brasil em 2020.....25
Figura 4 – Ciclo biológico do *Plasmodium* spp, mostrando a sua evolução nos hospedeiros humano e invertebrado 27
Figura 5 – Ciclo biológico do *Plasmodium* spp e a ação dos medicamentos em cada etapa do ciclo 28
Figura 6 – Estrutura química da artemisinina e de seus derivados.....29
Figura 7 – Estrutura química dos ACTs utilizados no Brasil.....30
Figura 8 – Biotransformação da artemisinina e de seus derivados 31
Figura 9 – Estrutura química da cloroquina e da hidroxicloroquina 32
Figura 10 – Biotransformação da cloroquina e da hidrocloroquina.....33
Figura 11 – Estrutura química da primaquina.....34
Figura 12 – Biotransformação da primaquina 35
Figura 13 – Estrutura química da tafenoquina.....36
Figura 14 – Biotransformação da tafenoquina 37
Figura 15 – Posicionamento do complexo CYP na célula 38
Figura 16 – Principais CYPs responsáveis pelo metabolismo de fármacos no corpo humano 39
Figura 17 – Fase I de biotransformação de fármacos depende do CYP450.....41
Figura 18 – Nomenclatura do Sistema CYP 42
Figura 19 – Perfil dos metabolizadores existentes e as possíveis variáveis genéticas das enzimas metabolizadoras 44
Figura 20 – Esquema do cromossomo 22.....46
Figura 21- Esquema do cromossomo 7.....47
Figura 22 – Mapa da região metropolitana do Amazonas.....52
Figura 23 – Representação esquemática da extração do DNA genômico 55
Figura 24 – Representação da reação de SnaPShot® 58
Figura 25 - Gráfico da procedência dos indivíduos da população em estudo ..64
Figura 26 – Padronização do PCR Multiplex.....65
Figura 27 - Padronização da reação de SnaPShot®.....66
Figura 28 - Mapa de desequilíbrio de ligação dos marcadores genotipados do *CYP2D6* 72

Figura 29 - Mapa de desequilíbrio de ligação dos marcadores genotipados do *CYP3A4/3A5*.....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais CYPs envolvidas no biometabolismo de medicamentos antimaláricos preconizados pelo Ministério da Saúde. 40
Tabela 2 - Sequência e tamanho dos iniciadores dos alelos estudados 57
Tabela 3 – Condições de reação do PCR Multiplex.....57
Tabela 4 - Sequência dos iniciadores utilizados e seus respectivos código rs, tamanho e *SNP*s. 59
Tabela 5 – Condições de reação do SnaPShot® 61
Tabela 6 - Principais características epidemiológicas dos indivíduos de Rio Preto da Eva - AM.....63
Tabela 7 - Distribuição das frequências genotípicas e alélicas nos indivíduos de Rio Preto da Eva. 68
Tabela 8 - Comparação das frequências alélicas do CYP2D6 com as outras populações 70
Tabela 9 – Comparação das frequências alélicas do CYP3A4/3A5 com as outras populações. 71
Tabela 10 - Desequilíbrio de ligação dos marcadores do *CYP2D6*.....72
Tabela 11 - Desequilíbrio de ligação dos marcadores do *CYP3A4/3A5* 73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACT.....Terapia Combinada a Base de Artemisinina
ATP.....Adenosina -Trifosfato
CPR……...Citocromo P450 Redutase
CQ.....Cloroquina
CYP- 450.....Citocromo P-450
CYP2D6.....Citocromo P450 Família 2, Subfamília D, Isoenzima 6
CYP3A4.....Citrocromo P450 Família 3, Subfamília A, Isoenzima 4
CYP3A5.....Citrocromo P450 Família 3, Subfamília A, Isoenzima 5
DCQ..... Desetilcloroquina
DDT.....Diclorodifeniltricloroetano
DL.....Desequilíbrio de Ligação
EDTA.....Ácido Etillenodiaminotetraacético
EHW.....Equilíbrio de Hardy-Weinberg
FAD.....Dinucleotídeo de Adenina Flavina
FMN.....Mononucleotídeo de Flavina
FMO-3.....Monooxigenase contendo Flavina 3
G6PD……Glicose 6-Fosfato Desidrogenase
GST……... Glutationa S-Transferase
H_2O_2……Peróxido de Hidrogênio
HCQ.....Hidroxicloroquina
IM.....Metabolizador Intermediário (*Intermediate Metabolizer)*
MAO-A.....Monoamina Oxidase - A
NADPH.....Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NM.....Metabolizador Normal (*Normal Metabolizer)*
OMS.....Organização Mundial da Saúde
PM.....Metabolizador Fraco (*Poor Metabolizer)*
PQ.....Primaquina
QR.....Quinona Redutase
RE.....Retículo Endoplasmático
RM.....Metabolizador Rápido (*Rapid Metabolizer)*
ROS.....Espécie Reativa de Oxigênio
Rs.....Código de Referência do *SNP* (*Reference SNP)*
SNP.....Polimorfismo de Base Única (*Single Nucleotide Polymorphism)*

TA.....Temperatura Ambiente

TCLE……Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGI.....Trato Gastrointestinal

TQ.....Tafenoquina

UGT.....Uridinas Difosfato Glicuronosiltransferases

UM.....Metabolizador Ultrarrápido (*Ultrarrapid Metabolizer)*

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa causada por hematozoários do gênero *Plasmodium* que são transmitidos aos humanos pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles.* Há sete espécies de plasmódios responsáveis pela infecção natural do homem: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum, P. malariae, P. ovale, P. simium, P. knowlesi e P. cynomolgi* (Brasil *et al.* 2017; Ashley *et al.* 2018; Imwong *et al.* 2019). Dentre essas espécies de *Plasmodium*, destacam-se o *P. vivax* e *P. falciparum* por apresentarem maior prevalência mundial. *O P. falciparum*, largamente predominante na África, é considerado a espécie de maior impacto na saúde pública em virtude das altas taxas de morbidade e mortalidade. O *P. vivax* é a espécie mais amplamente distribuída no mundo. Sua infecção é altamente debilitante causando importantes perdas socioeconômicas e nos últimos anos vêm ocorrendo notificações de malária grave causada *P. vivax* em diferentes cenários epidemiológicos mundiais (Figura 1) (Phyo *et al.* 2022).

Em 2020, devido a pandemia de COVID-19 e, consequentemente a interrupção do serviço de combate à diversas doenças, dentre elas a malária, houve um aumento do número casos, de 227 para 241 milhões (6%), e principalmente no número de mortes por malária, de 558 para 627 mil (12%), em relação ao ano de 2019, das quais cerca de 90% ocorreram na África Subsaariana (WHO 2021).

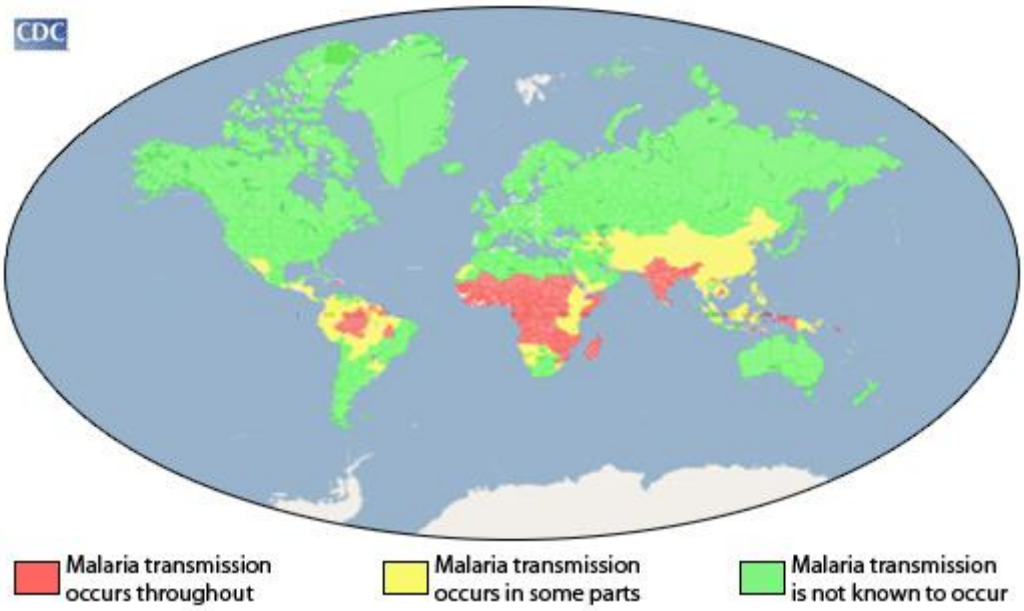


Figura 1 - Mapa global de casos de malária em 2020

Os países que ainda possuem grande concentração de casos estão na América Central e do Sul, África e Sul/Sudeste Asiático. Fonte: CDC 2021

Apesar da recente recomendação do uso da vacina RTS, S/AS01 entre crianças da África Subsaariana e de outras regiões com transmissão de moderada a alta da malária por *P. falciparum* pela Organização Mundial de Saúde (WHO 2021), o diagnóstico precoce e o tratamento quimioterápico/profilático eficaz ainda constituem as principais ferramentas para o controle da malária (WHO 2021). Entretanto, nos últimos anos, vários estudos têm relatado falha terapêutica em diferentes áreas endêmicas no mundo, incluindo o Brasil (O'Flaherty *et al.* 2017; Brasil *et al.* 2018; Barrett *et al.* 2019; Silvino *et al.* 2020; Teklehaimanot *et al.* 2020;). A falha terapêutica pode estar relacionada a diversos fatores dentre os quais pode-se destacar: a) a não adesão ao tratamento; b) o uso incorreto e/ou coadministração de medicamentos; c) a imunidade; d) as coinfecções; e) o polimorfismo genético dos parasitos e/ou dos hospedeiros (Elewa *et al*. 2017; Menard & Dondorp 2017; Romphosri *et al*. 2020). A variabilidade em genes que codificam enzimas envolvidas no biometabolismo de diferentes fármacos, como a família do Citocromo P-450 (CYP), pode contribuir para diferenças interindividuais na resposta terapêutica ou toxicológica aos vários fármacos, estando diretamente relacionadas ao surgimento de reações adversas e da falha terapêutica (Phillips *et al*. 2001; Bains 2013; Peko *et al*. 2019).

O CYP é uma superfamília de enzimas responsável pela biotransformação de diferentes substratos, endógenos e exógenos (Song *et al*. 2021). Os CYPs mais importantes no metabolismo de fármacos no organismo são o *CYP2C*, *CYP2D6*, *CYP3A4* e *CYP3A5* (Zanger & Schwab 2013; Waring 2020; Song *et al*. 2021). Estudos em diferentes populações de áreas endêmicas de malária, Africanas, Asiáticas e Americanas, incluindo regiões brasileiras, vêm demonstrando que a variabilidade genética das enzimas do sistema *CYP450*/famílias *CYP2* (*2D6*) e *CYP3* (*3A4* e *3A5*) está diretamente relacionada ao aparecimento de diferentes fenótipos de biotransformação, afetando tanto a eficácia quanto a toxicidade dos antimaláricos, além de contribuir para a resistência através da alteração das concentrações plasmáticas dos fármacos (Suarez-Kurtz *et al*. 2012; Silvino *et al*. 2016; Brasil *et al*. 2018; Ramírez *et al*. 2020). Ademais, variações genéticas do CYP450 têm demonstrado influenciar a susceptibilidade e a evolução clínica de várias doenças (Mittal *et al*. 2015; Bhat *et al*. 2018; Cong *et al*. 2018).

A caracterização do perfil genotípico de enzimas envolvidas no biometabolismo de fármacos antimaláricos (*CYP450*:*CYP2*/*CYP3*) de populações de áreas endêmicas brasileiras é uma ferramenta importante no auxílio a prevenção de efeitos adversos e da falha terapêutica dos tratamentos antimaláricos preconizados no Brasil (Plewes *et al*. 2019; Silvino 2019). Além disso, contribui na compreensão dos padrões de resposta terapêutica e no direcionamento, não somente na indicação do uso do fármaco correto (farmacogenômica), como também o esquema posológico adequado para determinados grupos populacionais, intensificando assim a eficácia terapêutica e o controle dessa endemia. Dentro desse contexto, o nosso estudo visa caracterizar o perfil genotípico de enzimas envolvidas no biometabolismo de fármacos antimaláricos (CYP450) em população de área endêmica brasileira de malária.

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 Malária no Brasil: aspectos históricos

A malária acompanha a humanidade ao longo de sua história (Nielsen *et al*. 2017; Rodrigues *et al*. 2018). Há relatos sobre febres malignas intermitentes e calafrios, consistentes com os sintomas da malária, em escritos chineses que remontam a 2700 anos antes de Cristo (a.C.), assim como em escritos egípcios, gregos e indianos, 1570 a 400 a.C. (Cox 2010; Tlapko *et al*. 2019). A doença chegou

a ser relacionada com a punição de deuses e a presença de maus espíritos nos pântanos (Bruce-Chwatt 1988). Hipócrates, no século V a.C., descartou tais superstições, descreveu detalhadamente os sintomas da malária e relacionou ocorrência de febres na população local à proximidade de corpos d'água estagnados (Neghina *et al*. 2010).

Estudos sobre a origem da malária apontam que o seu surgimento está vinculado a primatas não humanos, na Etiópia, e sua propagação com a evolução e migração humana (Neghina *et al*. 2010). A migração seguiu inicialmente para as regiões tropicais, subtropicais e temperadas do Velho Mundo e posteriormente para o Novo Mundo, com missionários, exploradores e escravos (Neghina *et al*. 2010; Yalcindag *et al*. 2012; Rodrigues *et al*. 2018). Nas Américas, há evidências que a malária por *P. vivax* tenha sido introduzida por ondas migratórias de habitantes de diferentes regiões da África, Sul da Ásia e Melanésia, enquanto a malária por *P. falciparum* tenha sido introduzida principalmente por habitantes de diferentes regiões da África, assim como por habitantes do Sudeste Asiático (Yalcindag *et al*. 2012; Rodrigues *et al*. 2018).

No Brasil, a primeira referência à malária data de 1587, com a ocorrência de casos nas tribos Tupinambás, trazida, provavelmente, durante o início da colonização, no século XVI, com o comércio transatlântico de escravos da África. Análises moleculares apontam que o *P. falciparum* foi introduzido no Brasil pelos africanos na época da escravidão, antes de 1560 e que o *P. vivax,* pode ter chegado antes da colonização europeia, pela travessia feita pelos melanésios entre a Ásia e a América, via Estreito de Bering, assim como durante a colonização com o comércio de escravos da África (Nielsen *et al*. 2017; Rodrigues *et al*. 2018)

Após o período colonial, entre os séculos XIX e XX, a região Amazônica teve um aumento substancial de casos de malária, devido aos migrantes vindos do Nordeste para extração de borracha na Amazônia e para a expansão da construção da ferrovia Madeira-Mamoré (Baia-da-Silva *et al*. 2019). No Sudeste do país, na mesma época, a transmissão crescia acentuadamente na Baixada Fluminense e no Vale do Paraíba, uma vez que com a abolição da escravatura os trabalhos de combate à malária, para os quais contribuía a mão de obra escrava, cessaram (Cives 2021). Assim, no fim do século XIX e início do século XX, a malária ocorria praticamente em todo o território nacional, com exceção de algumas áreas no Sul do país (Camargo 2003).

Durante os anos de 1930, uma grande epidemia de malária ocorreu quando navios franceses que faziam a rota postal França-Natal via Dakar trouxeram o *Anopheles gambiae* que invadiu o Nordeste brasileiro. A taxa de letalidade atingiu o patamar de 13% em uma população sem imunidade adquirida. Após os esforços conjuntos, nos anos iniciais da década de 1940, o vetor foi eliminado do Brasil (Oliveira-Ferreira *et al*. 2010).

Em meados da década de 40, foram notificados no Brasil uma média 5 milhões de casos de malária ao ano com cerca de 80 mil óbitos, em uma população de aproximadamente 55 milhões de habitantes. A alta incidência de malária no Brasil, assim como na população de vários países em desenvolvimento, levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a adotar o programa de erradicação de malária nas regiões atingidas por essa doença. Tal programa consistia no uso extensivo do DDT e no tratamento em massa da população. Esse programa no Brasil, que teve início em 1947, reduziu sensivelmente o número de casos, em menos de uma década, e a malária ficou restrita, quase exclusivamente, à região Amazônica (Melo *et al*. 2020; Cives 2021).

A partir da década de 70, devido ao processo de desenvolvimento e ocupação da Amazônia, a situação da malária começou a se agravar gradativamente, passando de 52 mil casos em 1970, para 635.646 em 1999. Nesse período iniciou-se um intenso fluxo migratório desordenado de pessoas não imunes para Amazônia. Afluxo esse relacionado aos projetos agropecuários, à construção de estradas e hidroelétricas, assim como às atividades de garimpo e mineração desenvolvidos na Amazônia (Cives 2021). Com isso, a região Amazônica vem flutuando no número de casos de malária, totalizando 99% dos casos em todo o Brasil (Figura 2).

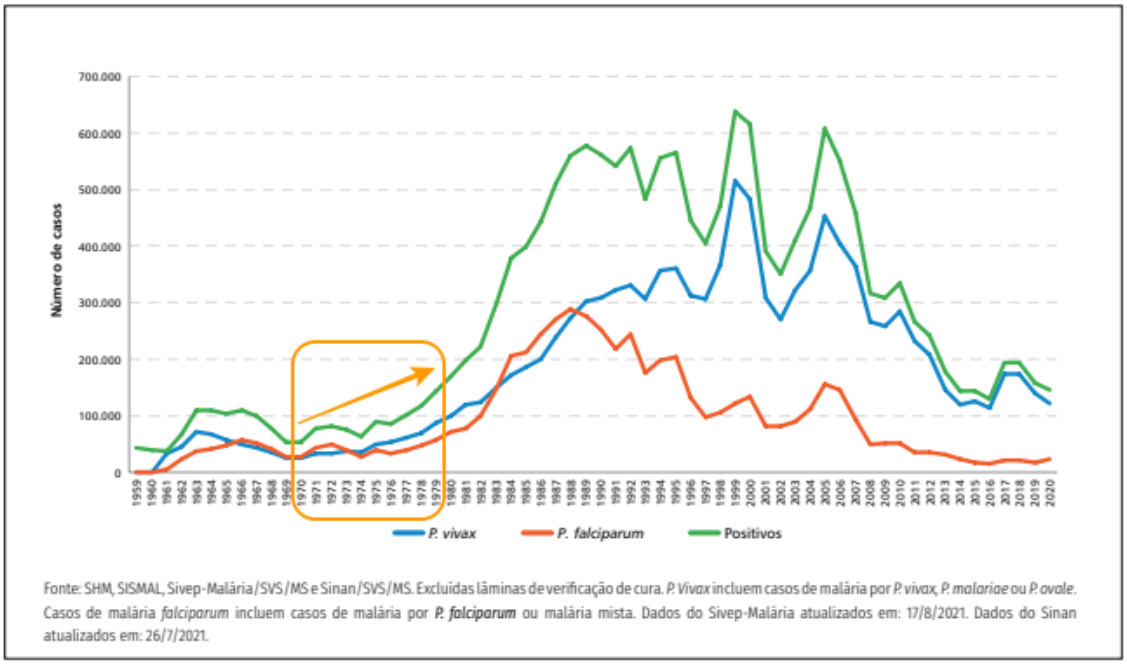


Figura 2 - Série histórica de casos de malária de 1959-2020

Em laranja claro, observa-se o aumento no número de casos a partir da década de 1970. (Brasil, MS 2021).

A partir de 2006, o número de casos de malária no Brasil começou a decair como resultado de ações integradas de controle, realizadas no âmbito federal, estadual e municipal. Tal decréscimo está relacionado a diversos fatores, dentre os quais se destacam: vigilância epidemiológica, implementação de diagnóstico e tratamento rápido, os quais também foram responsáveis pela diminuição acentuada no número de infecções causadas por *P. falciparum* (Oliveira-Ferreira *et al*. 2010).

Nos últimos anos, o número de casos de malária vem diminuindo no Brasil (Brasil, MS/SVS 2021), entretanto, apesar da redução no número de casos notificados, em 2020 o número de óbitos aumentou 18,9%. Esse aumento pode estar relacionado ao aumento de casos de malária por *P. falciparum* (Brasil, MS/SVS 2021) assim como ao cenário de pandemia de COVID-19, que pode ter contribuído tanto para a demora na busca pelo diagnóstico, quanto na demora pela suspeição de infecção pelo *Plasmodium* spp. (Brasil, MS/SVS 2021).

1.1.2 Malária no Brasil: situação atual

Em 2021, foram registrados aproximadamente 125 mil casos de malária no Brasil, sendo 84% causados pelo *P. vivax* (Brasil, MS/SVS 2021). As regiões endêmicas brasileiras respondem atualmente por 23% do total de casos de malária das Américas (WHO 2021), concentrando-se quase que em sua totalidade (99.6%) na região da Amazônia Legal (Figura 3), que compreende os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e parte do estado do Maranhão (Brasil, MS/SVS 2021; De Pina-Costa *et al*. 2021). No entanto, a distribuição da malária nessa região é heterogênea, uma vez que são detectados níveis diferenciais de transmissão entre certas áreas que podem estar associados a diversos fatores, dentre eles: as diferentes formas de ocupação do solo, as modalidades de exploração econômica dos recursos naturais, a distribuição vetorial assim como ao grau de imunidade e as características genéticas da população (Oliveira-Ferreira *et al*. 2010).

O principal vetor transmissor da malária no Brasil, principalmente na região Amazônica, é o *Anopheles darlingi*, em razão de sua abundância, elevada antropofilia e endofagia (Baia-da-Silva *et al*. 2019). Na região Extra-Amazônica, têm sido registrados surtos de malária decorrentes da introdução da doença por migrantes infectados oriundos das áreas de transmissão (Multini 2019), assim como casos autóctones, a maioria em áreas de Mata Atlântica. Nesse local, os casos autóctones são atribuídos a uma zoonose na qual primatas não-humanos atuam como potencial reservatório de infecção pelo *P. simium*, que é similar ao *P. vivax*, e o principal vetor é o *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Brasil *et al*. 2017; Multini 2019).

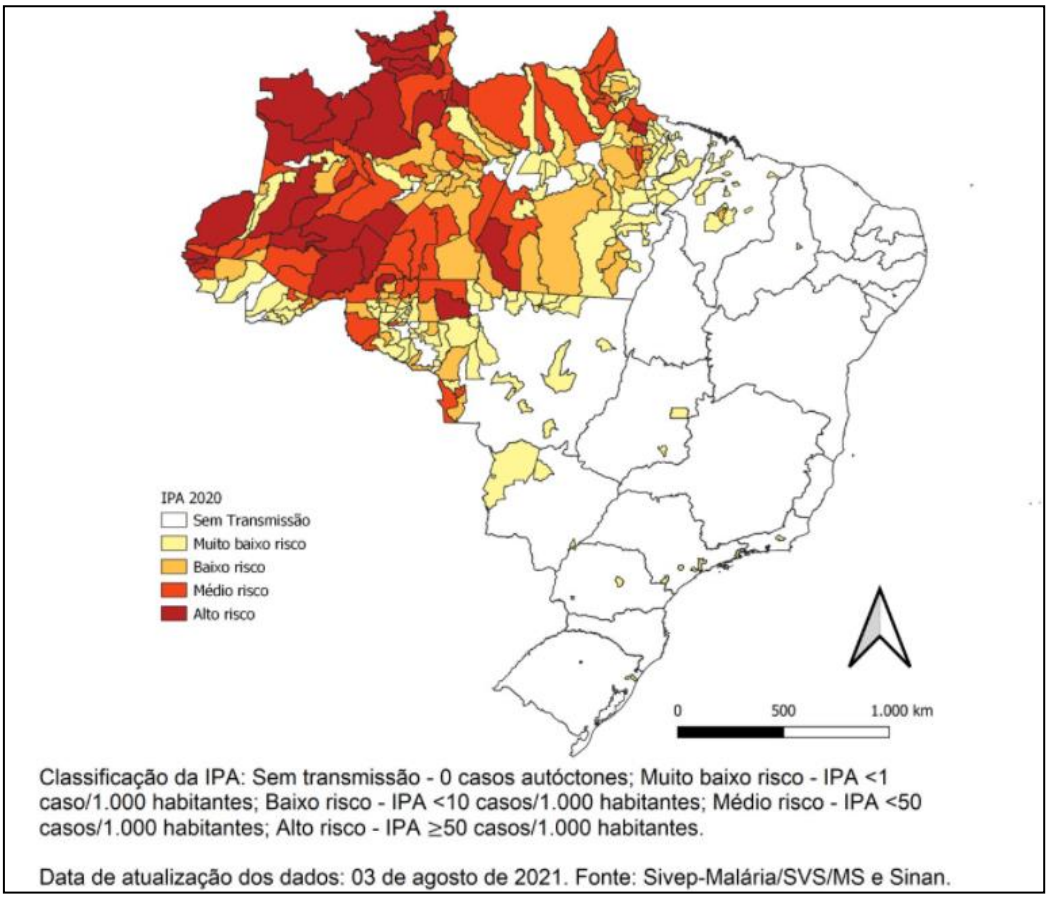


Figura 3 – Mapa de risco por município no Brasil em 2020

A região Norte ainda concentra a maioria dos casos de malária no país. Fonte: Brasil, MS/SVS 2021

1.1.3 Ciclo biológico do Plasmodium spp.

O ciclo biológico do *Plasmodium* spp. envolve dois hospedeiros: os invertebrados, mosquitos do gênero *Anopheles*, e os vertebrados, mamíferos, aves e/ou répteis. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito infectado inocula os esporozoítos no hospedeiro vertebrado. Eles podem atingir a corrente sanguínea, os vasos linfáticos ou ficarem na própria pele. Os esporozoítos que atingem os vasos linfáticos, podem invadir as células hospedeiras no linfonodo proximal. Os esporozoítos que ficaram na pele podem invadir a epiderme, a derme ou associarem-se com o folículo piloso (formas exo-eritrocíticas) (Ménard *et al* 2013). Já os esporozítos que atingem a corrente sanguínea, seguem para o fígado e ao infectarem os hepatócitos podem seguir dois caminhos: entrar em latência, transformando-se em hipnozoítos (nos casos de *P. vivax* ou *P. ovale*) ou sofrerem um processo de reprodução por esquizogonia, dando origem a esquizontes hepáticos (esquizontes exoeritrocíticos) repletos de merozoítos. Ao final dessa fase os hepatócitos se rompem e liberam merozoítos, envoltos por estruturas vesiculares denominadas merossomos

(Sturm *et al*. 2006), que são carreados através da circulação hepática até a corrente sanguínea. Liberados na corrente sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos (Cowman *et al*. 2016) dando início ao ciclo eritrocítico. No interior das hemácias, os merozoítos passam por três fases de desenvolvimento, morfologicamente diferentes, denominadas de trofozoíto imaturo (anel), trofozoíto maduro, e esquizontes sanguíneos, repletos de merozoítos. Ao final do ciclo eritrocítico, essas formas são liberadas e invadem outros eritrócitos, repetindo o ciclo eritrocítico, momento que coincide com as manifestações clínicas da doença, notadamente o paroxismo febril, caracterizado por calafrio, febre e sudorese. Alguns parasitos ao entrarem nas hemácias se diferenciam em formas sexuadas, os gametócitos femininos e masculinos, responsáveis pela infecção do vetor. Essas formas biológicas ao serem ingeridas por mosquitos do gênero *Anopheles*, durante o repasto sanguíneo, darão início a fase sexuada no interior do seu estômago, resultando na fecundação e formação de ovos (zigotos) que por sua vez se tornam móveis e alongados (oocinetos), que invadem a parede do intestino e se desenvolvem em oocistos. No interior do oocisto ocorrem diferenciação e divisão nuclear que resulta na formação de milhares de esporozoítos (formas infectantes), que migram para as glândulas salivares do mosquito vetor, os quais poderão, no momento da picada, ser inoculados no homem, perpetuando o ciclo biológico do *Plasmodium* spp (Figura 4) (Soulard *et al*. 2015; Vaughan & Kappe 2017; CDC 2021).

