



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - FCF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS- PPGCF



Caracterização molecular de isoformas do citocromo P450 em
pacientes com malária por *Plasmodium vivax*

JAQUELANE SILVA DE JESUS

MANAUS
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - FCF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS- PPGCF



JAQUELANE SILVA DE JESUS

Caracterização molecular de isoformas do citocromo P450 em
pacientes com malária por *Plasmodium vivax*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Igor Rafael dos Santos Magalhães
Co-orientador: Prof. Dr. José Pereira Moura Neto

MANAUS
2013



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas



**Ata de Defesa de Dissertação de Mestrado do
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas da discente Jaquelane Silva de Jesus,
ocorrida no dia trinta de agosto de dois mil e treze.**

No dia trinta de agosto de dois mil e treze, às nove horas, na sala dezenove da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, ocorreu a **vigésima primeira** defesa de dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. A defesa consistiu na apresentação e julgamento da dissertação da discente **Jaquelane Silva de Jesus**, mestranda deste Programa de Pós-Graduação, com o título **“Caracterização molecular de isoformas do citocromo P450 em pacientes com malária por Plasmodium vivax”**, tendo como orientador o Professor Doutor Igor Rafael dos Santos Magalhães e Coorientador o Professor Doutor José Pereira de Moura Neto, ambos pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas. A banca examinadora da defesa de dissertação de mestrado foi presidida pelo Professor Doutor Igor Rafael dos Santos Magalhães, e teve como demais integrantes os Professores Doutores Jaila Dias Borges da Universidade Federal do Amazonas e Professor Doutor Márcio Luis Lombardi Martinez da Universidade do Estado do Amazonas. Concluída a apresentação e realizadas as arguições correspondentes, a aluna foi considerada, nesta ordem: Professor Doutor Igor Rafael dos Santos Magalhães (X) **Aprovada** () **Reprovada**, Professora Doutora Jaila Dias Borges (X) **Aprovada** () **Reprovada** e Professor Doutor Márcio Luis Lombardi Martinez (X) **Aprovada**, () **Reprovada**. Não tendo mais nada a acrescentar, eu, Maria Cleomirete Lopes de Almeida, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, lavrei a presente Ata, que, após lida segue assinada pela mestranda, orientador e demais membros da Banca Examinadora. Manaus, trinta de agosto de dois mil e treze.


Profª. Drª. Marne Carvalho de Vasconcellos – Coordenador


Prof. Dr. Igor Rafael dos Santos Magalhães - Orientador e Presidente


Jaila Dias Borges - Membro


Prof. Dr. Márcio Luis Lombardi Martinez - Membro


Jaquelane Silva de Jesus - Mestranda

Ao meu pequeno Lucas, concebido durante a
execução deste trabalho, para que um dia, ao ver esta obra,
ele reflita que não há dificuldade que não possa ser superada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter-me feito acreditar *sempre*, mesmo nos momentos de pouca fé.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas PPGCF/UFAM pela oportunidade de executar este projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Igor Rafael do Santos Magalhães e Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto pela concretização conjunta desta obra, pelos esclarecimentos e aprendizados.

À toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular – LAEBM da Faculdade de Farmácia da UFAM, em especial a Brena de Lourdes Aguiar Lima pelas longas conversas e descontração e a Rita Netto cuja ajuda foi decisiva na reta final desse trabalho.

À Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – FMT/HVD na figura do Dr. Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda pela concessão das amostras biológicas dos pacientes incluídos neste estudo.

À Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM, na figura da Prof. Dr^a Adriana Malheiros por ter cedido o laboratório para que as análises moleculares pudessem ser realizadas. Em especial a Andrea Tarragô por sua ajuda na execução dos experimentos.

À minha amada mãe, Neidjane Cavalcanti da Silva, pelo enorme esforço em cuidar do meu pequeno Lucas durante a redação deste.

Ao meu amado marido, Daniel Wolinger Marcondes, que também deixou parte de seus interesses de lado para cuidar de nosso filho. E pelos momentos de distração indispensáveis para aliviar as tensões resultantes deste trabalho.

À minha família, irmã e pais, que mesmo sem saber a devida importância desta obra para mim, sempre apoiaram e confiaram.

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma colaboraram para a execução deste projeto.

““ Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem “Por quê”? Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo “Por que não”?””

George Bernard Shaw

RESUMO

De elevada prevalência no Brasil, especificamente na Região Amazônica, a malária é uma doença infecto-parasitária com impactos socioeconômicos em áreas endêmicas. O *Plasmodium vivax* é o agente de maior prevalência e tem sido associado a casos graves de malária antes atribuída apenas ao *Plasmodium falciparum*. A variabilidade genética do hospedeiro no metabolismo de fármacos antimaláricos, influenciada pelo polimorfismo de isoformas do citocromo P450 (CYP), poderia levar a alterações significativas na resposta terapêutica antimalárica. Pouco se conhece sobre a influência dos fatores genéticos no aumento da susceptibilidade individual do hospedeiro ao desenvolvimento de formas graves da doença. Portanto este projeto objetivou determinar a frequência dos alelos *CYP2B6*6*, *CYP2C8*3* e *CYP2D6*4* em pacientes com malária vivax, avaliar a relação entre os alelos encontrados e a ocorrência de malária grave e ainda estabelecer o perfil hematológico e bioquímico entre os portadores dos alelos encontrados. Para tanto foram utilizadas amostras de sangue periférico de pacientes com malária vivax atendidos numa unidade de saúde de referência na cidade de Manaus-AM. Dos quais foram extraídos o DNA leucocitário, que por sua vez foram amplificados por PCR em tempo real usando o sistema TaqMan® para a discriminação alélica. As frequências dos alelos *CYP2B6*6*, *CYP2C8*3* e *CYP2D6*4* foram 28,26%, 6,7%, 8,87%, respectivamente. O alelo *CYP2D6*4* foi o mais prevalente entre os pacientes diagnosticados com malária vivax grave, e também foi associado a níveis normais de reticulócitos, eritrócitos e hematócrito. Estudos futuros são necessários para compreender as implicações clínicas dos polimorfismos encontrados em pacientes com malária vivax.

Palavras-chave: Polimorfismo, citocromo P450, malária vivax

ABSTRACT

High prevalence in Brazil, specifically in the Amazon Region, malária is a parasitic infectious disease with socioeconomic impact in endemic areas. *Plasmodium vivax* is the most prevalent agent and has been associated with cases of severe malária before attributed only to *Plasmodium falciparum*. Genetic variability in host metabolism of antimalarial drugs, influenced by the polymorphism of cytochrome P450(CYP), could lead to significant changes in antimalarial treatment response. Little is known about the influence of genetic factors in the increase of the individual susceptibility of the host to development of severe disease. Therefore, this project aimed to determine the frequency of alleles *CYP2B6*6*, *CYP2C8*3* and *CYP2D6*4* in patients with vivax malária, to evaluate the relationship between the alleles found and the occurrence of severe malária and further establish the hematological and biochemical profile among carriers of alleles found. Therefore, we used peripheral blood samples of patients with vivax malária treated at a health care reference in Manaus-AM. Which were extracted leukocyte DNA, which in turn were amplified by real-time PCR using TaqMan ® system for allelic discrimination. The frequencies of the alleles *CYP2B6*6*, *CYP2C8*3* and *CYP2D6*4* were 28.26%, 6.7%, 8.87%, respectively. The *CYP2D6*4* allele was more prevalent among patients diagnosed with severe vivax malária, and was associated with normal levels of reticulocytes, erythrocytes and hematocrit. Future studies are needed to understand the clinical implications of the polymorphisms found in patients with vivax malária.

Keywords: Polymorphism, cytochrome P450, vivax malária

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICO

Figura 1: Representação gráfica de áreas de transmissão da malária no mundo.....	20
Figura 2: Representação gráfica de áreas de transmissão da malária no Brasil.....	21
Figura 3: Número de casos de malária em Manaus por espécies de plasmódio.....	21
Figura 4: Ciclo evolutivo do <i>Plasmodium</i> spp.....	07
Figura 5: Biotransformação (fase I e II) na ativação e inativação de fármacos.....	29
Figura 6: Genes do CYP ativos no genoma humano.....	29
Gráfico1: Uso de fármacos antimaláricos pelos pacientes portadores de malária vivax incluídos na pesquisa.....	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Critérios de diagnóstico para malária grave.....	25
Quadro 2: Características do metabolismo dos principais antimaláricos usados na clínica....	36
Quadro 3: Polimorfismos selecionados nos genes <i>CYP2B6</i> , <i>CYP2C8</i> e <i>CYP2D6</i> e seus respectivos números de identificação.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características sócio-demográficas dos pacientes diagnosticados com malária vivax, por gravidade da doença.....	53
Tabela 2: História clínica dos pacientes diagnosticados com malária vivax, por gravidade da doença.....	53
Tabela 3: Perfil clínico dos pacientes diagnosticados com malária vivax.....	56
Tabela 4: Parasitemia e perfis hematológico e bioquímico dos pacientes diagnosticados com malária vivax.....	57
Tabela 5: Frequências alélicas de <i>CYP2B6*6</i> , <i>CYP2C8*3</i> e <i>CYP2D6*4</i> em pacientes diagnosticados com malária vivax e em outras populações.....	63
Tabela 6: Frequência genotípica e alélica de <i>CYP2B6*6</i> , <i>CYP2C8*3</i> e <i>CYP2D6*4</i> em pacientes diagnosticados com malária vivax grave e não grave.....	65
Tabela 7 – Frequência genotípica dos alelos <i>CYP2B6*6</i> , <i>CYP2D6*4</i> entre os eventos clínicos e o gênero dos pacientes portadores de malária vivax.....	67
Tabela 8 – Frequência genotípica dos alelos <i>CYP2B6*6</i> , <i>CYP2C8*3</i> e <i>CYP2D6*4</i> entre os parâmetros hematológicos e o gênero dos pacientes portadores de malária vivax.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES – Anti-inflamatórios não-esteroidais

Bp – Pares de base

CAR – Receptor constitutivo de aldosterona

CDC- EUA – Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos

CYP - Citocromo P450

C/EBP α – CCAAT /potencializador de ligação de proteína alfa

G6PD – Glicose 6-fosfato desidrogenase

GR – Receptor de glicocorticóide

HnRNA - Ácido ribonucleico heterogêneo nuclear

HNF4 α – Fator nuclear de hepatócito 4alfa

HNF3 γ – Fator nuclear de hepatócito 3gama

5-HPQ – 5-hidroxiprimaquina (metabólito da primaquina)

Locigênico – Local fixo no cromossomo onde está localizado o gene ou marcador genético

MAQ-NOH – 6-metoxi-8-hidroxi-aminoquinolona (metabólito da primaquina)

FMT-HVD – Fundação de Medicina Tropical - Dr. Heitor Vieira Dourado

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NADPH – Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato

NCBI – Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia

pré-mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro imaturo

OMS / WHO – Organização Mundial de Saúde

P.ex.- Por exemplo

Pb – Pares de base

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

PXR –Receptor de progesterona

ROIs – Intermediários reativos de oxigênio

RORs – Receptor de ácido retinóico

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

VDR – Receptor de vitamina D

Xenobiótico – Qualquer agente estranho ao sistema biológico

Xg – Força de centrifugação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1 Malária	19
2.1.1 Aspectos gerais.....	19
2.1.2 Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> spp.....	21
2.1.3 Manifestações clínicas e patogênese da malária.....	23
2.1.3.1 Malária não grave e grave.....	23
2.1.3.2 Malária grave por <i>Plasmodium vivax</i>	25
2.2 Tratamento da malária	26
2.3 Metabolismo de fármacos	27
2.3.1 Citocromo P450.....	28
2.3.2 Polimorfismos genéticos envolvendo citocromo P450 e metabolismo de fármacos.....	30
2.4 Metabolismo de antimaláricos: papel do CYP e a influência de isoformas polimórficas na farmacocinética e resposta terapêutica	32
2.5 Farmacogenética das principais isoformas do CYP envolvidas no metabolismo de fármacos antimaláricos	36
2.5.1 CYP2B6.....	36
2.5.2 CYP2C8.....	38
2.5.3 CYP2D6.....	40
2.6 Papel do CYP na patogênese e evolução clínica de doenças: Um breve esboço	42
3. OBJETIVOS	44
3.1 Geral.....	44
3.2 Específicos.....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Casuística	45
4.1.1 Modelo do estudo.....	45

4.1.2 Local de estudo.....	45
4.1.3 População de estudo.....	45
4.1.4 Aspectos éticos.....	46
4.1.5 Amostra clínica.....	47
4.1.6 Critérios de inclusão e exclusão.....	47
4.2 Delineamento experimental.....	48
4.2.1 Análise molecular.....	48
4.2.1.1 Extração do DNA genômico.....	48
4.2.1.2 Amplificação e identificação dos polimorfismos.....	48
4.3 Análises estatísticas.....	49
4.3.1 Distribuição das Variáveis.....	50
4.3.2 Análise das Variáveis Qualitativas ou Categóricas.....	51
4.3.2 Análise das Variáveis Quantitativas ou não-categóricas.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 Caracterização dos pacientes.....	51
5.2 Caracterização clínica e laboratorial.....	53
5.3 Caracterização molecular.....	59
5.3.1 Frequências alélicas.....	59
5.3.2 Associações entre os polimorfismos estudados, as manifestações clínicas e os exames laboratoriais.....	65
5.4 Limitações e perspectivas.....	70
6.CONCLUSÕES.....	71
7.REFERÊNCIAS.....	72
7.1 Bibliografias consultadas.....	93
8. ANEXOS.....	94
8.1 Anexo 1 Documento de Aprovação do Projeto.....	94
8.2 Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para pacientes com malária vivax.....	97
8.3 Anexo 3 – Delineamento experimental.....	99

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecto-parasitária que afeta a saúde de diferentes populações distribuídas em áreas endêmicas ao redor do mundo (WESTENBERGER *et al.*, 2010). O Brasil concentra a maioria dos casos notificados da doença na América Latina e o agente de maior prevalência é o *Plasmodium vivax* (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; WHO, 2011a).

No passado a malária vivax foi considerada uma doença benigna e auto-limitada, entretanto estudos têm demonstrado a importância desta espécie no desenvolvimento de formas graves da doença, antes atribuída apenas ao *P. falciparum* em diferentes partes do mundo, inclusive com óbitos (KOCHAR *et al.*, 2005; LOMAR *et al.*, 2005; ALECRIM *et al.*, 2000; WELLS *et al.*, 2009; ALEXANDRE *et al.*, 2010; WHITE, 2011).

Segundo critérios da Organização Mundial de Saúde – OMS (2010), a malária grave é definida como uma infecção com complicações potencialmente fatais ao homem. Entre as principais manifestações clínicas descritas na literatura para malária grave por *P. vivax* podemos citar: anemia grave, trombocitopenia, síndrome da angústia respiratória, síndrome neurológica, insuficiência renal, edema pulmonar, ruptura de baço, icterícia, acidose metabólica e hipoglicemia. (KIRCHGATTER & PORTILLO, 2005; ALEXANDRE *et al.*, 2010, COSTA *et al.*, 2011; LACERDA *et al.*, 2012).

É amplo o conhecimento e publicações sobre os tipos de manifestações clínicas que vem sendo comumente observadas na malária grave vivax. Entretanto, comparativamente, pouco se conhece sobre os mecanismos fisiopatogênicos envolvidos na malária grave por *P. vivax*, bem como a influência dos fatores genéticos no aumento da susceptibilidade individual do hospedeiro ao desenvolvimento de formas graves da doença.

A terapia antimalárica adequada é empregada a fim de se evitar a progressão clínica da infecção. De acordo com Mehlotra *et al.* (2010), a resposta ao tratamento antimalárico pode ser monitorada pela concentração plasmática do fármaco ou metabólito ativo. Estes autores consideram ainda que a variabilidade genética do hospedeiro no metabolismo de fármacos antimaláricos pode gerar concentrações plasmáticas inadequadas, contribuindo para ineficácia devido a níveis subterapêuticos ou mesmo pela seleção de parasitas resistentes.

O metabolismo é uma etapa farmacocinética extremamente importante para que o fármaco alcance concentrações plasmáticas adequadas no seu sítio de ação (WALKER & EDWARDS, 1994). Há uma grande variedade interindividual no perfil farmacocinético de muitos agentes antimaláricos que pode resultar em alteração na concentração plasmática do fármaco (KERB *et al.*, 2009). As enzimas do citocromo P450 (CYP) são as principais responsáveis pelo metabolismo de antimaláricos no organismo (GUSMÁN & CARMONA-FONSECA, 2006). Essas enzimas são altamente polimórficas, polimorfismos de forma isolada ou associada a outros fatores podem contribuir para a variabilidade na resposta terapêutica (cura, recaída ou resistência) ou na toxicidade frequentemente relatada com o uso de antimaláricos (TOMALIK-SCHARTE *et al.*, 2008; KERB *et al.*, 2009).

Polimorfismos dos genes de isoformas do CYP têm sido frequentemente relatados na literatura associados a alterações no perfil metabólico de isoformas para vários fármacos, incluindo antimaláricos (PARIKH *et al.*, 2007; TIONG *et al.*, 2010; HONDA *et al.*, 2011; DESTA *et al.*, 2012; HARMSZE *et al.*, 2012; YOSUF & HUA, 2012). Estudos que descrevam a prevalência de polimorfismos em áreas endêmicas da malária ou relacionem a resposta terapêutica antimalárica e características fenotípicas e genotípicas do CYP são escassos. E, ainda, não há descrições na literatura a respeito dos polimorfismos nos genes do CYP e uma possível associação com a gravidade da infecção por *P. vivax*.

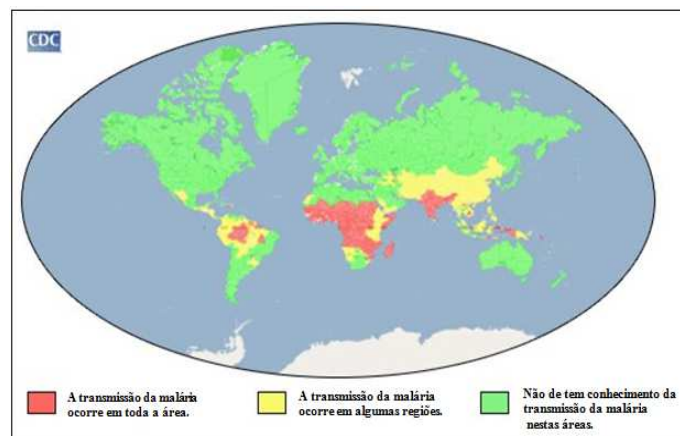
Estudos dessa natureza poderiam contribuir para caracterização genotípica de indivíduos de áreas endêmicas da malária quanto ao CYP450, bem como para o entendimento de fatores determinantes da malária grave, em função de alterações metabólicas, e ainda possibilitar a descoberta de possíveis marcadores moleculares de risco para o desenvolvimento de formas clínicas graves da malária vivax.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Malária

2.1.1 Aspectos gerais

A malária é considerada um importante problema de saúde pública com impactos na economia e na sociedade de países onde a doença é endêmica (WESTENBERGER *et al.*, 2010, **Figura 1**).



Figuras 1 - Representação gráfica de áreas de transmissão da malária no mundo. Adaptado de CDC-EUA, 2010c.

Trata-se de uma doença infecciosa que pode ser ocasionada no homem por quatro espécies do protozoário *Plasmodium* spp. (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. maláriae*). A transmissão ocorre através da picada do mosquito fêmea de mais de 30 espécies de *Anopheles* (ALONSO *et al.*, 2011). *P. falciparum* é a espécie responsável pela maioria dos casos de morte por malária, sobretudo na África Subsaariana, entretanto *P. vivax* é a mais difundida geograficamente, em particular no sul e sudeste da Ásia, América Central e América do Sul, respondendo por mais de 40% dos casos de malária no mundo. No Brasil, esta espécie é

responsável por aproximadamente 84% dos casos registrados (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; WESTENBERGER *et al.*, 2010).

Em 2010, cerca de 216 milhões de casos de malária foram notificados, com estimativas de 655.000 mortes, principalmente em crianças africanas (WHO, 2011a).

O Brasil responde por quase metade dos casos de malária na América Latina. Em 2010 foram notificados 334.618 casos de malária no país (WHO, 2011a). A região amazônica, constituída pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, é responsável por mais de 99% dos casos notificados no Brasil, sendo registrado no estado do Pará o maior número de casos (34%) (BRASIL, 2013; **Figura 2**). No Amazonas foram notificados 59.431 casos em 2011 (BRASIL, 2013). Em Manaus, ano de 2012, foram registrados pela Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) 3.434 casos de malária dos quais 95,8% foram causados pela espécie *P. vivax* (VIGIWEB/FMT-HDV, 2013; **Figura 3**).