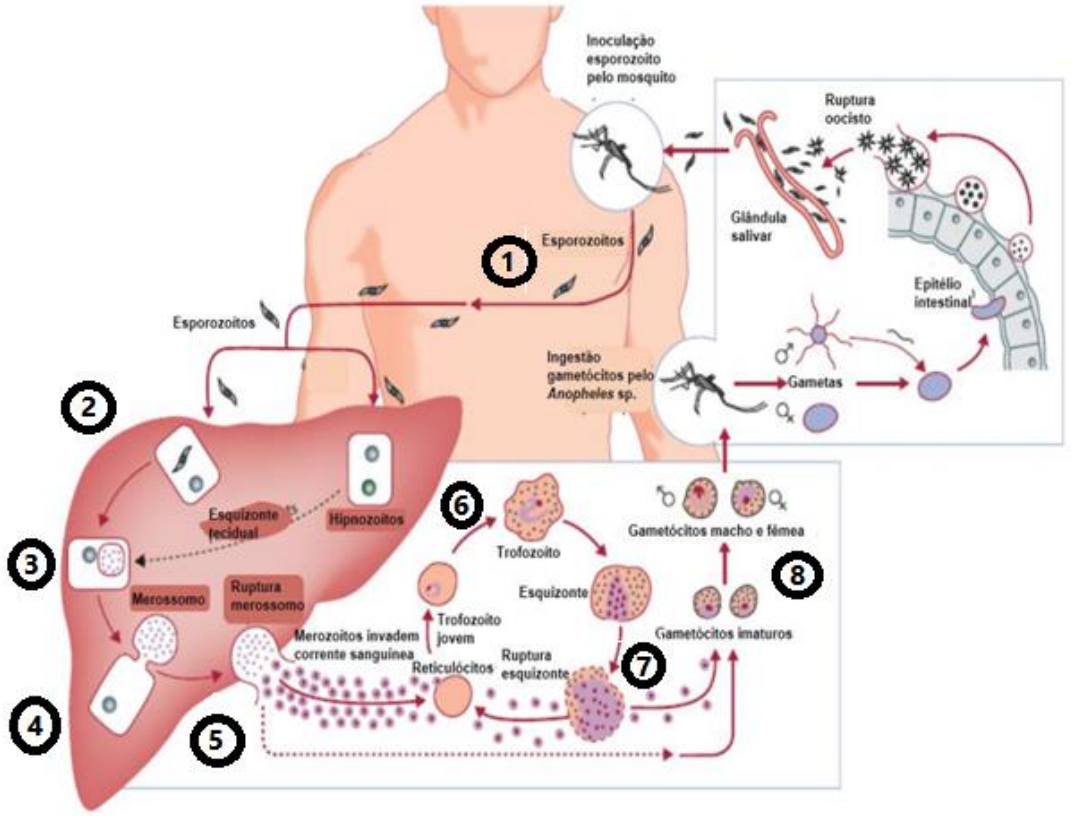


Figura 4 – Ciclo biológico do *Plasmodium* spp, mostrando a sua evolução nos hospedeiros humano e invertebrado

Fase pré-eritrocítica: Esporozoítos injetados na derme do hospedeiro vertebrado atingem a circulação sanguínea e migram para o fígado infectando os hepatócitos [1]; No parênquima hepático, os esporozoítos atravessam numerosos hepatócitos à procura de um hepatócito adequado para o desenvolvimento do esporozoíta ou podem formar hipnozoítos, as formas latentes de *P. vivax* e *P. ovale* [2]. Formação de um vácuolo parasitóforo onde os esporozoítos se desenvolvem assexuadamente [3] dando origem a milhares de merozoítos [4]. Merozoítos liberados do fígado para a circulação sanguínea [5]. Fase eritrocítica: Merozoítos penetram nos eritrócitos e se diferenciam em trofozoítas [6]. Estes se multiplicam originando esquizontes repletes de merozoítos que infectarão novos eritrócitos dando continuidade ao ciclo eritrocítico [7]. Alguns merozoítos se diferenciam em formas sexuadas (gametócitos masculino e feminino) que, ao serem ingeridos por mosquitos do gênero *Anopheles*, dão continuidade ao ciclo biológico do parasite [8]. Adaptado de Mueller *et al.* 2009

.

1.1.4 Tratamento da malária

O diagnóstico precoce e o tratamento farmacológico imediato, com compostos antimaláricos efetivos são estratégias para minimizar a transmissão da malária e controlar a doença (WHO 2021). O tratamento da malária não complicada tem como objetivo principal diminuir a morbidade e a mortalidade através da eliminação do parasito. Em termos de saúde pública, pretende-se ainda diminuir a sua

transmissibilidade, limitar os reservatórios humanos dos parasitos e prevenir o aparecimento e dispersão de resistência aos antimaláricos (WHO 2021).

Os quimioterápicos antimaláricos podem ser classificados quanto a sua ação em diferentes estágios do ciclo biológico de *Plasmodium* spp. Como (Figura 5): **esquizonticidas sanguíneos** (p. ex. cloroquina, mefloquina, quinina e derivados de artemisinina como arteméter e artesunato) atuam sobre as formas assexuadas do parasito responsáveis pela patogenia e manifestações clinicas da doença; **esquizonticidas teciduais** (p. ex. primaquina e tafenoquina) atuam sobre as formas latentes, os hipnozoítos hepáticos das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, evitando a recaída tardia; **gametocitocidas** (p. ex. primaquina e cloroquina) agem sobre as formas sexuadas, interrompendo o ciclo de transmissão do parasito e **esporonticidas** (p. ex. primaquina) previnem a esporogonia no mosquito vetor, inibindo a transmissão da doença (Alven & Aderibigbe 2019; Belete 2020; Brasil 2020).

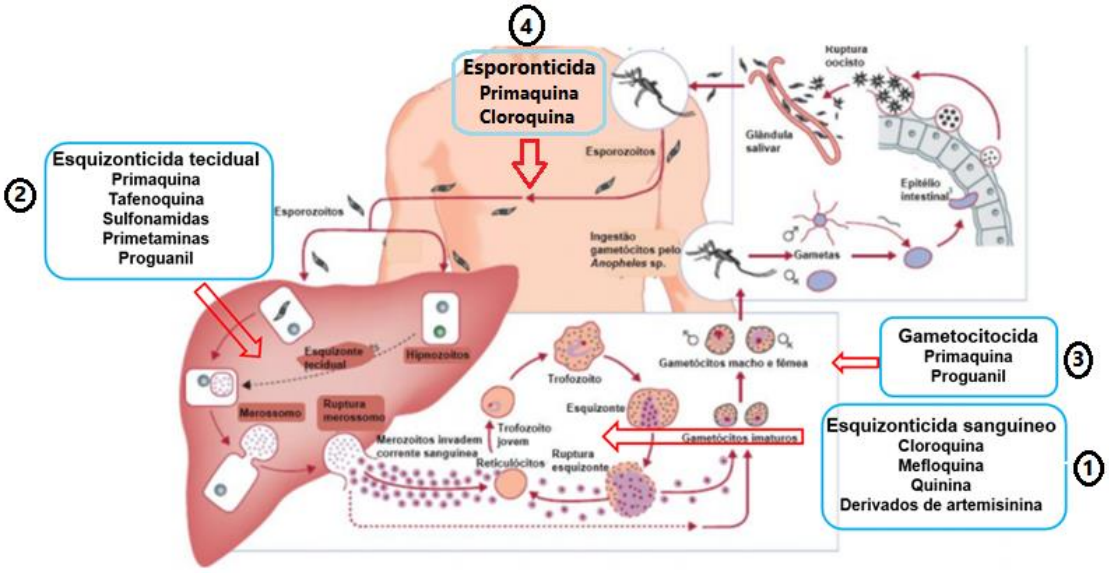


Figura 5 – Ciclo biológico do *Plasmodium* spp e a ação dos medicamentos em cada etapa do ciclo

Esquizonticidas sanguíneos: promovem a cura clínica [1]; Esquizonticidas teciduais ou hipnozoiticidas: promovem a cura radical da infecção por P. vivax e P. ovale [2]; Gametocitocidas: bloqueiam a transmissão do parasite [3]; Esporonticidas: inibem a transmissão do parasito [4]. Fonte: (BRASIL, MS/SVS 2020).

1.1.5 Metabolismo e Mecanismo de Ação dos Antimaláricos

1.1.5.1 Artemisinina e seus derivados

A artemisinina foi isolada, em 1972, por pesquisadores chineses de uma planta chamada *Artemisia annua L.* e sua estrutura foi elucidada somente em 1979 (Balint 2001). Os antimaláricos que tem na composição artemisinina ou seus derivados (Figura 6) são considerados fármacos de ação rápida e eficaz em comparação a outros medicamentos tradicionais (Li & Pybus 2019). Entretanto, eles apresentam algumas características que reduzem sua eficácia como alta lipofilicidade, baixa biodisponibilidade por via oral, tempo de meia-vida curto e considerável toxicidade (Li & Pybus 2019). Com a finalidade de reduzir a capacidade do parasito adquirir resistência, os efeitos adversos, assim como de prolongar o efeito terapêutico, os derivados de artemisinina são utilizados em combinação com outros fármacos antimaláricas de estruturas não relacionadas e com eliminação lenta: denominada de terapia combinada à base de artemisinina ou *Artemisinin Combination Therapy* (ACT) (Li & Pybus 2019; Arya *et al*. 2021).

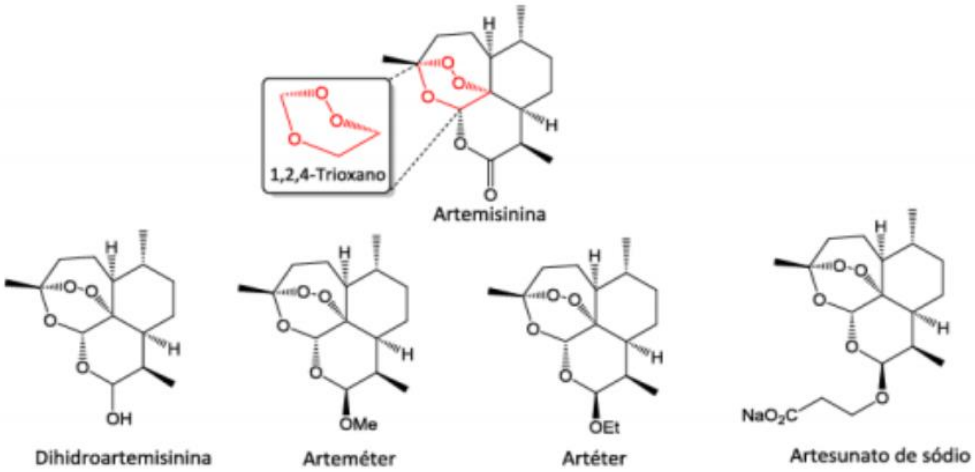


Figura 6 – Estrutura química da artemisinina e de seus derivados

Retirado de Carneiro 2016

As duas ACTs utilizadas no Brasil são uma combinação de Artesunato-Mefloquina e Artemeter-Lumefantrina (Figura 7). Durante suas meias-vidas, as artemisininas deixam somente os parasitos residuais, onde eles são eliminados pelo medicamento parceiro de eliminação lenta (Kerb *et al*. 2009). Esses medicamentos agem sendo

gametocidas e esquizonticidas sanguíneos, prevenindo a transmissão para outros hospedeiros e reduzindo a propagação de formas resistentes (Pinheiro *et al*. 2018).

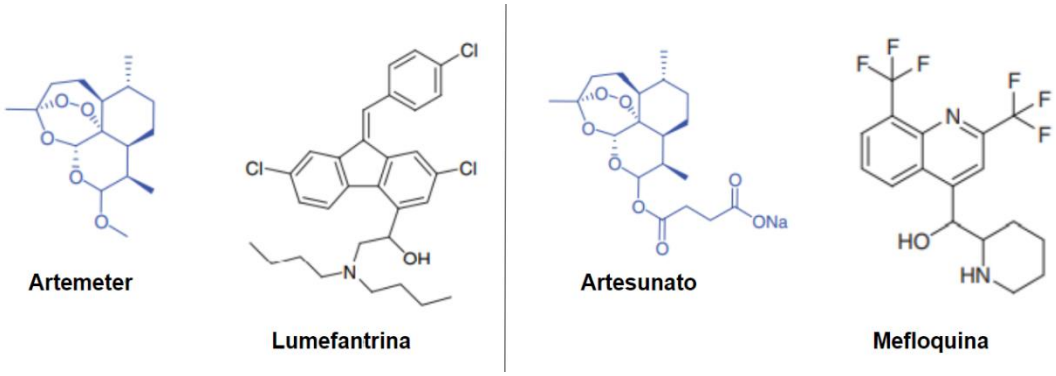


Figura 7 – Estrutura química dos ACTs utilizados no Brasil

Retirado de Martino *et al.* 2019

As ACTs são utilizadas principalmente para tratar as infecções por *P. falciparum,* mas também nas infecções por *P. vivax* em áreas onde circulam cepas resistentes à cloroquina. No entanto, há relatos de resistência do *P. falciparum* às ACTs no Sudeste Asiático: Camboja, Laos, Tailândia, entre outros (Quang *et al*. 2018; Koehne *et al*. 2021).

Os derivados da artemisinina são absorvidos rapidamente pelo trato gastrointestinal (TGI), mas não completamente, podendo variar entre indivíduos. A biodisponibilidade depende de cada composto (8-85%), já que a eliminação do arteméter ocorre de 3 a 7 horas após a absorção, do artesunato de 2 a 5 minutos, sendo convertidos a dihidroartemisinina, que é eliminado de 40 a 60 minutos, mefloquina de 2 a 3,5 semanas e a lumefantrina de 4 a 6 dias (Sugiarto *et al*. 2017). Sua distribuição pelo corpo é lenta, por ter alta ligação com proteínas plasmáticas (80%) (Balint 2001). Seu biometabolismo ocorre pelas enzimas do citocromo P450, *CYP3A4/3A5*, *CYP2B6* e *CYP2A6* e pelas moléculas que participam da fase II, as uridinas difosfato glicuronosiltransferases (*UGTs*), onde a artemisinina é metabolizada pelos *CYPs 3A4*, *CYP2B6* e *CYP2A6* nos metabólitos inativos, deoxiartemisinina, deoxidihidroartemisinina, cristal-7 e 9,10-dihidroartemisinina e o artesunato, artemeter e arteéter em dihidroartemisinina (metabólito ativo) pelos *CYPs 2A6*, *3A4/3A5* e *3A4/2B6*, respectivamente e metabolizados, na fase II, pelas *UGTs 1A9* e *2B7* no composto inativo α-dihidroartemisinina-β-glicoronida (Figura 8) (Kerb *et al*. 2009).

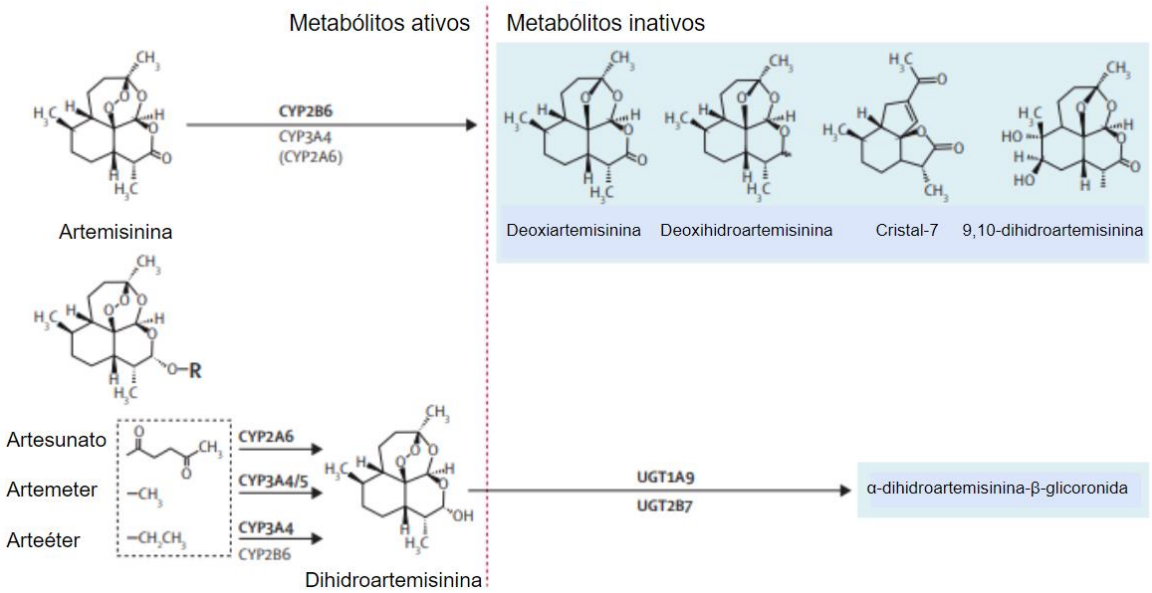


Figura 8 – Biotransformação da artemisinina e de seus derivados

Os metabólitos ativos estão sendo observados no lado esquerdo da figura, onde os CYPs estão atuando. No lado direito estão representados os metabólitos inativos e as enzimas que atuam na fase II. Adaptado de Kerb *et al.* 2009

Estudos relacionados ao modo de ação dessa família têm revelado que suas propriedades antimaláricas estão relacionadas com a formação de radicais livres que alteram as vias bioquímicas dentro do parasito, em particular, a do trofozoíto que pega e digere a hemoglobina do hospedeiro em seu vacúolo digestivo para obter aminoácidos. A digestão da hemoglobina libera o grupamento heme que é tóxico para o parasito, portanto, é polimerizado em hemozoína (pigmento malárico) (Martino *et al*. 2019). Com isso, os derivados de artemisinina são ativados pelo ferro da hemozoína: a clivagem da ponte do endoperóxido acontece através da reação de Fenton do ferro (Fe) II, que produz espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais centrados de carbono que alquilam e modificam as proteínas do parasito, causando sua morte (Pinheiro *et al*. 2018).

1.1.5.2 Cloroquina e Hidroxicloroquina

A cloroquina (CQ) e a hidroxicloroquina (HCQ) são medicamentos pertencentes à família das 4-aminoquinolinas (Figura 9), sendo a CQ sintetizado em 1934 e comercializado em 1949 e a HCQ em 1946 e vendido em 1955 (Browning 2014). Foram desenvolvidos após a ocupação da plantação de quinina pelos japoneses na Segunda Guerra Mundial (Ginsburg 2005). Possuem atividade esquizonticida sanguíneo, ou seja, combatem às formas eritrocíticas do *Plasmodium* spp. (Pedro

2011). Ambas se concentram nos vacúolos digestivos do parasito aumentando o pH e interferindo na capacidade do protozoário de metabolizar e utilizar a hemoglobina da hemácia. Com isso, a CQ e a HCQ formam um complexo com a ferriprotoporfirina IX, evitando a polimerização da hemozoína, substância de desintoxicação do *Plasmodium* spp., levando-o a morte (Fong & Wright 2013). Entretanto, existem cepas resistentes à cloroquina de *P. falciparum* e *P. vivax* em diversas regiões (Packard 2014; Almeida *et al*. 2020).

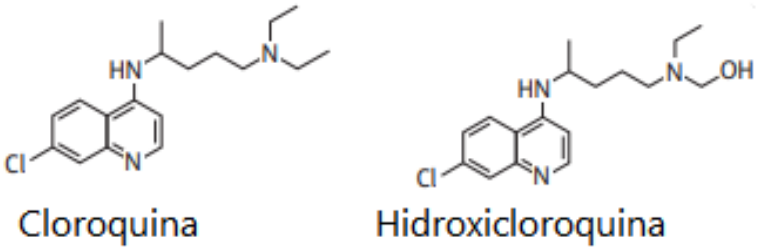


Figura 9 – Estrutura química da cloroquina e da hidroxicloroquina

Adaptado de Al-Bari 2015

São medicamentos eficientes, bem tolerados, estáveis, seguros, com facilidade de produção (Slater 1993), mas a CQ é mais tóxica do que a HCQ, principalmente em pacientes com retinopatias (Seok Lim *et al*. 2009). Ambos possuem propriedades farmacocinéticas parecidas (Tönnesmann *et al*. 2013). São bem absorvidos pelo TGI, possui de 70 a 80% de biodisponibilidade (Furst 1996). A cloroquina possui uma distribuição relativamente lenta, em torno de 60%, devido a interação com proteínas plasmáticas, a glicoproteína ácida alfa -1 (42 a 48%) e a albumina sérica (39%), além de lipoproteínas (Ducharme *et al*. 1996), concentrando-se em leucócitos e tecidos dos pulmões, rins, baço e fígado (Qozi *et al*. 2014). Já a hidroxicloroquina possui alta afinidade com a melanina, depositando-se em tecidos dos olhos e da pele (Schrezenmeier & Dörner 2020). Sua biotransformação ocorre pelas enzimas do citocromo P450 e as principais são a *CYP3A4* e *CYP2C8*. Contudo, outras CYPs podem contribuir no metabolismo como *CYP3A5*, *CYP2D6* e *CYP1A1* (Projean *et al*. 2003; Kaewkhao *et al*. 2019), onde a CQ e a HCQ são transformadas em desetilcloroquina e desetilhidroxicloroquina, somente pela via da HCQ e em seguida à bisetilcloroquina. Estas formas são metabólitos ativos e por fim, são transformados em metabólitos transientes (Figura 10) (Schrezenmeier & Dörner 2020). O medicamento é lentamente eliminado do corpo com padrão de eliminação multi-

exponencial, ou seja, uma eliminação inicial mais rápida, seguida por uma fase mais lenta (Chukanchitipat *et al*. 2017).

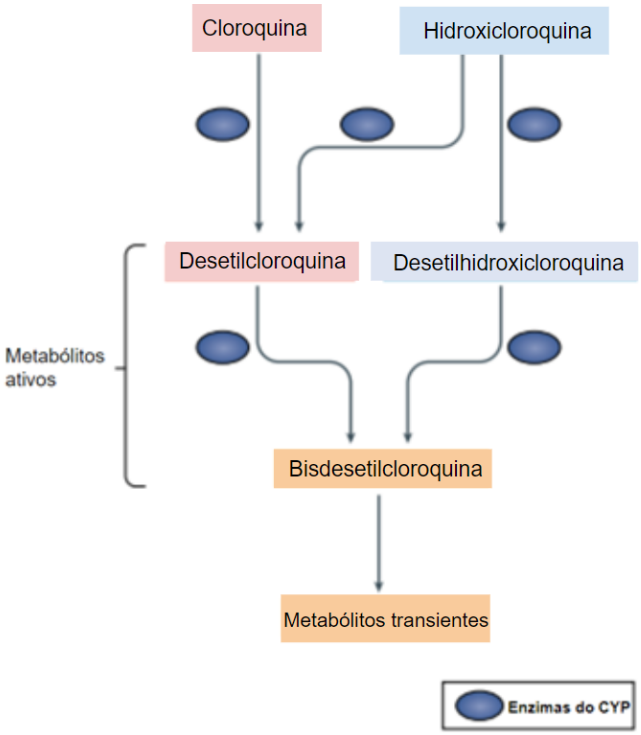
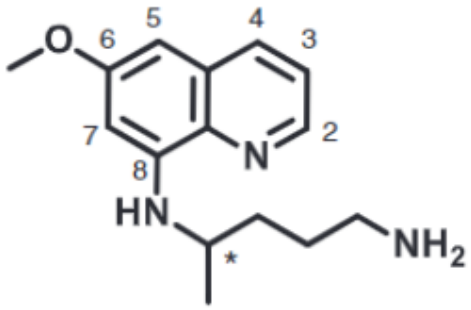


Figura 10 – Biotransformação da cloroquina e da hidrocloroquina

As bolinhas azuis representam as enzimas do CYP que participam de cada fase até formar os metabólitos ativos. Adaptado de Schrezenmeier & Dörner 2020

1.1.5.3 Primaquina

A primaquina (PQ) é um medicamento pertencente à família das 8-aminoquinolinas (Figura 11), tendo sido desenvolvido pelo exército dos Estados Unidos na Segunda Guerra Mundial para diminuir os casos de malária em suas tropas na região do Pacífico (Marcsisin *et al*. 2016). Foi sintetizada em 1945 e começou a ser utilizada na década de 1950 (Baird *et al*. 2019) no tratamento e cura radical de recaídas de malária por *P. vivax* e *P. ovale* causadas pelas formas latentes (hipnozoítas). Além disso, a OMS acrescentou seu uso a indivíduos com malária causada por *P. falciparum*, no intuito de combater a transmissão dos gametócitos maduros para o *Anopheles* spp. (Pybus *et al*. 2013; Avula *et al*. 2018;).



Primaquina

Figura 11 – Estrutura química da primaquina

Adaptado de Marcsisin *et al.* 2016

É um medicamento eficiente e seguro (Recht *et al*. 2014), entretanto desencadeia a oxidação da hemoglobina a metemoglobina, em indivíduos com deficiência do gene responsável pela expressão da NADH citocromo b5 redutase (Ferreira *et al*. 2011), induz hemólise em indivíduos deficientes de G6PD (glicose-6-fosfato desidrogenase) (Llano-Cuentas *et al*. 2019) e possui uma baixa meia vida, devido a rápida desaminação da PQ em seu metabólito inativo, a carboxiprimaquina (Davanço *et al*. 2014).

A primaquina é bem absorvida pelo TGI, sendo distribuída rapidamente para todos os tecidos, concentrando-se no fígado, coração, cérebro, pulmões e músculos esqueléticos (Baird & Hoffman 2004). É metabolizada no fígado principalmente pelas enzimas da fase I do biometabolismo, monoamina oxidase (*MAO-A*), monooxigenase contendo flavina 3 (*FMO-3*) e *CYP450*, sendo dessa última, principalmente pela *CYP2D6*, seguido das *CYP3A4*, *CYP2C19* e *CYP1A2*, transformando a primaquina, um pró-fármaco, em primaquina aldeído, seguindo de carboxiprimaquina (metabólito inativo), metabólito de PQ N-hidroxilado até chegar na 5-hidroxiprimaquina (metabólito com efeito antimalárico), 5,6-ortoquinona e outros metabólitos fenólicos (Figura 12) (Chamnanphon *et al*. 2020).

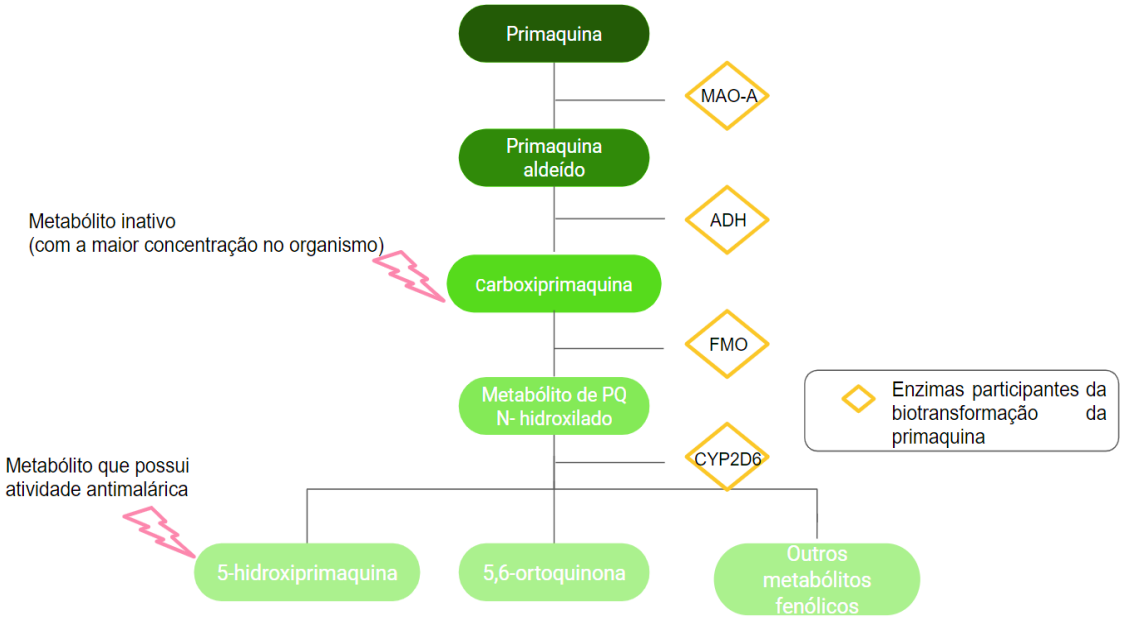


Figura 12 – Biotransformação da primaquina

Os losangos laranjas indicam quais as enzimas que participam de cada fase. Os raios na cor rosa representam em quais fases os metabólitos inativo e ativo são formados. Adaptado de Chamnanphon *et al.* 2020

O modo de ação da primaquina frente ao *Plasmodium* spp. ainda não está muito esclarecido, mas sua ação antimalárica formando peróxido de hidrogênio, por duas etapas, já é sustentada devido aos achados de Camarda e colaboradores (2019). Na primeira etapa, a PQ é convertida em metabólitos hidroxilados (OH-PQm) pelo complexo metabólico CPR (Citocromo P450 redutase) /*CYP2D6*. Em seguida, os metabólitos sofrem uma oxidação espontânea a quinoneiminas (O= PQm) com concomitante geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O CPR humano então recebe dois elétrons do NADPH e participa da transferência de um elétron através de cofatores FAD/FMN para as quinoneiminas, reduzindo-as assim de volta às formas hidroxil e perpetuando um ciclo catalítico que provoca o acúmulo de H_2O_2 nos locais de transformação metabólica (fígado, medula óssea e possivelmente outros). Os parasitos presentes nesses locais são então mortos pela ação do H_2O_2. Sua eliminação é rápida, onde uma parte é excretada em sua forma inalterada (Camarda *et al.* 2019).

1.1.5.4 Tafenoquina

A tafenoquina (TQ), assim como a primaquina, pertence à família das 8-aminoquinolinas (Figura 13), descoberto em 1978 no Instituto de Pesquisa do Exército

Walter Reed (Ebstie *et al.* 2016). Ela é ativa contra formas pré-eritrocíticas (fígado) e eritrocíticas (assexuadas), além de atuar em gametócitos das espécies de *Plasmodium*, incluindo *P. vivax* e *P. falciparum* (Frampton 2018). Utilizada também contra os hipnozoítos, que causam as recaídas tardias de *P. vivax* e *P. ovale* (Thakkar *et al.* 2018).

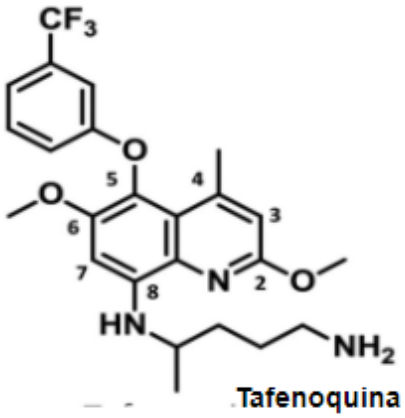


Figura 13 – Estrutura química da tafenoquina

Retirado de Vuong *et al.* 2015

É um medicamento seguro, tolerável, possui meia vida mais longa (em torno de 13-15 dias) (Dow *et al*. 2017; Thakkar *et al*. 2018), além de ser utilizado em dose única para a cura radical em pacientes maiores de 16 anos (Vuong *et al*. 2015). Entretanto, possui capacidade de induzir hemólise em indivíduos deficientes de G6PD, além de provocar oxidação da hemoglobina em metemoglobina e causar toxicidade ocular transitória e problemas gastrointestinais em alguns pacientes (Chu *et al*. 2019 e Val *et al*. 2019).

A tafenoquina é lentamente absorvida pelo TGI, mas se ingerido com alimentos ricos em gordura, sua disponibilidade aumenta para 41%, sua distribuição é lenta, por possuir alta ligação por proteínas plasmáticas, aproximadamente 99,5%. Participa da fase I de biotransformação, mas seu biometabolismo é lento, sendo a tafenoquina transformada em seu metabólito ativo, 5,6-ortoquinona, pela *CYP2D6* (Figura 14). Além disso, seu perfil de excreção é desconhecido (Ebstie *et al.* 2016; Frampton 2018; Lewis *et al.* 2020).

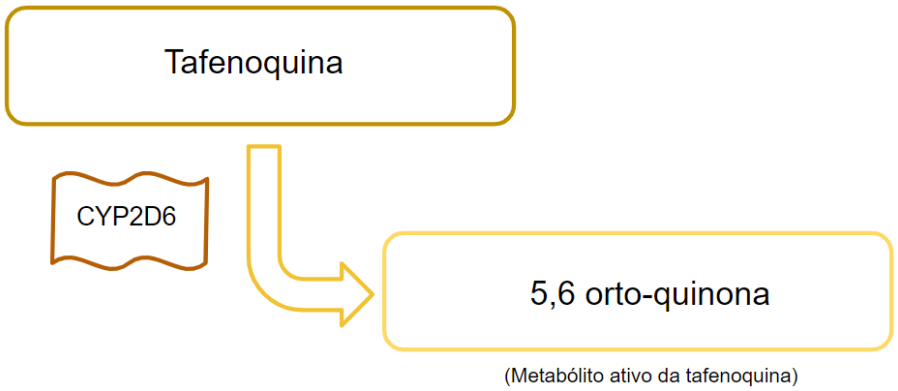


Figura 14 – Biotransformação da tafenoquina

O CYP2D6 é a enzima que participa do metabolismo da tafenoquina, cujo metabólito ativo é o 5,6 orto-quinona. Adaptado de Ebstie *et al.* 2016

A tafenoquina interfere na função mitocondrial levando à morte de microrganismos, como *Trypanosoma brucei*, *Leishmania* sp. e *P. falciparum*, por apoptose. Induz disfunção mitocondrial pela inibição do Citocromo C Redutase (Complexo Respiratório III), diminuindo a taxa de consumo de oxigênio e levando a despolarização no potencial de membrana das células mitocondriais, o que impede a função fisiológica da cadeia respiratória para gerar Adenosina-Trifosfato (ATP). Gera-se, concomitantemente, espécies reativas de oxigênio, elevação de cálcio intracelular e fragmentação do DNA nuclear. Além disso, a tafenoquina inibe a polimerização da hematina (como a cloroquina, diferente da primaquina que é inativa a esse processo). Ela também causa eriptose (“suicídio” dos eritrócitos), processo análogo a apoptose de células nucleadas (Frampton 2018; Hounkpatin *et al.* 2019).

1.1.6 Citocromo P-450 (CYP450)

As enzimas monoxigenases Citocromo-P450 (CYP450) são parte de uma superfamília de enzimas microssomias que estão presentes em todas as espécies vivas, desde bactérias até protistas, plantas, fungos e animais. Acredita-se que tenham se originado de um gene ancestral que existiu há mais de 3 bilhões de anos (Danielson 2002; Elfaki *et al*. 2018). As enzimas do CYP450 são hemoproteínas responsáveis pela biotransformação de xenobióticos e substâncias endógenas (Stipp & Acco 2020)**.** Essas enzimas são encontradas particularmente ativas no fígado e em altas concentrações no intestino delgado, mas podem ser expressas em outros órgãos, como cérebro, pulmões e os rins (Mittal *et al*. 2015; Li *et al*. 2019; Stipp & Acco 2020). Essas enzimas ficam associadas à membrana do retículo endoplasmático,

sendo importantes para o suporte dessas proteínas, além de facilitarem as interações com parceiros redox bem como com outras P-450 (Figura 15) (Brignac-Huber *et al*. 2016).

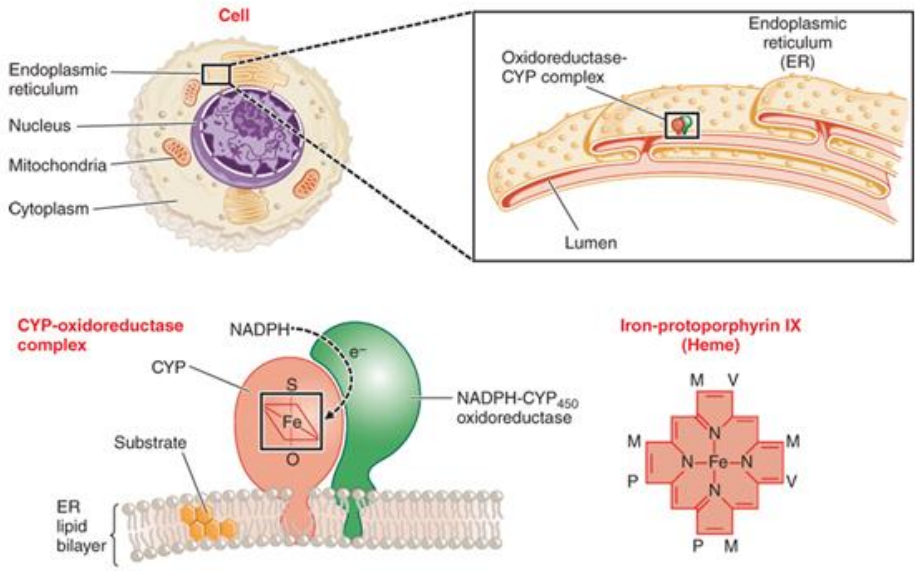


Figura 15 – Posicionamento do complexo CYP na célula

Os *CYPs* ficam mergulhados na bicamada lipídica do retículo endoplasmático (RE). A maior parte dessas proteínas é achada na superfície citosólica do RE. Outra enzima, a NADPH-CYP-oxidorredutase, passa os elétrons para o *CYP*, cujo complexo pode, em presença de O_2, oxidar os substratos xenobióticos, já que muitos desses são hidrofóbicos e consequentemente, estão dissolvidos na membrana do RE. Uma única molécula de NADPH-CYP-oxidorredutase transfere elétrons para todas as isoformas de *CYPs* encontradas na superfície do RE. Cada *CYP* possui uma molécula de ferro-protoporfirina IX, cuja função é se ligar e ativar o O_2. Os substituintes no anel de porfirina são grupos metila (M), propionila (P) e vinila (V). Retirado de Bruton *et al.* 2018.

Existem 57 genes de *CYP* ativos no genoma humano, e 58 pseudogenes identificados (Lam 2019), que estão divididos em 18 famílias e 44 subfamílias (Shahabi *et al*. 2014). Desses genes e pseudogenes, 42 estão envolvidos no metabolismo de xenobióticos e substâncias endógenas, como prostaglandinas e esteróides e 15 são conhecidos por estarem envolvidos no metabolismo de fármacos em humanos (Zanger 2008; Esteves *et al*. 2021). As primeiras três famílias (*CYP1-3*) geralmente estão envolvidas no metabolismo de substâncias exógenas como fármacos (Figura 16) (Sim & Ingelman- Sundberg 2010; Rendic *et al*. 2021). As CYPs *2D6* e *3A4*/*3A5* são algumas das principais enzimas que metabolizam a maioria dos medicamentos (Valikhani *et al*. 2021), possuindo papel fundamental no metabolismo

dos antimaláricos, contribuindo para um tratamento eficaz contra essa doença (Figura 16). Esse conjunto de enzimas altamente polimórficas participa das principais reações metabólicas no organismo (Waring 2020).

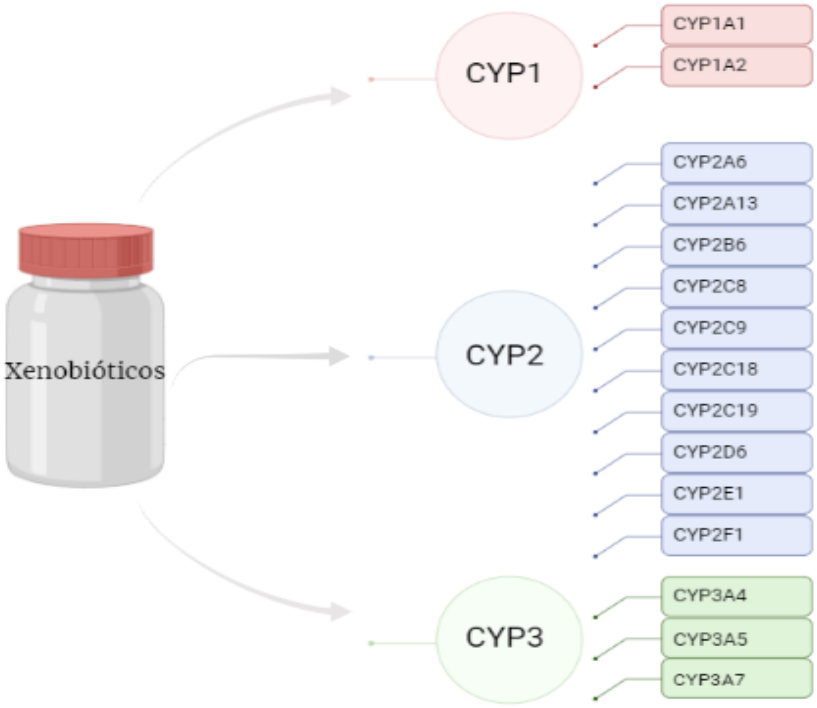


Figura 16 – Principais CYPs responsáveis pelo metabolismo de fármacos no corpo humano

Adaptado de Manikandan & Nagini 2018

Tabela 1 – Principais CYPs envolvidas no biometabolismo de medicamentos antimaláricos preconizados pelo Ministério da Saúde.

CYP2D6	**Cloroquina** **Primaquina** **Tafenoquina**
CYP3A4	**Artemisininas** **Cloroquina** **Hidroxicloroquina** **Lumefantrina** **Mefloquina** **Primaquina**
CYP3A5	**Artemeter** **Cloroquina** **Lumefantrina** **Mefloquina**

Fonte: Hodel et al. 2013; Drugbank 2021

1.1.6.1 Reações de biotransformação dos CYPs

As reações de biotransformação são classicamente distribuídas em duas categorias: as reações de oxidação/redução (fase I) e de conjugação/hidrólise (fase II). Tradicionalmente, as reações de oxidação convertem o fármaco em metabólitos mais hidrofílicos pela adição ou exposição de grupos funcionais polares, como por exemplo, grupos tiol, amina ou hidroxila. Regularmente, esses metabólitos são farmacologicamente inativos e podem ser eliminados sem nenhuma modificação adicional. Entretanto, alguns produtos de reações de oxidação e de redução precisam de modificações adicionais antes de serem excretados. Além disso, as enzimas do CYP450 participam das reações da fase I, cuja maioria são hemoproteínas monoxigenases, estando envolvidas em cerca de 75% do biometabolismo de todos os fármacos utilizados atualmente. As reações de conjugação (fase II) modificam os compostos através da associação de grupos hidrofílicos, como o ácido glicurônico, gerando conjugados mais polares. Então, na fase I, os medicamentos podem ser ativados, inativados ou terem inalterados suas atividades, enquanto a fase II

normalmente ocorre inativação total do medicamento, se este não tiver sido inativado na fase I (Figura 17) (Golan *et al*. 2014; Manikandan & Nagini 2018; Behrendorff 2021).

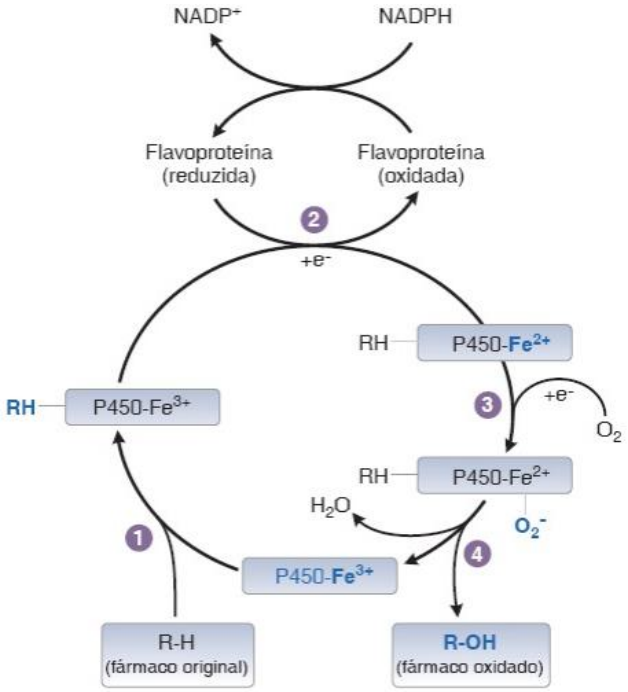


Figura 17 – Fase I de biotransformação de fármacos depende do CYP450

O fármaco forma um complexo com o CYP450 oxidado [1]; O NADPH doa um elétron à flavoproteína redutase, que reduz o complexo P450-fármaco [2] e [3]; O oxigênio une-se ao complexo e a NADPH doa outro elétron, criando o complexo oxigênio ativado-P450-substrato [4]; O ferro é oxidado, com perda de água, formando o produto oxidado do fármaco. Retirado de Golan *et al.* 2014

1.1.6.2 Nomenclatura dos CYPs

A nomenclatura é baseada na homologia da sequência de aminoácidos: o prefixo *CYP* é utilizado para designar o sistema do citocromo P-450. As isoenzimas são consideradas dentro de famílias e subfamílias. Quando se coloca um número após o prefixo *CYP*, este indica a família (por exemplo, *CYP2*), que compartilha mais de 40% de identidade. Depois utiliza-se uma letra que representa a subfamília (por exemplo, *CYP2D*), que compartilha cerca 55% de homologia. O último dígito do sistema, em geral, é um numeral que designa a isoenzima específica individual (por exemplo, *CYP2D6*), cuja identidade é compartilhada por cerca de 3% (Audi & Pussi 2000; Saha 2018). Além disso, pode-se observar um asterisco, um número e uma letra, após o conjunto tradicionalmente conhecido, significando a variante alélica de um indivíduo

(CYP2D6*1a), que no *CYP2D6*, por exemplo, já foram encontradas mais de 90 variações de alelos (Figura 18) (Sistonen *et al*. 2007; Do Prado 2009).

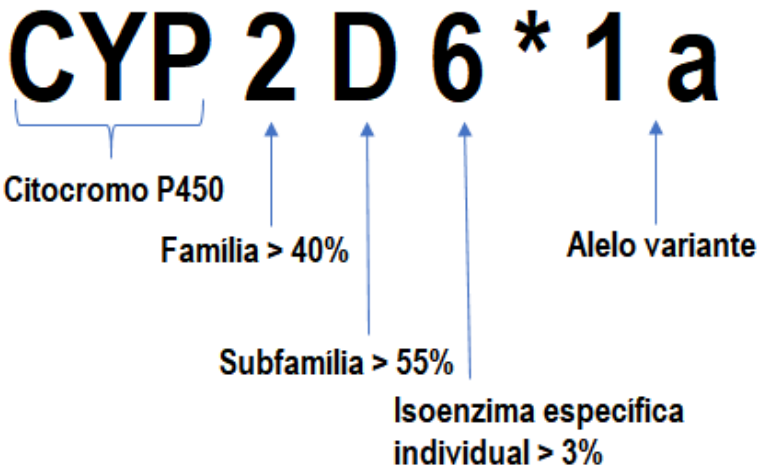


Figura 18 – Nomenclatura do Sistema CYP

1.1.6.3 Polimorfismo genético do CYP e o metabolismo de fármacos

Os polimorfismos genéticos são definidos como uma variação na sequência do DNA e que apresentam uma frequência alélica igual ou superior a 1% em determinada população (Bruton et al. 2018). As formas mais comuns de polimorfismos são as mutações, deleções, variações no número de sequências repetidas, micro e minissatélites e polimorfismo de base única (SNP, do inglês, *Single Nucleotide Polyphormism*). A herança de um *SNP* pode causar variabilidade individual de resposta aos fármacos (Kuehl 2001). A maioria dos *CYPs* envolvidos na biotransformação de fármacos são polimórficos. A variabilidade em genes que codificam enzimas envolvidas no biometabolismo de diferentes fármacos, como a família do Citocromo P-450, pode contribuir para diferenças interindividuais na resposta terapêutica ou toxicológica aos vários medicamentos, estando diretamente relacionadas ao surgimento de reações adversas e da falha terapêutica (Phillips *et al*. 2001; Bains 2013; Peko *et al*. 2019). Assim, fatores intrínsecos e extrínsecos podem influenciar a atividade da enzima da família do *CYP*, podendo ter importantes efeitos na farmacocinética dos medicamentos (Tornio & Backman 2018).

1.1.6.4 Influência dos CYPs na farmacocinética e na resposta terapêutica

Segundo Caudle *et al* (2017), para haver um padrão nas categorias de metabolizadores, existem cinco fenótipos para as variantes alélicas, os

metabolizadores ultrarrápidos (UM, do inglês *Ultrarapid Metabolizer*), metabolizadores rápidos (RM, do inglês *Rapid Metabolizer*), metabolizadores normais (NM, do inglês *Normal Metabolizer*), metabolizadores intermediários (IM, do inglês *Intermediate Metabolizer*) e metabolizadores fracos (PM, do inglês *Poor Metabolizer*). Metabolizadores ultrarrápidos são aqueles que possuem duas ou mais cópias do mesmo gene funcional com atividade enzimática intensa. Metabolizadores rápidos são aqueles que possuem uma cópia e mais um alelo do mesmo gene funcional com atividade enzimática aumentada. Metabolizadores normais são aqueles que possuem uma cópia do mesmo alelo funcional, ou seja, carregam dois alelos selvagens. Metabolizadores intermediários são aqueles que são heterozigotos para um alelo variante ou carregam dois alelos que causam atividade reduzida. Metabolizadores fracos são os que não têm atividade da proteína. Apresentam uma combinação de alelos que não geram proteínas funcionais (Metzger *et al*. 2006; Rodrigues 2015; Caudle *et al*. 2017). Para os indivíduos que apresentam fenótipo PM, o tratamento com doses padrão causará aumento das concentrações plasmáticas do metabólito, atingindo níveis tóxicos, alterando a eficácia do medicamento e causando efeitos adversos. No grupo de indivíduos que apresentam fenótipo UM, o tratamento com doses padrão não atingirá o efeito farmacológico esperado, pois esses indivíduos metabolizarão o medicamento muito rapidamente, alterando a eficácia do mesmo, pois não haverá resposta ao tratamento (Gamarra 2011). Na figura 19 mostra a relação genótipo-fenótipo e suas consequências farmacocinéticas.

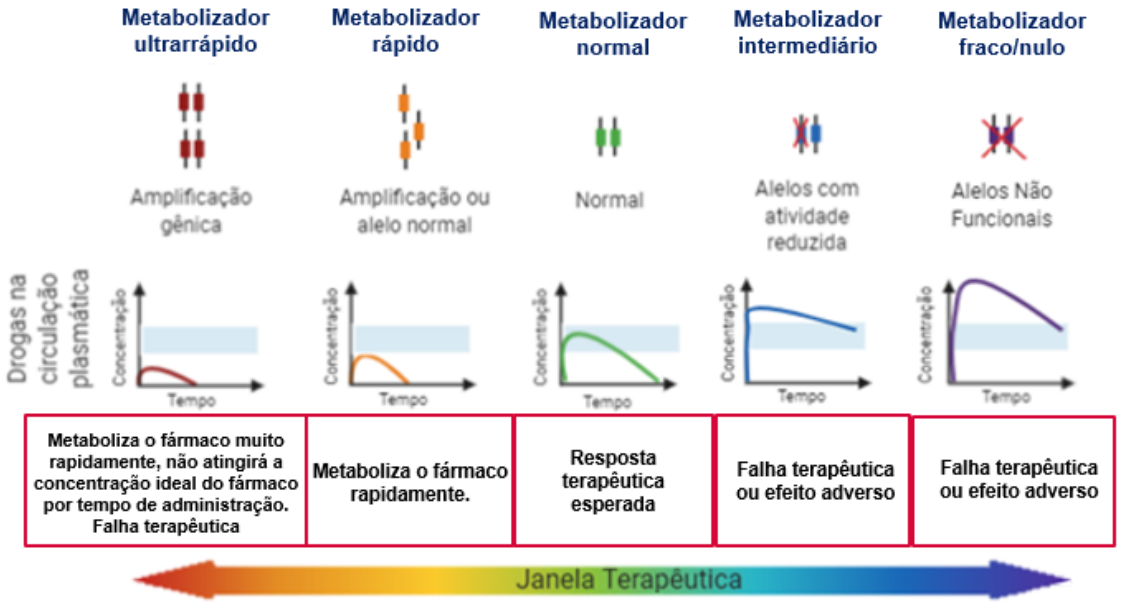


Figura 19 – Perfil dos metabolizadores existentes e as possíveis variáveis genéticas das enzimas metabolizadoras

Na janela terapêutica, os indivíduos podem apresentar fenótipos que variam de metabolizadores ultrarrápidos, quando há uma amplificação gênica, até metabolizadores fracos, cujos alelos não codificam proteínas funcionais, podendo alterar a eficácia do tratamento. Adaptado de Zanger *et al.* 2004; Metzger *et al.* 2006; Silvino 2019; Scudeler & Rodrigues-Soares 2020.

1.1.6.5 Relação do perfil de metabolizadores existentes com medicamentos antimaláricos

Estudos em diferentes populações de áreas endêmicas de malária, Africanas, Asiáticas e Americanas, vêm demonstrando que a variabilidade genética das enzimas do sistema *CYP450*/famílias *CYP2* (*2D6*) e *CYP3* (*3A4* e *3A5*) está diretamente relacionada ao aparecimento de diferentes fenótipos de biotransformação, afetando tanto a eficácia quanto a toxicidade dos antimaláricos, além de contribuir para a resistência através da alteração das concentrações plasmáticas dos fármacos (Marcsisin *et al*. 2016; Silvino *et al*. 2016; Sortica *et al*. 2016; Brasil *et al*. 2018).

Huang e colaboradores (2021) observaram na população da província de Yunnan, na China, que a frequência do alelo variante do *CYP2D6*10* é o responsável pelas maiores proporções de casos de malária por *P. vivax* e o genótipo *4/*4, que corresponde a atividade não funcional da enzima, foi detectado em indivíduos com suspeita de recaída por *P. vivax*. Esses achados revelam um risco da enzima do *CYP2D6* não metabolizar a primaquina e impedir o sucesso do tratamento.

Mehlotra e colaboradores (2021) observaram, na população de Madagascar que é uma mistura de asiáticos com africanos, uma prevalência de alelos comumente encontrados em populações asiáticas como o *CYP2D6*10* e os encontrados em populações africanas *CYP2D6*17*, que podem alterar o risco de recaída da malária por *P. vivax*, por originarem fenótipos intermediários, impedindo o sucesso do tratamento pela primaquina.

Pernaute-Lau e colaboradores (2021) observaram que os indivíduos Gabonenses, com malária grave por *P. falciparum*, possuem uma prevalência do *CYP2D6*17* associado a uma redução da função proteica e de outros *CYPs* da subfamília *2D6*, que podem alterar o tratamento da primaquina.

Estudos em populações de áreas endêmicas brasileiras (Acre, Amapá, Pará e Rondônia) observaram que o alelo *CYP2D6*4* pode alterar o risco de recaída da malária por *P. vivax* impedindo o sucesso do programa de controle de malária no Brasil. (Salles *et al*. 2021), podendo originar fenótipos de metabolização fraca e o *CYP2D6*17* (*SNP2850*) também foi observado em maior frequência do alelo variante em Rio Pardo, no Amazonas, podendo originar fenótipos de metabolização intermediária (Silvino 2019).