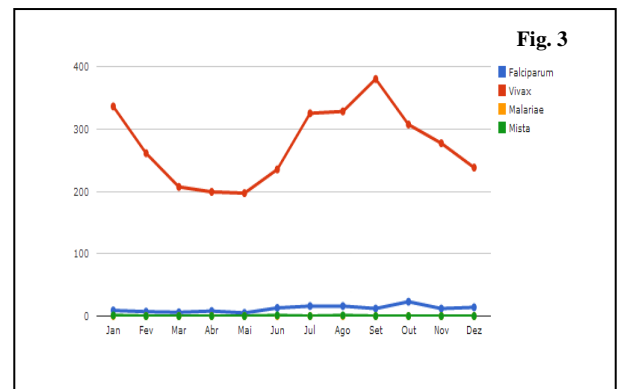
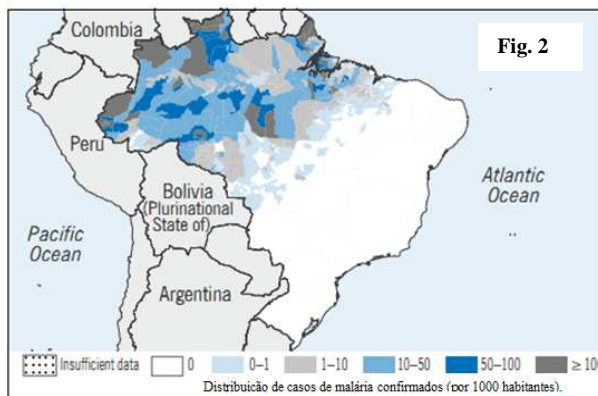


Figura 2 e 3- Representação gráfica de áreas de transmissão da malária no Brasil e número de casos de malária em Manaus por espécies de plasmódios registrados pela FMT-HVD (2012), respectivamente. Fonte: WHO (2011a) e VIGIWEB/FMT-HDV, 2013.

Esses dados revelam que o *P. vivax* tem se tornado espécie dominante em áreas endêmicas da malária. Entre as razões que justificam essa alta prevalência é a maior disponibilidade do diagnóstico molecular para distinguir as infecções causadas por essa

espécie daquelas ocasionadas pelo *P. falciparum* e mistas, e ainda a dificuldade em controlar a doença causada por esse agente (produção precoce de gametócitos e presença de hipnozoítos), além da corrente resistência a cloroquina e a falta de eficácia da primaquina, medicamento de primeira linha para a prevenção de recaídas da doença (COSTA *et al.*, 2012).

Por muito tempo a malária por *P. vivax* foi considerada erroneamente benigna, entretanto estudos recentes revelam que esse agente provoca uma resposta inflamatória no hospedeiro mais intensa quando comparado a equivalente parasitemia de *P.falciparum*. (WELLS *et al.*, 2009; WHITE, 2011).

2.1.2 Ciclo biológico do *Plasmodium spp.*

O parasita da malária apresenta um complexo ciclo biológico que envolve o inseto vetor e o hospedeiro vertebrado (**Figura 4**). Todas as espécies do parasita apresentam ciclo biológico semelhante (WISER, 1990).

A infecção se inicia quando esporozoítos são injetados com a saliva do mosquito infectado, os quais são carregados pela circulação sistêmica para o fígado onde ocorre a invasão dos hepatócitos. Nas células hepáticas os parasitas se reproduzem assexuadamente em um processo conhecido como esquizogonia tecidual (fase pré-eritrocítica). O desenvolvimento do parasito nos hepatócitos requer aproximadamente uma semana para o *P. falciparum* e *P. vivax* e cerca de duas semanas para o *P. malariae*. A esquizogonia tecidual culmina na produção de merozoítos que são liberados na corrente sanguínea e invadem os eritrócitos iniciando a segunda fase do ciclo (fase eritrocitária). Nesta fase, novamente se multiplicam de forma assexuada (trofozoítos), ocorrendo dentro de 48 horas nas infecções por

P. vivax e *P. falciparum* e 72 horas nas infecções por *P. malariae*, quando, então aparecem os sintomas da malária (NEVES *et al.*, 2009).

Nas infecções por *P. vivax* alguns parasitos se desenvolvem rapidamente, enquanto outros podem ficar em estado de latência no hepatócito, sendo por isso, denominados hipnozoítos. Estas formas podem levar semanas, meses ou mesmo anos para se reativarem depois da infecção primária e são responsáveis pela recaída (WISER, 1990). Essa espécie tem preferência por reticulócitos e podem durante a infecção, apresentar gametócitos no sangue periférico antes mesmo do aparecimento das manifestações clínicas, dificultando o controle da doença (COSTA *et al.*, 2011).

Depois de várias gerações, alguns parasitas se diferenciam sexualmente dando origem às formas gametocíticas que não se dividem e, uma vez ingeridos pelos insetos vetores irão fecundar-se para dar origem ao ciclo sexuado do parasito dentro do trato gastrointestinal do mosquito. Mais tarde, após passar por várias etapas evolutivas que formarão os esporozoítos, os parasitas

migrarão até as glândulas salivares, de onde serão transferidos para o sangue do hospedeiro humano durante o repasto sanguíneo, dando início a um novo ciclo (NEVES *et al.*, 2009).

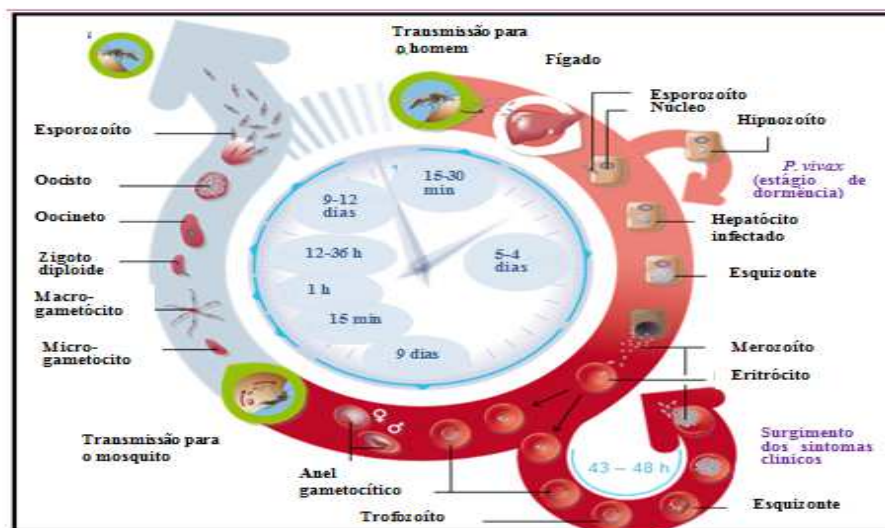


Figura 4 – Ciclo evolutivo do *Plasmodium* spp. Adaptado de MMV (2012).

2.1.3 Manifestações clínicas e patogênese da malária

No hospedeiro humano, a infecção pelo *Plasmodium* spp. geralmente pode manifestar-se de forma assintomática, não grave e grave. Os mecanismos fisiopatogênicos não estão totalmente elucidados. Sabe-se, entretanto, que a susceptibilidade às infecções é determinada por uma complexa interação entre os fatores do hospedeiro, do parasita e do meio ambiente. Entre os fatores do hospedeiro estão incluídos a idade, sexo, etnia, imunidade, presença de comorbidades crônicas, co-infecções e vários polimorfismos genéticos (LACERDA, 2007; ANDRADE E BARRAL-NETO, 2011).

2.1.3.1 Malária não grave e grave

Os sinais e sintomas da malária (febre, cefaléia, calor, calafrios, sudorese, astenia) não são específicos e se assemelham a infecções virais sistêmicas. A suspeita clínica de malária tem por base principalmente a febre ou a história de febre relatada pelo paciente (WHO, 2010a).

A síndrome febril aguda que caracteriza a malária não grave forma mais comum da doença, é justificada pela ruptura das hemácias pelos esquizontes e pela síntese e liberação de citocinas (IL-6, IL-10), TNF, linfócitos T e monócitos ativados (KARUNAWEERA *et al.*, 2003; NEVES *et al.*, 2009).

A malária grave, classicamente encontrada na África subsaariana, é responsável pelo maior número de casos de mortes da doença e o *P. falciparum* tem sido, tradicionalmente, implicado nesses casos (LACERDA, 2007). Entretanto, casos esporádicos de malária *vivax*

grave, inclusive com óbitos, têm sido relatados por diversos estudos (KOCHAR *et al.*, 2005; LOMAR *et al.*, 2005, ALECRIM *et al.*, 2000; ALEXANDRE *et al.*, 2010).

Entre os fatores implicados na patogênese da malária grave por ambas as espécies incluem-se o descontrole na produção de citocinas, hemólise intensa e supressão da eritropoiese (ANDRADE E BARRAL-NETO, 2011). Os critérios para classificação de malária grave foram estabelecidos a partir de infecções causadas por *P. falciparum* sendo reconhecida por alguns sinais e sintomas clínicos e resultados de exames laboratoriais. O diagnóstico de malária grave é estabelecido quando o paciente apresenta pelo menos uma destas complicações (WHO, 2010a, **Quadro 1**). Uma classificação de malária grave por *P. vivax* foi proposta por Alecrim (2000), na qual o autor considerou além dos critérios já estabelecidos para *P. falciparum* que também fosse avaliado ruptura esplênica e plaquetopenia abaixo de 50.000 plaquetas/uL.

Critérios para Malária Grave segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)	
Clínicos	Laboratoriais
Alterações da consciência ou coma	Hipoglicemia (glicose sanguínea < 40 mg/dl)
Prostração (fraqueza generalizada)	Acidose metabólica (bicarbonato plasmático <15 mmol/l)
Convulsões múltiplas (mais de dois episódios em 24 h)	Anemia normocítica grave (Hb <5 g/dl, hematócrito <15%)
Dificuldade respiratória	
Colapso circulatório ou Choque (pressão arterial sistólica <70 mm Hg em adultos e <50 mmHg em crianças)	Hiperparasitemia (>2% /100 000/μl em áreas de baixa intensidade de transmissão ou > 5% / 250000/μl em áreas de intensidade transmissão estável ou elevada de malária)
Icterícia clínica associada à evidência de disfunção de outros órgãos vitais	Hiperlactatemia (lactato > 5 mmol/l)
Hemoglobinúria	Insuficiência renal (Creatinina sérica > 265 mmol /l)
Sangramento Espontâneo	
Edema Pulmonar (com evidência radiológica)	

Quadro 1 – Critérios de diagnóstico para malária grave. Adaptado de WHO, 2010a.

2.1.3.2 Malária grave por *P. vivax*

Estudos realizados em diferentes partes do mundo têm relatado o envolvimento do *P. vivax* em casos graves de malária (KOCHAR *et al.*, 2005; POESPOPRODJO *et al.*, 2009; ALEXANDRE *et al.*, 2010; SARAVU *et al.*, 2011)

As complicações mais comumente observadas decorrentes da infecção na malária grave observadas em infecções por *P. falciparum* e mais recentemente também por *P. vivax* são: anemia grave, trombocitopenia, síndrome da angústia respiratória, síndrome neurológica, insuficiência renal, edema pulmonar, ruptura de baço, icterícia, acidose metabólica e hipoglicemia, além de frequentes comorbidades agudas e crônicas com mortes ocasionais (KIRCHGATTER & PORTILLO, 2005; ALEXANDRE *et al.*, 2010, COSTA *et al.*, 2011; LACERDA *et al.*, 2012).

A anemia grave é uma das principais manifestações descritas, especialmente em indivíduos com deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) (ANDRADE *et al.*, 2010). Esta complicação ocorre geralmente em resposta ao estresse oxidativo gerado por fármacos (p.ex. primaquina, cloroquina), ingestão de certos alimentos (p.ex. fava), infecções (p.ex. plasmódio), algumas doenças sistêmicas e estados patológicos (p.ex. acidose diabética) (OLIVEIRA, 2007). De acordo com a OMS é considerada anemia grave quando os níveis de hemoglobina estão menores que 5g/dL em crianças e abaixo de 7g/dL em adultos. A primaquina, único fármaco disponível para a eliminação dos hipnozoítos do *P. vivax*, é o principal antimalárico precipitante de crises hemolíticas (SILVA *et al.*, 2004; KRUDSOOD *et al.*, 2006; ALEXANDRE *et al.*, 2010; RAMOS JÚNIOR *et al.*, 2010; SHEKALAGHE *et al.*, 2010). A hemotoxicidade conferida por seus metabólitos (6-metoxi-8-hidroxilaminoquinolina e 5-hidroxiaminoprimaquina) bem como a participação do CYP

devido à formação de tais compostos tem sido relatada em diferentes estudos (BOLCHOZ *et al.*, 2001; BOWMAN *et al.*, 2005; MCMILLAN *et al.*, 2005; GANESAN *et al.*, 2009; 2012).

A malária por *P. vivax* também pode apresentar manifestações clínicas atípicas. Um estudo realizado por Mohapatra *et al.* (2002) envolvendo 110 pacientes com malária vivax revelaram ausência de paroxismos, cefaléia migranosa, mialgia, episódios de erupção cutânea urticariforme, bradicardia relativa e hipotensão postural.

2.2 Tratamento da malária

Os fármacos antimaláricos atuam sobre formas evolutivas específicas do *Plasmodium* spp. durante a infecção no homem. Os esquizotocidas sanguíneos (p.ex. cloroquina, quinina, mefloquina e derivados de artemisinina) atuam sobre os estágios assexuados do parasito, responsáveis pela patogenia e manifestações clínicas da doença. Já os esquizotocidas teciduais (única droga disponível na prática clínica é a primaquina) promovem a destruição das formas latentes ao atuarem sobre os hipnozoítas hepáticos das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, evitando assim as recaídas tardias. Há ainda os gametocitocidas que impedem o desenvolvimento das formas sexuadas (p.ex. cloroquina e primaquina) interrompendo dessa forma a transmissão do parasita. (BRASIL, 2010; WHO, 2010a)

Os principais objetivos do tratamento medicamentoso com antimaláricos é proporcionar a cura, diminuir a parasitemia e conseqüentemente a transmissão, bem como minimizar a resistência (WHO, 2010a).

As orientações sobre indicação e uso de antimaláricos preconizados no Brasil levam em consideração fatores como idade, peso, espécie do plasmódio infectante, comorbidades associadas, gravidade da doença, entre outros (BRASIL, 2010).

A resistência a antimaláricos surgiu no século XX, sendo mais evidente no *P. falciparum*. A OMS refere-se à resistência quando há falha terapêutica após a administração de uma dose padrão de antimalárico (WHO, 2006). Entretanto, apesar de a resistência a fármaco ser o principal fator responsável pela falha terapêutica, sabe-se que outros fatores como a falta de adesão do paciente, dosagem e duração de tratamento inadequado, estado de saúde e nutricional ou interações com outros fármacos podem levar a falha terapêutica sem que haja resistência de fato (KERB *et al.*, 2009; WHO, 2010b).

A introdução dos derivados de artemisinina no arsenal terapêutico contra a malária trouxe perspectivas otimistas sobre o controle e erradicação da malária. Em 2006, a OMS definiu o uso de derivados de artemisinina em combinação com outro fármaco antimalárico como primeira linha para o tratamento da malária não complicada por *P. falciparum* (WHO, 2006). Entretanto, a resistência a medicamentos antimaláricos tem sido documentada para todas as classes de antimaláricos incluindo os derivados de artemisinina (WHO, 2010a).

Dentre as causas para a falha terapêutica e recidiva da infecção malárica, podem-se citar as baixas concentrações plasmáticas alcançadas pelo fármaco, como no caso da cloroquina. Por outro lado, a formação de metabólitos reativos gerados pelo CYP pode ocasionar toxicidade diferencial de acordo com o polimorfismo destes genes, especialmente pela primaquina (KERB *et al.*, 2009).

2.3 Metabolismo de fármacos

A escolha correta e racional de uma terapia medicamentosa é base fundamental para o sucesso terapêutico. Ao se implementar um tratamento deve ser considerado as características fisiopatológicas do indivíduo, tais como sexo, idade, peso corporal e também a etnia do indivíduo (FUCHS & WANNMACHER, 1998).

A obtenção do efeito terapêutico ou tóxico depende da concentração do fármaco em seu sítio de ação, garantindo que o fármaco atinja, em concentrações adequadas, o órgão ou sistema suscetível ao efeito ideal e necessário requerido (WALKER & EDWARDS, 1994).

Além da escolha da dose que garanta a manutenção das concentrações terapêuticas aos sítios de ação no organismo, deve-se verificar se a quantidade presente no sítio receptor é adequada, pois o fármaco poderá ser ineficaz mesmo sendo o indicado, falseando, dessa forma, a eficácia do fármaco escolhido. Situações como essa, podem descartar erroneamente, o correto efeito terapêutico alcançado se a dose e/ou o intervalo de administração desejados fossem prescritos (ROWLAND & TOZER, 1995).

O metabolismo no organismo é o fator determinante na resposta terapêutica de qualquer medicamento, levando a formação de compostos mais ativos que o fármaco original ou compostos com pouca ou nenhuma atividade (GUSMÁN & CARMONA-FONSECA, 2006), e a possível formação de compostos tóxicos, contribuindo para desenvolvimento de eventos adversos.

2.3.1 Citocromo P450

As enzimas do CYP são pertencentes às enzimas microsossomais e são responsáveis pela oxidação e redução de fármacos, catalisando uma variedade de reações redutoras e oxidantes e abrange um grupo de substratos quimicamente diferentes (GILLIES *et al.*, 1989).

O metabolismo de xenobióticos ocorre basicamente em duas etapas: as reações de fase I (oxidação, redução ou hidrólise) catalisadas principalmente pelo sistema das monooxigenases dependentes do CYP e as reações de fase II (conjugação) predominantemente realizadas pelas enzimas do sistema UGT (uridina-difosfato-glucoronil transferase) (ORLLANA & GUAJARDO, 2004).

Comumente, em ambas as fases, ocorrem o aumento da hidrofiliidade de alguns compostos, o que pode facilitar sua excreção e/ou perda da atividade farmacológica e do potencial tóxico. Entretanto, em alguns casos, a biotransformação converte certos xenobióticos originalmente pouco reativos em produtos mais reativos com maior potencial de ligação a macromoléculas celulares e, portanto, mais tóxicos (PARKINSON, 2001, **Figura 5**).

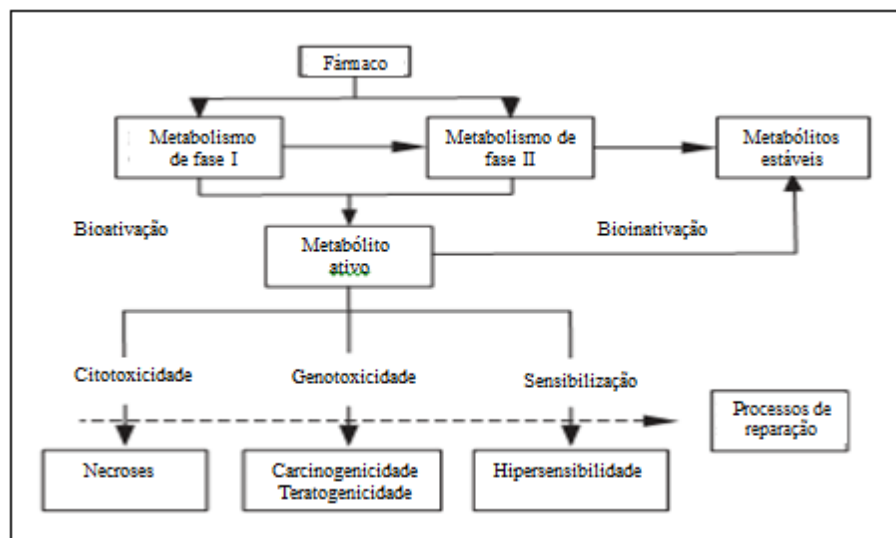


Figura 5– O metabolismo (fase I e II) na ativação e inativação de fármacos. Adaptado de Pirmohamed *et al.* (1996).

Até o momento são conhecidas 27 famílias do CYP humana, com apenas três envolvidas no processo de biotransformação de fármacos (CYP1, CYP2 e CYP3), respondendo com aproximadamente 75% de toda a fase I do metabolismo de fármacos (JOHANSSON & INGELMAN-SUNDBERG, 2011; HANC CYP, 2013, **Figura 6**).