Além disso, as variantes do *CYPs 3A4*/*3A5* podem também influenciar no tratamento com CQ/PQ (Sortica *et al*. 2016), além do tratamento com ACTs (Marwa *et al*. 2014). Poucos estudos de frequência dos alelos *CYP3A4*/*CYP3A5* relacionados aos antimaláricos no Brasil são relatados na literatura, entretanto estudos mostraram que eles possuem um papel fundamental na metabolização da maioria dos medicamentos, incluindo os antimaláricos (Hodel *et al*. 2013).

Hodel e colaboradores (2013) observaram que nos indivíduos de áreas endêmicas de malária houve uma frequência maior do alelo variante no Camboja, enquanto indivíduos da Tanzânia apresentavam uma frequência maior do alelo selvagem para o CYP3A5*3, o mesmo resultado foi observado por Marwa e colaboradores (2014) em indígenas da Tanzânia.

Almeida e colaboradores (2020) observaram em indivíduos amazonenses infectados pelo *P. vivax*, que não houve diferença na razão desetilcloroquina/cloroquina (DCQ/CQ) nos grupos de pacientes que carregam o alelo selvagem dos grupos de pacientes que carregam o alelo variante dos *CYPs 2C8*, *3A4* e *3A5*. Entretanto, a presença de alelos variantes associados ao metabolismo lento não consegue explicar a ausência de falha terapêutica da DCQ/CQ.

1.1.7 Farmacogenética das principais isoformas do CYP envolvidas no metabolismo de antimaláricos, abordados neste estudo

1.1.7.1 CYP2D6

O *CYP2D6* é o único gene codificador da proteína da subfamília do *CYP2D* (Zanger *et al*. 2013), sendo mais estudado como metabolizador de fármacos, envolvido na biotransformação de aproximadamente 20% dos medicamentos amplamente utilizados atualmente (Yu *et al*. 2004; Pan *et al*. 2017). Está localizado no cromossomo 22 (22q13.1) (Figura 20), abrigando também dois pseudogenes, o *CYP2D7* e *CYP2D8P*, possuindo 4382 nucleotídeos (Kimura *et al*. 1989).

Figura 20 – Esquema do cromossomo 22

A linha em Vermelho mostra a localização do *CYP2D6*, 22q13.1. Retirado de Genecardsuite 2020

A enzima deste citocromo dispõe de 497 aminoácidos. É a única enzima da família CYP de metabolização de fármacos que não é induzível, e as diferenças interindividuais relevantes nas atividades enzimáticas são amplamente atribuídas às variações genéticas (Do Prado 2009; Kiaco 2018). Múltiplos estudos têm mostrado que as frequências dos fenótipos alternativos do *CYP2D6* variam significativamente entre diferentes grupos étnicos e esses polimorfismos podem ser a principal ferramenta na indução de efeitos adversos na administração de agentes terapêuticos (Evans *et al*. 2004; Bernard *et al*. 2006; Zhou *et al*. 2017). Alguns desses polimorfismos são alelos nulos que levam à expressão mínima da proteína *CYP2D6* ou à expressão não funcional da proteína e indivíduos portadores desses alelos exibem o fenótipo *PM* (metabolizador fraco). Da mesma forma, a presença de polimorfismos genéticos do *CYP2D6* associados com atividade enzimática diminuída tem sido implicada no fenótipo *IM* (metabolizador intermediário), e várias cópias do gene CYP2D6 de tipo selvagem foram implicadas no fenótipo UM (metabolizador ultrarápido) (Pan *et al*. 2017). Além disso, os polimorfismos do gene do CYP2D6 também estão bem descritos entre todas as variantes do CYP e cerca de 100 alelos já foram identificados. Entre os múltiplos alelos do *CYP2D6*, *CYP2D6*1*, *CYP2D6*2*, *CYP2D6*33* e

*CYP2D6*35* são alelos ativos com atividade normal da enzima, enquanto que as duas variantes nulas mais importantes são *CYP2D6*4* (c.1846G>A, rs3892097) e *CYP2D6*5* (deleção do gene), resultando na inativação da enzima e ausência da proteína, respectivamente. A redução significativa na atividade enzimática é comumente associada com o *CYP2D6*10* (c.100C>T, rs1065852), *CYP2D6*17* (c.1023C>T, rs28371706, c.2850C>T, rs16947) e *CYP2D6*41* (c.2988G>A, rs28371725) (Lam 2019).

1.1.7.2 CYP3A (CYP3A4 e CYP3A5)

Ao todo quatro genes da família CYP3A foram descritos em humanos: *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* e *CYP3A43*. As isoformas *CYP3A4* e *CYP3A5* encontradas no cromossomo 7 (7q22.1) (Figura 21) são as mais importantes por codificarem para enzimas responsáveis pela metabolização de mais de 50% das drogas de uso clínico (Willrich 2006; Liu *et al*. 2007; Nowak *et al*. 2019). Essas enzimas são abundantemente encontradas no fígado e no epitélio intestinal, contribuindo substancialmente para o metabolismo de drogas via oral, mas podem ser achadas também nos rins, trato respiratório, pulmões e cérebro (Zanger *et al*. 2013; Lolodi *et al*. 2017).

Figura 21- Esquema do cromossomo 7

A linha em Vermelho mostra a localização do *CYP3A4/3A5*, 7q22.1. Retirado de Genecardsuite 2020

Estas enzimas catalisam várias reações, possuindo especificidade para vários substratos diferentes, entretanto existem alguns substratos comuns entre *CYP3A4* e *CYP3A5*, quer dizer uma sobreposição de especificidade, que dificulta a distinção em termos de biotransformação dessas duas enzimas (Belmonte *et al.* 2018). Devido à sua capacidade de interagir com compostos estruturalmente diversos, as enzimas CYP3A têm uma alta capacidade de modulação para alterar as respostas aos medicamentos (Wright *et al*. 2019). Foram identificadas mais de vinte variantes na região codificante do *CYP3A4*, a maioria delas associadas com a redução da atividade catalítica da enzima. A importância do alelo com redução de função *CYP3A4*22* C>T

SNP (rs35599367) no íntron 6, que resulta no decréscimo de 20% na atividade da enzima, tem sido amplamente reportado, especialmente em conjunção com o SNP do *CYP3A5*. A expressão do *CYP3A5* é altamente polimórfica, com atividades e níveis de expressão variáveis, com perda de função no alelo *3 (c.6986A>G, rs776746) no íntron 3 como a variante mais comum, no qual resulta em um defeito de *splicing* e, por conseguinte, a falta da atividade da enzima. Outras variantes do *CYP3A5* com perda de função ou de função reduzida podem ser encontradas no alelo *2 (rs28365083; g.27289C>A; T398N), *6 (14690G>A; rs10264272) e *7 (rs41303343; 27131_27132ins T) (Lam 2019).

1.2 Justificativa

Atentando para o fato de que a eficácia do tratamento contra a malária depende do metabolismo por enzimas do CYP450, cujos genes possuem inúmeras variantes alélicas que modulam a atividade enzimática, conferindo fenótipos de metabolizadores lentos até ultrarrápidos, pode-se supor que indivíduos com malária poderão apresentar falha terapêutica e reação adversas aos antimaláricos. Consequentemente, tal variabilidade gênica poderá comprometer o controle/eliminação da malária. O fato de o Brasil apresentar alta miscigenação, com populações etnicamente diversas e grande heterogeneidade entre suas regiões devido ao padrão peculiar de colonização, pode influenciar na distribuição e na frequência de genes humanos. Nesse contexto, a caracterização do perfil genotípico de enzimas envolvidas no biometabolismo de fármacos antimaláricos (CYP450: CYP2/CYP3) de população de área endêmica brasileira poderá fornecer subsídios para a melhor compreensão dos padrões de resposta terapêutica e no delineamento de novas estratégias quimioterápicas mais adequadas para determinados grupos populacionais, intensificando assim a eficácia terapêutica e o controle dessa endemia.

1.3 Hipóteses:

- **Hipótese nula**: A população em estudo não possui genótipos das enzimas CYP3A4, CYP3A5 e CYP2D6, associados aos fenótipos metabolizadores intermediário e fraco.

- **Hipótese alternativa**: A população estudada possui genótipos das enzimas CYP3A4, CYP3A5 e CYP2D6, associados aos fenótipos metabolizadores intermediário e fraco.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o perfil genotípico de enzimas envolvidas no biometabolismo de fármacos antimaláricos (CYP2D6 e CYP3A4/3A5) em população de área endêmica brasileira, Rio Preto da Eva – Amazonas.

2.2 Objetivos Específicos

i) Descrever as frequências alélicas e genotípicas das enzimas *CYP2D6*, *CYP3A4* e *CYP3A5* envolvidas no biometabolismo de fármacos antimaláricos preconizados pelo Ministério da Saúde (cloroquina, primaquina, Coartem®/artemeter + lumefantrina, artesunato, artemisinina e mefloquina);

ii) Inferir o perfil fenotípico das enzimas *CYP2D6, CYP3A4* e *CYP3A5* baseado nos dados genotípicos de 8 *loci* polimórficos encontrados na área de estudo;

iii) Comparar as frequências alélicas encontradas na população de Rio Preto da Eva, com as de outras populações, descritas na literatura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

As amostras utilizadas neste projeto foram coletadas por nosso grupo de pesquisa nos anos de 2013-2015 no município de Rio Preto da Eva, estado do Amazonas. Rio Preto da Eva está situado a 80 km da capital Manaus (Figura 22) e é uma área que possui atividade econômica agrícola, voltada para o cultivo de laranjas, além de pecuária, pesca, avicultura e extrativismo vegetal (De Brito *et al*. 2016; Prefeitura de Rio Preto da Eva 2021). Possui uma área territorial de 5815,622 km^2, com uma população estimada de 34.856 pessoas, tendo uma densidade demográfica de 4,42 habitantes/km^2, apresentando uma Latitude: 2º41’55” Sul, Longitude: 59º42’3” Oeste. Além disso, 52,5% da população vivia em área rural, enquanto 47,5% na área urbana (IBGE 2021). É uma região banhada pelo Rio que leva o mesmo nome do município, Rio Preto da Eva, com foz no Rio Solimões, cujo pico de transmissão da malária acontece no mês de outubro, onde o nível de água é baixo (Couto, 2015). Durante os anos de coleta do nosso estudo, Rio Preto da Eva apresentou Índice Parasitário Anual (IPA) de 29,4 (2013), 5,6 (2014) e 6,6 (2015). Em 2020, foram notificados 450 casos de malária em Rio Preto da Eva e desses, 99,3% causados por *P. vivax*, 0,3% por *P. falciparum* e nenhum caso por formas mistas (Brasil, MS/SVS 2020).

Figura 22 – Mapa da região metropolitana do Amazonas

Em vermelho está a delimitação da região metropolitana do estado do Amazonas e em azul está indicado o município de estudo, Rio Preto da Eva. Retirado de Atlas Amazonas em Mapas 2018

3.2 Voluntários e Aspectos Éticos de Pesquisa

Os 368 voluntários foram recrutados em suas residências, ou seja, uma busca ativa dos participantes. A maioria vivia em áreas rurais, perto de florestas e/ou coleções d'água. Trata-se de um estudo observacional, descritivo. Os aspectos éticos e metodológicos desse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, sob o registro 346.613. O projeto tem cadastro no SisGen sob o código A3524F7 (Anexo I).

3.2.1 Critérios de Elegibilidade

Foram estabelecidos critérios de inclusão e exclusão no presente estudo descritos abaixo:

- Inclusão:

- Residentes de Rio Preto da Eva independentemente de estarem infectados ou não pelo *Plasmodium* spp.;

- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado antes de qualquer procedimento.

- Exclusão:

- Parentes até segundo grau;
- Crianças menores de 10 anos;
- Populações indígenas, presidiários;
- Pessoas com deficiência intelectual;
- Gestantes, parturientes independentes de idade.

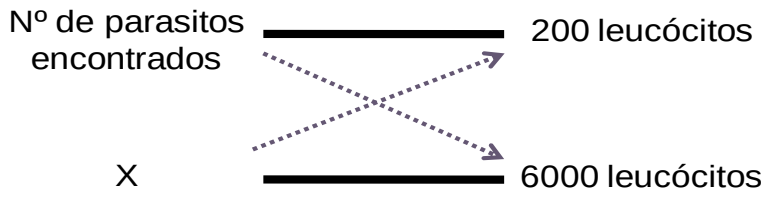
Os voluntários incluídos foram informados sobre as formas de transmissão da malária, os métodos profiláticos e sobre o projeto de pesquisa em andamento. Após o consentimento dos participantes, foi obtida a assinatura do TCLE do voluntário ou de seu responsável formalizando sua participação no projeto (Anexo II). Em seguida, os indivíduos participaram de uma entrevista para obtenção de seus dados gerais, como nome e idade e de seus dados epidemiológicos, como tempo de residência em área endêmica de malária, tempo desde a última infecção, número de malárias anteriores, características de moradia, atividades do dia a dia, entre outros (Anexo III).

3.3 Coleta de sangue

Após a assinatura do TCLE, 5 mL de sangue foram coletados, pelo nosso grupo, por via endovenosa utilizando o sistema à vácuo de coleta Vacutainer (Becton Dickison and Company, Franklin Lakes, USA) contendo EDTA para extração de DNA. As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas (3500 x *g*) por 10 min para a separação do plasma dos elementos figurados do sangue, em seguida, as amostras foram distribuídas em alíquotas de 1 mL, congeladas a -20 ºC e transportados em gelo seco para o Laboratório de Imunologia Clínica (LIC), Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. Em seguida, os voluntários preencheram um questionário sobre seus dados epidemiológicos.

3.4 Diagnóstico parasitológico e Avaliação da parasitemia

Pesquisadores de nossa equipe realizaram exames de gota espessa e distensão sanguínea, ambos corados pelo Giemsa (Sigma Chemical CO, St Louis, USA), em campo. A parasitemia foi calculada através do método de avaliação relativa à contagem de leucócitos na gota espessa. Esse método visa realizar a contagem do número de parasitos (considerando todas as espécies e estágios presentes) até alcançar 200 leucócitos. Assumindo uma leucometria média de 6.000 leucócitos/µL de sangue para todo paciente com malária foi realizado uma regra de três para obter a parasitemia/ µL de sangue, de acordo com imagem abaixo. Se nove ou menos parasitas fossem encontrados, 300 leucócitos adicionais eram contados, a fim de obter uma maior precisão na parasitemia final desses pacientes.



Ademais, pacientes que apresentaram diagnóstico positivo para malária foram submetidos ao tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil (cloroquina associada à primaquina para infecções por *P. vivax* e artemeter com lufemantrina (COARTEN®) para os indivíduos com *P. falciparum*) (Brasil, MS/SVS 2020).

3.5 Padronização e Genotipagem dos CYPs

3.5.1 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico a partir de células do sangue total dos voluntários, utilizando-se o método de colunas de sílica do kit QIAamp® DNA Blood Midi Kit (100) da QIAGEN (Quiagen, Valencia, CA, USA), foi realizado conforme as orientações do fabricante. Aproximadamente 1 mL de sangue, de cada amostra, previamente descongelada e a temperatura ambiente (TA), foi adicionado no tubo de centrífuga de 15 mL (BioNaky Molecular Biology Line). Em seguida, foram adicionados 100 µL de protease QIAGEN a esse tubo, homogeneizando-o levemente. Foram adicionados 1,2 mL de tampão de lise (AL) e o tubo foi vertido 15 vezes, seguido de uma vigorosa

agitação por pelo menos 1 minuto. A mistura foi incubada à 70 ºC por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto (96-100%) (Sigma) à amostra e o mesmo procedimento de homogeneização foi realizado. Cuidadosamente, toda a solução da etapa anterior foi transferida para a coluna do QIAamp, acoplado ao tubo falcon de 15 mL, a qual foi submetida a uma centrifugação a 3000 x *g* por 3 minutos em TA. Foi descartado o filtrado e a coluna foi colocada em um novo tubo falcon de 15 mL. Foram adicionados 2 mL de tampão de lavagem (AW1) na coluna, seguindo de uma centrifugação a 4000 x *g* por 3 minutos a TA. O filtrado foi descartado, colocando novamente no tubo cônico coletor de 15 mL, no qual foram adicionados 2 mL do tampão de lavagem (AW2), centrifugado a 4000 x *g* por 15 minutos a TA. A coluna foi transferida para um tubo falcon novo de 15 mL e o tubo contendo o filtrado foi descartado. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de tampão de eluição (AE) diretamente no centro da membrana. A coluna foi incubada à TA por 5 minutos e centrifugada a 4000 x *g* por 2 minutos a TA. O volume eluído contendo o DNA foi transferido e armazenado em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, previamente identificados e estocados a -20 ºC até o momento do uso (Figura 23).

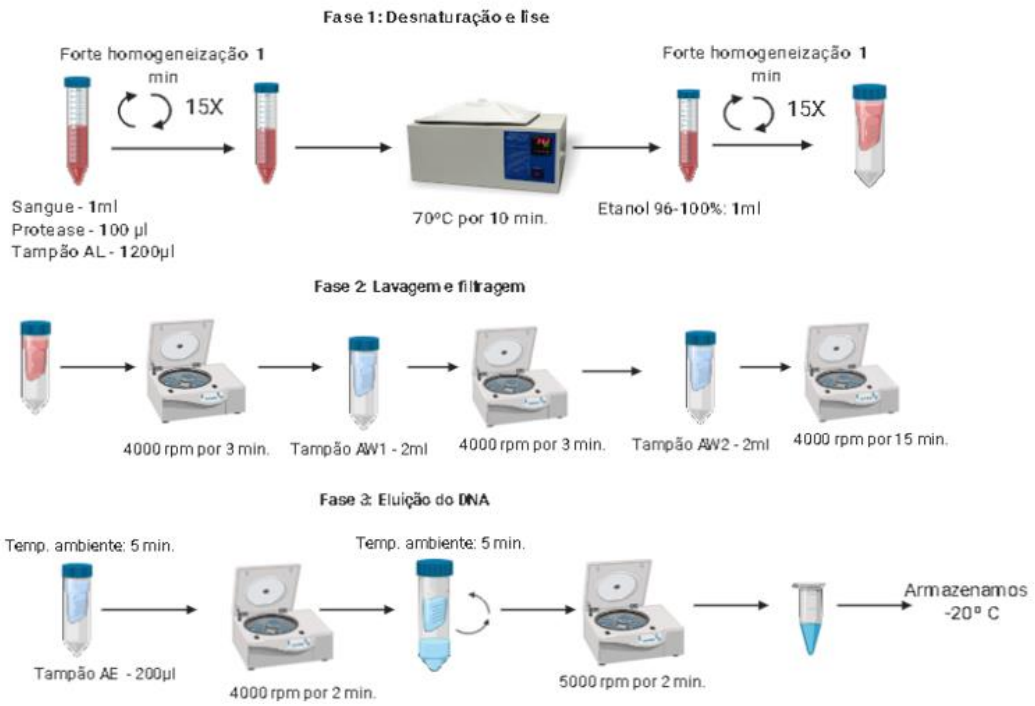


Figura 23 – Representação esquemática da extração do DNA genômico

3.5.2 Quantificação do DNA extraído

A quantidade e pureza do DNA foram verificadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000 Spectrophotometer - Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA), usando o software NanoDrop® 2000/2000c Spectrophotometer 1.6 (Thermo Scientific). A leitura da densidade ótica determina a quantidade de DNA, à 260 nm, e a existência de substâncias contaminantes (majoritariamente proteínas), à 280 nm. As estimativas do grau de pureza das amostras foram obtidas pela razão entre as leituras à 260 nm e 280 nm (A260/A280). Amostras que apresentaram valores da razão (A260/A280) entre 1,6 e 1,8 foram consideradas com um grau de pureza adequado para as análises. A absorbância lida à 260 nm foi utilizada para a estimativa da concentração de DNA em ng/µL, a qual foi posteriormente ajustada para 20 ng/µL.

3.5.3 Amplificação do DNA genômico por PCR Multiplex

A amplificação dos segmentos gênicos correspondentes às regiões codificantes dos genes *CYP2D6*4*, *CYP2D6*10*, *CYP2D6*17*(1023), *CYP2D6*17*(2850), *CYP3A4*22*, *CYP3A5*3F* e *CYP3A5*3K* foi realizada através da técnica de PCR Multiplex.

Foram utilizados 10 µL de *Master Mix*, 2 µL de *Q solution*, 5 µL de H_2O que fazem parte do Multiplex PCR Kit (100) da QIAGEN®, 2 µL de iniciadores diluídos para amplificação dos respectivos *CYPs 2D6*4*, *2D6*10*, *2D6*17*(1023) e (2850), *CYP3A4*22* e *CYP3A5*3F* e *3A5*3K* (Integrated DNA Technologies – IDT) na concentração de 2µM (Tabela 2) e 1 µL de amostra. Em seguida, as amostras foram amplificadas em 1 ciclo de 94 ºC por 15min, 35 ciclos de 94 ºC por 30 s, 60 ºC por 1 min e 30 s e 72 ºC por 1 min e 30 s e 1 ciclo de 72 ºC por 1 min e 30 s (Tabela 3) e 4º C/∞. Para a padronização foram utilizadas as amostras controle, obtidas dos membros do laboratório, além das amostras de Rio Preto da Eva.

Tabela 2 - Sequência e tamanho dos iniciadores dos alelos estudados

CYPs	Alelos estudados	Sequência dos iniciadores (senso e antissenso) (sentido 5'-3')	Tamanho dos iniciadores (pb)
CYP2D6	*CYP2D6*4*F	CCGCCTTCGCCAACCACT	18
	*CYP2D6*4*R	CCCTGCAGAGACTCCTCGGT	20
	*CYP2D6*10*F	CCCCTTCTCAGCCTGGCTTCTTG	23
	*CYP2D6*10*R	CCCATTTGGTAGTGAGGCAGGT	22
	*CYP2D6*17*F (1023)	CCAGCTCGGACTACGGTCATCAC	23
	*CYP2D6*17*R (1023)	CGCGAGGCGCTGGTGACCAA	20
	*CYP2D6*17*F (2850)	TCCCTCGGCCCCTGCACTGTTT	22
	*CYP2D6*17*R (2850)	GACTCTGTACCTCCTATCCACGTCA	25
CYP3A4	*CYP3A4*22*F	ACAGACAAACAGCCACAGACTTTCA	25
	*CYP3A4*22R*	GTAAAGTGCTGAAGAGGAATCGGCT	25
CYP3A5	*CYP3A5*3F* (F)	TGCTAACTAGAGGTGGGTAGAGGT	25
	*CYP3A5*3F* (R)	AAACGATGGATGGTGAGTGCTTTTA	25
	*CYP3A5*3K* (F)	AGGTTTTGAAGTCCAGAACTGAAGCA	26
	*CYP3A5*3K* (R)	CCAGCCCACAAAAGTATCCTGTGTA	25

Tabela 3 – Condições de reação do PCR Multiplex

CYP2D6, *CYP3A4* e *CYP3A5* (Volume final de 20 µL)	Condições de amplificação
***Master mix*: 10 µL**	**94ºC – 15min**
Iniciadores: 2 µL (na concentração de	**94ºC – 30s**
2 µM/ µL de cada iniciador senso e	**60ºC – 1min 30s** } **35 ciclos**
antissenso)	**72ºC – 1min 30s**
***Q-solution*: 2 µL**	**72ºC – 1min 30s**
H_2O ultrapura: 5 µL	**4ºC - ∞**
Amostra (DNA): 1 µL	

Em seguida, 5 µL do produto da PCR foram aplicados em gel de agarose a 4%, corado com *GelRed*™ e expostos a luz ultavioleta (UV) para visualização dos fragmentos amplificados.

3.5.4 Reação por SnaPShot®

3.5.4.1 Purificação do produto do PCR Multiplex

Foi utilizado Tampão 10X e as enzimas SAP (Fosfatase Alcalina de Camarão, do inglês “Shrimp Alkaline Phosphatase”, Affymetrix), cuja função é a desfosforilação de dNTPs remanescentes da reação de PCR e a Exonuclease I (Exo I, Affymetrix) que remove iniciadores da reação de PCR e misturas que contêm DNAs de fita simples com terminação 3’-hidroxil. Dez microlitros do produto de PCR foram adicionados à 4,5 µL da mistura dessas enzimas nos volumes 1,06 µL (Tampão 10X), 3,3 µL (SAP) e 0,13 µL (Exonuclease I). Em todas as reações foram utilizados controles negativo (água) e positivo (amostras previamente genotipadas). A reação foi realizada nas seguintes condições: 1 ciclo de 37 ºC por 1 hora, 80 ºC por 15min e 4 ºC/∞ (Tabela 5).

3.5.4.2 Reação pelo Método SnaPShot®

Após a purificação do produto de PCR Multiplex, as amostras foram submetidas a reação do SnaPShot®, mecanismo de genotipagem baseado na extensão de uma única base (Figura 24).

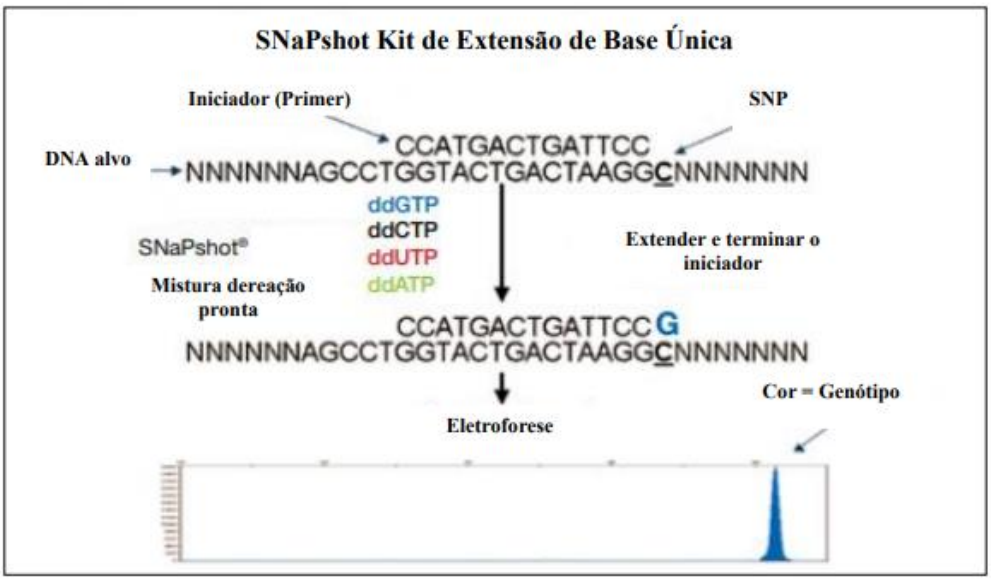


Figura 24 – Representação da reação de SnaPShot®

A reação de SnaPShot® utiliza a inserção de base única em locais conhecidos. Cada iniciador se liga a região anterior onde se encontra o *SNP* do DNA alvo. Em seguida, a polimerase insere um ddNTP (dideoxinucleotídeo) fluorescente a sua extremidade 3’. A cor da fluorescência mostra a base que foi adicionada representado em um eletroferograma (User Bulletin Thermofisher 2005)

Foram utilizadas duas misturas separadas, uma mistura que continha 0,5 µL de iniciadores diluídos dos *SNP 2850*, *SNP 100*, *SNP 1846* na concentração de 2 pmol/µL e o *SNP1023* na concentração de 2,5 pmol/µL do *CYP2D6* (IDT) (Tabela 4), 2,5 µL da mistura da reação e 1 µL de água ultrapura e uma segunda mistura que continha 0,5 µL iniciadores diluídos dos *SNP 15389*, *SNP 31551*, *SNP 31661* na concentração 2pmol/µL e o *SNP29753* na concentração de 2,5 pmol/ µL do *CYP3A4/3A5* (IDT) (Tabela 4). Em seguida, nas respectivas placas, foram pipetados, em cada poço, 4 µL da mistura e 1,5 µL do produto de PCR purificado. Posteriormente, a placa foi selada e submetida a seguinte ciclagem, 25 ciclos de 96 °C por 10 s, 50 °C por 5 s e 60 °C por 30 s (Tabela 5).