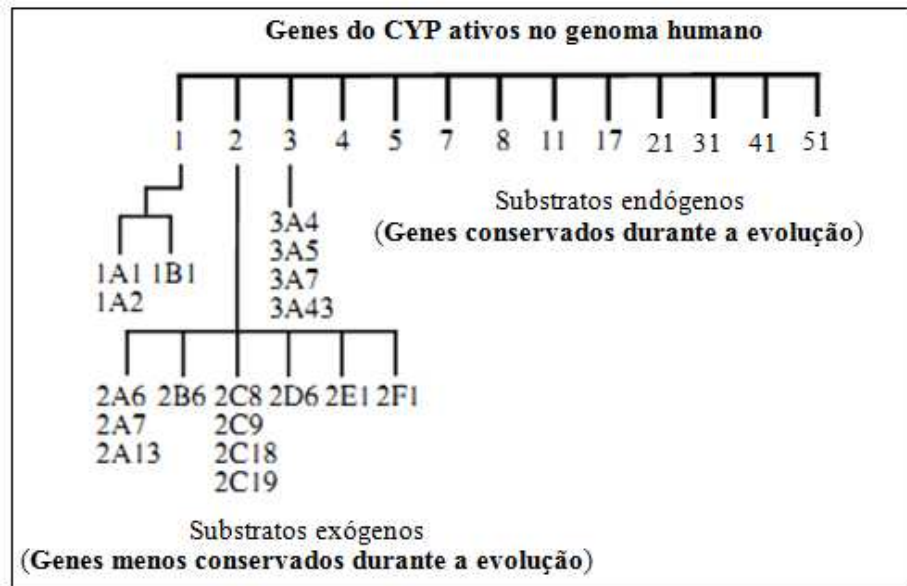


Figura 6– Genes do CYP ativos no genoma humano . Adaptado de Ingelman-Sundberg & Rodriguez-Antona (2005).

2.3.2 Polimorfismos genéticos envolvendo citocromo P450 e metabolismo de fármacos

A resposta a fármacos é influenciada por múltiplos fatores. A capacidade de metabolização apresenta variabilidades intra e interindividual, com a intraindividual envolvendo fatores ambientais, enquanto a interindividual fatores genéticos e ou ambientais. Os fatores genéticos são importantes já que estes podem modificar a estrutura e função das enzimas metabolizadoras de fármacos (WENNERHOLM, 2003).

Apesar dos primeiros estudos relacionando polimorfismos genéticos de enzimas metabolizadoras em humanos terem iniciado nos anos 50, Garrod, em 1902, já havia sugerido que o componente genético estivesse envolvido nas diferenças interindividuais e surgimento de reações adversas por deficiência enzimática.

Bonicke & Reif (1953) foram os pioneiros ao observarem diferenças interindividuais e o surgimento de reações adversas, e que tais manifestações estariam associadas à eliminação lenta do fármaco. Posteriormente, Mitchell *et al.* (1958) propuseram que as variações na inativação de fármacos poderiam estar ligadas ao controle genético.

Estudos envolvendo especificamente polimorfismos das enzimas do CYP foram publicados na década de 70 (EICHELBAUM *et al.*, 1975; GOEDDE *et al.*, 1978) A fenotipagem de indivíduos tratados com os fármacos debrisoquina e esparteína resultou no maior conhecimento da ampla variabilidade interindividual nas concentrações plasmáticas dos fármacos acompanhada de eventos adversos relativos a essas concentrações. Tais manifestações foram justificadas pela presença de alelos mutantes no *loci* gênico CYP2D6, as quais não permitiam a síntese da enzima CYP2D6, responsáveis pelo metabolismo de diversos compostos endógenos e xenobióticos (KAGIMOTO *et al.*, 1990; LARES-ASSEF & TRUJILLO-JIMÉNEZ, 2001).

Estes estudos possibilitaram que mais tarde fosse criado um sistema de classificação baseado nas diferenças fenotípicas individuais quanto ao perfil metabólico de determinada enzima do CYP (INGELMAN-SUNDBERG, 2004): os metabolizadores lentos (ML), portadores de dois alelos mutantes ou da deleção dos genes e, portanto, sem atividade enzimática; metabolizadores intermediários (MI) com apenas um dos alelos mutante; metabolizadores rápidos (MR) com os dois alelos funcionais e ainda, os metabolizadores ultrarrápidos (MU), que carregam mais de duas cópias ativas do gene.

Neste sentido, supõe-se que indivíduos ML apresentam elevado risco de sofrerem reações tóxicas mesmo em doses terapêuticas, já que estes apresentam uma menor taxa de metabolismo e, portanto, deficiência na detoxificação do fármaco pelo organismo. Enquanto que indivíduos portadores dos fenótipos MR e MU apresentam risco de ineficácia terapêutica, sendo necessárias doses maiores que as usuais para atingirem o efeito terapêutico desejado ou

apresentam risco aumentando de sofrerem reações tóxicas em caso de terapia com fármacos de janela terapêutica estreita (AUDI & PUSSI, 2000).

Diversos fatores genéticos podem alterar a atividade ou expressão das enzimas do CYP. A duplicação gênica pode levar a superexpressão enzimática, já alterações quantitativas e ou qualitativas no gene como deleção, mutações pontuais, *splicing* incorreto do RNA, podem levar a síntese de uma enzima com menor, maior ou sem nenhuma atividade funcional. Fatores relacionados ao ambiente ou a exposição a um xenobiótico também podem diminuir ou mesmo inibir a síntese e a atividade das enzimas do CYP (INGELMAN-SUNDBERG, 2001).

No genoma humano existem 115 genes que codificam as enzimas do CYP, com apenas 57 destes funcionais (JOHANSSON & INGELMAN-SUNDBERG, 2011; HANC CYP, 2013). A família CYP1 inclui 3 subfamílias codificadas por 3 genes e 1 pseudogene. Já CYP2 inclui 13 subfamílias codificadas por 16 genes e 16 pseudogenes, enquanto CYP3 inclui 1 subfamília codificadas por 4 genes e 2 pseudogene (NELSON *et al.*, 1996).

2.4 Metabolismo de antimaláricos: papel do CYP e a influência de isoformas polimórficas na farmacocinética e na resposta terapêutica

Várias enzimas do CYP participam do metabolismo de fármacos antimaláricos (GUSMÁN & CARMONA-FONSECA, 2006). Dentre os principais antimaláricos utilizados atualmente, podemos citar: cloroquina - CQ (CYP2C8, CYP3A4, CYP2D6) (PROJEAN *et al.*, 2003); primaquina - PQ (CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6, CYP3A4) (LI *et al.*, 2003; GANESAN *et al.*, 2009); mefloquina - MQ (CYP3A4) (Li *et al.*, 2003); arteméter - AM (CYP2B6, CYP3A4) (HONDA *et al.*, 2011); artesunato - AS (CYP2A6) (YUSOF & HUA,

2012) e amodiaquina - AQ (CYP2C8) (HONDA *et al.*, 2011). No **Quadro 2** estão listadas algumas características do metabolismo dos principais antimaláricos usados na clínica.

Há uma grande variabilidade interindividual no perfil farmacocinético de muitos fármacos antimaláricos que pode resultar em alteração na concentração plasmática do fármaco (KERB *et al.*, 2009). As enzimas do CYP são altamente polimórficas e esses polimorfismos de forma isolada ou associada a outros fatores podem contribuir para a variabilidade na resposta terapêutica (cura, recaída ou resistência) ou na toxicidade frequentemente relatada com o uso de antimaláricos. (TOMALIK-SCHARTE *et al.*, 2008).

As variações na atividade de uma ou de várias enzimas do complexo CYP, podem fazer com que o fármaco não seja convertido para a forma ativa ou que este processo ocorra tão lentamente que haja redução na concentração do metabólito antimalárico necessária para eliminar o parasita. Pode ocorrer também que a conversão seja tão rápida que conduza a rápida eliminação, e, ainda poderia levar a acumulação de alguns derivados tóxicos que provoquem reações adversas (GUSMÁN & CARMONA-FONSECA, 2006). Ganesan *et al.* (2009) ao estudarem a relação entre as isoformas do CYP e a ocorrência de efeitos adversos demonstraram que múltiplas isoformas contribuíram para a ocorrência de hemotoxicidade da primaquina em eritrócitos humanos *in vitro*.

Hellgren *et al.* (1994) compararam as variações nas concentrações plasmáticas da cloroquina (CQ) e de seu metabólito desetilcloroquina (DCQ) com a parasitemia em escolares diagnosticados com malária na Tanzânia. A concentração da CQ e DCQ variaram, respectivamente, entre 6-950 nmol/L e 10-299 nmol/L. Os autores verificaram também que apenas 9% das crianças apresentaram níveis plasmáticos de CQ acima da concentração mínima inibitória que é de 100 nmol/L, e que nestes pacientes o número de trofozoítos de falciparum foi significativamente menor se comparados ao grupo que apresentou níveis de CQ abaixo de 100 nmol/L.

Diferenças regionais na resposta terapêutica a primaquina na malária vivax têm sido relatada por diferentes estudos. Esses sugerem que dose ou concentrações subterapêuticas sejam fatores de risco para falha terapêutica com primaquina (DUARTE *et al.*, 2001; GOLLER *et al.*, 2007).

Estudos que descrevam a prevalência de polimorfismos em áreas endêmicas da malária ou mesmo que relacionem eficácia terapêutica antimalárica às características fenotípicas e genotípicas do CYP são escassos. Estudos realizados em pacientes com malária classificaram alguns indivíduos como ML quando portadores de determinados polimorfismos nas isoformas CYP2C8 e CYP2C19, responsáveis, pelo metabolismo dos fármacos amodiaquina e proguanil, respectivamente (MBERU *et al.*, 1995; KANEKO *et al.*, 1999; CAVACO *et al.*, 2005, PARIKH *et al.*, 2007). Mais recentemente, Honda *et al.* (2011) relataram a participação de diferentes alelos do *CYP2B6* envolvidos na desmetilação do artesunato. Entretanto, faz-se necessário a realização de outros estudos para que haja uma melhor compreensão do significado clínico da influência de polimorfismos nessas enzimas na eficácia terapêutica de fármacos antimaláricos.

Fármacos	Estrutura química	Principais metabólitos	Vias	Principais isoformas do CYP envolvidas	Principais efeitos adversos ¹
Amodiaquina	4-aminoquinolina ³	Ativos: N-Desetilamodiaquina. Outros menos ativos: 2-hidroxiclindamicina, N-bisdesetilamodiaquina, etc ³	Eliminação da cadeia lateral e outras vias de N-oxidação ³	CYP2C8 ³	Hepatotoxicidade, agranulocitose
Arteméter	Peróxido de lactona sesquiterpênica ³	Ativo: Diidroartemisinina ³	Desmetilação ³	CYP2B6; CYP3A4//3A5 ³	TGI (náusea, dor abdominais, anorexia), teratogenicidade
Artesunato	Peróxido de lactona sesquiterpênica ⁵	Ativo: Diidroartemisinina ⁵	Desmetilação ⁵	CYP2A6; CYP2B6 ⁵	TGI (náusea, dor abdominais, anorexia), teratogenicidade
Clindamicina	Lincosaminas ⁸	Ativo: Sufóxido de clindamicina. Outros menos ativos: N-desmetilclindamicina ⁸	S-oxidação ⁸	CYP3A4 ⁸	TGI (náusea, dor abdominais, anorexia, colite pseudomembranosa), leucopenia, eosinofilia, reações de hipersensibilidade.
Cloroquina	4-aminoquinolina ⁶	Ativos: N-desetilcloroquina, N-bisdesetilcloroquina. Outros menos ativos: 7-cloro 4-aminoquinolona, etc ⁶ .	Desaminação oxidativa, eliminação da cadeia lateral e outras vias de N-oxidação ⁶ .	CYP2C8; CYP3A4/3A5; CYP2D6 ⁶	TGI (náusea, dor abdominais, anorexia), dermatite, retinopatia, hemólise grave, alterações neuropsíquicas
Mefloquina	Aril-aminoálcool ⁴	Inativo: Carboximefloquina ⁴	Carboxilação e hidroxilação ⁴	CYP3A4 ⁴	TGI (náusea, dor abdominais, anorexia), alterações de sono e de comportamento, leucocitose, trombocitopenia
Primaquina	8-aminoquinolina ²	Ativo: 5-hidroxiprimaquina e 5-dimetilhidroxiprimaquina. Inativo: carboxiprimaquina ²	Carboxilação e hidroxilação ²	CYP1A2; CYP2B6; CYP2D6; CYP3A4 ^{2,4}	TGI (náusea, dor abdominais, anorexia), hemólise grave, leucopenia
Quinina	Aril-aminoálcool ⁷	Ativo: 3-hidroxiquinina ⁷	Hidroxilação ⁷	CYP3A4; CYP2C19 ⁷	TGI (náusea, dor abdominais, anorexia), hemólise grave, leucopenia, cinchonismo, trombocitopenia

Referências: BRUNTON *et al.*, 2006¹; GANESAN *et al.*, 2009²; HONDA *et al.*, 2011³; LI *et al.*, 2003⁴; YUSOF & HUA, 2012⁵; PROJEAN *et al.*, 2003⁶; ZHANG *et al.*, 1997⁷; WYNALDA *et al.*, 2003⁸).

Quadro 2– Características do metabolismo dos principais antimaláricos usados na clínica. Adaptado de GUSMÁN & CARMONA-FONSECA, 2006.

2.5 Farmacogenética das principais isoformas do CYP envolvidas no metabolismo de fármacos antimaláricos

2.5.1 CYP2B6

CYP2B6 é expressa primariamente no fígado, compreendendo entre 2 a 10% do conteúdo total de CYP hepático, e em alguns tecidos extra-hepáticos incluindo o rim, cérebro, intestino e pele (WANG & TOMPKINS, 2008). Esta isoforma exerce um papel importante no metabolismo de fármacos tais como os agentes antineoplásicos, anticonvulsivantes, benzodiazepínicos e antimaláricos como os derivados de artemisinina e primaquina (GANESAN *et al.*, 2009; HONDA *et al.*, 2011).

O gene *CYP2B6* está localizado no cromossomo 19 (entre 19q12 e 19q13,2), é composto por 9 exons e está dentro de um grupamento gênico de 112 pb (HOFFMAN *et al.*, 2001).

A expressão gênica varia amplamente entre indivíduos. Tal variabilidade pode ser atribuída a diferenças na regulação transcricional e a fatores genéticos hereditários. A transcrição de *CYP2B6* é regulada pelos receptores nucleares CAR e PXR, sendo fortemente induzida por ligantes desses receptores que são indutores clássicos como a rifampicina, barbitúricos, ciclofosfamida, efavirenz, derivados de artemisinina que são também substratos da enzima, sendo esta, a indução enzimática, um dos principais fatores que contribuem para a elevada variabilidade. Outros fatores como a idade, sexo, inflamação e polimorfismos também vêm sendo citados (AITKEN & MORGAN, 2007; HOFMANN *et al.*, 2008; CROOM *et al.*, 2009; THORN *et al.*, 2010; ZANGER & KLEIN, 2013; ZANGER & SCHWAB, 2013).

Mais de 25 alelos variantes já foram identificados em adição ao *CYP2B6*1* (tipo selvagem) com variação na sequência de aminoácido e/ou efeito funcional comprovado (HANC CYP, 2013; ZANGER & SCHWAB, 2013). A distribuição dos alelos do *CYP2B6* varia de acordo com a população e etnia (MEHLOTRA *et al.*, 2006; ARENAZ *et al.*, 2010). O alelo mais comum é o *CYP2B6*6*, ocorrendo com frequência entre 15 a 60% em diferentes populações e é caracterizado pela presença de duas variantes, *CYP2B6:516G>T* (rs3745274, *CYP2B6:Gln172His*), no exon 4 e *CYP2B6:785A>G* (rs2279343, *CYP2B6:Lys262Arg*), no exon 5 (WANG & TOMPKINS, 2008).

A variante *CYP2B6:516G>T* ocorre com maior frequência em negros e americanos africanos quando comparados a caucasianos (HAAS *et al.*, 2004; THORN *et al.*, 2010).

Estudos prévios sugerem que *CYP2B6:516G>T* pode alterar tanto a expressão quanto a eficiência catalítica da enzima e que tais alterações são substrato-dependentes. Hofmann *et al.* (2008) verificaram que os níveis de mRNA hepático encontravam-se reduzidos na presença do alelo *CYP2B6*6*, resultando na diminuição da expressão enzimática. Segundo os autores, um *splicing* incorreto do pré-mRNA, levando ao encurtamento do mRNA com a ausência dos exons 4 a 6, seriam responsáveis pela redução dos níveis de mRNA. Ariyoshi *et al.* (2011) demonstraram que a substituição do aminoácido glicina por histidina na proteína foi capaz de alterar a eficiência catalítica de *CYP2B6*.

Polimorfismos em *CYP2B6*6*, predominantemente *CYP2B6:516G>T*, estão associados a alterações farmacocinéticas com repercussões clínicas importantes para alguns substratos. Essa variante tem sido frequentemente associada com a redução da atividade enzimática de *CYP2B6*, elevação da concentração plasmática, redução do clearance e conseqüente aumento da neurotoxicidade do efavirenz e também ao

aumento do risco de desenvolvimento de resistência e esse fármaco por descontinuidade do tratamento (HAAS *et al.*, 2004; RODRIGUEZ-NOVOA *et al.*, 2005; GOULDEN *et al.*, 2010, WYEN *et al.*, 2011). Alterações farmacocinéticas semelhantes têm sido verificadas para outros fármacos, por exemplo, a metadona, onde a elevação na concentração plasmática conferida pela proteína mutante potencializa o risco de desenvolvimento de arritmias cardíacas graves (DOBRINAS *et al.*, 2013).

De acordo com Nakajima *et al.* (2007) e Ariyoshi *et al.* (2011) essa variante estaria associada com o aumento da atividade catalítica da enzima e o aumento da concentração plasmática do metabólito ativo da ciclofosfamida.

Honda *et al.* (2011) em estudo *in vitro* para caracterização funcional de variantes polimórficas de *CYP2B6* envolvidas na atividade de desmetilação do arteméter revelaram que o alelo *CYP2B6*6* conferiu atividade enzimática aumentada de *CYP2B6*, sendo esta a principal variante relacionada ao aumento da concentração do metabólito ativo - diidroartemisinina (DHA).

Segundo Wang *et al.* (2013) é complexo estabelecer uma relação entre o genótipo dessa enzima e o metabolismo *in vivo*, já que há um efeito combinado entre os alelos envolvidos na expressão e atividade catalítica de *CYP2B6*, e ainda, esta relação é substrato-dependente.

2.5.2 CYP2C8

Essa isoforma é responsável pelo metabolismo oxidativo de classes farmacológicas importantes incluindo alguns antimaláricos (cloroquina, amodiaquina, dapsona), hipoglicemiantes (repaglinida, rosiglitazona), quimioterápicos (paclitaxel), hipolipêmicos (sinvastatina) (KIM *et al.*, 2003; INGELMAN-SUNDBERG *et al.*,

2007). É expressa em maior quantidade no fígado, compondo cerca de 7% do total de CYPs nesse órgão e em menor quantidade em alguns tecidos extra-hepáticos (DAILY & AQUILANTE, 2009).

A expressão hepática do gene *CYP2C* é regulada constitutivamente pelos fatores de transcrição HNF4 α , HNF3 γ , C/EBP α , RORs além de ser induzida por ligantes dos receptores nucleares PXR, CAR, GR, VDR (CHEN & GOLDSTEIN, 2009).

O gene *CYP2C8* está localizado no cromossomo 10q24 e é composto por nove exons (KLOSE *et al.*, 1999). Apresenta ampla variabilidade fenotípica intra e inter-individual para o metabolismo de alguns substratos de *CYP2C8*. Os principais fatores que contribuem para essa variabilidade são polimorfismos genéticos e alta inducibilidade quando expostas a diferentes xenobióticos (GOLDSTEIN, 2001; FEIDT *et al.*, 2010).

Mais de 20 alelos variantes do gene *CYP2C8*1* estão descritos (HANC CYP, 2013). Os alelos de maior frequência encontrados em diferentes populações são *CYP2C8*2*, *CYP2C8*3*, *CYP2C8*4* (DAI *et al.*, 2001; BAHADUR *et al.*, 2002).

O alelo *CYP2C8*3* é caracterizado pela presença de duas variantes: *CYP2C8:416G>A* (rs11572080, Arg139Lys) e *CYP2C8:1196A>G* (rs10509681, Lys399Arg), nos exons 3 e 8, respectivamente (DAI *et al.*, 2001). Ocorre com maior frequência em brancos e raramente em africanos e asiáticos (DAI *et al.*, 2001; BAHADUR *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2013). Em estudo realizado por Cavaco *et al.* (2006) a frequência do alelo *CYP2C8*3* foi de 19,8% entre os caucasianos portugueses.

Estudos que avaliam o impacto do *CYP2C8*3* na atividade catalítica da proteína variante apresentam resultados controversos. Essa variante foi inicialmente associada à redução da atividade metabólica *in vitro* do paclitaxel, ácido araquidônico, amodiaquina, ciclosporina A (DAI *et al.*, 2001; PARIKH *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2008).

Investigações recentes, *in vitro* e *in vivo*, sugerem que o impacto do alelo *CYP2C8*3* na atividade da enzima depende do substrato. Este alelo foi associado ao aumento do clearance de amodiaquina, repaglinida, paclitaxel, cerivastatina e redução do clearance do ibuprofeno (KASPERA *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2013). Stage *et al.* (2013) demonstraram que *CYP2C8*3* estava associado a baixos níveis plasmáticos de rosiglitazona, bem como, a redução na resposta terapêutica em indivíduos portadores da desse alelo.

Estudos têm demonstrado que a enzima CYP2C8 é a principal responsável pelo metabolismo da cloroquina (PAGANOTTI *et al.*, 2011; STAGE *et al.*, 2013). Não foram encontrados na literatura estudos que descrevessem, especificamente, a influência de *CYP2C8*3* no metabolismo desse fármaco, o que justifica a realização de um ensaio desta natureza.

2.5.3 CYP2D6

A enzima CYP2D6 é responsável pelo metabolismo de aproximadamente 25% dos fármacos empregados na clínica, com a dose necessária para atingir a mesma concentração plasmática variando de 10 a 30 vezes entre os indivíduos (INGELMAN-SUNDBERG & RODRIGUEZ-ANTONA, 2005). Entre as principais classes de fármacos metabolizados por essa enzima incluem-se os antimaláricos como a cloroquina e primaquina, antidepressivos, antipsicóticos, antiarrítmicos, betabloqueadores, antieméticos e opióides (PROJEAN *et al.*, 2003; GARDINER *et al.*, 2006, PYBUS *et al.*, 2012).

CYP2D6 é uma das isoformas do CYP que tem sido mais amplamente estudada em relação aos polimorfismos genéticos. Uma das razões que justificam o interesse

nessa enzima é o tipo de variação interindividual na sua atividade o que tem levado a descobertas de deleções ou duplicações do gene *CYP2D6*, bem como o papel da farmacogenômica na farmacologia clínica (TEH & BERTILSSON, 2011). Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de regulação e variabilidade na expressão desse gene. Acredita-se que haja a participação do fator HNF4 α no processo de regulação transcricional (CAIRNS *et al.*, 1996; ZANGER & SCHWAB, 2013).

O gene *CYP2D6* está localizado no cromossomo 22q13.1, é composto por nove exons e 4.383 bp (KIMURA *et al.*, 1989). Já foram descritos mais de 105 alelos variantes do *CYP2D6*1* (HANC CYP, 2013).

O alelo *CYP2D6:1846G>A* (rs3892097) é gerado por um *splicing* incorreto na região intrônica do gene que leva a formação de uma proteína não funcional (KAGIMOTO *et al.*, 1990; OWEN *et al.*, 2009). Portadores heterozigotos desse alelo tendem a apresentar uma menor atividade enzimática quando comparado aqueles que portam os dois alelos funcionais (ZANGER & SCHWAB, 2013).

Trabalhos já demonstraram que a frequência alélica para a *CYP2D6* é influenciada por diferenças regionais e sua atividade enzimática por diferentes etnias (CHIBA *et al.*, 2012). O alelo *CYP2D6*4* possui elevada frequência entre os caucasianos (TEH & BERTILSSON, 2011). No Brasil, a frequência do alelo *CYP2D6*4* foi de 0,24 incluindo indivíduos descendentes de africanos e europeus (SILVEIRA *et al.*, 2009)

Estudos têm demonstrado a influência de polimorfismos genéticos de *CYP2D6* no desfecho terapêutico de desordens no sistema nervoso central, cardiovasculares, câncer, bem como interações medicamentosas (RODRIGUEZ-ANTONA *et al.*, 2010; MADLENSKY *et al.*, 2011). O polimorfismo dessa enzima tem sido frequentemente implicado no fenótipo ML (SACHSE *et al.*, 1997). *CYP2D6* tem sido citada como

enzima chave para o metabolismo do antimalárico primaquina e em menor extensão da cloroquina (GANESAN *et al.*, 2009; PYBUS *et al.*, 2012), entretanto não se sabe o papel de polimorfismos nessa enzima no metabolismo desses fármacos, bem como a sua influência na resposta clínica.

2.6 Papel do CYP na patogênese e evolução clínica de doenças: Um breve esboço

Tem sido reportado que polimorfismos nas enzimas do CYP podem interferir na susceptibilidade ao desenvolvimento e/ou na evolução clínica de diversas doenças.

Brown *et al.* (2000) em estudo de caso-controle relatou uma associação significativa entre homozigotos para o alelo *CYP2D6*4* e pacientes com espondilite anquilosante. Esse mesmo alelo, em conjunto com outros dois, esteve associado a um maior risco de desenvolvimento de câncer de pulmão em chineses (HUANG *et al.*, 2013). Indivíduos fenotipados como metabolizadores lentos para o gene *CYP2D6* foram associados com um maior risco para o desenvolvimento da doença de Parkinson (MCCANN *et al.*, 1997).

Yuan *et al.* (2011) concluíram que o alelo *CYP2B6*6* pode ser considerado um fator de risco predisponente à patogêneses da leucemia aguda.

Feng *et al.* (2012) ao estudar crianças chinesas com tuberculose encontrou uma associação significativa entre polimorfismos nas isoformas *CYP2C19* e *CYP3A4* e uma menor susceptibilidade para tuberculose pediátrica. Pacientes homozigotos para o alelo *CYP2C19*2* portadores de doença arterial coronariana apresentaram um pior prognóstico em relação aos não portadores, essa associação foi significativa, de acordo

com Chen *et al.* (2012). Shi & Chen (2004) ao investigar a associação entre polimorfismo em *CYP2C19* e susceptibilidade ao câncer, relatou uma alta incidência de metabolizadores lentos para esse gene em pacientes com câncer de estômago, esôfago e pulmão.

Em estudo realizado no Japão, Tamaki *et al.* (2011), relataram uma maior frequência de indivíduos homozigotos para o alelo *CYP2A6*4* entre os pacientes portadores de câncer de pulmão, os autores sugerem que possa haver uma associação entre o polimorfismo e a doença na população estudada.

Wickliffe *et al.* (2011) demonstraram que alelo *CYP1A2*1F* esteve associado à porfiria cutânea tardia, indicando, segundo os autores, que esse polimorfismo é fator de risco para o desenvolvimento dessa doença. Já o alelo *CYP1A1*2A* foi considerado preditor de alto risco para o desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda (KRAJINOVIC *et al.*, 2013).

Como mencionado anteriormente, estudos envolvendo polimorfismos de enzimas do CYP e a doença malárica são escassos. Os poucos estudos disponíveis sobre esse assunto estão focados no efeito de isoformas polimórficas no metabolismo de antimaláricos. No entanto, conforme visto acima, a tendência atual na literatura científica é buscar a relação entre os polimorfismos dessas enzimas e a evolução de diferentes patologias, sejam infecciosas ou não.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

Caracterizar molecularmente as principais isoformas do citocromo P450 envolvidas no metabolismo de antimaláricos em pacientes com malária por *Plasmodium vivax*.

3.2 Específicos

1. Avaliar a frequência dos alelos *CYP2B6*6*, *CYP2C8*3* e *CYP2D6*4* em pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado diagnosticados com malária vivax;
2. Avaliar a relação entre os polimorfismos encontrados e a ocorrência de malária grave por *P. vivax*;
3. Descrever o perfil hematológico e bioquímico dos pacientes portadores de polimorfismos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

4.1.1 Modelo do estudo

Trata-se de um estudo observacional, retrospectivo, do tipo descrito transversal. Foram utilizadas amostras e dados clínicos obtidos de estudo epidemiológico realizado pelo projeto “*Caracterização clínica da malária complicada por Plasmodium vivax*”, desenvolvido na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD, nos anos de 2009 e 2010.

4.1.2 Local de estudo

O estudo foi realizado na cidade de Manaus (AM), Brasil. Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM e no Laboratório Multidisciplinar da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM.

4.1.3 População de estudo

Pacientes com malária por *Plasmodium vivax* atendidos na FMT-HDV no período compreendido entre março de 2009 a abril de 2010. O diagnóstico da malária

foi realizado pelo método de gota espessa e a confirmação de monoinfecção realizada por diagnóstico molecular pela técnica da Reação da Polimerase em Cadeia - PCR. Para todos os indivíduos, as informações clínico-laboratoriais foram extraídas do prontuário médico e questionário padronizado e referem-se ao estado do paciente na admissão. O diagnóstico de malária grave foi realizado segundo critérios adotados pela OMS (2010) para doença causada pelo *P. falciparum*, já que até o momento não foram estabelecidos critérios específicos para as infecções causadas pelo *P. vivax*.

4.1.4 Aspectos éticos

As amostras de sangue utilizadas no estudo foram obtidas por meio do projeto “*Caracterização clínica da malária complicada por Plasmodium vivax*”, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), em junho de 2009, pelo parecer nº343/2009, protocolo de nº 25.000.011.792/2009-15 (**Anexo 1**), em que justifica ao paciente, via Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (**Anexo 2**), que parte do material biológico colhido foi armazenada para ser usado em estudos futuros sobre malária.

Os experimentos realizados seguirão as normas de Biossegurança de acordo com a Lei no. 11.105 de 24 de março de 2005, regulamentada pelo decreto no. 5.591 de 22 de novembro de 2005, seguindo as normas técnicas do Manual de Biossegurança de Procedimentos da Comissão Técnica de Biossegurança da FIOCRUZ (2005).

4.1.5 Amostra clínica

Foram utilizadas amostras de sangue periférico de 231 pacientes atendidos na FMT-HDV, diagnosticados com malária pelo *P. vivax*, coletadas no período de março de 2009 a abril de 2010, de pacientes atendidos na FMT-HVD. O procedimento técnico utilizado para a coleta das amostras está descrito no **Anexo 3**. As amostras encontram-se armazenadas em "freezer " a -70°C no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM e foram provenientes do Banco de Materiais Biológicos da FMT-HVD.

4.1.6 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos na pesquisa todos os pacientes com diagnóstico microscópico de malária por *P. vivax*.

Foram excluídos da pesquisa os pacientes que:

- ✓ Apresentaram diagnóstico de malária mista (*P. vivax* e *P. falciparum*) ou por *P. falciparum* à PCR;
- ✓ Apresentaram as seguintes comorbidades infecciosas: Hepatites A, B, C, D e E, HIV e dengue;
- ✓ Encontravam-se grávidas ou lactantes;
- ✓ Uso corrente de prescrição médica, incluindo contraceptivos orais;
- ✓ Faziam uso de fármacos oxidantes, senão aquelas utilizadas no tratamento antimalárico;
- ✓ Tabagista;

- ✓ Uso recente ou frequente de bebidas alcóolicas;
- ✓ Apresentavam comprometimento hepático e renal prévio.

4.2 Delineamento experimental

4.2.1 Análise molecular

4.2.1.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de 300µL de sangue, utilizando o kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification Kit*, conforme protocolo do fabricante (**Anexo 3**). Após a extração, o DNA foi armazenado a -70°C até o momento das análises moleculares.

4.2.1.2 Amplificação e identificação dos polimorfismos

Os polimorfismos foram analisados pelo método de PCR em Tempo Real e sistema TaqMan® para a discriminação alélica (**Quadro 3**). A reação de amplificação foi realizada para um volume de 10uL/reação, contendo 5uL de 2x *TaqMan Universal Master Mix*, 0,200uL de 20x *SNP Genotyping Assay*, 2,800uL de água esterilizada, com 2 uL de DNA da amostra.

Os produtos amplificados foram detectados e analisados através da plataforma *StepOnePlus™ v. 2.0 (Applied Biosystems)*. As condições das reações foram às seguintes: uma pré-desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguindo-se 45 ciclos de

92°C por 15 segundos para desnaturação e de 60°C durante 1 minuto para emparelhamento dos *primers* e extensão.

Alelos	Ref. SNP ID
<i>CYP2B6</i> *6 (15631 G>T)	rs37455274
<i>CYP2C8</i> *3 (2130 G>A)	rs11572080
<i>CYP2D6</i> *4 (1846 G>A)	rs3892097

Quadro 3 – Polimorfismos selecionados nos genes *CYP2B6*, *CYP2C8* e *CYP2D6*.

4.3 Análises estatísticas

4.3.1 Programa utilizado

Os dados foram analisados estatisticamente no programa SPSS, versão 19.0.

Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

4.3.2 Distribuição das Variáveis

A análise de normalidade da distribuição das variáveis foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

4.3.3 Análise das Variáveis Qualitativas ou Categóricas

A análise das variáveis qualitativas ou categóricas foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado (χ^2). As análises de valores inferiores a 4, foram realizadas pelo teste exato de Fisher. Para estimar a força de associação entre duas variáveis foi calculada a razão de prevalência, sua significância foi estimada pelo intervalo de confiança de 95% e pelos testes de Mantel-Haenszel e Yates.

4.3.4 Análise das Variáveis Quantitativas ou Não Categóricas

Para análise de diferença entre duas médias numéricas utilizou-se o teste T independente para variáveis com distribuição normal e o teste U de Mann-Whitney para aquelas de distribuição não normal. Para análise de diferenças de médias entre três ou mais grupos, utilizou-se o teste ANOVA para variáveis com distribuição normal, com o teste de comparações múltiplas (ou *post hoc*) para identificar quais grupos diferem entre si. No caso de distribuições fora do normal utilizou-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos pacientes

Dos 231 pacientes com malária vivax incluídos no estudo, 85 (36,8%) foram portadores de malária grave, 136 (58,9%) de malária não grave e 10 (4,3%) não foram classificados quanto à gravidade em virtude da ausência de dados clínico-laboratoriais, os quais foram avaliados somente com relação à frequência alélica.

Na **Tabela 1** estão listadas as características sócio-demográficas dos pacientes onde se observa média de idade similar entre os dois grupos, não havendo diferença também na frequência de indivíduos entre os gêneros. A ocorrência de gravidade da doença foi maior no gênero masculino ($p=0,020$) e no grupo de pacientes de maior peso ($p<0,01$). Não foram encontrados relatos na literatura de diferenças entre os sexos quanto à gravidade da malária vivax.

A **Tabela 2** demonstra que a maior parte dos pacientes acometidos previamente por malária não desenvolveu a forma grave na doença malárica atual (36,1% *versus* 63,9%). Embora essa relação não tenha sido estatisticamente significativa, acredita-se que haja uma proteção clínica em pacientes expostos frequentemente a infecções maláricas, corroborando os achados neste trabalho (ALVES *et al.*, 2009).

Tabela 1 - Características sócio-demográficas dos pacientes diagnosticados com malária vivax, por gravidade da doença.

Características	Total (N)	Malária grave	Malária não grave	p
Gênero M/F, n (%)	221	51(45,5) / 34(31,2)	61(54,5) / 75(68,8)	0,020
Idade (anos)	217	33,46 ± 19,97	31,83 ± 24,871	0,611
Peso (kg)	221	62,505 ± 20,471	51,622 ± 26,31	<0,01

N - número total de pacientes; M - masculino; F - feminino;

Tabela 2 – História clínica dos pacientes diagnosticados com malária vivax, por gravidade da doença.

Características	Total (N)	Malária grave	Malária não grave	p
Malária prévia S/N, n(%)	221	30(36,1)/55(39,9)	53(63,9)/83(60,1)	0,343
N de episódios ⁽¹⁾	93	1,34 ± 2,02	1,22 ± 1,26	0,728
Duração da doença (dias)	128	4,04 ± 5,29	3,09 ± 2,03	0,219
Uso prévio de antimaláricos ⁽²⁾ S/N, n(%)	212	35(40,7)/ 47(37,3)	51(59,3)/ 79(62,7)	0,361

N - número total de pacientes; S-sim; N-não ⁽¹⁾ – Número de episódios de malária prévia; ⁽²⁾ – Uso de antimaláricos nos últimos 30 dias.

Quando questionados sobre o uso de antimaláricos nos últimos 30 dias que antecederam a consulta, 40,57% dos pacientes relataram fazer uso de algum fármaco antimalárico. Provavelmente esses já haviam sido expostos a infecção malárica e retornaram ao serviço porque houve falha terapêutica, ou a doença recidivou ou ainda

foram novamente infectados pelo *Plasmodium* spp. No **Gráfico 1** estão listados os antimaláricos que foram usados pelos pacientes antes ou durante a doença malárica atual. Observa-se que padrão está de acordo com o usual para o tratamento de malária vivax em que cloroquina e primaquina são os mais empregados na rotina (BRASIL, 2010).

Fármacos antimaláricos

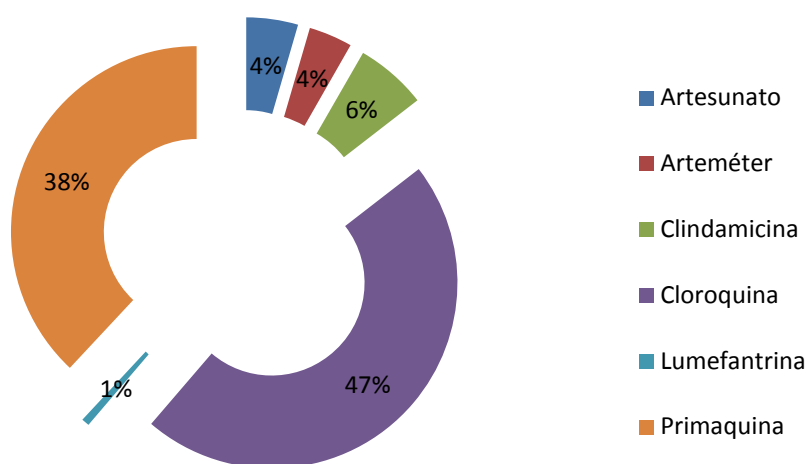


Gráfico 1 – Uso de fármacos antimaláricos pelos pacientes portadores de malária vivax incluídos na pesquisa.

5.2 Caracterização clínica e laboratorial

A **Tabela 3** resume os sinais e sintomas clínicos apresentados pelos pacientes diagnosticados com malária vivax.

Considerando o total de pacientes, verificou-se que a hepatomegalia e esplenomegalia foi diagnosticada em 48,05% e 27,7% dos pacientes incluídos no

estudo, respectivamente. O estudo realizado por Latif *et al.* (2012), no Paquistão, com pacientes diagnosticados com malária vivax e mista (vivax e falciparum) revelou um percentual menor 32,3% e 9,6%, respectivamente. Essa discrepância pode estar associada tanto às diferenças clínicas entre as populações como ao fato da FMT-HVD ser uma unidade de referência mundial no tratamento da malária e, portanto, apresentar resultados com melhor diagnóstico.

Em nosso estudo a icterícia foi observada em 71,4% (60/84) dos casos graves ($p=0,000$) (dados não mostrados). De acordo com a OMS (2010) a icterícia deve estar associada à disfunção em outro órgão vital para ser critério de gravidade em pacientes com malária vivax. Estudos demonstram ser essa a clínica principal observada em portadores de malária grave (KOCHAR *et al.*, 2010; RAMOS-JUNIOR *et al.*, 2010).

O acometimento cerebral na malária pode ser caracterizado por alterações ao nível de consciência, desorientação, prostração, podendo evoluir para o coma. Recentemente tem sido relatado que essa condição, apesar de pouco frequente, pode manifestar-se devido à monoinfecção pelo *P. vivax* (TANWAR *et al.*, 2011). Neste estudo apenas um paciente foi admitido com malária cerebral (dado não mostrado).

A correlação entre clínica e gênero demonstrou que as mulheres foram mais acometidas por calafrios, mioartralgia e vômitos, enquanto os homens por icterícia, hepatomegalia, gengivorragia. Nosso estudo, assim como outros na literatura, demonstra que os sinais e sintomas clínicos na malária vivax podem manifestar-se de forma e intensidade diferente entre os gêneros sem que haja, até o momento, uma explicação clínica para isso (KOCHAR *et al.*, 2005; RODRIGUEZ-MORALES *et al.*, 2005; RODRIGUEZ-MORALES *et al.*, 2006).

Tabela 3 – Perfil clínico dos pacientes diagnosticados com malária vivax.