Tabela 4 - Sequência dos iniciadores utilizados e seus respectivos código rs, tamanho e *SNP*s.

CYPs	Alelos	*SNPs*	Códigos rs	Sequência do primer (sentido 5'-3')	Tamanho dos iniciadores
CYP2D6	****4***	***SNP1846***	**rs3892097**	**$(GACT)_2$GTTGGGGCGAAAGGGGCGTC**	**28**
	****10***	***SNP100***	**rs1065852**	**$(GACT)_4$AACGCTGGGCTGCACGCTAC**	**36**
	****17***	***SNP1023***	**rs28371706**	**$(GACT)_6$CCGAAACCCAGGATCTGG**	**42**
	****17***	***SNP2850***	**rs16947**	**$(GACT)_2$AGAACAGGTCAGCCACCACTATGC**	**32**
CYP3A4	****22***	***SNP15389***	**rs35599367**	**$(GACT)_5$GTTCAGTGTCTCCATCACACCCAG**	**44**
CYP3A5	****3F***	***SNP31551***	**rs28365085**	**$(GACT)_1$CATCTCTTGAATCCACCTTTAGAACA**	**32**
		SNP31611	**sem rs**	**$(GACT)_2$CTAAGTGGAGAATGAGTTATTCTAAGGA**	**36**
	****3K***	***SNP29753***	**rs41279854**	**$(GACT)_4$GCAAGTTTCATGTTCATGAGAGCA**	**40**

rs = Referência do *SNP* (*Reference SNP*); *SNP* = Polimorfismo de Base Única (*Single Nucleotide Polymorphism*)

3.5.4.3 Purificação do SnaPShot®

Os fragmentos foram purificados pela enzima SAP, no volume de 1 µL em cada poço. A placa foi selada novamente seguindo as condições da primeira purificação: 37 ºC/1 h, depois a 80 ºC/15 min e a 4 ºC/∞ (Tabela 5).

3.5.4.4 Preparação da placa para o Sequenciamento

A última etapa do sequenciamento por SnaPShot® foi realizado no Laboratório de Virologia Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Em uma nova placa foram pipetados 9,5 µL da mistura contendo Hi-Di® Formamida e GeneScan® 120 Liz, nos volumes de 7,5 µL (Hi-Di® Formamida) e 2 µL (Hi-Di® Formamida + GeneScan® 120 Liz, na proporção 1:3). Em seguida, foi adicionado 0,5 µL do produto purificado do SnaPShot®. A placa foi submetida ao choque térmico (98 ºC por 5min) e levada ao freezer -70 ºC, protegida da luz, até o momento do sequenciamento (Tabela 5). As amostras foram submetidas à eletroforese em capilar no sequenciador automático ABI Prism 3130 (ThermoFisher) utilizando o protocolo padrão para análise de fragmentos SNaPshot®. Os eletroferogramas gerados foram analisados com o auxílio do software GeneMapper® versão 4.0 (ThermoFisher).

Tabela 5 – Condições de reação do SnaPShot®

Reações da Técnica de SnaPShot	Reagentes	Ciclagens
Purificação do PCR Multiplex	**SAP**: **3,3 µL** **Exo I**: **0,13 µL** **Tampão 10X**: **1,06 µL** **Produto amplificado**: **10 µL**	**37 ºC** – **1h** **80 ºC** – **15min** **4 ºC** - ∞
Reação por SnaPShot	**Mistura da Reação**: **2,5 µL** **Iniciadores**: **0,5 µL** **H_2O ultrapura**: **1 µL** **Produto purificado do PCR Multiplex**: **1,5 µL**	**96 ºC** – **10s** **50 ºC** – **5s** **60 ºC** – **30s** } **25 ciclos**
Purificação do SnaPShot	**SAP**: **1 µL**	**37 ºC** – **1h** **80 ºC** – **15min** **4 ºC** - ∞
Preparação da placa para o Sequenciamento	**Formamida**: **7,5 µL** **Liz + Formamida (1:3)**: **2 µL** **Produto purificado do SnaPShot**: **0,5 µL**	**98 ºC** – **5min** **Gelo até o momento de sequenciar (choque)**

3.5.5 Banco de dados e Análise estatística

Os dados epidemiológicos de Rio Preto da Eva foram armazenados no banco de dados Epi-Info™ 2007 (CDC) e as frequências genotípicas e alélicas foram analisadas através dos programas GraphPad Prism versão 5.0 e “R” versão 2.14.0. Foi utilizado o Teste do qui-quadrado ($\chi 2$), para avaliar se as proporções observadas entre dois grupos são estatisticamente distintas. Serão considerados significativos dados que apresentarem $P \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Características Epidemiológicas

A Tabela 6 resume as principais características epidemiológicas da população de Rio Preto da Eva. Participaram desse estudo 368 indivíduos (um indivíduo foi incluído, apesar da falta do seu questionário), independentes de estarem ou não com malária, no momento da coleta. Desses, observamos que a maioria dos indivíduos era do sexo masculino (54%) e que, embora tenhamos observado uma variação na idade entre 26 e 54 anos, os nossos dados indicam que a população em estudo é adulta, tendo uma mediana de 40 anos. Além disso, a maioria dos indivíduos relatou histórico de malária (82,8%) e moravam há 27 anos em área endêmica. No momento da coleta, dez indivíduos (3%) estavam infectados, sendo cinco com *P. vivax*, três com *P. falciparum* e dois com malária mista (*P. vivax* e *P. falciparum*).

Tabela 6 - Principais características epidemiológicas dos indivíduos de Rio Preto da Eva - AM

Características Epidemiológicas		
Gênero	**Masculino (N/%)**	**198/54**
	Feminino (N/%)	**169/46**
	Total (N)	**367**
Idade (M_d)		**40 (26 - 54)**
Indivíduos	**Sem histórico de malária (N/%)**	**63/17,2**
	Com histórico de malária (N/%)	**304/82,8**
Tempo (em anos) de residência em área endêmica (M_d)		**27 (19,5 - 43)**
Números de episódios prévios de malária (M_d)		**10 (9,5 – 22,5)**
Tempo (meses) desde a última infecção (M_d)		**60 (24 – 96)**
Indivíduos com malária no ano da coleta	**Total (N/%)**	**10/2,7**
	***P. vivax* (N/%)**	**5/1,4**
	***P. falciparum* (N/%)**	**3/0,8**
	Mista: *P. vivax* e *P. falciparum* (N/%)	**2/0,5**

M_d = Mediana (Quartil 25 – 75); N = Número de indivíduos

Os dados de procedência dos indivíduos da localidade estudada (Figura 25), de acordo com seus próprios relatos, mostram que a população é composta basicamente de indivíduos nativos da região Amazônica, oriundos principalmente dos estados do Amazonas (236/70,2%) e Pará (74/22%), e 26 (7,2%) são da região Extra-Amazônica (migrantes), a maioria proveniente das regiões Nordeste (57,7%) e Sul (19,2%).

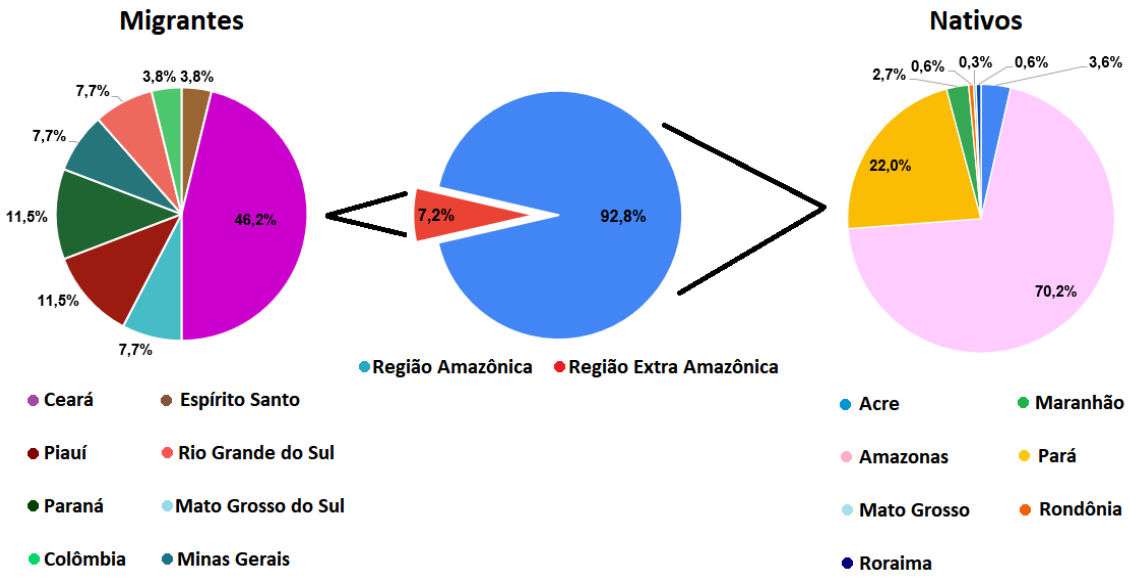


Figura 25 - Gráfico da procedência dos indivíduos da população em estudo

4.2 Padronização da Genotipagem

4.2.1 PCR Multiplex

Foi realizada a padronização do PCR Multiplex com as amostras do Rio de Janeiro (controle). Foram realizadas duas estratégias: a primeira foi a de colocar em um único tubo todos os iniciadores (Mistura 1) e a segunda foi a de colocar somente os iniciadores da mesma família (*CYP3A4/CYP3A5*) (Mistura 2) ou os da família do *CYP2D6* (Mistura 3). De acordo com a eletroforese (Figura 26), prosseguimos com a primeira estratégia, já que todos os primers foram amplificados.

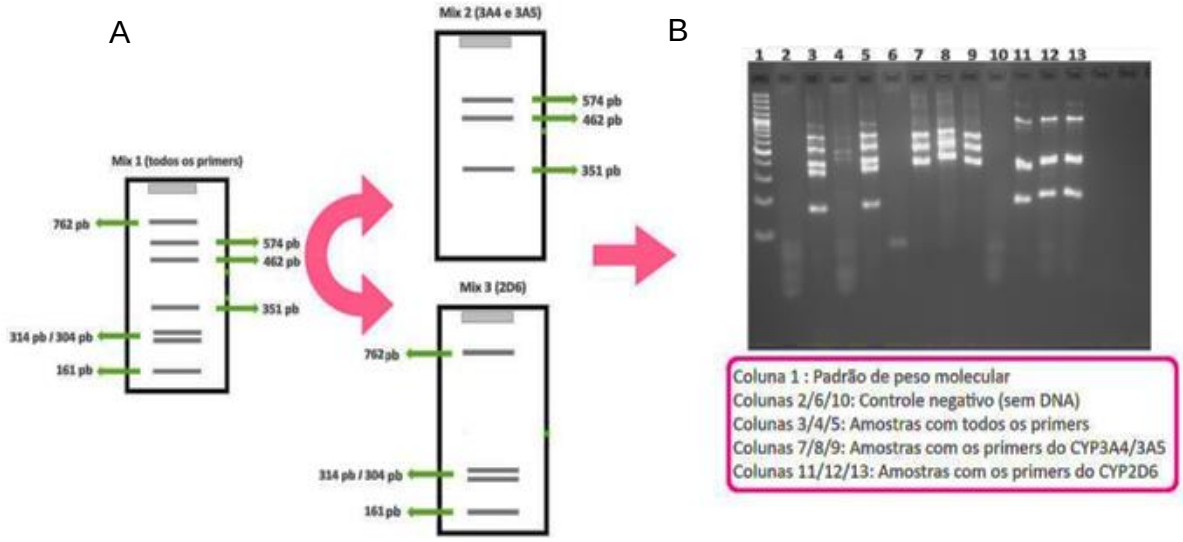
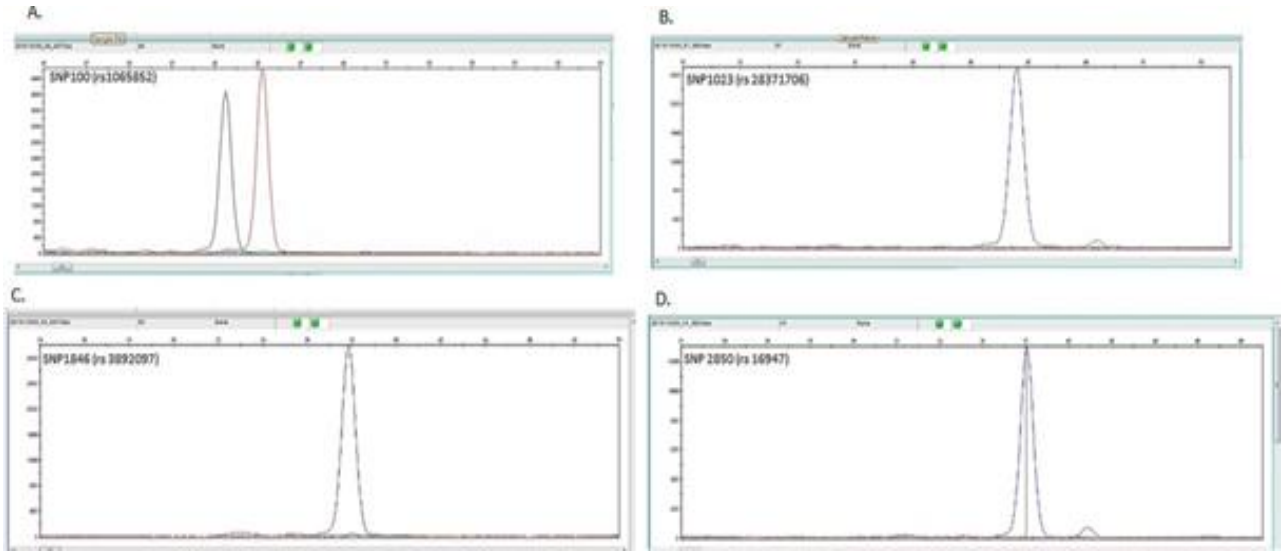


Figura 26 – Padronização do PCR Multiplex

Representação esquemática (A) das regiões de amplificação dos iniciadores para o *CYP2D6*, *CYP3A4* e *CYP3A5* (Mistura 1), *CYP3A4* e *CYP3A5* (Mistura 2) ou *CYP2D6* (Mistura 3) e (B) do gel de eletroforese.

4.2.2 Reação por SnaPShot®

Foi realizada a padronização do *SnaPShot*® tentando as mesmas estratégias do PCR Multiplex. Entretanto, o tubo contendo todos os primers não foi como esperado, pois alguns picos não apareceram no eletroferograma. Com isso, a segunda estratégia foi realizada, separando cada família em um tubo distinto e assim, os picos foram observados. A Figura 27 mostra os eletroferogramas padrão para os *SNPs* em estudo.



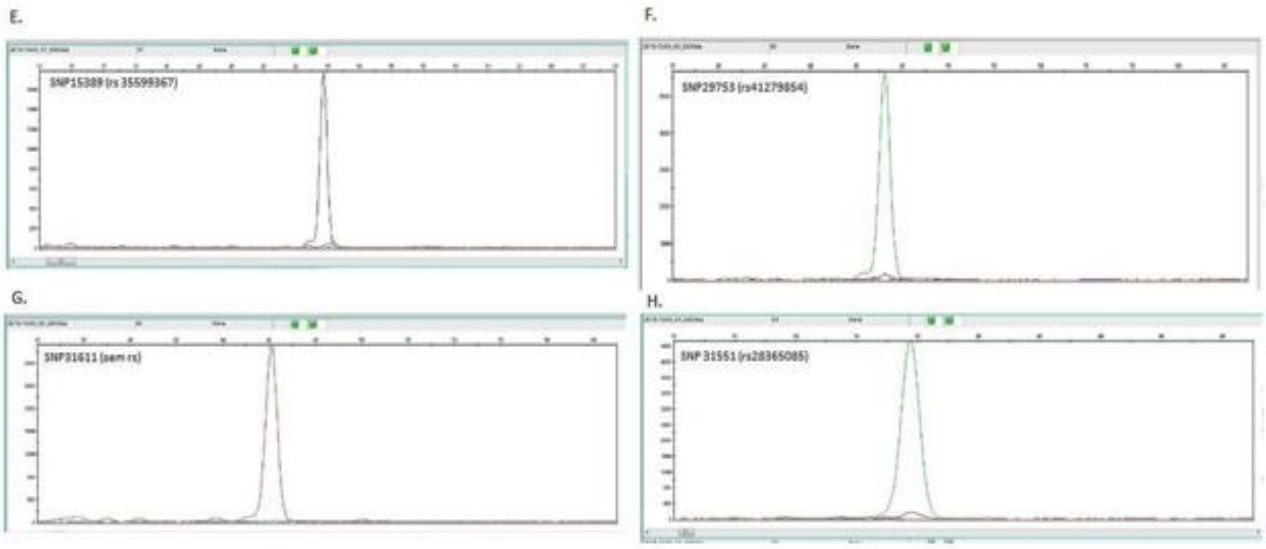


Figura 27 - Padronização da reação de SnaPShot®

Eletroferogramas representativos do padrão de extensão de base única dos iniciadores de *SNaPshot*®. (A) *SNP* rs1065852 – demonstrando um indivíduo heterozigoto; (B) *SNP* rs28371706; (C) *SNP* rs3892097; (D) *SNP* rs16947; (E) *SNP* rs35599367; (F) *SNP* rs41279854; (G) *SNP* 31611 (sem rs); (H) *SNP* rs28365085. Eixo x refere-se ao tamanho do fragmento formado e eixo y à intensidade de fluorescência do ddNTP incorporado. Verde = adenina; vermelho = timina; preto = citosina; azul = guanina

4.3 Genotipagem das amostras de Rio Preto da Eva

4.3.1 Análises das frequências genotípicas, alélicas e do Equilíbrio de Hardy Weinberg nos SNPs estudados

Das 368 amostras, 363 (98,6%) foram genotipadas para o *CYP2D6* e 364 (98,9%) para o *CYP3A4/3A5*. Para o *CYP2D6*17* (2850 A>G), o genótipo G/A apareceu na maioria das amostras (47%), seguido do G/G (36%) e A/A (17%). Já o alelo G foi o mais encontrado nas amostras (59%) e o alelo A em 41% das amostras. Para o *CYP2D6*4* (1846 C>T), o genótipo C/C apareceu em 82% das amostras, seguido de C/T (17%) e T/T (1%). Já o alelo C foi o mais encontrado, em 90% das amostras e o alelo T em 10%. Para o *CYP2D6*17* (1023 A>G), o genótipo G/G foi observado em 95% das amostras, o genótipo G/A em 4% e o genótipo A/A em 1%. O alelo G foi o mais predominante, em 97% das amostras e o alelo A em 3%. Para o *CYP2D6*10* (100 C>T), o genótipo C/C foi encontrado em 79% das amostras, o genótipo C/T em 17% e o genótipo T/T em 3% das amostras. O alelo C foi o mais

predominante, observado em 88% das amostras e o alelo T em 12%. Dentre os *SNPs* do *CYP2D6*, dois (rs28371706 e rs1065852) obtiveram valores de p menores que 0,05, ou seja, não estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para o *CYP3A5*3F* (31611 C>T), o genótipo T/T foi encontrado em 58% das amostras, o genótipo T/C em 37% e o genótipo C/C em 5%. O alelo T foi o mais predominante, em 76% das amostras e o alelo T em 24%. Para o *CYP3A5*3F* (31551 A>G), o genótipo A/A apareceu em quase todas as amostras (99,7%), exceto em uma delas. Assim, o alelo A foi o mais predominante, sendo observado em 99,8% das amostras. Para o *CYP3A5*3K* (29753 A>G), o genótipo A/A apareceu em 96% das amostras e o genótipo A/G em 4%. O alelo A foi mais encontrado, em 98% das amostras e o alelo G em 2%. Para o *CYP3A4*22* (15389 C>T), o genótipo C/C apareceu em 96% das amostras e o genótipo C/T em 4%. O alelo C foi o mais encontrado com 98% das amostras e o alelo T em 2%. Dentre os *SNPs* da *CYP3A4/3A5*, todos foram encontrados em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências genotípicas e alélicas estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Distribuição das frequências genotípicas e alélicas nos indivíduos de Rio Preto da Eva.

	Frequências genotípicas		Frequências alélicas		Valor de p (EHW)
CYP2D6*17	**G/G**	129 (36%)	**G**	429 (59%)	0,70
rs16947	**G/A**	171 (47%)	**A**	297 (41%)	
(2850 G>A)	**A/A**	63 (17%)			
CYP2D6*4	**C/C**	296 (82%)	**C**	654 (90%)	0,58
rs3892097	**C/T**	62 (17%)	**T**	72 (10%)	
(1846 C>T)	**T/T**	5 (1%)			
CYP2D6*17	**G/G**	344 (95%)	**G**	704 (97%)	**0.00011**
rs28371706	**G/A**	16 (4%)	**A**	22 (3%)	
(1023 G>A)	**A/A**	3 (1%)			
CYP2D6*10	**C/C**	288 (79%)	**C**	639 (88%)	**0.0018**
rs1065852	**C/T**	63 (17%)	**T**	87 (12%)	
(100 C>T)	**T/T**	12 (3%)			
CYP3A5*3F	**T/T**	210 (58%)	**T**	556 (76%)	0.60
Sem rs	**T/C**	136 (37%)	**C**	172 (24%)	
(31611 C>T)	**C/C**	18 (5%)			
CYP3A5*3F	**A/A**	363 (99,7%)	**A**	727 (99,8%)	1
rs28365085	**A/G**	1 (0,3%)	**G**	1 (0,2%)	
(31551 A>G)					
CYP3A5*3K	**A/A**	350 (96%)	**A**	714 (98%)	1
rs41279854	**A/G**	14 (4%)	**G**	14 (2%)	
(29753 A>G)					
CYP3A4*22	**C/C**	351 (96%)	**C**	715 (98%)	1
rs35599367	**C/T**	13 (4%)	**T**	13 (2%)	
(15389 C>T)					

Valores de p ≤ 0,05 são considerados desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (em vermelho).

EHW: Equilíbrio de Hardy- Weinberg, auxiliado pelo teste de qui-quadrado.

A = adenina; T = timina; C = citosina; G = guanina

rs = Referência do SNP (*Reference SNP*); SNP = Polimorfismo de Base Única (*Single Nucleotide Polymorphism*)

4.3.2 Comparação das frequências alélicas do município de Rio Preto da Eva com as de outras populações do mundo

As frequências alélicas da população de Rio Preto da Eva podem ser comparadas com as de outras populações do mundo descritos na literatura e no banco de dados Ensembl (https://www.ensembl.org/index.html) para o *CYP2D6* (Tabela 8) e para o *CYP3A4/3A5* (Tabela 9). É importante ressaltar que o *CYP3A5*3F* (*SNP31611*) não possui código rs, portanto não foi incluído na Tabela 9. Ao comparar nossas frequências com as de outras populações, descritas na literatura, a frequência alélica do *CYP2D6*4* se assemelha com as frequências das populações de área endêmica brasileira, Amazonas (De Jesus 2013; Brasil *et al*. 2018; Silvino 2019) e dos países Gâmbia, Nigéria, Tanzânia, Japão, China e Camboja, entretanto Porto Rico, Colômbia, Itália, Espanha, Índia e Sri Lanka possuem uma frequência um pouco maior do que a frequência de Rio Preto da Eva. Além disso, os dados da frequência do *CYP2D6*4* de Salles e colaboradores (2021) em áreas endêmicas brasileiras (Acre, Amapá, Pará e Rondônia) estão com uma frequência do alelo variante maior em comparação a população de Rio Preto da Eva. A frequência alélica do *CYP2D6*10* se assemelha com as frequências das populações de área endêmica brasileira, Acre, Amapá, Amazonas, Pará e Rondônia (Brasil *et al*. 2018; Silvino 2019; Salles *et al*. 2021) e dos países Gâmbia, Nigéria, Tanzânia, Porto Rico, Colômbia, Itália, Espanha, Índia e Sri Lanka, entretanto as frequências do alelo variante são maiores no Japão, China e Camboja. A frequência alélica do *CYP2D6*17* (*SNP1023*) se assemelha com a maioria das frequências das populações, exceto em Gâmbia, Nigéria e Tanzânia que possuem uma frequência do alelo variante um pouco maior do que de Rio Preto da Eva. A frequência alélica do *CYP2D6*17* (*SNP2850*) se assemelha com a frequência da população de área endêmica brasileira, Amazonas (Silvino 2019) e de Gâmbia, Nigéria, Tanzânia, Índia e Sri Lanka, entretanto Porto Rico, Colômbia, Japão, China, Camboja, Itália e Espanha possuem uma frequência do alelo variante menor.

Tabela 8 - Comparação das frequências alélicas do CYP2D6 com as outras populações

Autores	Populações (n)	*CYP2D6*4* (1846C>T) rs3892097		*CYP2D6*10* (100C>T) rs1065852		*CYP2D6*17* (1023G>A) rs28371706		*CYP2D6*17* (2850G>A) rs16947	
		C	T	C	T	G	A	G	A
Nosso estudo	**Rio Preto da Eva - AM (n = 363)**	**0,9**	**0,1**	**0,88**	**0,12**	**0,97**	**0,03**	**0,59**	**0,41**
De Jesus (2013)	Manaus - AM (n = 231)	0,911	0,089	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Hodel et al (2013)	Tanzânia (n = 150)	0,959	0,041	0,934	0,066	0,8	0,2	0,39	0,61
	Camboja (n = 125)	1	0	0,39	0,61	1	0	0,923	0,077
Brasil et al (2018)	Manaus – AM (n = 190)	0,914	0,086	0,950	0,050	0,982	0,018	NA	NA
Silvino (2019)	Rio Pardo - AM (n = 261)	0,9	0,1	0,893	0,107	0,921	0,079	0,575	0,425
Salles et al (2021)	Plácido de Castro - AC (n = 18)	0,694	0,306	0,944	0,056	NA	NA	NA	NA
	Porto Velho - RO (n = 21)	0,74	0,26	0,857	0,143	NA	NA	NA	NA
	Novo Repartimento - PA (n= 57)	0,68	0,32	0,833	0,167	NA	NA	NA	NA
	Macapá - AP (n = 44)	0,68	0,32	0,898	0,102	NA	NA	NA	NA
	Goianésia do Pará - PA (n = 80)	0,65	0,35	0,894	0,106	NA	NA	NA	NA
Banco de dados Ensembl	Gâmbia (n = 113)	0,96	0,04	0,885	0,115	0,836	0,164	0,465	0,535
	Nigéria (n = 108)	0,944	0,056	0,894	0,106	0,745	0,255	0,44	0,56
	Porto-Rico (n = 104)	0,846	0,154	0,822	0,178	0,99	0,01	0,611	0,389
	Colômbia (n = 94)	0,835	0,165	0,814	0,186	0,989	0,011	0,691	0,309
	Sul da China (n = 105)	1	0	0,386	0,614	1	0	0,867	0,133
	Japão (n = 104)	1	0	0,639	0,361	1	0	0,861	0,139
	China, Beijing (n = 103)	0,995	0,005	0,398	0,602	1	0	0,835	0,165
	Itália (n = 107)	0,813	0,187	0,794	0,206	1	0	0,626	0,374
	Espanha (n = 107)	0,855	0,145	0,827	0,173	0,991	0,009	0,621	0,379
	Indianos Gurajati (n = 103)	0,874	0,126	0,85	0,15	1	0	0,558	0,442
	Indianos Telugu (n = 102)	0,887	0,113	0,828	0,172	1	0	0,598	0,402
	Sri Lanka (n = 102)	0,892	0,108	0,848	0,152	1	0	0,623	0,377

NA – Não avaliado

A frequência alélica do *CYP3A4*22* se assemelha com a frequência da população de São Paulo (Willrich *et al*. 2013), Gâmbia, Nigéria, Colômbia, Japão, China, Índia e Sri Lanka, entretanto a frequência em Porto Alegre (Antunes *et al*. 2015), Porto Rico, Itália, Espanha, Holanda e Bélgica do alelo variante é maior. A frequência do *CYP3A5*3F* (*SNP31551*) se assemelha com a maioria das frequências das populações, exceto pelas populações do Japão e China, que possuem uma frequência do alelo variante um pouco maior. A frequência do *CYP3A5*3K*, em Rio

Preto da Eva e em 1 grupo étnico (Europeu) de Lee e colaboradores (2003) tiveram a frequência do alelo variante um pouco maior em comparação as frequências das outras populações.