	Total (N)		Masculino (N)		Feminino (N)		p	RP (IC 95%)
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não		
Hemoglobinúria	25	106	13	54	12	52	0,551	1,043 (0,436-2,435)
Leucocitúria	53	78	28	39	25	39	0,444	1,120 (0,557-2,252)
Hematúria	5	90	2	41	3	49	0,590	0,797 (0,127-5,000)
Dor abdominal	137	77	66	43	71	34	0,175	0,735 (0,419-1,288)
Anorexia	164	57	83	29	81	28	0,547	0,989 (0,541-1,808)
Calafrios	198	22	94	18	104	4	<0,01	0,201 (0,066-0,615)
Esplenomegalia	63	158	35	77	28	81	0,222	1,315 (0,731-2,364)
Hepatomegalia	110	111	63	49	47	62	0,034	1,696 (0,996-2,887)
Colúria	128	92	69	42	59	50	0,142	1,392 (0,813-2,384)
Convulsões	8	213	4	108	4	105	0,624	0,972 (0,237-3,989)
Febre	218	3	109	3	109	0	0,128	0,973(0,944-1,004)
Tosse	68	152	30	82	38	70	0,115	0,674 (0,379-1,198)
Cefaléia	183	28	89	17	94	11	0,162	0,613 (0,272-1,380)
Icterícia	90	130	54	57	36	73	0,013	1,921 (1,113-3,316)
Mioartralgia	163	48	75	31	88	17	0,018	0,467 (0,240-0,911)
Oligúria	23	194	14	95	9	99	0,195	1,621 (0,670-3,922)
Palidez	168	53	89	23	79	30	0,145	1,469 (0,789-2,737)
Vômito	161	60	73	39	88	21	<0,01	0,447 (0,242-0,826)
Consciência alterada	8	144	5	71	3	73	0,360	1,714 (0,395-7,439)
Edema	16	144	6	76	10	68	0,185	0,537 (0,185-1,555)
ARDS	6	158	4	78	2	76	0,365	1,949 (0,347-10,95)
Equimose	4	91	1	42	3	49	0,384	0,389 (0,039-3,880)
Petéquiias	19	76	6	37	13	39	0,139	0,486 (0,167-1,414)
Hemorragia	54	106	23	59	31	47	0,081	0,591 (0,305-1,145)
Transfusão	21	139	14	68	7	71	0,099	2,088 (0,795-5,488)
Epistaxe	14	81	7	36	7	45	0,460	1,250 (0,402-3,891)
Gengivorragia	5	90	5	38	0	52	0,017	---
Hiperbilirrubinemia⁽¹⁾	71	86	43	37	28	49	0,021	2,034 (1,073-3,854)
Prostração	3	79	2	45	1	34	0,610	1,511 (0,132-17,36)

ARDS - Síndrome de Angústia Respiratória Aguda; N- Número total de pacientes; DP- Desvio padrão; RP - razão de prevalência; IC - intervalo de confiança;⁽¹⁾ Bilirrubina sérica total > 3mg/dL;

O perfil hematológico tem papel importante na evolução clínica da malária. As infecções pelo *Plasmodium vivax* podem causar alterações hematológicas importantes, tais como linfopenia, eritropenia, plaquetopenia, redução nos níveis de hemoglobina, hematócrito e índices hemantimétricos (AKHTAR *et al.*, 2012; LACERDA *et al.*, 2012; BHAWNA *et al.*, 2013). Na **Tabela 4** estão discriminadas as médias dos resultados para parasitemia e perfis hematológico e bioquímico, entre os gêneros.

Tabela 4 – Parasitemia e perfis hematológico e bioquímico dos pacientes diagnosticados com malária vivax.

Parâmetros	N	Total	Masculino	Feminino	P
Parasitemia/uL	220	10267,1 ± 14166,4	8555,6± 13039,4	12010,0± 15089,6	0,070
WBC (x10³/µL)	160	6,68 ± 3,64	7,74 ± 4,24	5,55 ± 2,47	<0,01
Bastonetes (%)	156	1,85 ± 3,85	1,64 ± 3,86	2,07 ± 4,05	0,494
Neutrófilos (%)	157	58,3 ± 14,9	60,82 ± 14,89	55,62 ± 14,89	0,028
Eosinófilos (%)	158	2,05 ± 2,06	2,37 ± 2,09	1,72 ± 2,2	0,117
Monócitos (%)	158	8,83 ± 4,95	9,04 ± 5,17	8,06 ± 4,74	0,576
Linfócitos (%)	159	28,17 ± 14,00	26,00 ± 13,43	30,48 ± 14,31	0,044
RBC (x10 ⁶ /µL)	160	3,64 ± 0,1	3,65 ± 1,11	3,63 ± 0,85	0,900
Hb (g/dL)	160	10,42 ± 2,75	10,50 ± 3,06	10,35 ± 2,41	0,747
Ht (%)	160	31,42 ± 8,68	31,33 ± 9,07	31,51 ± 8,29	0,900
VCM (fL)	160	86,65 ± 7,5	86,63 ± 7,91	86,69 ± 7,07	0,966
HCM (pg)	160	28,85 ± 2,78	29,03 ± 2,94	28,67 ± 2,59	0,399
CHCM (g/dL)	160	33,27 ± 1,60	33,4 ± 1,27	33,11 ± 1,88	0,257
RDW (%)	160	13,59 ± 2,24	13,55 ± 2,33	13,61 ± 2,14	0,865
Reticulócitos (%)	127	3,10 ± 3,64	4,02 ± 4,43	2,06 ± 2,04	<0,01
Plt (x10³/µL)	160	111,05 ± 122,73	138,18 ± 147,50	81,55 ± 81,32	<0,01
VPM	159	9,49 ± 1,70	9,50 ± 2,1	9,46 ± 1,13	0,868
Lactato (mmol/L)	122	2,05 ± 2,50	1,81 ± 1,25	2,30 ± 3,34	0,274
Albumina (g/dL)	144	3,63 ± 0,58	3,65 ± 0,63	3,62 ± 0,50	0,771
Globulina (g/dL)	132	2,75 ± 0,73	2,91 ± 0,80	2,59 ± 0,61	<0,01
Pt (g/dL)	134	6,4 ± 0,9	6,59 ± 1,02	6,19 ± 0,68	0,011
FA	146	325,8 ± 196,64	311,20 ± 201,74	341,21 ± 191,33	0,358
ALT (U/L)	155	80,30 ± 156,45	95,42 ± 208,30	64,14 ± 64,09	0,215
AST (U/L)	156	73,67 ± 114,36	81,79 ± 119,62	65,13 ± 108,70	0,365
Glicose	157	111,05 ± 51,15	116,68 ± 57,81	105,38 ± 43,01	0,167
BD(mg/dL)	159	2,22 ± 3,05	2,41 ± 4,23	2,03 ± 2,05	0,498
BI (mg/dL)	156	2,30 ± 4,09	3,04 ± 5,31	1,52 ± 1,94	0,020
BT(mg/dL)	156	4,58 ± 6,45	5,49 ± 8,13	3,61 ± 3,82	0,069
Uréia (mg/dL)	157	44,07 ± 45,17	56,98 ± 58,08	30,67 ± 15,40	<0,01
Creatinina(mg/dL)	154	1,10 ± 1,40	1,41 ± 1,91	0,78 ± 0,37	<0,01
CK	109	81,97 ± 241,55	125,84 ± 322,276	30,19 ± 24,55	0,039
LDH (U/L)	143	839,40 ± 454,51	931,3 ± 544,32	740,84 ± 307,03	0,012
Lactato (mmol/L)	122	2,05 ± 2,50	1,81 ± 1,25	2,30 ± 3,34	0,274

N- Número total de pacientes; DP- Desvio padrão; RBC – hemácias; WBC – leucócitos; Hb – hemoglobina; Ht – hematócrito; HCM – hemoglobina corpuscular média; VCM – volume corpuscular médio; CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW – dispersão do tamanho dos eritrócitos; VPM – volume plaquetário médio; Pt – proteínas totais; FA – fosfatase alcalina; BD – bilirrubina direta; BI – bilirrubina indireta; BT – bilirrubina total; Crea – creatinina; CK – creatina quinase; ALT – alanina aminotransferase; AST – aspartatoaminotransferase; LDH – lactato desidrogenase;

A análise dos dados demonstrou número de leucócitos dentro dos valores de referência adotados neste estudo (4.600 – 10.200/mm³). Entretanto verificou-se

diferença significativa no percentual de linfócitos e neutrófilos entre os gêneros, com discreto aumento de neutrófilos seguido de redução de linfócitos no gênero masculino. Ramos Júnior *et al.* (2010) em estudo de caracterização clínica da hemólise em pacientes diagnosticados com malária vivax do gênero masculino na cidade de Manaus relataram que 66,7% dos pacientes apresentaram leucocitose (leucócitos $> 12 \times 10^3/\mu\text{L}$).

Na infecção malárica ocorre degradação de cerca de 60 a 80% dos eritrócitos circulantes (DAI *et al.*, 2012). A ruptura de células vermelhas causadas pelo ciclo do *Plasmodium* spp. e a depuração de eritrócitos deformados infectados ou não são as principais causas de anemia (AUTINO *et al.*, 2012).

Em nosso estudo 76,3% e 57,5% dos pacientes apresentaram eritropenia e reticulocitose, respectivamente. Os níveis de hematócrito encontravam-se reduzidos em 81,9% dos pacientes e em 83,8% dos indivíduos houve aumento no grau de anisocitose. O percentual dessas variações apontados em estudo por Bhawna *et al.* (2013) foi menor ao encontrado em nosso estudo, em que a eritropenia e reticulocitose ocorreu em 19,5% e 27,5% dos pacientes, respectivamente e os níveis de hematócrito encontravam-se reduzidos em 69,5% dos pacientes.

Anemia tem sido frequentemente associada com todas as malárias, e sua gravidade tem sido relacionada principalmente com a idade e local endêmico. Tradicionalmente, infecções por *P. falciparum* têm produzido maior frequência para anemia grave que *P. vivax* (WHO, 2000; SINA, 2002). Entretanto, trabalhos recentes têm demonstrado elevada frequência e diferentes graus de anemia grave em malária vivax (MOHAPATRA *et al.*, 2002; ALEXANDRE *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2012) o que foi demonstrado em nosso estudo, principalmente quando referente ao gênero masculino, onde a frequência de anemia grave foi maior.

Plaquetopenia (plaqueta $<150.000/\mu\text{L}$) na malária é uma manifestação comum e um dos sinais laboratoriais de confirmação para malária, tanto em crianças como em adultos. Tal condição está presente, principalmente nos estágios iniciais da infecção malárica (AUTINO *et al.*, 2012). Em nosso estudo, 53,7% dos pacientes apresentaram plaquetopenia, sendo mais acentuada nas mulheres do que nos homens. Cerca de 50% dos pacientes foram acometidos com plaquetopenia grave (plaqueta $< 50.000/\mu\text{L}$). Em geral esses resultados foram semelhantes aos relatados em outros estudos (LATIF *et al.*, 2012; AKHTAR *et al.*, 2012; BHAWNA *et al.*, 2013).

Em relação ao perfil bioquímico dos pacientes, a análise dos resultados demonstra que os níveis de uréia, creatinina sérica e proteína quinase foram significativamente maiores entre os pacientes do gênero masculino. Estudo realizado por Moses & Johnkennedy (2013) em pacientes portadores de malária pelo *P. falciparum* e grupo controle também demonstrou diferenças nestes parâmetros, em que se verificaram maiores níveis de uréia e menores de creatinina sérica nas mulheres do que nos homens.

Níveis elevados de bilirrubina indireta, LDH, reticulócitos, associados à anemia, hepatomegalia e icterícia são parâmetros indicativos da ocorrência de hemólise extravascular (OMS, 2010). Observou-se que as médias dos níveis plasmáticos e as frequências desses marcadores foram significativamente maiores entre os pacientes do gênero masculino.

5.3 Caracterização molecular

5.3.1 Frequências alélicas

Do total de 231 pacientes, 230 foram genotipados para o gene *CYP2B6*, 222 para o *CYP2C8* e todos para o gene *CYP2D6*. Os genótipos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A frequência de indivíduos portadores do alelo *CYP2B6**6 foi de 42,2%, sendo 27,8% em heterozigose (G/T) e 14,3% em homozigose (T/T). Já para o alelo *CYP2C8**3 a frequência de portadores foi de 13,5%, todos em heterozigose. Para o alelo *CYP2D6**4 a frequência de portadores foi de 16,5%, sendo 15,2% em heterozigose (G/A) e 1,3% em homozigose (A/A).

Apesar desse estudo não ter sido desenhado com o objetivo de avaliar o impacto dos polimorfismos encontrados no metabolismo dos antimaláricos algumas inferências puderam ser realizadas sob o ponto de vista farmacológico.

Polimorfismos em enzimas do CYP podem contribuir para variações na eficácia e segurança de fármacos antimaláricos (TOMALIK-SCHARTE *et al.*, 2008). Ambos, eficácia e segurança, são dependentes de concentrações plasmáticas e tempo de exposição adequados, já que exposições insuficientes ao fármaco estão associadas ao maior risco de falha ou resistência terapêutica enquanto que um maior tempo de exposição está relacionado a uma maior chance de desenvolvimento de reações adversas (GUSMAN & CARMONA-FONSECA, 2006).

No Brasil, a cloroquina e a primaquina ainda são base do tratamento da malária vivax não complicada (BRASIL, 2010). Atividade antiparasitária desses antimaláricos é

dependente da biotransformação (PROJEAN *et al.*, 2003; GANESAN *et al.*, 2009; PYBUS *et al.*, 2013). Polimorfismos nessas isoformas podem alterar a atividade catalítica da enzima. Estudos sugerem que os alelos *CYP2D6*4* e *CYP2C8*3* reduzem a atividade catalítica das enzimas CYP2D6 e CYP2C8, envolvidas no metabolismo da primaquina e da cloroquina, respectivamente (SACHSE *et al.*, 1997; PAGANOTTI *et al.*, 2011; STAGE *et al.*, 2013). Assim, o metabolismo desses fármacos estaria comprometido na presença desses alelos, portanto, pode-se sugerir que a conversão da primaquina e da cloroquina em seus respectivos metabólitos ativos seria menor, resultando, conseqüentemente, em menor efeito farmacológico dos antimaláricos em portadores desses alelos.

O tratamento de formas graves da doença malárica, independente do agente infeccioso, é baseado no uso de derivados de artemisinina combinado a outros antimaláricos (OMS, 2010). Estudos anteriores realizados por Nakajima *et al.* (2007), Ariyoshi *et al.* (2011) e Honda *et al.* (2011) relataram o aumento da atividade metabólica *in vivo* e *in vitro* da enzima CYP2B6 associada a variante *CYP2B6*6*, objeto deste estudo. Supõe-se que atividade antimalárica dos derivados de artemisinina é realizada pelo diidroartemisinina (DHA), que é o principal metabólito ativo desse grupo farmacológico (HONDA *et al.*, 2011). Portanto, indivíduos portadores dessa variante poderiam apresentar maiores concentrações de DHA o que, teoricamente, aumentaria o efeito farmacológico, assim ao ser instaurada a farmacoterapia com derivados de artemisinina, esses indivíduos seriam beneficiados.

Por outro lado, estudos têm reportado que a própria malária reduz o conteúdo e pode alterar a capacidade metabólica das enzimas do CYP (AKINYINKA *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 2009). Tais efeitos podem ser decorrentes da resposta inflamatória intensa gerada na infecção malárica. Acredita-se que a relação entre a inflamação e

atividade das monooxigenases seja mediada pelas citocinas IL1 β , IL6, TNF α e interferons α e γ (AITKEN *et al.*, 2006). Vet *et al.* (2011), cita em artigo de revisão, diversos estudos demonstrando que a inflamação está associada a uma regulação negativa na expressão e atividade dessas enzimas. Foi reportado que houve a redução da atividade de CYP2D6 em pacientes em processo inflamatório agudo (JONES *et al.*, 2010). Tais alterações promoveriam aumento na concentração plasmática do fármaco, devido à redução do *clearance*, com conseqüente aumento do risco de reações adversas. No caso de fármacos que precisam ser biotransformados para exercerem seu papel farmacológico, o efeito contrário poderia ser esperado, ou seja, uma menor disponibilidade de fármaco ativo.

Assim poderíamos sugerir que as alterações nas enzimas do CYP ocasionadas não somente pelos polimorfismos detectados nos pacientes portadores de malária vivax como também o próprio processo inflamatório, através da regulação negativa, de forma isolada ou conjuntamente, podem ter repercussões relevantes em termos do tratamento farmacológico da doença.

As frequências dos alelos *CYP2B6**6 (T), *CYP2C8**3 (A) e *CYP2D6**4 (A) foram de 28,26%, 6,7% e 8,87%, respectivamente, na população estudada. Não foram encontrados estudos prévios relatando a frequência desses polimorfismos especificamente em pacientes portadores de malária vivax. Em geral, as frequências alélicas encontradas neste estudo foram semelhantes a outros relatos descritos na literatura e aos dados dispostos na página do NCBI (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Frequências alélicas de *CYP2B6*6*, *CYP2C8*3* e *CYP2D6*4* em pacientes diagnosticados com malária vivax neste estudo e em outras populações

População	N	% alelo			Referências
		<i>CYP2B6*6</i>	<i>CYP2C8*3</i>	<i>CYP2D6*4</i>	
Brasileiros	231	28,26	6,7	8,87	Este estudo
Brasileiros	1.034	36,9	9,8	11,7	Suarez-Kurtzet <i>et al.</i> , 2012
Brasileiros	115	---	---	14,5	Maciel <i>et al.</i> , 2009
Colombianos	152	36,5	---	---	Bahadur <i>et al.</i> , 2002
Indianos malasianos	123	---	12	---	Muthiah <i>et al.</i> , 2005
Chineses	123	38	0	0	Hodel <i>et al.</i> , 2013 ⁽¹⁾
Negros africanos	148	34	0	4,1	Hodel <i>et al.</i> , 2013 ⁽¹⁾
Caucasianos europeus	35	28,6	---	---	Lang <i>et al.</i> , 2001
Negros europeus	146	34	---	---	Wyen <i>et al.</i> , 2008 ⁽²⁾

N - Número total de pacientes;^{(1) e (2)} População estudada era portador de malária *falciparum* e HIV/AIDS, respectivamente; --- Não foi avaliado pelos autores.

Polimorfismos em isoformas do CYP têm sido considerados como fatores de riscos predisponentes ao desenvolvimento ou podem interferir na evolução clínica de diversas doenças. A maior parte dos estudos tem associado às variantes de CYP a patogêneses de diferentes tipos de câncer, entre os quais pulmão, estômago, esôfago e leucemia (*CYP2D6*4* / *CYP2C19*2* / *CYP2A6*4* / *CYP1A2*1F*) (YUAN *et al.*, 2011; TAMAKI *et al.* 2011; HUANG *et al.*, 2013; KRAJINOVIC *et al.*, 2013) . Outros têm avaliado o envolvimento dos genes polimórficos desse complexo enzimático na susceptibilidade ou na evolução clínica de doenças inflamatórias, infecciosas e crônicas, como a espondilite anquilosante (*CYP2D6*4*), porfiria cutânea tardia (*CYP1A2*1F*), tuberculose (*CYP2C19*3*), doença arterial coronariana (*CYP2C19*2*) e doença de Parkinson (ML de *CYP2D6*) (MCCANN *et al.*, 1997; BROWN *et al.*, 2000; FENG *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2012; WICKLIFFE *et al.*, 2011).

Esses estudos revelam que a importância do CYP pode estar além da farmacogenética, já que polimorfismos nessas enzimas podem atuar como coadjuvantes na patogênese ou mesmo interferir no prognóstico de muitas doenças, independente da introdução de terapia medicamentosa.

No caso específico da malária, já se sabe que alguns fatores genéticos ligados ao hospedeiro, p. ex. as hemoglobinopatias, oferecem riscos diferenciais ao desenvolvimento de gravidade a infecção pelo *Plasmodium* spp. Em nosso estudo observou-se que o número de portadores do *CYP2B6*6* foi maior entre os casos não grave (60 *versus* 31) da doença, embora essa diferença não fosse estatisticamente significativa ($p < 0,059$). Não foram observadas diferenças significativas entre a distribuição dos genótipos, o número de portadores do alelo *CYP2C8*3* e a gravidade da doença malárica. Já para o alelo *CYP2D6*4*, pode-se verificar que a frequência dos portadores desse polimorfismo foi maior no grupo grave, havendo uma associação significativa entre o genótipo heterozigoto e a gravidade da doença. E ainda, a chance do desenvolvimento de gravidade entre os pacientes portadores desse polimorfismo, neste estudo, foi 2,647 vezes maior se comparado aos não portadores (**Tabela 6**).