Tabela 9 – Comparação das frequências alélicas do CYP3A4/3A5 com as outras populações.

Autores	Populações (n)	*CYP3A4*22* (15389C>T) rs35599367		*CYP3A5*3F* (31551A>G) rs28365085		*CYP3A5*3K* (29753A>G) rs41279854	
		C	T	A	G	A	G
Nosso estudo	**Rio Preto da Eva (n = 364)**	**0,98**	**0,02**	**0,998**	**0,002**	**0,98**	**0,02**
Lee et al (2003)	3 grupos étnicos (Africanos, Asiáticos e Europeus) (n = 92)	NA	NA	NA	NA	0,98-1	0 - 0,02
Saeki et al (2003)	Japão (n = 187)	NA	NA	0,983	0,027	NA	NA
Park et al (2008)	Coreia (n = 194)	NA	NA	0,997	0,003	NA	NA
Woo et al (2017)	Coreia (n = 281)	NA	NA	1	0	1	0
Willrich et al (2013)	2 grupos (hipercolesterolêmico e normolipidêmico) São Paulo - SP (n = 213)	0,97 - 0,99	0,01 - 0,03	NA	NA	NA	NA
Kitzmiller et al (2014)	2 grupos auto declarados (Africanos-Americanos e Brancos) (n = 830)	0,96 - 0,99	0,01 - 0,04	NA	NA	NA	NA
Antunes et al (2015)	Porto Alegre - RS (n = 178)	0,949	0,051	NA	NA	NA	NA
Spitman et al (2017)	Holanda e Bélgica (n = 637)	0,94	0,06	NA	NA	NA	NA
Adegbola et al (2020)	Nigéria (n = 69)	1	0	NA	NA	NA	NA
Banco de dados Ensembl	Gâmbia (n = 113)	1	0	1	0	1	0
	Nigéria (n = 108)	1	0	1	0	1	0
	Porto-Rico (n = 104)	0,952	0,048	1	0	1	0
	Colômbia (n = 94)	0,973	0,027	1	0	1	0
	Sul da China (n = 105)	1	0	1	0	1	0
	Japão (n = 104)	1	0	0,976	0,024	1	0
	China, Beijing (n = 103)	1	0	0,985	0,015	1	0
	Itália (n = 107)	0,963	0,037	1	0	1	0
	Espanha (n = 107)	0,963	0,037	1	0	1	0
	Indianos Gurajati (n = 103)	0,995	0,005	1	0	1	0
	Indianos Telugu (n = 102)	0,995	0,005	1	0	1	0
	Sri Lanka (n = 102)	0,99	0,01	1	0	1	0

NA – Não avaliado

4.3.3 Análise de Desequilíbrio de ligação

A análise de desequilíbrio de ligação (DL), que mostra a correlação entre os marcadores para cada par de *SNPs*, foi tratado a partir do cálculo do coeficiente de correlação (r^2). Para que o desequilíbrio fosse considerado, o r^2 precisa ser maior ou igual a 0,8 (Carlson *et al*. 2004). Nesse caso, para os marcadores do *CYP2D6*, a correlação entre os *SNPs* 1846 e 100 é de 0,8, o que corresponde a uma correlação muito forte, um desequilíbrio de ligação alto. Já os marcadores para o *CYP3A4/3A5*, nenhum obteve valores ≥ 0,8, ou seja, são marcadores independentes. As tabelas e os mapas de cada CYP estão expostos abaixo (Tabelas 10 e 11 Figuras 28 e 29).

Tabela 10 - Desequilíbrio de ligação dos marcadores do *CYP2D6*

	rs16947	**rs3892097**	**rs28371706**	**rs1065852**
rs16947	NA	0.068	0.035	0.087
rs3892097	NA	NA	0.00010	**0.80**
rs28371706	NA	NA	NA	0.0016
rs1065852	NA	NA	NA	NA

Foram considerados em desequilíbrio os marcadores com $r^2 \geq 0,8$ (em vermelho)

rs = Referência do SNP (*Reference SNP*)

NA = Não avaliado

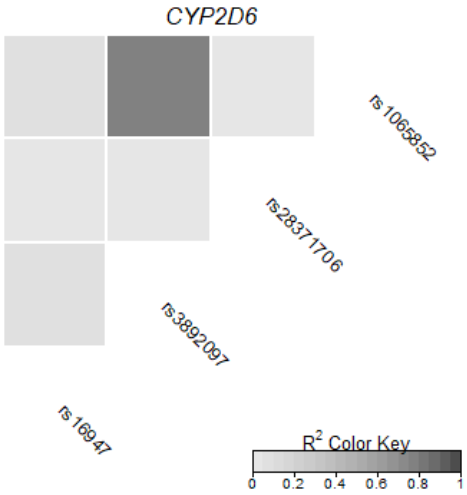


Figura 28 - Mapa de desequilíbrio de ligação dos marcadores genotipados do *CYP2D6*

Foram considerados em desequilíbrio os marcadores com $r^2 \geq 0,8$ (coloração cinza escuro)

Tabela 11 - Desequilíbrio de ligação dos marcadores do *CYP3A4/3A5*

	Sem rs	rs28365085	rs41279854	rs35599367
Sem rs	NA	0.00025	8.04e-05	0.0055
rs28365085	NA	NA	9.71e-05	0.00011
rs41279854	NA	NA	NA	0.00026
rs35599367	NA	NA	NA	NA

rs = Referência do SNP (*Reference SNP*)

NA = Não avaliado

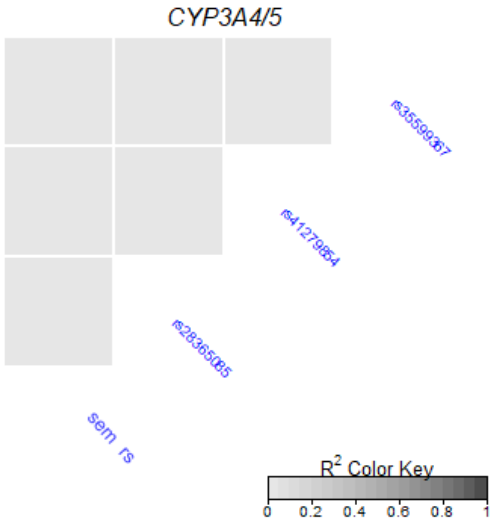


Figura 29 - Mapa de desequilíbrio de ligação dos marcadores genotipados do *CYP3A4/3A5*

5 DISCUSSÃO

O Ministério da Saúde junto com a Secretaria de Vigilância em Saúde possui como aliado no combate à malária o Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM) que foi criado para reduzir a morbimortalidade e a gravidade dos casos da doença. O tratamento quimioterápico rápido e eficaz é o pilar desse Programa, pois previne a ocorrência dos casos graves e, consequente óbito, assim como elimina as fontes de infecção para os hospedeiros, contribuindo para a redução da transmissão (WHO, 2021). Entretanto, nos últimos anos, vários estudos têm relatado falha terapêutica da associação das drogas cloroquina (CQ) e primaquina (PQ), assim como das terapias combinadas à base de artemisinina (ACTs), utilizadas como tratamentos de primeira linha para a malária causada por *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente (Ladeia-Andrade *et al*. 2019; Teklehaimanot *et al*. 2020; Das et al. 2021). Apesar da resistência do *Plasmodium* spp. ser um dos principais fatores de insucesso terapêutico (Belete 2020; Takata 2020), vários outros fatores podem contribuir, como os genéticos do hospedeiro envolvidos na biotransformação de fármacos. As enzimas CYP450, codificadas por genes altamente polimórficos, são as principais enzimas metabolizadoras de fármacos. A variabilidade genética dessas enzimas é responsável pela variabilidade interindividual e interétnica na resposta terapêutica, assim como na ocorrência de efeitos adversos e falha terapêutica (Phillips *et al*. 2001; Bains 2013; Peko *et al*. 2019).

As isoenzimas 2D6, 3A4 e 3A5 do sistema CYP450 são as principais isoformas desse complexo enzimático, responsáveis por mais da metade da biometabolização dos fármacos, incluindo os principais antimaláricos utilizados em países endêmicos, assim como no Brasil (Sortica *et al.* 2016; Almeida *et al.* 2020; Salles *et al.* 2021). Vários Polimorfismos de Base Única com importância na regulação da expressão e nas atividades das enzimas tem sido relatado nesses genes (Waring 2019; Taylor *et al.* 2020; PharmVar 2022). Considerando a importância que esses polimorfismos podem ter na modulação da resposta terapêutica aos antimaláricos, nosso estudo teve como objetivo caracterizar o perfil da diversidade alélica e genotípica dos genes *CYP2D6*, C*YP3A4* e *CYP3A5* da população de Rio Preto da Eva, Amazonas. Os alelos estudados foram selecionados por apresentarem repercussões funcionais importantes, assim como pela presença e frequência em diferentes populações (Tabelas 8 e 9).

A enzima CYP2D6 é altamente polimórfica e responsável pela biotransformação de aproximadamente 25% dos fármacos de uso clínico, incluindo os antimaláricos cloroquina, primaquina e tafenoquina. Neste estudo avaliamos as frequências genotípicas e alélicas das variantes *CYP2D6*4*, *CYP2D6*10* e *CYP2D6*17* em indivíduos residentes em Rio Preto da Eva, Amazonas.

O alelo *CYP2D6*4* é o mais frequente nas populações Europeias (Llerena *et al.* 2014). Neste estudo a frequência de indivíduos portadores de genótipos polimórficos (C/T, T/T) para o *CYP2D6*4* foi de 18%. Frequências semelhantes foram encontradas em outros municípios de área endêmica brasileira, como Manaus e Rio Pardo/AM, Porto Velho/RO, Novo Repartimento/PA e Goianésia do Pará (De Jesus 2013; Brasil *et al*. 2018; Silvino 2019; Salles 2021). Em contraste, frequências mais elevadas desses genótipos polimórficos (> 50 %) foram observados em Macapá/AP e Plácido de Castro/AC (Salles 2021). Segundo Salles e colaboradores, vários fatores podem contribuir para essa alta frequência dos genótipos polimórficos do *CYP2D6*4*, dentre eles destaco a influência europeia associada a fatores históricos-geográficos dos dois municípios com a Guiana Francesa e a Bolívia, respectivamente. Os genótipos variantes do *CYP2D6*4* são caracterizados fenotipicamente como pobres metabolizadores (PM). Indivíduos PM são mais suscetíveis a efeitos adversos devido a níveis plasmáticos elevados de fármacos ativos, como a cloroquina (esquizonticida sanguíneo) ou pode também ocorrer falha terapêutica quando a droga utilizada for um pró-fármaco (p. ex. primaquina e tafenoquina: esquizonticidas teciduais e gametocitocidas), ou seja, a droga só será ativa após a sua biotransformação (De Pina-Costa *et al.* 2021; Mehlotra *et al.* 2021).

O alelo *CYP2D6*10* é encontrado em alta frequência em populações asiáticas (33 – 43%), incluindo japoneses, coreanos, chineses e residentes das ilhas do pacífico (Llerena *et al.* 2014). Em Rio Preto da Eva, a frequência de indivíduos portadores de genótipos polimórficos (C/T, T/T) para o *CYP2D6*10* foi de 20%. É interessante observar que frequências semelhantes foram encontradas em outros municípios de área endêmica Brasileira, como Manaus/AM, Rio Pardo/AM, Porto Velho/RO, Novo Repartimento/PA e Goianésia do Pará (De Jesus 2013; Brasil *et al*. 2018; Silvino 2019; Silvino *et al*. 2020; Salles 2021). Em relação a Rio Preto da Eva, esperávamos encontrar uma maior frequência de genótipos polimórficos, em razão de imigrantes Japoneses da década de 60 implementarem na região uma colônia agrícola. Tal fato, permitiu que a colônia fosse emancipada em município em 1981. Cabe ressaltar que o *CYP2D6*10* não estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg o que sugere que ele

ainda esteja sobre pressão de seleção, além de estar em desequilíbrio de ligação com o alelo *CYP2D6*4*, também relatado em Rio Pardo (Silvino *et al.* 2020). Indivíduos portadores de genótipos variantes do *CYP2D6*10* são caracterizados fenotipicamente como metabolizadores intermediários (IM). Indivíduos IM, como os PM, são mais suscetíveis a efeitos adversos (p. ex. cloroquina), assim como a falha terapêutica (p. ex. primaquina e tafenoquina) (Mat Salleh *et al.* 2020; Mehlotra *et al.* 2021).

O alelo *CYP2D6*17* apresenta frequências elevadas em africanos e afro-americanos e é praticamente ausente em caucasianos (Llerena *et al.* 2014). Em nosso estudo, a frequência de indivíduos portadores de genótipos polimórficos do *CYP2D6*17* (*SNP2850*) foi de 64% (G/A - 47%, A/A - 17%); frequência semelhante foi observada na Tanzânia (G/A - 40%, A/A - 40%) (Hodel *et al*. 2013). Em contraste, a frequência de indivíduos portadores de genótipos polimórficos do *CYP2D6*17* (*SNP1023*) foi baixa (G/A - 4%, A/A - 1%). Essa baixa frequência foi encontrada em Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo/AM (Silvino 2019; Silvino 2020) e em Manaus/AM (Brasil et al 2018). Entretanto, em nossa população de estudo o *SNP1023* não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que sugere que ela esteja ainda sobre pressão de seleção, ou seja, é uma população ainda em evolução. Portadores de genótipos variantes do *CYP2D6*17* são caracterizados fenotipicamente como metabolizadores intermediários (IM), ou seja, considerando o *CYP2D6*17* (SNP2850), mais da metade da população de Rio Preto da Eva é suscetível a efeitos adversos (p. ex. cloroquina), assim como a falha terapêutica (p. ex. primaquina e tafenoquina) (Hodel *et al.* 2013; Silvino 2020).

O Brasil por ser um país de dimensões continentais com uma alta miscigenação, populações com diferentes proporções de etnia na sua composição e grande heterogeneidade entre suas regiões devido ao padrão peculiar de colonização era esperado encontrar uma distribuição heterogênica de genes envolvidos no biometabolismo de fármacos, segundo trabalhos prévios de farmacogenética (Sortica *et al.* 2012; Suarez-Kurtz *et al.* 2014). Entretanto, é curioso observar que as frequências genotípicas polimórficas dos *CYP2D6*4, *10 e *17* apresentaram uma distribuição homogênea entre os diferentes grupos populacionais da Amazônia brasileira (De Jesus 2013; Brasil *et al*. 2018; Silvino 2020; Salles 2021) incluindo o de Rio Preto da Eva, exceto o *CYP2D6*4* em Macapá/AP e Plácido de Castro/AC (Salles 2021).

Na realidade, em relação as frequências alélicas, há diferenças marcantes inter e intrapopulações de diferentes origens étnicas e regiões geográficas (Llerena *et al.*

2014). Como supracitado, determinados alelos são observados em altas frequências em diferentes populações, tais como *CYP2D6*4* em europeus, *CYP2D6*10* em asiáticos e *CYP2D6 *17* em africanos (Zhou *et al.* 2009; Crews *et al.* 2014; Llerena *et al.* 2014). Em Rio Preto da Eva (Tabela 8), as frequências dos alelos polimórficos **4* (10%), **10* (12%), **17/SNP2850* (41%) e **17/SNP1023* (3%) oscilam entre as relatadas para asiáticos, europeus e africanos (Llerena *et al.* 2014), como esperado para uma população miscigenada. De modo geral, as frequências alélicas de Rio Preto da Eva foram semelhantes as observadas em outras populações da Região Amazônica. As diferenças observadas (Tabela 8) podem estar relacionadas com diferentes fatores, dentre eles, diferentes proporções de etnias na composição das populações e tamanho da amostra (Friedrich *et al.* 2014; Llerena *et al.* 2014).

As enzimas CYP3A4 e CYP3A5 são altamente polimórficas e responsáveis pela biotransformação de mais que 50% dos fármacos de uso clínico, incluindo os antimaláricos artemisininas, cloroquina, hidroxicloroquina, lumefantrina, mefloquina e primaquina (Piedade *et al.* 2012). Nesse estudo avaliamos as frequências genotípicas e alélicas das variantes *CYP3A4*22, CYP3A5*3F e CYP3A5*3K* em Rio Preto da Eva – AM. Sabe-se que essas variantes codificam para enzimas com atividade reduzida (CYP3A4) ou nula (CYP3A5), entretanto, até o momento, poucos estudos descrevendo a frequência dessas variantes em populações de regiões endêmicas de malária foram reportados.

O alelo *CYP3A4*22* ocorre predominantemente nas populações europeias (Mulder *et al.* 2021). Neste estudo observamos uma baixa frequência (4%) de indivíduos portadores de genótipo polimórfico (C/T) para o *CYP3A4*22*, o que sugere que essa variante tenha pouca influência no nível de resposta terapêutica aos antimaláricos, bem como de outros medicamentos substratos da enzima codificada por esse gene, na população de Rio Preto da Eva. Ao comparar a frequência do alelo polimórfico *CYP3A4*22* de Rio Preto da Eva (2%) com outras regiões geográficas, incluindo brasileiras (Tabela 9), observamos uma distribuição similar entre elas, excetuando nas populações indianas, onde o alelo variante é raro (0,5%).

O alelo *CYP3A5*3* apresenta uma grande amplitude nas frequências alélicas entre europeus, africanos e asiáticos (Lamba *et al*. 2012; Suarez-Kurtz *et al*. 2014). Em Rio Preto da Eva maioria dos indivíduos são portadores de genótipo selvagem para os *CYP3A5*3F* (31551 A>G; A/A - 100%) e *3A5*3K* (29753 A>G; A/A – 96%), exceto para o *CYP3A5*3F* (31611 C>T) onde a frequência de indivíduos portadores do genótipo polimórfico homozigoto T/T, caracterizado fenotipicamente como

metabolizador nulo/sem atividade enzimática, foi de 58%, ou seja, mais da metade da população é suscetível a falha terapêutica e aos efeitos adversos dos antimaláricos artemisininas, cloroquina, hidroxicloroquina, lumefantrina, mefloquina e primaquina. Até o momento, não há estudos descrevendo as frequências dessas variantes na população brasileira (Tabela 9). Entretanto, a frequência do alelo polimórfico em outras regiões geográficas do mundo é baixa (Tabela 9), porém associada a perda da atividade enzimática da enzima CYP3A5*3 (Sánchez *et al.* 2011; Dapia *et al*. 2014; Liang *et al.* 2021). Vale ressaltar que todas as variantes alélicas do *CYP3A4/3A5* estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e com valores de desequilíbrio de ligação baixos, sendo marcadores independentes.

O conhecimento da farmacogenética de uma população aliado à epidemiologia da malária é um passo importante para a compreensão da eficácia da resposta terapêutica em populações de área endêmica de malária, assim como da influência da variabilidade genética na falha terapêutica e nos efeitos adversos aos antimaláricos. O presente estudo se mostra pioneiro em Rio Preto da Eva/AM contemplando a análise de vários polimorfismos em genes (*CYP2D6, CYP3A4* e *CYP3A5*) envolvidos na metabolização de antimaláricos, assim como de outros fármacos de uso clínico. Os dados gerados têm implicações diretas no controle da malária, pois constatamos a presença de variantes alélicas que codificam para fenótipos metabolizadores intermediários e nulos para os medicamentos de primeira linha no tratamento da infecção causada por *P. vivax* e *P. falciparum*. Estudos complementares serão necessários para avaliar o impacto funcional desses polimorfismos nas respostas aos medicamentos atuais, ou futuros, usados nos tratamentos das infecções causadas por *P. vivax e P. falciparum*.

6 CONCLUSÕES

Com base nos nossos dados, podemos concluir que:

- A caracterização genética dos 8 *loci* referentes ao *CYP2D6* e *CYP3A4/3A5* dos indivíduos de Rio Preto da Eva (AM) apresentaram um perfil polimórfico para os *CYP2D6*17* (47%; G/A e 17%; A/A) e CYP3A5*3F (58%; T/T) e as outras variantes alélicas apresentaram frequências maiores do alelo selvagem.

- As frequências de alelos (64%) que codificam para fenótipos metabolizadores intermediários (*CYP2D6*17*: SNP 2850 – 47% G/A e 17% A/A), assim como de alelos que codificam para fenótipos metabolizadores fracos (*CYP3A5*3F*: SNP31611 – 58% T/T), observadas nesse estudo, sugerem que uma parte significante da população de Rio Preto da Eva está em risco de falha terapêutica ou de efeitos adversos ao antimaláricos e outros medicamentos.

- Ao comparar nossas frequências com as de outras populações, descritas na literatura, os *SNPs* estudados estão em concordância com as frequências encontradas em outras populações.

7 PERSPECTIVAS

Em Rio Preto da Eva – AM e em outras populações de área endêmica de malária:

- Descrever as frequências haplotípicas dos genes *CYP2D6* e *CYP3A4/3A5* envolvidas no biometabolismo de fármacos antimaláricos preconizados pelo Ministério da Saúde, inferindo a atividade enzimática;

- Investigar o impacto das variantes alélicas presentes nos genes *CYP2D6* e *CYP3A4/3A5* na metabolização e no efeito dos antimaláricos ao longo do tratamento de indivíduos infectados;

- Avaliar a possível associação entre as variantes alélicas presentes nos genes *CYP2D6 e CYP3A4/3A5* e a susceptibilidade à malária;

- Caracterizar o perfil étnico utilizando marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) associando a ancestralidade genética e as variantes alélicas presentes nos genes *CYP2D6* e *CYP3A4/3A5.*

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adegbola AJ, Rana A, Adeagbo BA. et al. Influence of selected polymorphisms in disposition genes on lumefantrine pharmacokinetics when coadministered with efavirenz. Pharmacogenetics and Genomics, 2020; 30(5): 96-106.

Al-Bari AA. Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. J Antimicrob Chemother. 2015; 70:1608-21.

Almeida ACG, Puça MCB, Figueiredo EFG. et al. Influence of CYP2C8, CYP3A4 and CYP3A5 host genotypes on early 2 recurrence of Plasmodium vivax. Antimicrob Agents Chemother. 2020; 64(7).

Antunes MV, De Oliveira V, Raymundo S. et al. CYP3A4*22 is related to increased plasma levels of 4-hydroxytamoxifen and partially compensates for reduced CYP2D6 activation of tamoxifen. Pharmacogenomics. 2015; 16(6): 601-17.

Alven S, Aderibigbe B. Combination Therapy Strategies for the Treatment of Malaria. Molecules. 2019; 24(19):3601.

Arya A, Foko LPK, Chaudhry S. et al. Artemisinin-based combination therapy (ACT) and drug resistance molecular markers: A systematic review of clinical studies from two malaria endemic regions – India and sub-Saharan Africa. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2021; 15:43–56.

Ashley EA, Phyo AP, Woodrow CJ. Malaria. Lancet. 2018; 391:1608-21.

Audi EA, Pussi, FD, Isoenzimas do CYP450 e biotransformação de drogas. Acta Scientiarum. 2000; 22(2):599-604.

Avula B, Tekwani BL, Chaurasiya ND. et al. Metabolism of primaquine in normal human volunteers: investigation of phase I and phase II metabolites from plasma and urine using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-fight mass spectrometry. Malar J. 2018; 17(294).

Baia-da-Silva DC, Brito-Sousa JD, Rodovalho SR. et al. Current vector control challenges in the fight against malaria in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2019; 52.

Bains RK. African variation at Cytochrome P450 genes Evolutionary aspects and the implications for the treatment of infectious diseases. Evol Med Public Health. 2013; (1):118–34.

Baird JK. 8-Aminoquinoline Therapy for Latent Malaria. Clin Microbiol Rev. 2019; 32(4).

Baird JK. Hoffman SL, Primaquine Therapy for Malaria. Clin Infect Dis. 2004; 39:1336–45.

Balint GA. Artemisinin and its derivatives an important new class of antimalarial agents. Pharmacol Ther. 2001; 90:261-65.

Barrett MP, Kyle DE, Sibley D. et al. Protozoan persister-like cells and drug treatment failure. Nat Rev Microbiol. 2019; 17(10):607-20.

Behrendorff JBYH. Reductive Cytochrome P450 Reactions and Their Potential Role in Bioremediation. Front Microbiol. 2021; 12.

Belete TM. Recent Progress in the Development of New Antimalarial Drugs with Novel Targets. Drug Des Devel Ther. 2020; 14:3875–89.

Belmonte C, Ochoa D, Roman M. et al. Influence of CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5 and ABCB1 Polymorphisms on Pharmacokinetics and Safety of Aripiprazole in Healthy Volunteers. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2018; 122:596-605.

Bernard S, Neville KA, Nguyen AT. et al. Interethnic Differences in Genetic Polymorphisms of CYP2D6 in the U.S. Population: Clinical Implications. The Oncologist. 2006; 11:126–35.

Bhat MA, Gandhi G. CYP2D6 (C2850T, G1846A, C100T) polymorphism, haplotypes and MDR analysis in predicting coronary artery disease risk in north-west Indian population: A case-control study. Gene. 2018; 663:17-24.

Brasil LW, Rodrigues-Soares F, Santoro AB. et al. CYP2D6 activity and the risk of recurrence of Plasmodium vivax malaria in the Brazilian Amazon: a prospective cohort study. Malaria J, 2018; 17(57).

Brasil, Ministério da Saúde. Boletim - Brasil registra redução de 19,1% nos casos de malária, 2020. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/brasil-registra-reducao-de-19-1-nos-casos-de-malaria. Acesso em: 25 de fevereiro de 2021.

Brasil, Ministério da Saúde. Guia de tratamento de malária no Brasil. 1ª ed. 2020.

Brasil, Ministério da Saúde. Malária: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. 2021. Disponível em: https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria. Acesso em: 15 de março de 2021.

Brasil, Ministério da Saúde - CGPNCM/DEVIT/SVS/MS, MALÁRIA-BRASIL 2021. Disponível em: https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/. Acesso em: 15 de março de 2021.

Brasil P, Zalis MG, Pina-Costa A. et al. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. Lancet. 2017; 5:e1038-e1046.

Brignac-Huber LM, Park JW, Reed JR. et al. Cytochrome P450 Organization and Function Are Modulated by Endoplasmic Reticulum Phospholipid Heterogeneity. Drug Metab Dispos. 2016; 44:1859–66.

Browning DJ. Pharmacology of Chloroquine and Hydroxychloroquine. In: Hydroxychloroquine and Chloroquine Retinopathy. Springer. 2014.

Bruce-Chwatt LJ. History of Malaria from Prehistory to Eradication, Malaria: Principles and Practice of Malariology. Edinburgh: Wernsdorfer & McGregor. 1988.

Bruton LL, Knollmann BC, Hilal-Dandan R. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 13ª ed. 2018.

Camarda G, Jirawatcharadech P, Priestley RS. et al. Antimalarial activity of primaquine operates via a two-step biochemical relay. Nature Communications. 2019; 10 (3226).

Camargo EP. Malária, Maleita, Paludismo. Ciência e Cultura. 2003; 55(1).

Carlos BC, Rona LDP, Christophides GH. et al. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil, Pathogens and Global Health, 2019; 113(1):1-13.

Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ. et al. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. Am J Hum Genet, 2004; 74(1):106-20.

Carneiro RG. Análise da interação dos metabólitos de Plasmodium falciparum com os fármacos diidroartemisinina e anterolano mediada por heme, Monografia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Brasília, 2016.

Caudle KE, Dunnenberger HM, Freimuth RR. et al. Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results: consensus terms from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). Genetics in Medicine, 2017; 19(2).

CDC, Biology – Lifecycle of Malaria. 2021. Disponível em: https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html#:~:text=The%20malaria%20parasite%20life%20cycle,which%20rupture%20and%20release%20merozoites%20. Acesso em: 15 de novembro de 2021.

Chamnanphon M, Gaedigk A, Puangpetch A. et al. Pharmacogene Variation in Thai *Plasmodium vivax* Relapse Patients Treated with a Combination of Primaquine and Chloroquine. Pharmacogenomics and Personalized Medicine. 2020; 13:1–12.

Chu CS, Freedman DO. Tafenoquine and G6PD: a primer for clinicians. J Travel Med, 2019; 26(4).

Chukanchitipat K, Na-Bangchang K. A review of clinical pharmacokinetics of chloroquine and primaquine and their application in malaria treatment in Thai population. Afr. J. Pharm. Pharmacol. 2017; 11(38):475-490.

Cid NAL. Avaliação de Polimorfismos da CYP3A5 em Indivíduos da Região Centro-Oeste do Brasil. Dissertação. Universidade Católica de Goiás. 2016.

Cives, Malária, Universidade do Rio de Janeiro. 2021. Disponível em: http://www.cives.ufrj.br/informacao/malaria/mal-iv.html. Acesso em: 03 de dezembro de 2021.

Cong L, Fu Q, Gao T. CYP17A1 rs743572 polymorphism might contribute to endometriosis susceptibility: evidences from a case-control study. Medicine. 2018; 97(28).

Couto BRW. Análise espacial e temporal das relações entre a sazonalidade dos casos de malária e a variabilidade hidrológica no Estado do Amazonas, Brasil, Tese, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas, 2015.

Cox FEG. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. Parasites & Vectors. 2010; 3(5).

Cowman AF, Healer J, Marapana. D. et al. Malaria: Biology and Disease, Cell. 2016;157.

Danielson PB. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. Curr Drug Metab. 2002; 3(6):561-597.

Dapia I, Tabakov A, Román LE et al. Effect of the CYP3A5, CYP3A4, CYP3A7, ABCB1, POR and NR1/2 genes in the pharmacokinetics of tacrolimus in a pediatric cohort with stable serum concentrations after renal transplantation: study protocol. IberoAmerican Journals. 2017; 1(1).

Das S, Kar A, Manna S. et al. Artemisinin combination therapy fails even in the absence of Plasmodium falciparum kelch13 gene polymorphism in Central India. Scientifc Reports. 2021; 11(9946).

Davanço MG, Aguiar ACC, Dos Santos LA. et al. Evaluation of Antimalarial Activity and Toxicity of a New Primaquine Prodrug. PLoS One. 2014; 9(8).

De Brito DM, Vital W, Santana LKL. Incidência de Malária no Município de Rio Preto da Eva - AM no período de 2003 a 2013. Scientia Amazonia. 2016; 5(1):82-92.

De Jesus JS. Caracterização Molecular de isoformas do citocromo P450 em pacientes com malária por *Plasmodium vivax*. Dissertação. Universidade Federal do Amazonas. 2013.

De Pina-Costa A, Silvino ACR, Dos Santos EM. et al. Increased primaquine total dose prevents Plasmodium vivax relapses in patients with impaired CYP2D6 activity: reporto f three cases. Malar J. 2021; 20(341).

Do Prado CM. Desenvolvimento de metodologia para a determinação dos genótipos principais dos genes CYP2D6, CYP2C19 e CYP2C9: aplicação na Farmacogenética, Dissertação, Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, 2009.

Dow G, Smith B. The blood schizonticidal activity of tafenoquine makes an essential contribution to its prophylactic efficacy in nonimmune subjects at the intended dose (200 mg). Malar J. 2017; 16(209).

Drugbank. 2021. Disponível em: https://go.drugbank.com/. Acesso em: 10 de março de 2021.

Ducharme J, Farinotti R, Clinical Pharmacokinetics and Metabolism of Chloroquine. Clin. Pharmacokinet. 1996; 31(4).

Ebstie YA, Abay SM, Tadesse WT. et al. Tafenoquine and its potential in treatment and relapse prevention of Plasmodium vivax malaria: the evidence to date. Drug Des Devel Ther. 2016; 10:2387–99.

Elewa H, Wilby KJ. A Review of Pharmacogenetics of Antimalarials and Associated Clinical Implcations. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2017; 42(5):745-756.

Elfaki I, Mir R, Almutairi FM. et al. Cytochrome P450: Polymorphisms and Roles in Cancer, Diabetes and Atherosclerosis, Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2018; 19:2057-70.

Esteves F, Rueff J, Kranendonk M. The Central Role of Cytochrome P450 in Xenobiotic Metabolism - A Brief Review on a Fascinating Enzyme Family. J Xenobiot. 2021; 11(3):94-114.

Evans WE, Relling MV. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. Nature. 2004; 429:464-468.

Ferreira MES, Gomes MSM, Vieira JLF. Metemoglobinemia em pacientes com malária por Plasmodium vivax em uso oral de primaquine. Rev Soc Bras Med Trop. 2011; 44(1):113-115.

Fong KY, Wright DW. Hemozoin and antimalarial drug discovery, Future Med. Chem. 2013; 5(12):1437–50.

Frampton JE. Tafenoquine: First Global Approval. Drugs. 2018; 78(14):1517-23.

Freire-Maia N. Inbreeding in Brazil. Am J Hum Genet. 1957; 9:284-298.

Friedrich DC, Genro JP, Sortica VA. et al. Distribution of CYP2D6 Alleles and Phenotypes in the Brazilian Population. PLoS One, 2014; 9(10).

Furst DE. Pharmacokinetics of hydroxychloroquine and chloroquine during treatment of rheumatic diseases. Lupus, 1996; 5(1):11–15.

Gaedigk A, Dinh JC, Jeong H. et al. Ten Years' Experience with the CYP2D6 Activity Score: A Perspective on Future Investigations to Improve Clinical Predictions for Precision Therapeutics. J. Pers. Med. 2018; 8(15).

Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE. et al. The CYP2D6 Activity Score: Translating Genotype Information into a Qualitative Measure of Phenotype. Nature. 2008; 83(2).

Gamarra JGA. Estudo para a Caracterização Genotípica e Fenotípica da Atividade Enzimática da Subfamília Citocromo P450 CYP2D6 de Voluntários Sadios. Tese. Universidade de São Paulo. 2011.

Genecardsuite. 2021. Disponível em: https://www.genecards.org/. Acesso em: 09 de março de 2021.

Ginsburg H. Should chloroquine be laid to rest?. Acta Tropica, 2005; 96:16–23.

Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ. et al. Princípios de Farmacologia - a Base Fisiopatológica da Farmacologia. 3ª ed. 2014.

GSK, Brasil se torna o primeiro país com malária endêmica a aprovar tafenoquina em dose única para cura radical da malária por Plasmodium vivax. 2019. Disponível em: https://br.gsk.com/pt-br/sala-de-imprensa/press-releases/2019/brasil-se-torna-o-primeiro-pa%C3%ADs-com-mal%C3%A1ria-end%C3%AAmica-a-aprovar-tafenoquina-em-dose-%C3%BAnica-para-cura-radical-da-mal%C3%A1ria-por-plasmodium-vivax/. Acesso em 25 de novembro de 2019.

Governo do Amazonas, Atlas Amazonas em Mapas, 2ª ed., Amazonas – Brasil. 2018.

Hodel EMS, Csajka C, Ariey F. Effect of Single Nucleotide Polymorphisms in Cytochrome P450 Isoenzyme and N-Acetyltransferase 2 Genes on the Metabolism of Artemisinin-Based Combination Therapies in Malaria Patients from Cambodia and Tanzania. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 7(2):950-58.

Hounkpatin AB, Kreidenweiss A, Held J. Clinical utility of tafenoquine in the prevention of relapse of Plasmodium vivax malaria: a review on the mode of action and emerging trial data. Infect Drug Resist. 2019; 12:553–70.

Huang H, Dong Y, Xu Y. et al. The association of CYP2D6 gene polymorphisms in the full-length coding region with higher recurrence rate of vivax malaria in Yunnan Province, China. Malar J. 2021; 20:160.

IBGE, Cidade e Estados, Rio Preto da Eva. 2021. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/am/rio-preto-da-eva.html. Acesso em 04 de março de 2021.

Imwong M, Madmanee W, Suwannasin K. et al. Asymptomatic Natural Human Infections with the Simian Malaria Parasites Plasmodium cynomolgi and Plasmodium knowlesi. J Infect Dis. 2019; 219(5):695– 702.

Jesus, FIA. O PAPEL DA FARMACOGENÉTICA NA TERAPIA DO HIV. Dissertação. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. 2014.

Kaewkhao K, Chotivanich K, Winterberg M. et al. High sensitivity methods to quantify chloroquine and its metabolite in human blood samples using LC–MS/MS, Bioanalysis, 2019; 11(5):333-47.

Kerb R, Fux R, Mörike K. et al. Pharmacogenetics of antimalarial drugs: effect on metabolism and transport. Lancet Infect Dis. 2009; 9(12):760-74.

Kiaco K. Malária por *Plasmodium falciparum* em Angola: estudos genéticos associados a combinações terapêuticas à base de artemisinina, Dissertação, Insituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa. 2018.

Kimura S, Umeno M, Skoda, RC. et al. The Human Debrisoquine 4-Hydroxylase (CYP2D) Locus: Sequence and Identification of the Polymorphic CYP2D6 Gene, a Related Gene, and a Pseudogene. Am. J. Hum. Genet. 1989; 45:889-904.

Kitzmiller JP, Luzum JA, Baldassarre D. et al. CYP3A4*22 and CYP3A5*3 are associated with increased levels of plasma simvastatin concentrations in the cholesterol and pharmacogenetics study cohort. Pharmacogenetics and Genomics. 2014; 24(10): 486-491.

Koehne E, Adegnika, AA, Held, J. et al. Pharmacotherapy for artemisinin-resistant malaria. Expert Opin Pharmacother. 2021; 22(18):2483-2493.

Kuehl P; Zhang J; Lin Y; et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. Nature Genetics. 2001; 27(4):383-91.

Ladeia-Andrade S, Menezes MJ, De Souza TN. et al. Monitoring the Efficacy of Chloroquine-Primaquine Therapy for Uncomplicated Plasmodium vivax Malaria in the Main Transmission Hot Spot of Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2019; 63(5).

Lam YWF. Principles of Pharmacogenomics: Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, and Clinical Implications, Pharmacogenomics, 2nd Edition, Chapter 1, p. 1-53, Elsevier, 2019.

Lamba J, Hebert JM, Schuetz EG. et al. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP3A5. Pharmacogenet Genomics. 2012; 22(7): 555–558.

Lee SJ, Usmani KA, Chanas B. et al. Genetic findings and functional studies of human CYP3A5 single nucleotide polymorphisms in different ethnic groups. Pharmacogenetics. 2003; 13(8).

Lewis J, Gregorian T, Portillo I. et al. Drug Interactions with Antimalarial Medications in Older Travelers: A Clinical Guide. J Travel Med. 2020; 27(1).

Li M, Li A, He R. et al. Gene polymorphism of cytochrome P450 significantly affects lung cancer susceptibility. Cancer Medicine. 2019; 8(10):4892-4905.

Li Q, Pybus B, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profiles of Rapid- and Slow-Acting Antimalarial Drugs. Malaria. 2019.

Liang H, Zhang X, Ma Z. et al. Association of CYP3A5 Gene Polymorphism and Amlodipine-Induced Peripheral Edema in Chinese Han Patients with Essential Hypertension. Pharmacogenomics and Personalized Medicine. 2021; 14:189-197.

Liu YT, Hao HP, Liu CX. et al. Drugs as CYP3A Probes, Inducers, and Inhibitors. Drug Metab Rev. 2007; 39(4):699–721.

Llanos-Cuentas A, Lacerda MVG, Hien TT. et al. Tafenoquine versus Primaquine to Prevent Relapse of Plasmodium vivax Malaria. N Engl J Med. 2019; 380:229-241.

Llerena A, Naranjo MEG, Rodrigues-Soares F. et al. Interethnic variability of CYP2D6 alleles and of predicted and measured metabolic phenotypes across world populations. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2014; 10(11):1569-83.

Lolodi O, Wang YM, Wright WC. et al. Differential Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and Its Implication in Drug Discovery. Curr Drug Metab. 2017; 18(12):1095–1105.

Machado TMB. Migração, Estrutura Populacional, Tipos de Casamentos e Doenças Genéticas. Tese. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

Manikandan P, Nagini S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. Curr Drug Tar. 2018; 19:38-54.

Marcsisin SR, Reichard G, Pybus BS. Primaquine pharmacology in the context of CYP2D6 pharmacogenomics: Current state of art. Pharmacol Ther. 2016; 161: 1-10.

Martino E, Tarantino M, Bergamini M. et al. Artemisinin and its derivatives; ancient tradition inspiring the latest therapeutic approaches against malaria. Future Med. Chem. 2019; 11(12):1443-59.

Marwa KJ, Schmidt T, Sjögren M. et al. Cytochrome P450 single nucleotide polymorphisms in an indigenous Tanzanian population: a concern about the metabolism of artemisinin-based combinations. Malar J 2014; 13:420.

Mat Salleh NH, Rahman MFA, Samsusah S. et al. Case report: recurrence of Plasmodium vivax malaria due to defective cytochrome P450 2D6 function in Pos Lenjang, Pahang, Malaysia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2020; 0: 1–4.

Mehlotra RK, Gaedigk A, Howes RE. et al. CYP2D6 Genetic Variation and Its Implication for Vivax Malaria Treatment in Madagascar. Front. Pharmacol. 2021; 12.

Melo JO, Padilha MAO, Barbosa RTA. et al. Evaluation of the malaria elimination policy in Brazil: a systematic review and epidemiological analysis study. Trop Biomed. 2020; 37(2):513-535.

Menard D, Dondorp A. Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017; 7(7).

Ménard R, Tavares J, Cockburn I. et al. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. Nature Reviews Microbiology. 2013; 11:701-12.

Metzger IF, Souza-Costa DC, Tanus-Santos JE. Farmacogenética: Princípios, Aplicações e Perspectivas, Medicina, Ribeirão Preto. Simpósio: Farmacogenética. 2006; 39(4):515-21.

Mittal B, Tulsyan S, KUMAR S. et al. Cytochrome P450 in Cancer Susceptibility and Treatment. Advances in Clinical Chemistry. 2015; 71:77-139.

Moxon CA, Gibbins MP, McGuinness D. et al. New Insights into Malaria Pathogenesis. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2020; 15:315-343.

Mueller I, Galinski MR, Baird K. et al. Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. Lancet Infect Dis. 2009; 9(9):555-566.

Mulder TAM, Van Eerden RAG, De With M. et al. CYP3A4*22 Genotyping in Clinical Practice: Ready for Implementation? Front. Genet. 2021; 12(711943).

Multini LC. Diversidade genética e fenotípica do vetor de malária Anopheles cruzii (Diptera: Culicidae) em São Paulo, Tese, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2019.

Neghina R, Neghina AM, Marincu I. et al. Malaria, a journey in time: in search of the lost myths and forgotten stories. Am J Med Sci. 2010; 340(2):492-498.

Nielsen R, Akey JM, Jakobsson M. et al. Tracing the peopling of the world through genomics. Nature. 2017; 541(7637):302-310.

Nowak JK, Bancerz B, Bartkowska-Śniatkowska A. CYP3A drug metabolism in the developmental age: recente advances. J Med Sci. 2019; 88(1):58-61.

O'Flaherty K, Maguire J, Simpson JA. et al. Immunity as a predictor of anti-malarial treatment failure: a systematic review. Malar J. 2017; 16(158).

Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P. et al. Malaria in Brazil: an overview. Malar J. 2010; 9(115).

Packard RM. The Origins of Antimalarial-Drug Resistance. N Engl J Med. 2014; 371(5).

Pan X, Ning M, Jeong H, Transcriptional Regulation of CYP2D6 Expression. Drug Metab Dispos. 2017; 45:42–48.

Park SY, Kang YS, Jeong MS. et al. Frequencies of CYP3A5 genotypes and haplotypes in a Korean population. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. 2008; 33: 61–65.

Pedro RS, Tratamento Farmacológico da Malária em um Instituto de Pesquisa Clínica no Rio de Janeiro, Dissertação, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, 2011.

Peko SM, Ntoumi F, Vouvoungui C. et al. Distribution of the cytochrome P450 CYP2C8*2 allele in Brazzaville, Republic of Congo. Int J Infect Dis. 2019; 85:49–53.

Pena SDJ, Santos FR, Tarazona-Santos E. Genetic admixture in Brazil. Am J Med Genet. 2020; 1–11.

Pernaute-Lau L, Adegnika AA, Zhou Y. et al. Pharmacogene Sequencing of a Gabonese Population with Severe Plasmodium falciparum Malaria Reveals Multiple Novel Variants with Putative Relevance for Antimalarial Treatment. Antimicrob Agents Chemother. 2021; 65(7).

PharmVar. Pharmacogene Variation Consortium. 2022. Disponível em: https://www.pharmvar.org/. Acesso em 04 de março de 2020.

Phillips KA, Veenstra DL, Oren E. et al. Potential Role of Pharmacogenomics in Reducing Adverse Drug Reactions: A Systematic Review. JAMA. 2001; 286(18):2270-79.

Piedade R, Schaeffeler E, Winter S. et al. PXR Variants and Artemisinin Use in Vietnamese Subjects: Frequency Distribution and Impact on the Interindividual Variability of CYP3A Induction by Artemisinin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2012; 56(4):2153–57.

Pinheiro LCS, Feitosa LM, Da Silveira FF. et al. Current Antimalarial Therapies and Advances in the Development of Semi-Synthetic Artemisinin Derivatives. An Acad Bras Cienc. 2018; 90(2):1251-71.

Plewes K, Leopold SJ, Kingston HWF. et al. Malaria: What's New in the Management of Malaria?. Infect Dis Clin N Am. 2019; 33:39–60.

Prefeitura de Rio Preto da Eva, 2021. Sobre o Município. 2021. Disponível em: https://riopretodaeva.am.gov.br/o-municipio/sobre-o-municipio/. Acesso em 04 de março de 2021.

Projean D, Baune B, Farinotti R. et al. In Vitro Metabolism of Chloroquine: Identification of CYP2C8, CYP3A4, and CYP2D6 as the Main Isoforms Catalyzing N-Desethylchloroquine Formation. Drug Metab Dispos. 2003; 31(6):748-54.

Puça MCSB. Falha Terapêutica na Malária por Plasmodium vivax: Investigação de Fatores Relacionados à Metabolização de Primaquina e Estudo de Polimorfismos Relacionados à Resistência aos Antimaláricos. Dissertação. Instituto René Rachou, FIOCRUZ, 2021.

Pybus BS, Marcsisin SR, Jin X. et al. The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP 2D6. Malaria J. 2013; 12(212).

Qozi M, Cantrell FL, Chloroquine/Hydroxychloroquine, Encyclopedia of Toxicology, Volume 1, 3ª ed. Elsevier. 2014.

Quang NN, Chavchich M, Anh CX, Comparison of the Pharmacokinetics and Ex Vivo Antimalarial Activities of Artesunate–Amodiaquine and Artemisinin–Piperaquine in Healthy Volunteers for Preselection Malaria Therapy. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2018; 99(1):65-72.

Ramírez AM, González CL, Maniega TS. et al. Several Plasmodium vivax relapses after correct primaquine treatment in a patient with impaired cytochrome P450 2D6 function. Malar J. 2020; 19(259).

Recht J, Ashley EA, White NJ. Safety of 8-Aminoquinoline Antimalarial Medicines. Geneva: World Health Organization, 2014. Disponível em: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241506977/en/. Acesso em 17 de junho de 2020.

Rendic SP, Guengerich FP. Human Family 1–4 cytochrome P450 enzymes involved in the metabolic activation of xenobiotic and physiological chemicals: an update. Archives of Toxicology. 2021; 95(2):395-472.

Rodrigues ADD. Comparação da informação farmacogenética de metabolizadores CYP polimórficos entre US labels e RCMs, Dissertação, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 2015.

Rodrigues PT, Valdivia HO, De Oliveira TC. et al. Human migration and the spread of malaria parasites to the New World. Scientific Reports. 2018; 8(1):1993.

Romphosri S, Changruenngam S, Chookajorn T. et al. Role of a Concentration Gradient in Malaria Drug Resistance Evolution: A Combined within- and between Hosts Modelling Approach. Scientific Reports, 2020; 10(6219).

Saeki M, Saito Y, Nakamura T. et al. Single Nucleotide Polymorphisms and Haplotype Frequencies of CYP3A5 in a Japanese Population. Mutation in Brief. 2003; 618.

Saha N. Chapter 6 - Clinical Pharmacokinetics and Drug Interactions. Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research. p. 81-106, 2018.

Salles PF; Perce da Silva DS; Rossi AD. et al. CYP2D6 Allele Frequency in Five Malaria Vivax Endemic Areas from Brazilian Amazon Region. Front Pharmacol. 2021; 12.

Sánchez A, Cabrera S, Santos D. et al. Population Pharmacokinetic/Pharmacogenetic Model for Optimization of Efavirenz Therapy in Caucasian HIV-Infected Patients. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(11):5314-24.

Saiz-Rodríguez M, Almenara S, Navares-Gómez M. et al. Effect of the Most Relevant CYP3A4 and CYP3A5 Polymorphisms on the Pharmacokinetic Parameters of 10 CYP3A Substrates. Biomedicines. 2020; 8(94).

Schrezenmeier E, Dörner T. Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology. Nat Rev Rheumatol. 2020; 16(3):155-166.

Scudeler MM, Rodrigues-Soares F. Farmacogenética na América Latina. Acta Biologica Brasiliensia. 2020; 3(2):85-100.

Seok Lim H, Im, JS, Cho JY. et al. Pharmacokinetics of Hydroxychloroquine and Its Clinical Implications in Chemoprophylaxis against Malaria Caused by Plasmodium vivax. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(4):1468–75.

Shahabi P, Siest G, Meyer UA. et al. Human cytochrome P450 epoxygenases: Variability in expression and role in inflammation-related disorders. Pharmacol Ther. 2014; 144:134-61.

Shnayder NA, Petrova MM, Shesternya PA. et al. Using Pharmacogenetics of Direct Oral Anticoagulants to Predict Changes in Their Pharmacokinetics and the Risk of Adverse Drug Reactions. Biomedicines. 2021, 9:451.

Silvino ACR, Costa GL, De Araújo FCF. 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).

Silvino ACR, Recorrências na malária por Plasmodium vivax: variabilidade genética da enzima do complexo citocromo P450 2D6 (CYP2D6) e sua influência na falha terapêutica por primaquina, Dissertação, Instituto René Rachou, Minas Gerais, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, 2019.

Silvino ACR, Kano FS, Costa MA. et al. Novel Insights into Plasmodium vivax Therapeutic Failure: CYP2D6 Activity and Time of Exposure to Malaria Modulate the Risk of Recurrence. Antimicrob Agents Chemother. 2020; 64(5).

Sim SC, Ingelman-Sundberg M. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: A peer- reviewed database of CYP variants and their associated effects. Human Genomics. 2010; 4(4):278 – 81.

Sim SC, Ingelman-Sundberg M. Update on Allele Nomenclature for Human Cytochromes P450 and the Human Cytochrome P450 Allele (CYP-Allele) Nomenclature Database, Cytochrome P450 Protocols. Methods in Molecular Biology. 2013; 987(21).

Sistonen J, Sajantila A, Lao O. et al. CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. Pharmacogenet Genomics. 2007; 17(2):93-101.

Slater AFG. Chloroquine: Mechanism of Drug Action and Resistance in *Plasmodium falciparum.* Pharmacol Ther. 1993; 57:203-235.

Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W. et al. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. Mol Biochem Parasitol. 1993; 58(2):283-92.

Song Y, Li C, Liu G. et al. Drug-Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes Have Multifarious Influences on Treatment Outcomes. Clin Pharmacokinet. 2021; 60:585-601.

Sortica VA, Lindenau JD, Cunha MG. et al. The effect of SNPs in CYP450 in Chloroquine/Primaquine Plasmodium vivax malaria treatment. Pharmacogenomics. 2016; 17(17).

Soulard V, Vanga HB, Lorthiois A. et al. Plasmodium falciparum full life cycle and Plasmodium ovale liver stages in humanized mice. Nature Communications. 2015; 6(7690).

Spitman ABS, Moes DJAR, Gelderblom H. et al. Effect of CYP3A4*22, CYP3A5*3, and CYP3A combined genotypes on tamoxifen metabolism. Eur J Clin Pharmacol.2017; 73:1589–98.

Stipp MC, Acco A. Involvement of cytochrome P450 enzymes in infammation and cancer: a review. Cancer Chemother Pharmacol. 2020; 87(3):295-309.

Sturm A, Amino R, Van De Sand C. et al. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. Science. 2006; 313(5791):1287-90.

Suarez-Kurtz G, Genro JP, De Moraes MO. et al. Global pharmacogenomics: Impact of population diversity on the distribution of polymorphisms in the CYP2C cluster among Brazilians. Pharmacogenomics J. 2012; 12:267-76.

Suarez – Kurtz G, Perini JA, Bastos-Rodrigues L. et al. Impact of population admixture on the distribution of the CYP3A5*3 polymorphism. Pharmacogenomics. 2007; 8(10):1299-1306.

Sugiarto SR, Davis TME, Salman S. Pharmacokinetic considerations for use of artemisinin-based combination therapies against falciparum malaria in different ethnic populations. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. 2017; 13(11).

Takata J, Sondo P, Humphreys GS. et al. The WorldWide Antimalarial Resistance Network Clinical Trials Publication Library: A Live, Open-Access Database of Plasmodium Treatment Efficacy Trials. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2020; 103(1): 359–368.

Talapko J, Škrlec I, Alebic T. et al. Malaria: The Past and the Present, Microorganisms. 2019; 7(179).

Taylor C, Crosby I, Yip V. et al. A Review of the Important Role of CYP2D6 in Pharmacogenomics. Genes. 2020; 11(1295).

Teklehaimanot A, Teklehaimanot H, Girmay A. et al. Case Report: Primaquine Failure for Radical Cure of Plasmodium vivax Malaria in Gambella, Ethiopia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2020; 103(1):415–20.

Thakkar N, Green JA, Koh GCKW. et al. Population Pharmacokinetics of Tafenoquine, a Novel Antimalarial. Antimicrob Agents Chemother. 2018; 62(11).

Tönnesmann E, Kandolf R, Lewalter T. Chloroquine cardiomyopathy – a review of the literature. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 2013; 35(3):434–42.

Tornio A, Backman JT, Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update. Advances in Pharmacology. 2018; 83(1).

Val F, Costa FTM, King L. et al. Tafenoquine for the prophylaxis, treatment and elimination of malaria: eagerness must meet prudence. Future Microbiology. 2019; 14:1261-79.

Vaughan AM, Kappe SHI, Malaria Parasite Liver Infection and Exoerythrocytic Biology. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017; 7(6).

Vuong C, Xie LH, Potter BMJ. et al. Differential Cytochrome P450 2D Metabolism Alters Tafenoquine Pharmacokinetics, Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(7).

Waring RH, Cytochrome P450: genotype to phenotype. Xenobiotica. 2020; 50(1):9-18.

WHO, Malaria. 2021. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria. Acesso em: 10 de dezembro de 2021.

WHO, World Malaria Report. 2021.