No entanto, por se tratar de um trabalho pioneiro e inovador na tentativa de associar os polimorfismos *CYP2B6*6*, *CYP2C8*3* e *CYP2D6*4* para a gravidade na doença malárica, não foi possível estabelecer se essas foram aleatórias ou se de fato houve relação significativa na evolução da doença malárica.

Tabela 6 – Frequência genotípica e alélica de *CYP2B6*6*, *CYP2C8*3* e *CYP2D6*4* em pacientes diagnosticados com malária vivax grave e não grave.

Alelo	Perfil Genético	Genótipo	Total de pacientes		Malária grave		Malária não grave		p ⁽¹⁾	p ⁽²⁾ RP(IC95%)
			(N)	% alelo	(N)	% alelo	(N)	% alelo		
<i>CYP2B6*6</i>	Selvagem	G/G	133		54		75		0,059	0,152 0,728(0,411-1,253)
	Portador	G/T	64	28,26	25	21,76	35	31,48		
		T/T	33		6		25			
	Total		230		85		135			
<i>CYP2C8*3</i>	Selvagem	G/G	192		73		111		0,180	0,180 0,608(0,254-1,454)
	Portador	G/A	30	6,7	8	9,87	20	15,27		
		A/A	0		0		0			
	Total		222		81		131			
<i>CYP2D6*4</i>	Selvagem	G/G	193		64		121		0,026	<0,01 2,647 (1,277- 5,485)
	Portador	G/A	35	8,87	19	13,52	14	5,88		
		A/A	3		2		1			
	Total		231		85		136			

N - Número total de pacientes; RP - razão de prevalência; IC – intervalo de confiança p⁽¹⁾ – Valor de p para diferenças entre o genótipo dos pacientes e gravidade da doença; p⁽²⁾ – Valor de p para diferenças entre o perfil genético dos pacientes e gravidade da doença; % alelo – alelo mutante.

5.3.2 Associações entre os polimorfismos estudados, as manifestações clínicas e os exames laboratoriais

Na **Tabela 7** estão sumarizadas as manifestações clínicas associadas aos alelos *CYP2B6*6* e *CYP2D6*4*, por gênero. Não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa para o alelo *CYP2C8*3*.

Associações entre as manifestações clínicas e os genótipos estudados revelaram que dos 3 pacientes afebris observados neste estudo, 2 foram heterozigotos para o *CYP2C8*3*, tal resultado foi estatisticamente significativo.

A ocorrência de calafrios foi significativamente menor ($p=0,04$) nos pacientes portadores do alelo *CYP2D6*4* do que no grupo selvagem. Do total pacientes genotipados como homozigotos para esse alelo, todos foram do gênero masculino e, 2 relataram não sentir calafrios, sendo essa relação estatisticamente significativa. Houve um aumento significativo no número médio de dias de calafrios, febre e mioartralgia relatados pelos pacientes portadores do alelo *CYP2B6*6* se comparado aos não portadores.

Na prática clínica a ocorrência de petéquias e gengivorragia indica deficiência plaquetária (LACERDA, 2007). A presença de petéquias foi significativamente menor nos portadores do alelo *CYP2D6*4* do que em não portadores ($p=0,024$).

A associação do aparecimento de hemoglobinúria e de leucocitúria entre os genótipos dos alelos estudados não apresentou dados estatísticos significativos, entretanto ao se considerar o gênero dos indivíduos, verificou-se que 50% das mulheres que não apresentaram hemoglobinúria era portadora do alelo *CYP2B6*6* em heterozigose. E que 60,71% dos homens que não apresentaram leucocitúria era portador

do genótipo selvagem, a análise dos resultados evidenciou uma associação estatisticamente significativa entre a ausência de hemoglobinúria nas mulheres e de leucocitúria nos homens com os genótipos mencionados para este alelo na população de estudo ($p < 0,01$).

Foi demonstrada uma associação significativa entre os pacientes do gênero masculino diagnosticados com malária não grave e o genótipo homocigoto para o *CYP2B6*6*.

Tabela 7 – Frequência genotípica dos alelos *CYP2B6*6*, *CYP2D6*4* entre os eventos clínicos e o gênero dos pacientes diagnosticados com malária vivax.

Alelo	Total	Masculino N (%)		Feminino N(%)	
		Sim	Não	Sim	Não
<i>CYP2B6*6</i>					
Hemoglobinúria					
G/G	73	8(11)	38(52,1)	6(8,2)	2(28,8)
G/T	39	5(12,8)	7(17,9)	1(2,6)	26(66,7)
T/T	18	0(0)	8(44,4)	5(27,8)	5(27,8)
Total	130	13(10)	53(40,8)	12(9,2)	52(40)
p	0,544		0,056		<0,01
<0,01					
<i>CYP2B6*6</i>					
Leucocitúria					
G/G	73	17(23,3)	29(39,7)	10(13,7)	17(23,3)
G/T	39	9(23,1)	3(7,7)	12(30,8)	15(38,5)
T/T	18	2(11,1)	6(33,3)	3(16,7)	7(38,9)
Total	130	28(21,5)	38(29,2)	25(19,2)	39(30)
p	0,108		0,034		0,698
0,011					
<i>CYP2B6*6</i>					
Malária grave					
G/G	131	38(29,5)	36(27,9)	16(12,4)	39(30,2)
G/T	60	11(18,3)	10(16,7)	14(23,3)	25(41,7)
T/T	31	2(6,5)	14(45,2)	4(12,9)	11(35,5)
Total	222	51(23,2)	60(27,3)	34(15,5)	75(34,1)
p	0,059		0,015		0,719
<0,01					
<i>CYP2D6*4</i>					
Calafrios					
G/G	185	80(43,2)	12(6,5)	90(48,6)	3(1,6)
G/A	32	13(40,6)	4(12,5)	14(43,8)	1(3,1)
A/A	3	1(33,3)	2(66,7)	0(0)	0(0)
Total	220	94(42,7)	18(8,2)	104(47,3)	4(1,8)
p	<0,01		0,030		0,513
0,014					

N- número total de pacientes

Ao associarmos os parâmetros hematológicos listados na **Tabela 8** com os polimorfismos pesquisados, por gênero, obtiveram-se resultados estatisticamente significativos. Em que, para o gênero masculino, a eritropenia ($He < 4,5 \times 10^6/\mu L$) esteve associada a não portadores do alelo *CYP2B6*6*, enquanto que níveis normais de eritrócitos estiveram associados aos portadores heterozigotos de *CYP2C8*3* e homozigotos de *CYP2D6*4*. A redução do hematócrito ($HCT < 40\%$) esteve associada ao genótipo selvagem de *CYP2D6*4*, enquanto que níveis normais foram associados aos portadores do alelo *CYP2D6*4* e *CYP2C8*3*. O grau de anisocitose ($RDW > 14\%$) foi maior entre os indivíduos do gênero masculino não portador do alelo *CYP2B6*6*.

Em nosso estudo verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre os níveis de reticulócitos e o alelo *CYP2D6*4*, em que os indivíduos portadores desse polimorfismo apresentaram níveis normais enquanto que os selvagens níveis aumentados ($> 3\%$) ($p=0,025$) (dados não mostrados).

A hemólise é uma manifestação clínica ocasionada pela infecção malárica, podendo levar a complicações sistêmicas graves e danos em órgão-alvos (DAI *et al.*, 2012). Além de a própria malária cursar com hemólise, o quadro pode ser agravado com uso de 8-aminoquinolonas, principalmente a primaquina. No entanto, este fármaco é o único agente antimalárico disponível para eliminar os hipnozoítos de *P.vivax* (ALEXANDRE *et al.*, 2010; RAMOS JÚNIOR *et al.*, 2010; SHEKALAGHE *et al.*, 2010).

O principal limitante do uso desse fármaco é sua hemotoxicidade, especialmente em pacientes portadores de deficiência em G6PD (ANDRADE *et al.*, 2010). Sabe-se que a hemotoxicidade das 8-aminoquinolonas é mediada pelas enzimas do citocromo

P450, isto é, os metabólitos responsáveis pelo dano nos eritrócitos são produtos do metabolismo desse fármaco via, p.ex., a isoforma CYP2D6 (GANESAN *et al.*, 2009).

Como já mencionado, polimorfismos em CYP2D6 foi associado a metabolizadores lentos (SACHSE *et al.*, 1997). A hemotoxicidade da primaquina, assim como a atividade farmacológica, também é dependente da biotransformação hepática. Portanto, do ponto de vista farmacológico, pode-se inferir que indivíduos portadores do alelo *CYP2D6*4* apresentariam níveis plasmáticos reduzidos dos metabólitos desse fármaco, com conseqüente redução na toxicidade hematológica. Assim, sabendo que, neste estudo, esse polimorfismo esteve associado a níveis normais de reticulócitos, eritrócitos e hematócrito e que sua ausência esteve associada a níveis alterados desses parâmetros no gênero masculino, ao ser instaurado o esquema terapêutico com a primaquina, poderíamos sugerir que os portadores desse polimorfismo, em especial aqueles com deficiência de G6PD, cursariam com quadros hemolíticos mais brandos.

Entretanto dada a complexidade dos fatores fisiopatogênicos envolvidos nas síndromes hemolíticas em portadores de malária, sabemos que tais dados não são suficientes para avaliar o impacto desses polimorfismos nesse evento clínico. Além disso, a complexidade que envolve a relação genótipo-metabolismo *in vivo* requer um estudo desenhado especificamente para esse fim.

Não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa entre os parâmetros bioquímicos dos pacientes incluídos neste estudo e os polimorfismos pesquisados.

Tabela 8 – Frequência genotípica dos alelos *CYP2B6*6*, *CYP2C8*3* e *CYP2D6*4* entre os parâmetros hematológicos e o gênero dos pacientes diagnosticados com malária vivax.

Alelo	Total	Masculino N (%)		Feminino N (%)	
Hemácia (x 10⁶/μL)					
CYP2B6*6		<4,5	<4,5	<4,5	<4,5
G/G	92	47(51,1)	10(10,9)	24(26,1)	11(12,0)
G/T	46	13(28,3)	1(2,2)	21(45,7)	11(23,9)
T/T	21	9(42,9)	1(4,8)	8(38,1)	3(14,3)
Total	159	69(43,4)	12(7,5)	53(33,3)	25(15,7)
p	0,809		0,556		0,904
0,036					
RDW (%)					
CYP2B6*6		< 14	>14	<14	>14
G/G	92	8(8,7)	49(53,3)	8(8,7)	27(29,3)
G/T	46	3(6,5)	11(23,9)	4(8,7)	28(60,9)
T/T	21	1(4,8)	9(42,9)	2(9,5)	9(42,9)
Total	159	12(7,5)	69(43,4)	14(8,8)	64(40,3)
p	0,913		0,706		0,544
0,028					
Hemácia (x 10⁶/μL)					
CYP2C8*3		<4,5	>4,5	<4,0	>4,0
G/G	135	59(43,7)	7(5,2)	45(33,3)	24(17,8)
G/A	16	6(37,5)	5(31,3)	5(31,3)	0(0)
Total	151	65(43)	12(7,9)	50(33,1)	24(15,9)
p	0,232		<0,01		0,132
<0,01					
Hematócrito (%)					
CYP2C8*3		<40	>40	<40	>40
G/G	135	58(43,0)	8(5,9)	54(40,0)	15(11,1)
G/A	16	6(37,5)	5(31,3)	5(31,3)	0(0)
Total	151	64(42,4)	13(8,6)	59(39,1)	15(9,9)
p	0,148		0,017		0,311
<0,01					
Hemácia (x 10⁶/μL)					
CYP2D6*4		<4,5	>4,5	<4,0	>4,0
G/G	132	58(43,9)	8(6,1)	46(34,8)	20(15,2)
G/A	26	11(42,3)	3(11,5)	7(26,9)	5(19,2)
A/A	2	0(0)	2(100)	0(0)	0(0)
Total	160	69(43,1)	13(8,1)	53(33,1)	25(15,6)
p	0,022		<0,01		0,438
<0,01					
Hematócrito (%)					
CYP2D6*4		<40	>40	<40	>40
G/G	132	57(43,2)	9(6,8)	55(41,7)	11(8,3)
G/A	26	11(42,1)	3(11,5)	8(30,8)	4(15,4)
A/A	2	0(0)	2(100)	0(0)	0(0)
Total	160	68(42,5)	14(8,8)	63(39,4)	15(9,4)
p	<0,01		<0,01		0,178
<0,01					

N - número total de pacientes

5.4 Limitações e perspectivas

A falta de informação sobre os dados hematológicos, bioquímicos e a parasitemia durante e após a instauração da farmacoterapia nos pacientes incluídos nesse estudo, somados a escassez de dados na literatura sobre a influência desses polimorfismos no metabolismo dos antimaláricos de uso corrente em nossa região foram fatores limitantes para avaliarmos o desfecho dos polimorfismos estudados na terapêutica dos pacientes portadores de malária vivax. Este estudo foi pioneiro ao descrever a frequência dos alelos *CYP2B6**6, *CYP2C8**3 e *CYP2D6**4 em pacientes portadores de malária vivax e avaliar a relação de tais polimorfismos a gravidade da doença, entretanto há de se comentar a importância de se desenvolver estudos futuros focados na avaliação do impacto do perfil farmacogenético no metabolismo dos antimaláricos, especialmente a primaquina, único fármaco disponível usado no tratamento e prevenção de recaídas pelo *P. vivax*, e também para a confirmação e esclarecimento das associações encontradas neste estudo, pois somente assim será possível prever qual é a real contribuição desses fatores genéticos no desfecho da doença malárica.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados neste estudo, pode-se concluir que:

1. As frequências dos alelos *CYP2B6*6*, *CYP2C8*3* e *CYP2D6*4* nos pacientes portadores de malária vivax foram de 28,26%, 6,7%, 8,87%, respectivamente. De maneira geral, as frequências encontradas estão de acordo com outros relatos descritos na literatura para diferentes populações.

2. O alelo *CYP2D6*4* foi o mais prevalente entre os pacientes que desenvolveram gravidade à doença malárica. As frequências dos alelos *CYP2B6*6* e *CYP2C8*3* não foram diferentes entre os grupos grave e não grave.

3. Houve associação significativa entre indivíduos portadores heterozigotos para o *CYP2D6*4* e casos graves da doença malárica.

4. A contagem normal para reticulócitos foi associada aos portadores do alelo *CYP2D6*4*.

5. Indivíduos do gênero masculino portadores dos alelos *CYP2C8*3* e *CYP2D6*4* foram associados significativamente a níveis normais de eritrócitos e de hematócrito.

8. REFERÊNCIAS

AITKEN, A.E.; MORGAN, E.T. Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.*, v.35, p.1687–1693, 2007.

AKHTAR, S.; GUMASHTA, R.; MAHORE, S.; MAIMOON, S. Hematological changes in malária: A comparative study. *Journ. Pharm. and Biolog. Scien.*, v.2(4), p.15-19, 2012.

AKINYINKA, O.O.; SOWUNMI, A.; HONEYWELL, R.; RENWICK, A.G.; The effects of acute falciparum malária on the disposition of caffeine and the comparison of saliva and plasma-derived pharmacokinetic parameters in adult Nigerians. *Eur J Clin Pharmacol.*, v. 56(2), p.159-65, 2000.

ALECRIM; M.G.C. Estudo clínico, resistência e polimorfismo parasitário na malária pelo Plasmodium vivax, em Manaus (AM). Doutorado (Tese). Brasília: Universidade de Brasília, 2000.

ALEXANDRE, M.A.; FERREIRA, C.O.; SIQUEIRA, A.M.; MAGALHÃES, B.L.; MOURÃO, M.P.; LACERDA, M.V.; ALECRIM, M.G. Severe Plasmodium vivax malária, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.*, v.16(10), p.1611-4, 2010.

ALONSO, P.L.; BROWN, G.; AREVALO-HERRERA, M.; BINKA, F.; CHITNIS, C.; COLLINS, F.; DOUMBO, O.K.; GREENWOOD, B.; HALL, B.F.; LEVINE, M.M.; MENDIS, K.; NEWMAN, R.D.; PLOWE, C.V.; RODRÍGUEZ, M.H.; SINDEN, R.; SLUTSKER, L.; TANNER, M. A research agenda to underpin malária eradication. *PLoS Med.*, v. 8(1), p.1000406, 2011.

ALVES, F.P., DURLACHER, R.R., MENEZES, M.J., KRIEGER, H., SILVA, L.H., CAMARGO, E.P., High prevalence of asymptomatic Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum infections in native Amazonian populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.66, p.641-648, 2002.

ANDRADE, B.B.; ARAÚJO-SANTOS, T.; LUZ, N.F.; KHOURI, R.; BOZZA, M.T.; CAMARGO, L.M.; BARRAL, A.; BORGES, V.M.; BARRAL-NETTO, M. Heme impairs prostaglandin E2 and TGF-beta production by human mononuclear cells via

Cu/Zn superoxide dismutase: insight into the pathogenesis of severe malária. *J. Immunol.*, v.185(2), p.1196-204, 2010.

ANDRADE, B.B.; BARRAL-NETTO, M. Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malária. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.106(1), p.70-8, 2011.

ARENAZ, I.; VICENTE, J.; FANLO, A.; VÁSQUEZ, P.; MEDINA, J.C.; CONDE, B.; GONZÁLEZ-ANDRADE, F.; SINUÉS, B. Haplotype structure and allele frequencies of CYP2B6 in Spaniards and Central Americans. *Fundam Clin Pharmacol.*, v.24(2), p.247-53, 2010.

ARIYOSHI, N.; OHARA, M.; KANEKO, M.; AFUSO, S.; KUMAMOTO, T.; NAKAMURA, H. Q172H replacement overcomes effects on the metabolism of cyclophosphamide and efavirenz caused by CYP2B6 variant with Arg262. *Drug Metab Dispos.*, v.39, p.2045–2048, 2011.

AUDI, E. A.; PUSSI, F.D. Isoenzimas do CYP450 e biotransformação de drogas. *Acta Scientiarum*, v. 22(2), p.599-604, 2000.

AUTINO, B.; CORBETT, Y.; CASTELLI, F.; TARAMELLI, D. Pathogenesis of malária in tissues and blood. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. v.4(1):p.61, 2012.

BAUER, T.; BOUMAN, H.J.; VAN WERKUM, J.W.; FORD, N.F.; TEN BERG, J.M.; TAUBERT, D. Impact of CYP2C19 variant genotypes on clinical efficacy of antiplatelet treatment with clopidogrel: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. V.4, p. 343, 2011.

BAHADUR, N.; LEATHART, J. B. S.; MUTCH, E.; STEIMEL-CRESPI, D.; DUNN, S. A.; GILISSEN, R. CYP2C8 polymorphisms in Caucasians and their relationship with paclitaxel 6 alpha-hydroxylase activity in human liver microsomes. *Biochem.Pharmacol.*, v.64, p.1579–1589, 2002.

BHAWNA, S.; BHARTI, A.; YOGESH, K.; REENA, A. Parasitemia and Hematological Alterations in Malária: A Study from the Highly Affected Zones. *Iran. Jour. of Pathol.*, v. 8(1), p.1- 8, 2013.

BOLCHOZ, L.J.; BUDINSKY, R.A.; MCMILLAN, D.C.; JOLLOW, D.J. Primaquine-induced hemolytic anemia: formation and hemotoxicity of the arylhydroxylamine metabolite 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.297, p. 509–515, 2001.

BONICKE, R.; REIF, W. Enzymatic inactivation of isonicotinic acid hydrazide in human and animal organism. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, v.220, p.321–323, 1953.

BOWMAN, Z.S.; JOLLOW, D.J.; MCMILLAN, D.C. Primaquine-induced hemolytic anemia: role of splenic macrophages in the fate of 5-hydroxyprimaquine-treated rat erythrocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.315, p.980–986, 2005.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K. L. GOODMAN & GILMAN. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. N. 1, v. 44, 2013. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Abr/12/boletim_1_d_e_2013_malária.pdf> . Acesso em: 25/07/2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Terapêutica da Malária. 1ª ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Nota técnica nº.26 CGPNCM/DEVEP/SVS/MS. Brasília: 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1526>. Acesso em: 09/03/2012.

BROWN, M.A.; EDWARDS, S.; HOYLE, E.; CAMPBELL, S.; LAVAL, S.; DALY, A.K.; PILE, K.D.; CALIN, A.; EBRINGER, A.; WEEKS, D.E.; WORDSWORTH, B.P. Polymorphisms of the CYP2D6 gene increase susceptibility to ankylosing spondylitis. *Hum Mol Genet.*, v.9(11), p.1563-6, 2000.