WHO, WHO recommends groundbreaking malaria vaccine for children at risk. Disponível em: https://www.who.int/news/item/06-10-2021-whorecommends-groundbreaking-malaria-vaccine-for-children-at-risk. Acesso em: 20 de outubro de 2021

Willrich MAV. Estudo da expressão gênica e de polimorfismos da CYP3A5 em pacientes com hipercolesterolemia tratados com atorvastatina, Dissertação, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 2006.

Willrich MAV, Rodrigues AC, Cerda A. et al. Effects of atorvastatin on CYP3A4 and CYP3A5 mRNA expression in mononuclear cells and CYP3A activity in hypercholeresterolemic patients. Clinica Chimica Acta. 2013; 421:157–63.

Woo HI, Lee SK, Kim J. et al. Variations in plasma concentrations of tamoxifen metabolites and the effects of genetic polymorphisms on tamoxifen metabolism in Korean patients with breast cancer. Oncotarget. 2017; 8(59): 100296-10031.

Wright WC, Chenge J, Chen T. Structural perspectives of the CYP3A family and their small molecule modulators in drug metabolism. Liver Research. 2019; 3(3-4):132-142.

Yalcindag E, Elguero E, Arnathau C. et al. Multiple independent introductions of Plasmodium falciparum in South America. PNAS. 2012; 109(2):511-16.

Yu AM, Idle JR, Gonzalez FJ. Polymorphic Cytochrome P450 2D6: Humanized Mouse Model and Endogenous Substrates. Drug Metabolism Reviews. 2004; 36(2):243-277.

Zanger U, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. Pharmacol Ther. 2013; 138:103–141.

Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2004; 369(1):23–37.

Zanger UM, Turpeinen M, Klein K. et al. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. Anal Bioanal Chem. 2008; 392:1093–1108.

Zhou Y, Ingelman-Sundberg I, Lauschke VM, Worldwide Distribution of Cytochrome P450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects. Clin Pharmacol Ther. 2017; 102(4).

ANEXO I – REGISTRO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA DA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ/IOC

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência do polimorfismo do hospedeiro e do parasito (P. vivax e P. falciparum) na resposta imune e terapêutica de indivíduos naturalmente expostos a infecção.

Pesquisador: Dalma Maria Banic

Área Temática: Área 1. Genética Humana.
(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 2

CAAE: 14622813.8.0000.5248

Instituição Proponente: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ
CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 346.613

Data da Relatoria: 15/07/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto nacional que objetiva delinear o perfil da diversidade gênica de proteínas potencialmente vacinais de P. vivax e P. falciparum e do polimorfismo dos antígenos KIR/HLA/CYP de indivíduos residentes em áreas endêmica brasileiras (Manaus e Belém, no período de 2013 a 1018) e verificar a influência desses na infecção malárica, nas respostas imune celular, humoral e terapêutica. Para tanto, os pesquisadores irão avaliar: o polimorfismo das proteínas candidatas a compor uma vacina antimalárica de P. vivax e de P. falciparum, realizar análises intrapopulacionais de diversidade genotípica dessas proteínas; caracterizar os receptores KIR/HLA/TNFr na população estudada e a expressão dos receptores KIR/HLA/TNFr; a frequência alélica dos genes envolvidos no biometabolismo de drogas antimaláricas, atualmente preconizadas pelo Ministério da Saúde (cloroquina, primaquina, Coartem® (artemeter + lumefantrina), artesunato, artemisinina e mefloquina) e mapear os epítopos de células B das proteínas de P. vivax e P. falciparum avaliando o perfil da resposta imune (IgG e IgG-subclasses) na população de estudo.

O estudo será realizado em um universo amostral de 600 indivíduos, não aparentados, por área

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

endêmica de estudo; para o cálculo amostral para proporção para uma prevalência de 0,5, significância de 5%. De um total de 1200 voluntários, serão coletadas amostras de sangue, dados clínicos e epidemiológicos de 800 indivíduos sem malária e 400 com malária. Serão excluídos do estudo indivíduos com idade inferior a 10 anos, populações indígenas, presidiários, doentes mentais, gestantes e parturientes independentes da idade. Após a assinatura do TCLE que formaliza a participação desses indivíduos, os voluntários serão avaliados clinicamente por um médico. Em seguida, será realizada entrevista que tem como objetivo o preenchimento de um questionário de investigação de dados pessoais, clínicos e epidemiológicos.

As amostras de sangue serão coletadas por via endovenosa utilizando o sistema à vácuo de coleta (Vaccutainer) contendo heparina sódica (20 mL) para a obtenção do plasma e células e contendo EDTA (10 mL) para extração de DNA no dia do diagnóstico e antes do início do tratamento. Em seguida as amostras serão alíquotadas, criopreservadas e transportadas para o Laboratório de Simulídeos Oncocercose e Pesquisas em Malária, IOC, Fiocruz-RJ. Diagnóstico parasitológico por microscopia e por PCR de malária: por distensão sanguínea e/ou gota espessa e a pesquisa de plasmódio pela técnica de PCR será realizada após a extração de DNA parasitário. Análise do polimorfismo genético relacionado ao hospedeiro humano (A etapa de Caracterização dos receptores KIR/TNFr/HLA será realizada no Laboratório de Histocompatibilidade da UERJ, sob a supervisão do Dr. Luis Cristóvão Sobrino Porto): Caracterização dos receptores KIR/TNFr/HLA/CYP450. Mapeamento dos epitopos de células B de proteínas de P. falciparum e P. vivax pela técnica de SPOT-Synthesis. Os exames hematológicos serão realizados nos postos/clínicas das Secretárias de Saúde dos Municípios. Será avaliado no hemograma, número de reticulócitos, a concentração de hemoglobina (g/dL), o hematócrito (%), o volume globular médio (VGM ¿ mm3), a hemoglobina corpuscular média (HCM ¿ pg), nos. Avaliação do perfil de anticorpos específicos de P. vivax e P. falciparum (classes e subclasses) por ELISA. Análises dos dados e análise estatística: Dados demográficos, clínicos e epidemiológicos e resultados dos experimentos da resposta imune de cada voluntário e do polimorfismo hospedeiro/parasito serão armazenados no Banco de dados Epi-info (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) e analisado através do programa Graphpad Prism versão 5.0 (San Diego, CA). O padrão de qualidade das sequências obtidas será o valor acima de 20. As sequências nucleotídicas obtidas (senso e antisenso) para cada amostra serão analisadas utilizando programas provenientes do pacote DNASTAR/Lasergene Software (Madison, WI). A variabilidade nucleotídica será avaliada com o auxílio do programa MEGA versão 5. Os testes estatísticos serão utilizados para verificar as

correlações entre os resultados experimentais, as caracterizações genéticas e os dados epidemiológicos. Os resultados obtidos poderão auxiliar no delineamento de novas estratégias para o desenvolvimento de vacinas e tratamentos mais eficazes em diferentes cenários epidemiológicos no controle da malária assim como de outras patologias.

Foram anexados ao projeto os seguintes documentos: 1- Folha de Rosto, 2- Projeto completo, 3-TCLE dos voluntários de Manaus, 4- TCLE dos voluntários do Pará, 5- TERMO DE ASSENTIMENTO dos menores de Manaus, 6- TERMO DE ASSENTIMENTO dos menores de Belém, 7- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para Pais/Responsáveis) de Manaus, 8- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para Pais/Responsáveis) de Belém, 9- Questionário com dados clínicos e epidemiológicos, 10- Termos de Responsabilidade e Compromisso de todos os membros da equipe das duas localidades, e 11- Termo de Anuência dos representantes legais das duas localidades.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o perfil da diversidade gênica de proteínas potencialmente vacinais em isolados de P. vivax e P. falciparum e do polimorfismo dos antígenos KIR/HLA/TNFr/CYP de indivíduos residentes em área endêmica brasileira e verificar influência desses na infecção malárica e nas respostas imune e terapêutica de indivíduos naturalmente expostos a infecção.

Objetivos Secundários:

1. Avaliar o polimorfismo genético das proteínas PvMSP3, PvMSP9 e PvDuffy em isolados de P. vivax e das proteínas PfMSP3, PfMSP9 (ABRA), P126(SERA), e EBA-175 em isolados de P. falciparum, oriundos de pacientes naturalmente expostas a infecção (PCR, sequenciamento gênico, análises intrapopulacional e comparação com sequencias depositadas no banco de dados GenBankTM).
2. Realizar a tipagem molecular dos receptores KIR, TNFr e HLA (classe I e II) das populações estudadas, através da técnica de PCR-SSO e PCR-SSOP (Método Luminex), respectivamente.
3. Determinar a expressão, qualidade e quantidade de transcritos dos genes KIR/HLA/TNFrs na população estudada (método RTPCR em tempo real).
4. Avaliar as frequências alélicas dos genes das famílias CYP envolvidas no biometabolismo de drogas antimaláricas atualmente preconizadas pelo Ministério da Saúde (cloroquina, primaquina, Coartem® (artemeter + lumefantrina), artesunato, artemisinina e mefloquina) nas populações de

estudo.

5. Identificar novos SNPs nas sequências nucleotídicas referentes aos alelos das famílias CYP e caracterizar novos alelos na populações de estudo.

6. Comparar as frequências gênicas do KIR/TNFr/HLA e CYP encontradas na população de Pará e Manaus, com as de outras populações, descritas na literatura.

7. Mapear os epítopos de células B das proteínas de P. vivax (PvMSP3, PvMSP9 e PvDuffy) e P. falciparum (PfMSP3, PfMSP9/ABRA, P126 e EBA-175) na população estudada através da técnica de SPOTSynthesis/ ELISA.

8. Avaliar a concentração sérica de imunoglobulinas e o perfil da resposta anticorpo (IgG, IgA, IgM e IgD e IgG-subclasses) induzida pelos epítopos de células B das proteínas estudadas (Imunoturbimetria/Kit da BioSys e SPOT-Synthesis/ELISA) nos indivíduos residentes em área endêmica brasileira.

9. Avaliar possíveis correlações entre os itens acima e os dados clínicos, epidemiológicos, hematológicos e parasitológicos das populações estudadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os possíveis riscos e desconfortos estão relacionados a coleta de sangue: A coleta de sangue da veia do braço poderá causar alguma dor local e, eventualmente, formação de uma área arroxeada no local, que desaparece em 3 a 5 dias; a coleta de sangue com furo no dedo poderá ocasionar dor local e pequeno sangramento. Todos os cuidados apropriados serão tomados, como o uso de seringa, agulha e gaze descartável assim como álcool iodado e outros para assepsia e curativo local. Não há riscos potenciais visto que os procedimentos que serão utilizados durante o trabalho são normalmente empregados na coleta de sangue e no diagnóstico da malária.

Benefícios:

O desenvolvimento de projetos de pesquisa de ponta, como esse em questão, contribui para o desenvolvimento sanitário e social do Brasil.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é pertinente, tem valor científico, está muito bem fundamentado e trará importante contribuição para o conhecimento do tema. A metodologia está adequada aos objetivos apresentados.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Com base nas diretrizes éticas para pesquisas com seres humanos, expressas na Resolução CNS 466/2012, todos os documentos de apresentação obrigatória foram anexados.

Recomendações:

A pesquisadora acatou todas as recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências apresentadas no parecer anterior, foram atendidas pela pesquisadora principal. Recomendamos aprovação do projeto em pauta.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, como membro do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP Fiocruz/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012, manifesto-me pela APROVAÇÃO do projeto da forma como foi apresentado uma vez que a pesquisadora responsável atendeu a todas pendências.

Ressalto que a pesquisadora responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo.

RIO DE JANEIRO, 01 de Agosto de 2013

José Henrique da Silva Pilotto

Assinador por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

José Henrique da Silva Pilotto
Matrícula SIAPE 0627357
CRM 52.37829-7

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO(TCLE)

Anexo 1 -M

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: Influência do polimorfismo do hospedeiro (KIR/HLA/TNFr/CYP) e de proteínas de *P. vivax* e *P. falciparum* candidatas à vacina antimalárica na resposta imune e terapêutica de indivíduos naturalmente expostos a infecção"

Investigadores Responsáveis:
. Dalma Maria Banic *(Principal)*– Laboratório de Simulídeos e Onconcercose *"Pesquisas em Malária"* IOC/Fiocruz.
. Antônia Maria R. Franco – Laboratório de Leishmania e Doenças de Chagas – **INPA**/Manaus

Instituições: Fiocruz: IOC-RJ e INPA/Manaus

Equipe: Daiana de Souza P. da Silva, Raquel Alves Pinna e Marilza Maia Herzog - Laboratório de Simulídeos e Oncocercose *"Pesquisas em Malária"* IOC/Fiocruz; Lilian Rose Pratt-Riccio – Laboratório de Pesquisas em Malária IOC/Fiocruz; Thais Tibery e Francimeire Gomes Pinheiro – Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas – INPA – Manaus; Ana Cecília A. X. de Oliveira - Laboratório de Toxicologia Ambiental, DCB-ENSP/Fiocruz; Antônio Têva - Laboratório de Imunodiagnóstico – DCB-ENSP/Fiocruz; Luis Cristovão Porto - Laboratório de Histocompatibilidade –UERJ

Endereços:

- **Dalma Maria Banic** - Laboratório de Simulídeos e Oncocercose *"Pesquisas em Malária"*- IOC/Fiocruz. Avenida Brasil 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP 21040-900. **Telefones: (21) 2562–1613; 2562-1630.**
- **Antônia Maria R. Franco** – Laboratório de Leishmania e Doenças de Chagas – INPA/Manaus – Av. André Araújo 2936 – Bairro Aleixo – Manaus/AM – CEP 69060-001. **Telefone: (92) 3643-3068.**
- **Comitê de Ética em Pesquisa** – CEP/Fiocruz - Avenida Brasil 4036 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP 21040-360. **Telefone: (21) 3882-9011**.

Nome do voluntário: _____

Rubrica Voluntário

O (A) Sr.(ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa tendo como título *"Influência do polimorfismo do hospedeiro e do parasito (P. vivax e P. falciparum) na resposta imune e terapêutica de indivíduos naturalmente expostos a infecção"*. Informamos que esse estudo é para o maior conhecimento da malária, que é uma doença transmitida por mosquito e que causa momentos de febre alta e calafrios após os quais a pessoa fica cansada e sem forças para trabalhar. Além de verificar se o Sr (a) tem malária, será pesquisado qual parasita está causando esta doença na região e quais os tipos de respostas protetora "imunológica" e ao medicamento são mais benéficas para o seu organismo. O conhecimento desta resposta poderá ser importante para se tentar prever a evolução e a cura da doença e com isto tentar evitar ou diminuir as formas graves. Além disto, o melhor conhecimento desta doença pode, no futuro, ajudar no desenvolvimento de novos tratamentos e mesmo de uma vacina.
O tratamento da malária somente será oferecido pelas Secretárias de Saúde dos Municípios, quando necessários, sendo assim os resultados serão todos repassados para eles. O seguinte exame será realizado: **Exame de sangue.** A coleta de sangue da veia do braço ou sangue com furo no dedo. Os exames e coleta do material serão do seguinte modo: 1) sangue da veia do braço: com a

Rubrica Pesquisador

Este Termo de Consentimento Livre Esclarecido deve ser impresso, assinado, rubricado (em caso de mais de uma pagina) em duas vias sendo uma entregue ao sujeito da pesquisa e outra arquivada pelo pesquisador.

agulha descartável e tubo tipo vacutainer será tirado a quantidade de 30 mL de sangue do braço, podendo em algum outro momento da pesquisa ser solicitado outra nova coleta de sangue. A retirada sangue pode ser feita por médico, enfermeiro, farmacêutico ou um dos pesquisadores que trabalhe na pesquisa; 2) Sangue com furo no dedo: com uma lanceta descartável será feito um furinho no dedo médio de minha mão que eu escolhi para o exame. As gotas de sangue serão colocadas em um papel de filtro ou lâmina de vidro para exame no microscópio quando for preciso. Os possíveis riscos e desconfortos que possam vir depois são aqueles comuns que acontecem com esses tipos de exames: sangue da veia do braço – pode produzir dor local, rouxidão que desaparece em 3 a 5 dias; sangue com furo no dedo - dor local e pequeno sangramento no momento. Não há riscos potenciais visto que os procedimentos que serão utilizados durante este trabalho são os normalmente usados para o diagnóstico da malária.

Todos os dados, informações, material coletado e estocado (sangue, soro, plasma e células) estão submetidos às normas éticas destinadas à pesquisa envolvendo seres humanos e serão utilizados neste projeto, podendo eventualmente vir a ser utilizado também em pesquisas futuras, porém sempre resguardando a sua privacidade. Os resultados desse e de estudos futuros serão relatados a você e considerados confidenciais, podendo ser divulgados na forma de comunicação científica. Entretanto, não será permitida sua identificação, o que garante sua privacidade.

Para participar deste estudo o Sr (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira.

Os gastos necessários para a participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa. O material coletado para realização dos exames ficará sob a guarda da coordenadora do projeto pelo período de cinco anos até que todos os experimentos propostos no projeto sejam realizados e se necessário para repetição de testes para confirmação de dados.

Você será esclarecido (a) em qualquer aspecto que desejar. Também informamos que você pode recusar ou desistir de participar deste estudo a qualquer momento, sem prejuízo para seu acompanhamento ou sofrer quaisquer sanções ou constrangimentos.

Declaro que li e entendi todas as informações referentes a este estudo e que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe, a qual estará à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver dúvidas.

Atesto que assinei duas copias do termo de consentimento de igual teor e fiquei com uma via. Pelo presente consinto voluntariamente em participar no estudo, permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados em minha pessoa.

	_____, _____	
	Nome e Assinatura - Voluntário	**Data**
	_____, _____	
	Nome e Assinatura - Pesquisador	**Data**
	_____, _____	
	Nome e Assinatura – Testemunha	**Data**

Em caso de analfabetismo inserir impressão digital

Este Termo de Consentimento Livre Esclarecido deve ser impresso, assinado, rubricado (em caso de mais de uma pagina) em duas vias sendo uma entregue ao sujeito da pesquisa e outra arquivada pelo pesquisador.

Anexo 1 –M-P/R

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
(para Pais/Responsáveis)

Título do Projeto: Influência do polimorfismo do hospedeiro (KIR/HLA/TNFr/CYP) e de proteínas de *P. vivax* e *P. falciparum* candidatas à vacina antimalárica na resposta imune e terapêutica de indivíduos naturalmente expostos a infecção"

Investigadores Responsáveis:
. Dalma Maria Banic *(Principal)*– Laboratório de Simulídeos e Onconcercose *"Pesquisas em Malária"* IOC/Fiocruz.
. Antônia Maria R. Franco – Laboratório de Leishmania e Doenças de Chagas – **INPA**/Manaus

Instituições: Fiocruz: IOC-RJ e INPA/Manaus

Equipe: Daiana de Souza P. da Silva, Raquel Alves Pinna e Marilza Maia Herzog - Laboratório de Simulídeos e Oncocercose *"Pesquisas em Malária"* IOC/Fiocruz; Lilian Rose Pratt-Riccio – Laboratório de Pesquisas em Malária IOC/Fiocruz; Thais Tibery e Francimeire Gomes Pinheiro – Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas – INPA – Manaus; Ana Cecília A. X. de Oliveira - Laboratório de Toxicologia Ambiental, DCB-ENSP/Fiocruz; Antônio Têva - Laboratório de Imunodiagnóstico – DCB-ENSP/Fiocruz; Luis Cristovão Porto - Laboratório de Histocompatibilidade –UERJ

Endereços:

- **Dalma Maria Banic** - Laboratório de Simulídeos e Oncocercose *"Pesquisas em Malária"*- IOC/Fiocruz. Avenida Brasil 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP 21040-900. **Telefones: (21) 2562–1613; 2562-1630**
- **Antônia Maria R. Franco** – Laboratório de Leishmania e Doenças de Chagas – INPA/Manaus – Av. André Araújo 2936 – Bairro Aleixo – Manaus/AM – CEP 69060-001. **Telefone: (92) 3643-3068.**
- **Comitê de Ética em Pesquisa** – CEP/Fiocruz - Avenida Brasil 4036 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP 21040-360. **Telefone: (21) 3882-9011**.

Nome do voluntário: _____

Rubrica Voluntário

Convidamos o (a) seu/sua filho (a) (ou menor de idade que está sob sua responsabilidade) para participar como voluntário (a) do projeto de pesquisa intitulado *"Influência do polimorfismo do hospedeiro e do parasito (P. vivax e P. falciparum) na resposta imune e terapêutica de indivíduos naturalmente expostos a infecção"*. Informamos que esse estudo é para o maior conhecimento da malária, que é uma doença transmitida por mosquito e que causa momentos de febre alta e calafrios após os quais a pessoa fica cansada e sem forças para trabalhar. Além de verificar se o Sr (a) tem malária, será pesquisado qual parasita está causando esta doença na região e quais os tipos de respostas protetora "imunológica" e ao medicamento são mais benéficas para o seu organismo. O conhecimento desta resposta poderá ser importante para se tentar prever a evolução e a cura da doença e com isto tentar evitar ou diminuir as formas graves. Além disto, o melhor conhecimento desta doença pode, no futuro, ajudar no desenvolvimento de novos tratamentos e mesmo de uma vacina.
O tratamento da malária somente será oferecido pelas Secretárias de Saúde dos Municípios, quando necessários, sendo assim os resultados serão todos repassados para eles. O seguinte exame será realizado: **Exame de sangue.** A coleta de sangue da veia do braço ou sangue com furo no

Este Termo de Consentimento Livre Esclarecido deve ser impresso, assinado, rubricado (em caso de mais de uma pagina) em duas vias sendo uma entregue ao sujeito da pesquisa e outra arquivada pelo pesquisador.

dedo. Os exames e coleta do material serão do seguinte modo: 1) sangue da veia do braço: com a agulha descartável e tubo tipo vacutainer será tirado a quantidade de 30 mL de sangue do braço, podendo em algum outro momento da pesquisa ser solicitado outra nova coleta de sangue. A retirada sangue pode ser feita por médico, enfermeiro, farmacêutico ou um dos pesquisadores que trabalhe na pesquisa; 2) Sangue com furo no dedo: com uma lanceta descartável será feito um furinho no dedo médio de minha mão que eu escolhi para o exame. As gotas de sangue serão colocadas em um papel de filtro ou lâmina de vidro para exame no microscópio quando for preciso. Os possíveis riscos e desconfortos que possam vir depois são aqueles comuns que acontecem com esses tipos de exames: sangue da veia do braço – pode produzir dor local, rouxidão que desaparece em 3 a 5 dias; sangue com furo no dedo - dor local e pequeno sangramento no momento. Não há riscos potenciais visto que os procedimentos que serão utilizados durante este trabalho são os normalmente usados para o diagnóstico da malária.

Todos os dados, informações, material coletado e estocado (sangue, soro, plasma e células) estão submetidos às normas éticas destinadas à pesquisa envolvendo seres humanos e serão utilizados neste projeto, podendo eventualmente vir a ser utilizado também em pesquisas futuras, porém sempre resguardando a sua privacidade. Os resultados desse e de estudos futuros serão relatados a você e considerados confidenciais, podendo ser divulgados na forma de comunicação científica. Entretanto, não será permitida sua identificação, o que garante sua privacidade.

Para participar deste estudo o Sr (a) não terá nenhum custo. Cabe ressaltar, que nem o Sr (a), nem o (a) Menor receberão qualquer vantagem financeira.

Os gastos necessários para a participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa. O material coletado para realização dos exames ficará sob a guarda da coordenadora do projeto pelo período de cinco anos até que todos os experimentos propostos no projeto sejam realizados e se necessário para repetição de testes para confirmação de dados.

Você será esclarecido (a) em qualquer aspecto que desejar. Também informamos que você pode recusar ou desistir de participar deste estudo a qualquer momento, sem prejuízo para seu acompanhamento ou sofrer quaisquer sanções ou constrangimentos.

Declaro que li e entendi todas as informações referentes a este estudo e que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe, a qual estará à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver dúvidas.

Atesto que assinei duas copias do termo de consentimento de igual teor e fiquei com uma via. Pelo presente consinto voluntariamente em participar no estudo, permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados em minha pessoa.

	_____,	_____
	Nome e Assinatura - Responsável	**Data**
	_____,	_____
	Nome e Assinatura - Pesquisador	**Data**
	_____,	
	Nome e Assinatura – Testemunha	**Data**

Em caso de analfabetismo inserir impressão digital

Este Termo de Consentimento Livre Esclarecido deve ser impresso, assinado, rubricado (em caso de mais de uma pagina) em duas vias sendo uma entregue ao sujeito da pesquisa e outra arquivada pelo pesquisador.

ANEXO III – QUESTIONÁRIO DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

REGISTRO No

PROJETO: **Malária: Caracterização do perfil genotípico de enzimas (CYP450) envolvidas na biotransformação de drogas antimaláricas de população de área endêmica brasileira, Rio Preto da Eva - AM**

DADOS PESSOAIS

NOME:	**SEXO**: ☐ F ☐ M

IDADE:	**NATURALIDADE**:	**PROCEDÊNCIA:**

ENDEREÇO ATUAL:
NÚMERO DE RESIDENTES NO ENDEREÇO ATUAL:

PROFISSÃO:

Tempo de residência
Área endêmica (anos) : Rondônia (anos): Endereço atual:

HISTÓRIA PREGRESSA DE MALÁRIA

NÚMERO DE INFECÇÕES ANTERIORES DE MALÁRIA:
Espécies: ☐ P. *falciparum* ☐ P. *vivax* ☐ P. *malariae* ☐ Nenhuma ☐ Não lembra

NÚMERO DE INFECÇÕES ESSE ANO (2004):
Espécies: ☐ P. *falciparum* ☐ P. *vivax* ☐ P. *malariae* ☐ Nenhuma ☐ Não lembra

DATA DA ÚLTIMA INFECÇÃO:
Espécies: ☐ P. *falciparum* ☐ P. *vivax* ☐ P. *malariae* ☐ Nenhuma ☐ Não lembra
LOCAL PROVAVEL DE INFECÇÃO:
FEZ O TRATAMENTO COMPLETO?: ☐ Sim ☐ Não

JA FOI HOSPITALIZADO COM MALÁRIA: ☐ Sim ☐ Não Data:
MALÁRIA GRAVE NA FAMÍLIA: ☐ Sim ☐ Não Data: **OBS:**
TEM ALGUEM NA FAMÍLIA COM MALÁRIA OU TEVE MALÁRIA RECENTEMENTE? ☐ Sim ☐ Não

EXPOSIÇÃO A INFECÇÃO MALÁRICA

LOCALIZAÇÃO DA CASA

☐ Floresta ☐ Coleção d'agua ☐ Nenhuma

TIPO DE CASA (proteção em relação ao contato com mosquito)

☐ Boa ☐ Parcial ☐ Nenhuma

ATIVIDADES AO AMANHECER:

ATIVIDADES AO ANOITECER:

SABE COMO A MALÁRIA É TRANSMITIDA?

☐ Sim ☐ Não ☐ Foi informado mas não acredita

COMO?:

USO DE MEDIDAS PROFILÁTICAS

☐ Mosquiteiro ☐ Inseticida ☐ antimaláricos ☐ Outras ☐ Nenhuma

Data da última borrifação de inseticida (FNS):

INFECÇÃO ATUAL

SINTOMAS

☐ Febre ☐ Cefaleia ☐ Calafrios ☐ Náusea ☐ Mialgia ☐ Nenhum

DATA DO INICIO DOS SINTOMAS:

DIAGNÓSTICO

Espécies: ☐ P. *falciparum* ☐ P. *vivax* ☐ P. *malariae* ☐ Nenhuma

PARASITEMIA:

LOCAL PROVAVEL DE INFECÇÃO:

RECEBEU TRANSFUSÃO DE SANGUE ?: ☐ Sim ☐ Não Data:

É DOADOR DE SANGUE?: ☐ Sim ☐ Não Data da última doação:

COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

☐ **GOTA ESPESSA** ☐ **ESFREGAÇO** ☐ **PLASMA**

☐ **CÉLULAS** ☐ **HLA** ☐ **PARASITOS**

OBS