CAVACO, I.; STROMBERG-NORKLIT, J.; KANEKO, A.; MSELLEM, M.I.; DAHOMA, M.; RIBEIRO, V.L.; BJORKMAN, A.; GIL, J.P. CYP2C8 polymorphism

frequencies among malária patients in Zanzibar.*Eur J Clin Pharmacol.*, v.61, p.15–8, 2005.

CAVACO, I.;PIEADADE, R.; GIL, J.P.; RIBEIRO, V. CYP2C8 polymorphism among the Portuguese.*Clin Chem Lab Med.*, v.44(2), p.168-70, 2006.

CAIRNS, W.; SMITH, C. A.; MCLAREN, A. W.; WOLF, C. R. Characterization of the human cytochrome P4502D6 promoter. A potential role for antagonistic interactions between members of the nuclear receptor family.*J Biol Chem.*, v.271, p.25269–25276, 1996.

CARVALHO, R.S, FRIEDRICH, K.; DE-OLIVEIRA, A.C.; SUAREZ-KURTZ, G.; PAUMGARTTEN, F.J.Malária downmodulates mRNA expression and catalytic activities of CYP1A2, 2E1 and 3A11 in mouse liver.*Eur J Pharmacol.*, v.616(1-3), p. 265-9, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTIONS – CDC/USA.Malária Map Application. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malária/map/index.html>>. Acesso em: 09/03/2012.

CHIBA, K.; KATO, M.; ITO, T.; SUWA, T.; SUGIYAMA, Y.Inter-individual variability of in vivo CYP2D6 activity in different genotypes.*Drug Metab Pharmacokinet.*, 2012.

CHIDA, M.; YOKOI, T.; FUKUI, T.; KINOSHITA, M.; YOKOTA, J.; KAMATAKI, T. Detection of three genetic polymorphisms in the 5'-flanking region and intron 1 of human CYP1A2 in the Japanese population.*Jpn. J. Cancer*, v. 90, p.899-902, 1999.

CHEN, M.; LIU, X.J.; YAN, S.D.; PENG, Y.; CHAI, H.; LI, Q.; WEI, J.F.; XU, Y.N.; HUANG, D.J. Association between cytochrome P450 2C19 polymorphism and clinical outcomes in Chinese patients with coronary artery disease.*Atherosclerosis*, v.220(1), p.168-71, 2012.

COSTA, F.T.;LOPES, S.C.; FERRER, M.; LEITE, J.A.; MARTIN-JAULAR, L.; BERNABEU, M.; NOGUEIRA, P.A.; MOURÃO, M.P.; FERNANDEZ-BECERRA, C. LACERDA, M.V.; DEL PORTILLO, H. On cytoadhesion of Plasmodium vivax: raison d'être?*Mem Inst Oswaldo Cruz.*, v.106(1), p.79-84, 2011.

COSTA, F.T.; LOPES, S.C.; ALBRECHT, L.; ATAÍDE, R.; SIQUEIRA, A.M.; SOUZA, R.M.; RUSSELL, B.; RENIA, L.; MARINHO, C.R.; LACERDA, M.V. On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malária: perspectives from the Brazilian field. *Int J Parasitol.* v.42(12)p.1099-105, 2012.

CROOM, E.L.; STEVENS, J.C.; HINES, R.N.; WALLACE, A.D., HODGSON, E. Human hepatic CYP2B6 developmental expression: the impact of age and genotype. *BiochemPharmacol.*, v. 78, p.184–190, 2009.

DAI, D.; ZELDIN, D.C.; BLAISDELL, J.A.; CHANAS, B.; COULTER, S.J.; GHANAYEM, B.I.; GOLDSTEIN, J.A. Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics.*, v.11, p.597-607, 2001.

DAILY, E.B; AQUILANTE, C.L. Cytochrome P450 2C8 pharmacogenetics: a review of clinical Studies. *Pharmacogenomics*, v.10(9), p. 1489–1510, 2009.

DESTA, Z.; ZHAO, X.; SHIN, J.G.; FLOCKHART, D.A. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet.*, v.41(12), p.913-58, 2002.

DOBRINAS, S.M; CRETTOL, S.V.; ONEDA, B.; LAHYANI, R.; ROTGER, M. CHOONG, E.; LUBOMIROV, R.; CSAJKA, C.; EAP, C.B. Contribution of CYP2B6 alleles in explaining extreme (S)-methadone plasma levels: a CYP2B6 gene resequencing. *Pharmacogenetics and Genomics*, v.23, p.84–93, 2013.

DUARTE, E.C.; PANG, L.W; RIBEIRO, L.C.; FONTES, C.J. Association of subtherapeutic dosages of a standard drug regimen with failures in preventing relapses of vivax malária. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.65(5), p.471–476, 2001.

EAP, C.B.; BENDER, S.; JAQUENOUD SIROT, E.; CUCCHIA, G.; JONZIER-PEREY, M.; BAUMANN, P.; ALLORGE, D.; BROLY, F. Nonresponse to clozapine and ultrarapid CYP1A2 activity: clinical data and analysis of CYP1A2 gene. *J Clin Psychopharmacol.*, v.24, p. 214–9, 2004.

EICHELBAUM, M.; SPANNBRUCKER, N.; DENGLER, H. J. Proceedings: N-oxidation of sparteine in man and its interindividual differences. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, v.287, p.94, 1975.

FEIDT, D.M.; KLEIN, K.; HOFMANN, U.; RIEDMAIER, S.; KNOBELOCH, D.; THASLER, W.E. Profiling induction of cytochrome p450 enzyme activity by statins using a new liquid chromatography-tandem mass spectrometry cocktail assay in human hepatocytes. *DrugMetab.Dispos.*, v.38, p.1589–1597, 2010.

FENG, W.X.; LIU, F.; GU, Y.; JIAO, W.W.; SUN, L.; XIAO, J.; WU, X.R.; MIAO, Q.; SHEN, C.; SHEN, D.; SHEN, A. Functional polymorphisms in CYP2C19 & CYP3A5 genes associated with decreased susceptibility for paediatric tuberculosis. *Indian J Med Res.*, v.135(5), p.642-9, 2012.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. Farmacologia Clínica – Fundamentos da Terapêutica Racional, 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

GANESAN, S.; TEKWANI, B.L.; SAHU, R.; TRIPATHI, L.M.; WALKER, L.A. Cytochrome P(450)-dependent toxic effects of primaquine on human erythrocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.*, v.241(1), p.14-22, 2009.

GANESAN, S.; CHAURASIYA, N.D.; SAHU, R.; WALKER, L.A.; TEKWANI, B.L. Understanding the mechanisms for metabolism-linked hemolytic toxicity of primaquine against glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes: Evaluation of eryptotic pathway. *Toxicology.*, v.294(1), p.54-60, 2012.

GARROD, A. E. About Alkaptonuria. *Med. Chir. Trans.*, v. 85, p.69–78, 1902.

GOEDDE, H.W. Genetic aspects in the metabolism of drugs and environmental agents. *Ann Biol Clin.*, v.36(3), p.181-9, 1978.

GOUNDEN, V.; VAN NIEKERK, C.; SNYMAN, T.; GEORGE, J.A. Presence of the CYP2B6 516G> T polymorphism, increased plasma Efavirenz concentrations and early neuropsychiatric side effects in South African HIV-infected patients. *AIDS Res Ther.*, v. 19, p.7-32, 2010.

GOLDSTEIN, J.A. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol.*, v.52, p.349–355, 2001.

GOLLER, J.L.; JOLLEY, D; RINGWALD, P.; BIGGS, B.A. Regional differences in the response of Plasmodium vivax malária to primaquine as anti-relapse therapy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.76(2), p.203–207, 2007.

GUSMÁN, V.; CARMONA-FONSECA, J. Cytochrome P-450 and the response to antimalarial drugs. *Rev Panam Salud Publica*. v.19(1), p. 9-22, 2006.

HARMSZE, A.M.; VAN WERKUM, J.W.; HACKENG, C.M.; RUVEN, H.J.; KELDER, J.C.; BOUMAN, H.J.; BREET, N.J.; TEN BERG, J.M.; KLUNGEL, O.H.; DE BOER, A.; DENEER, V.H. The influence of CYP2C19*2 and *17 on on-treatment platelet reactivity and bleeding events in patients undergoing elective coronary stenting. *Pharmacogenet Genomics*, v.22(3):169-75, 2012.

HAAS, D.W.; RIBAUDO, H.J.; KIM, R.B.; TIERNEY, C.; WILKINSON, G.R.; GULICK, R.M. Pharmacogenetics of efavirenz and central nervous system side effects: an Adult AIDS Clinical Trials Group study. *Aids*, v.18, p. 2391–2400, 2004.

HELLGREN, U.; ERICSSON, O.; KIHAMIA, C.M.; ROMBO, L. Malaria parasites and chloroquine concentrations in Tanzanian schoolchildren. *Trop. Med. Parasitol.*, v.45(4), p.293–297, 1994.

HODEL, E.M.; LEY, S.D.; QI, W.; ARIEY, F.; GENTON, B.; BECK, H.P. A microarray-based system for the simultaneous analysis of single nucleotide polymorphisms in human genes involved in the metabolism of anti-malarial drugs. *Malar J.*, v.9, p.8:285, 2009.

HOFMANN, M.H.; BLIEVERNICH, J.K.; KLEIN, K.; SAUSSELE, T.; SCHAEFFELER, E.; SCHWAB, M.; ZANGER, U.M. Aberrant splicing caused by single nucleotide polymorphism c.516G>T [Q172H], a marker of CYP2B6*6, is responsible for decreased expression and activity of CYP2B6 in liver. *J Pharmacol Exp Ther.*, v.325(1), p.284-92, 2008.

HONDA, M.; MUROI, Y.; TAMAKI, Y.; SAIGUSA, D.; SUZUKI, N.; TOMIOKA, Y.; MATSUBARA, Y.; ODA, A.; HIRASAWA, N.; HIRATSUKA, M. Functional characterization of CYP2B6 allelic variants in demethylation of antimalarial artemether. *Drug Metab Dispos*. v.39(10), p.1860-5, 2011.

HUANG, F.M.; CHEN, H.C.; KHAN, M.A.; YANG, F.L.; WAN, X.X.; XU, A.H.; OUYANG, F.D.; ZHANG, D.Z. CYP2A6, CYP1A1 and CYP2D6 polymorphisms in lung cancer patients from Central South China. *Med Oncol*. v.30(2), p.521, 2013.

HSIEH, K. P.; LIN, Y.Y.; CHENG, C.L.; LAI, M.L.; LIN, M.S.; SIEST, J.P.; HUANG, J.D. Novel mutations of CYP3A4 in Chinese. *Drug Metab Dispos*. v.29(3), p.268-73, 2001.

INGELMAN-SUNDBERG, M. Implications of polymorphic cytochrome P450-dependent drug metabolism for drug development. *Drug.Metab.Dispos.*, v.29(4), p. 570-3, 2001.

INGELMAN-SUNDBERG, M. 2004 Human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, v.369, p.89-104, 2004.

INGELMAN-SUNDBERG, M.; RODRIGUEZ-ANTONA, C. Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, v.360, p.1563-1570, 2005.

INGELMAN-SUNDBERG, M.; SIMA, S.C.; GOMEZ, A.; RODRIGUEZ-ANTONA, C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther.*, v.116, p.496-526, 2007.

JEOVANIO-SILVA, A.L.; MONTEIRO, T.P.; EL-JAICK, K.B.; DO BRASIL, P.E.; ROLLA, V.C.; DE CASTRO, L. Unique CYP3A4 genetic variant in Brazilian tuberculosis patients with/without HIV. *Mol Med Report.*, v.5(1), p.153-61, 2012.

JOHANSSON, I.; INGELMAN-SUNDBERG M. Genetic Polymorphism and Toxicology-with Emphasis on Cytochrome P450. *Toxicological sciences*, v.120(1), p.1-13, 2011.

KAGIMOTO, M.; HEIM, M.; KAGIMOTO, K.; ZEUGIN, T.; MEYER, U.A. Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. *J Biol Chem*, v. 265(28), p.17209-214, 1990.

KANEKO, A.; BERGQVIST, Y.; TAKECHI, M.; KALKOA, M.; KANEKO, O.; KOBAYAKAWA, T.; ISHIZAKI, T.; BJÖRKMAN, A. Intrinsic efficacy of proguanil against falciparum and vivax malaria independent of the metabolite cycloguanil. *J Infect Dis.*, v.179(4), p.974-9, 1999.

KARUNAWEERA, N.D.; WIJESEKERA, S.K.; WANASEKERA, D.; MENDIS, K.N.; CARTER, R. The paroxysm of Plasmodium vivax malaria. *Trends Parasitol.*, v.19(4), p.188-93, 2003.

KASPERA, R.; NARAHARISETTI, S.B.; EVANGELISTA, E.A.; MARCIANTE, K.D.; PSATY, B.M.; TOTAH, R.A. Drug metabolism by CYP2C8.3 is determined by substrate dependent interactions with cytochrome P450 reductase and cytochrome b5. *Biochem Pharmacol.*, v.82, p.681–691, 2011.

KATZUNG, B.G. Farmacologia Básica & Clínica 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

KERB, R.; FUX, R.; MÖRIKE, K.; KREMSNER, P.G.; GIL, J.P.; GLEITER, C.H.; SCHWAB, M. Pharmacogenetics of antimalarial drugs: effect on metabolism and transport. *Lancet Infect Dis.*, v.9(12), p.760-74, 2009.

KIRCHGATTER, K; PORTILLO, H.A. Clinical and molecular aspects of severe malária. *An Acad Bras Cienc.*, v.77(3), p.455-475, 2005.

KIM, A.K; PARK, J.Y; LEE, J.S.; LIM, S. Cytochrome P450 2C8 and CYP3A4/5 are Involved in Chloroquine Metabolism in Human Liver Microsomes. *Arch Pharm Res.*, v.26(8), p.631-637, 2003.

KOCHAR, D.K.; SAXENA, V.; SINGH, N.; KOCHAR, S.K.; KUMAR, S.V.A. Plasmodium vivax malária. *Emerg Infect Dis.*, v.11(1), p.132-4, 2005.

KOCHAR, D.K.; TANWAR, G.S.; KHATRI, P.C.; KOCHAR, S.K.; SENGAR, G.S.; GUPTA, A.; KOCHAR, A.; MIDDHA, S.; ACHARYA, J.; SAXENA, V.; PAKALAPATI, D.; GARG, S.; DAS, A: Clinical features of children hospitalized with malária-a study from Bikaner, northwest India. *Am J Trop Med Hyg*, v.83, p.981-989, 2010.

KRAJINOVIC, M.; LABUDA, D.; RICHER, C.; KARIMI, S.; SINNETT, D. Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Leukemia*, v.93(5), p.1496-501, 1999.

KRUDSOOD, S.; WILAIRATANA, P.; TANGPUKDEE, N.; CHALERMRUT, K.; SRIVILAIRIT, S.; THANACHARTWET, V.; MUANGNOICHAROEN, S.; LUPLERTLOP, N.; BRITTENHAM, G.M.; LOOAREESUWAN, S. Safety and tolerability of elubaquine (bulaquine, CDRI 80/53) for treatment of Plasmodium vivax malária in Thailand. *Korean J Parasitol.*, v. 44(3), p. 221-228, 2006.

LACERDA, M.V.; MOURÃO, M.P.; ALEXANDRE, M.A.; SIQUEIRA, A.M.; MAGALHÃES, B.M.; MARTINEZ-ESPINOSA, F.E.; FILHO, F.S.; BRASIL, P.; VENTURA, A.M.; TADA, M.S.; COUTO, V.S.; SILVA, A.R.; SILVA, R.S.; ALECRIM, M.G. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malária: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J.*, v9, p.11-12, 2012.

LACERDA, M.V.G. Manifestações clínicas e patogênese da plaquetopenia na malária. Doutorado (Tese). Brasília: Universidade de Brasília, 2007.

LANG, T.; KLEIN, K.; FISCHER, J.; NÜSSLER, A.K.; NEUHAUS, P.; HOFMANN, U.; EICHELBAUM M.; SCHWAB, M.; ZANGER, U.M. Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics*. v.11(5)p.399-415, 2001.

LARES-ASSEFF, I.; TRUJILLO-JIMÉNEZ, F. La farmacogenética y su importancia en la clínica. *Gaceta Médica de México*, v.137(3), p.227-236, 2001.

LI, X.Q.; BJORKMAN, A.; ANDERSSON, T.B.; GUSTAFSSON, L.L.; MASIMIREMBWA, C.M. Identification of human cytochrome P(450)s that metabolise anti-parasitic drugs and predictions of in vivo drug hepatic clearance from in vitro data. *Eur J Clin Pharmacol.*, v.59(5), p.429-42, 2003.

LOMAR, A.V.; VIDAL, J.E.; LOMAR, F.P.; BARBAS, C.V.; MATOS, G.J.; BOULOS, M. Acute respiratory distress syndrome due to vivax malária: case report and literature review. *Braz J Infect Dis.*, v.9(5), p.425-30, 2006.

LATIF, N.; EJAZ, M.S.; HANIF, S.; MEMON, H. Clinical and hematological pattern in patients with plasmodium vivax. *Quart. Medic. Chan.*, v.1, p48-51, 2012.

MACIEL, M.E.; OLIVEIRA, F.K.; PROPST, G.B.; DA GRAÇA BICALHO, M.; CAVALLI, I.J.; RIBEIRO, E.M. Population analysis of xenobiotic metabolizing genes in South Brazilian Euro and Afro-descendants. *Genet Mol Biol.* v.32(4), p.723-8, 2009.

MADLENSKY, L.; NATARAJAN, L.; TCHU, S.; PU, M.; MORTIMER, J.; FLATT, S. W. Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clin Pharmacol Ther.*, v. 89, p.718-725, 2011.

MCMILLAN, D.C.; POWELL, C.L.; BOWMAN, Z.S.; MORROW, J.D.; JOLLOW, D.J. Lipids versus proteins as major targets of pro-oxidant, direct-acting hemolytic agents. *Toxicol.Sci.*, v.88, p.274–283, 2005.

MCCANN, S.J.; POND, S.M.; JAMES, K.M.; LE COUTEUR, D.G. The association between polymorphisms in the cytochrome P-450 2D6 gene and Parkinson's disease: a case-control study and meta-analysis. *J Neurol Sci.*, v.153(1), p.50-3, 1997.

Medicines for Malária Venture - MMV. Disponível em: <<http://www.mmv.org/newsroom/press-releases/one-step-closer-blocking-transmission-malaria>>. Acesso em: 10/03/2012.

MEHLOTRA, R.K.;ZIATS, M.N.; BOCKARIE, M.J.; ZIMMERMAN, P.A. Prevalence of CYP2B6 alleles in malária-endemic populations of West Africa and Papua New Guinea. *Eur. J Clin Pharmacology.*,v.62(4), p.267-75, 2006.

MEHLOTRA, R.K.; HENRY-HALLDIN, C.N.; ZIMMERMAN, P.A. Application of pharmacogenomics to malária: a holistic approach for successful chemotherapy. *Pharmacogenomics*, v.10(3), p.435-49, 2009.

MITCHELL, R.S.; RIEMENSNIDER, D.K.; HARSCH, J.R.; BEL, J.C. New information on the clinical implications of individual variations in the metabolic handling of antituberculous drugs particularly isoniazid. Trans. 17th . Conf. Chemother. Tuberc. Washington D.C. US. Veterans Adm. Army Navy, p.77-85, 1958.

MOHAPATRA, M.K.; PADHIARY, K.N.; MISHRA, D.P.; SETHY, G. Atypical manifestations of Plasmodium vivax malária. *Indian J Malariol.*,v.39(1-2), p.18-25, 2002.

MOSES, O.; JOHNKENNEDY, N. The Alteration of Serum Glucose, Urea and Creatinine Level of Malária Patients in Obowo Local Government Area of Imo State Nigeria. *Int. Jour. Advan. Med.*,v.1, p.1-6, 2013.

MURAYAMA, N.; SOYAMA, A.; SAITO, Y.; NAKAJIMA, Y.; KOMAMURA, K.; UENO, K.; KAMAKURA, S.; KITAKAZE, M.; KIMURA, H.; GOTO, Y.; SAITOH, O.; KATOH, M.; OHNUMA, T.; KAWAI, M.; SUGAI, K.; OHTSUKI, T.; SUZUKI, C.; MINAMI, N.; OZAWA, S.; SAWADA, J. Six Novel Nonsynonymous CYP1A2 Gene Polymorphisms: Catalytic Activities of the Naturally Occurring Variant Enzymes. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 308(1), p.12-19, 2004.

MUTHIAN, Y.D.; LEE, W.L.; TEH, L.K.; ONG, C.E.; ISMAEL, R. Genetic polymorphism of CYP2C8 in three Malaysian ethnics: *CYP2C8*2* and *CYP2C8*3* are found in Malaysian Indians. *J. Clin. Pharm. Ther.*, v.30, p.487-490, 2005.

NAKAJIMA, M.; KOMAGATA, S.; FUJIKI, Y.; KANADA, Y.; EBI, H.; ITOH, K. Genetic polymorphisms of CYP2B6 affect the pharmacokinetics/pharmacodynamics of cyclophosphamide in Japanese cancer patients. *Pharmacogenet. Genomics*, v.17, p.431-445, 2007.

NELSON, D.R.; KAMATAKI, T.; WAXMAN, D.J.; GUENGERICH, F.P.; ESTABROOK, R.W.; FEYEREISEN, R.; GONZALEZ, F.J.; COON, M.J.; GUNSALUS, I.C.; GOTOH, O.; *et al.* The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* v.6(1), p.1-43, 1993.

NEVES, D.P. Parasitologia dinâmica. 3ª ed. Editora: Atheneu, 2009.

OLIVEIRA, R.A.G. Hemograma: como fazer e interpretar. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2007.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M.V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J.L.; TAUIL P.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Malária in Brazil: an overview. *Malar J.*, v.9, p.115, 2010.

ORLLANA, M. B.; GUAJARDO, V.T. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Rev Méd Chile*, v.132, p.85-94, 2004.

PAGANOTTI, G.M.; GALLO, B.C.; VERRA, F.; SIRIMA, B.S.; NEBIÉ, I.; DIARRA, A.; COLUZZI, M.; MODIANO, D. Human genetic variation is associated with Plasmodium falciparum drug resistance. *J Infect Dis.*, v.204(11), p.1772-8, 2011.

PARIKH, S.; OUEDRAOGO, J.B.; GOLDSTEIN, J.A.; ROSENTHAL, P.J.; KROETZ, D.L. Amodiaquine metabolism is impaired by common polymorphisms in CYP2C8: implications for malaria treatment in Africa. *Clin Pharmacol Ther.* v.82(2), p.197-203, 2007.

PARKINSON, A. Biotransformation of Xenobiotics. In: Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons, 6th edition, International Edition, McGraw-Hill, p.133-224, 2001.

PIRMOHAMED, M.; MADDEN, S.; PARK, K. idiosyncratic Drug Reactions. *Clin Pharmacokinet.*, v.31, p.21-30, 1996.

POESPOPRODJO, J.R.; FOBIA, W.; KENANGALEM, E.; LAMPAH, D.A.; HASANUDDIN, A.; WARIKAR, N.; SUGIARTO, P.; TJITRA, E.; ANSTEY, N.M.; PRICE, R.N. Vivax malária: a major cause of morbidity in early infancy. *Clin Infect Dis.*, v.48(12), p.1704-12, 2009.

PYBUS, B.S.; MARCSISIN, S.R.; JIN, X.; DEYE, G.; SOUSA, J.C.; LI, Q.; CARIDHA, D.; ZENG, Q.; REICHARD, G.A.; OCKENHOUSE, C.; BENNETT, J.; WALKER, L.A.; OHRT, C.; MELENDEZ, V. The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP 2D6. *Malar J.*, v.12(1), p.212, 2013.

PROJEAN, D.; BAUNE, B.; FARINOTTI, R.; FLINOIS, J.P.; BEAUNE, P.; TABURET, A.M.; DUCHARME, J. In vitro metabolism of chloroquine: identification of CYP2C8, CYP3A4, and CYP2D6 as the main isoforms catalyzing N-desethylchloroquine formation. *Drug Metab Dispos.*, v.31(6), p.748–54, 2003.

RAMOS JÚNIOR, W.M.;SARDINHA, J.F.; COSTA, M.R.; SANTANA, M.S.; ALECRIM, M.G.; LACERDA, M.V. Clinical aspects of hemolysis in patients with P. vivax malária treated with primaquine, in the Brazilian Amazon. *Braz J Infect Dis.*, v.14(4), p.410-2, 2010.

RAUNIO, H.; RAUTIO, A.; GULLSTÉN, H.; PELKONEN, O. Polymorphisms of CYP2A6 and its practical consequences. *Br J Clin Pharmacol.*, v.52(4), p.357-63, 2001.

REEVE, P. A.; TOALIU, A.; KANEKO, J. J.; GANCZAKOWSKI, M. Acute intravascular haemolysis in Vanuatu following a single dose of primaquine in individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *J. Trop. Med. Hyg.*, v.95, p.349–351, 1992.

RODRÍGUEZ-ANTONA, C.; SAYI, J.G.; GUSTAFSSON, L.L.; BERTILSSON, L.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Phenotype-genotype variability in the human CYP3A locus as assessed by the probe drug quinidine and analyses of variant CYP3A4 alleles. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 338(1), p. 299-305, 2005.

RODRIGUEZ-ANTONA, C.; GOMEZ, A.; KARLGREN, M.; SIM, S. C.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Molecular genetics and epigenetics of the cytochrome P450 gene family and its relevance for cancer risk and treatment. *Hum Genet.*, v. 127, p.1–17, 2010.

RODRIGUEZ-MORALES, A.J.; SANCHEZ, E.; VARGAS, M.; *et al.* Occurrence of thrombocytopenia in Plasmodium vivax malária. *Clin Infect Dis.*, v.41, p.130-131, 2005.

RODRIGUEZ-MORALES, A.J.; SÁNCHEZ, E.; VARGAS, M.; PICCOLO, C.; COLINA, R.; ARRIA, M. Anemia and thrombocytopenia in children with Plasmodium vivax malária. *J Trop Pediatr.*, v.52(1), p.49-51, 2006.

ROSSINI, A.;LIMA, S.S.; RAPOZO, D.C.; FARIA, M.; ALBANO, R.M.; PINTO, L.F. CYP2A6 and CYP2E1 polymorphisms in a Brazilian population living in Rio de Janeiro. *Braz J Med Biol Res.*, v39(2), p.195-201, 2006.

RÖWER, S.;BIENZLE, U.; WEISE, A.; LAMBERTZ, U.; FORST, T.; OTCHWEMAH, R.N.; PFÜTZNER, A.; MOCKENHAUPT, F.P. Short communication: high prevalence of the cytochrome P450 2C8*2 mutation in Northern Ghana. *Trop Med Int Health.*v.10(12), p.1271-3, 2005.

ROWLAND, M.; TOZER, T.N. Clinical Pharmacokinetics - Concepts and Applications. 3 ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1995.

SACHSE, C.; BROCKMÖLLER, J.; BAUER, S.; ROOTS, I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am. J. Hum. Genet.*v.60, p.284–295, 1997.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 72, n.12, p. 5463-7, 1977.

SANTOS, P.C.;SOARES, R.A.; SANTOS, D.B.; NASCIMENTO, R.M.; COELHO, G.L.; NICOLAU, J.C.; MILL, J.G.; KRIEGER, J.E.; PEREIRA, A.C. CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population. *BMC Med Genet.* v.19, p.12-13, 2011.

SARAVU, K.; DOCHERLA, M.; VASUDEV, A.; SHASTRY, B.A. Thrombocytopenia in vivax and falciparum malária: an observational study of 131 patients in Karnataka, India. *Ann Trop Med Parasitol.*, v.105(8), p.593-8, 2011.

SELVAM, R.; BASKARAN, G. Hematological impairments in recurrent Plasmodium vivax infected patients. *Jpn J Med Sci Biol.*, v.49, p.151-165, 1996.

SCORDO, M.G.; AKLILLU, E.; YASAR, U.; DAHL, M.L.; SPINA, E.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in a Caucasian and a black African population. *Br J Clin Pharmacol.*, v.52, p.447-450, 2001.

SHEKALAGHE, S.A.; TER BRAAK, R.; DAOU, M.; KAVISHE, R.; BIJLLAARDT, V.D.; BOSCH, W.V.B.S.; KOENDERINK, J.B.; LUTY, A.J.; WHITTY, C.J.; DRAKELEY, C.; SAUERWEIN, R.W.; BOUSEMA, T. In Tanzania, hemolysis after a single dose of primaquine coadministered with an artemisinin is not restricted to glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient (G6PD A-) individuals. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.54(5), p.1762-8, 2010.

SHI, W.X.; CHEN, S.Q. Frequencies of poor metabolizers of cytochrome P450 2C19 in esophagus cancer, stomach cancer, lung cancer and bladder cancer in Chinese population. *World J Gastroenterol.*, v.10(13), p.1961-3, 2004.

SMITH, H.E.; JONES, JP.; KALHORN, T.F.; FARIN, F.M.; STAPLETON, P.L.; DAVIS, C.L. Role of cytochrome P450 2C8 and 2J2 genotypes in calcineurin inhibitor-induced chronic kidney disease. *Pharmacogenet Genomics*, v.18, p.943-53, 2008.

SILVA, M.C.M.; SANTOS, E.B.; COSTA, E.G.; FILHO, M.G.S.; GUERREIRO, G.F.; PÓVOA, M.M. Alterações clínico-laboratoriais em pacientes com malária por Plasmodium vivax e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase tratados com 0,50mg/kg/dia de primaquina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.37(3), p.215-217, 2004.

SILVEIRA, V.S.; CANALLE, R.; SCRIDELI, C.A.; QUEIROZ, R.G.; TONE, L.G. Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes in a Brazilian population. *Biomarkers.*, v.14(2), p.111-7, 2009.

SIM, S.C.; RISINGER, C.; DAHL, M.L.; AKLILLU, E.; CHRISTENSEN, M.; BERTILSSON, L.; INGELMAN-SUNDBERG, M. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin Pharmacol Ther.* v. 79(1), p.103-13, 2006.

SINA, B. Focus on Plasmodium vivax. *Trends Parasitol.*, v.18, p.287-289, 2002.

STAGE, T.B.; CHRISTENSEN, M.M.H.; FEDDERSEN, S.; BECK-NIELSEN, H. BRØSEN, K. The role of genetic variants in CYP2C8, LPIN1, PPARGC1A and PPARG on the trough steady-state plasma concentrations of rosiglitazone and on glycosylated haemoglobin A1c in type 2 diabetes. *Pharmacogenetics and Genomics*, v.23, p.219–227, 2013.

SUAREZ-KURTZ, G.; PENA SD.; STRUCHINER, C.J.; HUTZ, M.H. Pharmacogenomic Diversity among Brazilians: Influence of Ancestry, Self-Reported Color, and Geographical Origin. *Front Pharmacol.* v.6(3), p.191, 2012.

TAMAKI, Y.; ARAI, T.; SUGIMURA, H.; SASAKI, T.; HONDA, M.; MUROI, Y.; MATSUBARA, Y.; KANNO, S.; ISHIKAWA, M.; HIRASAWA, N.; HIRATSUKA, M. Association between cancer risk and drug-metabolizing enzyme gene (CYP2A6, CYP2A13, CYP4B1, SULT1A1, GSTM1, and GSTT1) polymorphisms in cases of lung cancer in Japan. *Drug Metab Pharmacokinet.*, v.26(5), p.516-22, 2011.

TANWAR, G. S.; KHATRI, P. C.; SENGAR, G. S.; KOCHAR, A. S.; KOCHAR, K.; MIDDHA, S.; TANWAR, G.; KHATRI, N.; PAKALAPATI D.; GARG, S.; DAS, A.; KOCHAR, D. K. Clinical profiles of 13 children with Plasmodium vivax cerebral malária. *Annals of Tropical Paediatrics.*, v.31, p.351–356, 2011.

TELLO-MONTOLIU, A.; JOVER, E.; MARÍN, F.; BERNAL, A.; LOZANO, M.L.; SÁNCHEZ-VEJA, B.; PASTOR, F.J.; HURTADO, J.A.; VALDÉS, M.; VICENTE, V.; RIVERA, J. Influence of CYP2C19 Polymorphisms in Platelet Reactivity and Prognosis in an Unselected Population of Non ST Elevation Acute Coronary Syndrome. *Rev Esp Cardiol.* v. 65(3), p.219-226, 2012.

TEH, L.K.; BERTILSSON, L. Pharmacogenomics of CYP2D6: Molecular genetics, interethnic differences and clinical importance. *Drug Metab Pharmacokinet.*, v.27(1), p.55-67, 2011.

TIONG, K.H.; YIAP, B.C.; TAN, E.L; ISMAIL, R.; ONG, C.E. Functional characterization of cytochrome P450 2A6 allelic variants CYP2A6*15, CYP2A6*16, CYP2A6*21, and CYP2A6*22. *Drug Metab Dispos.*, v.38(5), p.745-51, 2010.

THORN, C.F.; LAMBA, J.K.; LAMBA, V.; KLEIN, T.E.; ALTMAN, R.B. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP2B6 *Pharmacogenetics and Genomics*, v.20, p.520–523, 2010.

USLU, A.; OGUS, C.; OZDEMIR, T.; BILGEN, T.; TOSUN, O.K.I. The effect of CYP1A2 gene polymorphisms on Theophylline metabolism and chronic obstructive pulmonary disease in Turkish patients. *BMB Rep.*, v.43(8), p.530-4, 2010.

VET, N.J.; DE HOOG, M.; TIBBOEL, D.; DE WILDT, S.N. The effect of inflammation on drug metabolism: a focus on pediatrics. *Drug Discov. Today.*, v.16(9-10), p.435-42, 2011.

VIGIWEB. Sistema de Informações Operacionais e Epidemiológicas. Casos de malária. Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – FMT-HDV. Disponível em: <<http://www.fmt.am.gov.br/layout2011/vigiweb/vigiwebcons4.asp>>. Acesso em: 25/07/2013.

WANG, H; TOMPKINS, M.L. CYP2B6: New Insights into a Historically Overlooked Cytochrome P450 Isozyme *Curr Drug Metab.*, v. 9(7), p. 598–610, 2008.

WALKER, A.H.; JAFFE, J.M.; GUNASEGARAM, S.; CUMMINGS, S.A.; HUANG, C.S.; CHERN, H.D.; OLOPADE, O.I; WEBER, B.L.; REBBECK, T.R. Characterization of an allelic variant in the nifedipine specific element of CYP3A4: Ethnic distribution and implications for prostate cancer risk mutations in brief. *Hum Mutat.*, v.12(4), p.289, 1998.

WALKER, R.; EDWARDS, C. Clinical Pharmacy and Therapeutics New York: Churchill Livingston, 1994.

WELLS, T.N.; ALONSO, P.L.; GUTTERIDGE, W.E. New medicines to improve control and contribute to the eradication of malária. *Nat Rev Drug Discov.*, v.8(11), p.879-91, 2009.

WESTENBERGER, S.J.; MCCLEAN, C.M.; CHATTOPADHYAY, R., DHARIA, N.V.; CARLTON, J.M.; BARNWELL, J.W.; COLLINS, W.E.; HOFFMAN, S.L.; ZHOU, Y.; VINETZ, J.M.; WINZELER, E.A. A systems-based analysis of

Plasmodium vivax lifecycle transcription from human to mosquito. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, p. 653, 2010.

WHITE, N.J. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malária. **Malar. J.**, v.10, p.297, 2011.

WICKLIFFE, J.K.; ABDEL-RAHMAN, S.Z.; LEE, C.; KORMOS-HALLBERG, C.; SOOD, G.; RONDELLI, CM.; GRADY, J.J.; DESNICK, R.J.; ANDERSON, K.E. CYP1A2*1F and GSTM1 alleles are associated with susceptibility to porphyria cutanea tarda. **Mol Med.**, v.17(3-4), p.241-7, 2011.

WISER, M.F. *Plasmodium Life Cycle*.(1990). Disponível em: <<http://www.tulane.edu/~wiser/malária/>>. Acesso em: 10/03/2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Severe falciparum malária. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v.94(Suppl 1), p.38-40, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the treatment of malária. 1^a ed. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the treatment of malária. 2^a ed. 2010a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Antimalarial Drug Efficacy and Drug Resistance 2000-2010. 2010b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Interactive Malária Statistics. 2010c. Disponível em: <http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=view&id=2632&Itemid=2130>. Acesso em: 14/03/2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malária Report. 2011a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Malária. Fact Sheet. 2011b; N° 94. Disponível em: <<http://www.OMS.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>>. Acesso em: 08/03/2012.

WYNALDA, M.A.; HUTZLER, J.M.; KOETS, M.D.; PODOLL, T.; WIENKERS, L.C. In vitro metabolism of clindamycin in human liver and intestinal microsomes. *Drug Metab Dispos.* V.31(7), p.878-87, 2003.

WYEN, C.; HENDRA, H.; VOGEL, M.; HOFFMANN, C.; KNECHTEN, H.; BROCKMEYER, N.H.; BOGNER, J.R.; ROCKSTROH, J.; ESSER, S.; JAEGER, H.; HARRER, T.; MAUSS, S.; VAN LUNZEN, J.; SKOETZ, N.; JETTER, A.; GRONEUER, C.; FÄTKENHEUER, G.; KHOO, S.H.; EGAN, D.; BACK, D.J.; OWEN, A; Impact of CYP2B6 983T>C polymorphism on non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor plasma concentrations in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother.*, v.61(4), p.914-8, 2008.

WU, X.; ZUO, J. GUO, T.; YUAN, L. CYP2C8 Polymorphism Frequencies Among Han, Uighur, Hui, and Mongolian Chinese Populations. *Genetic Testing Mol. Biomarkers.*, v.17 (2), 2013.

YUSOF, W.; HUA, G. Gene, ethnic and gender influences predisposition of adverse drug reactions to artesunate among Malaysians. *Toxicol Mech Methods.*, v.22(3), p.184-92, 2012.

YUA, L.; SHIA, D.; MAA, L.; ZHOUB, Q.; ZENGA, S. Influence of CYP2C8 polymorphisms on the hydroxylation metabolism of paclitaxel, repaglinide and ibuprofen enantiomers in vitro. *Biopharm. Drug Dispos.*, v.34, p.278-287, 2013.

YUAN, ZHONG-HAI.; LIU, QIAN.; ZHANG, YING .; LIU, HONG-XING .; ZHAO, JUN .; ZHU, PING . CYP2B6 gene single nucleotide polymorphisms and leukemia susceptibility. *Annals of Hematol.*, v.90(3), p.293-299, 2011.

ZANGER, U.M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>>, 2013.

ZANGER, U.M.; KLEIN, K. Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance. *Frontiers in genetics*, v.4, art. 24, 2013.

ZHANG, H.; COVILLE, P.F.; WALKER, R.J.; MINERS, J.O.; BIRKETT, D.J.; WANWIMOLRUK, S. Evidence for involvement of human CYP3A in the 3-hydroxylation of quinine. *Br J Clin Pharmacol.*, v.43(3), p.245-52, 1997.

ZHOU, S. F.; YANG, L. P.; ZHOU, Z.W.; LIU, Y. H.; CHAN, E. Insights into the Substrate Specificity, Inhibitors, Regulation, and Polymorphisms and the Clinical Impact of Human Cytochrome P450 1A2. *The AAPS Journal*, v.11(3), p. 481-94, 2009.

5.1 Bibliografias consultadas

FERREIRA, M.E.S.; GOMES, M.S.M.; VIEIRA, J.L.F. Metemoglobinemia em pacientes com malária por *Plasmodium vivax* em uso oral de primaquina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.44(1), p.113-115, 2011.

GROBUSCH, M.P.; KREMSNER, P.G. Uncomplicated malária. *Curr Top Microbiol Immunol.*, v.295, p.83-104, 2002.

GUEMBAROVSKI, R. L. Análise de associação dos genes CYP1A1, GSTM1, GSTT1 e da perda de heterozigose em 3p em portadores de carcinoma bucais. Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós- Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Genética, do Departamento de Genética, UFPR, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Genética, Curitiba, 2007.

HOFFMAN, S.M.; NELSON, D.R.; KEENEY, D.S. Organization, structure and evolution of the CYP2 gene cluster on human chromosome 19. *Pharmacogenetics.*, v.11(8), p.687-98, 2001.

IKEYA, K.; JAISWAL, A.K.; OWENS, R.A.; JONES, J.E.; NEBERT, D.W.; KIMURA, S. Human CYP1A2: sequence, gene structure, comparison with the mouse and rat orthologous gene, and differences in liver 1A2 mRNA expression. *Mol. Endocrinol.*, v.3, p.1399-408, 1989.

KIMURA, S.; UMENO, M.; SKODA, R.C.; MEYER, U.A.; GONZALEZ, F.J. 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.*, v.45(6), p.889-904, 1989.

KLOSE, T.S.; BLAISDELL, J.A.; GOLDSTEIN, J.A.; Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. *J Biochem Mol Toxicol.*, v.13, p.289–295, 1999.

KOJIMA, K.; NAGATA, K.; MATSUBARA, T.; YAMAZOE, Y. Broad but distinct role of pregnane X receptor on the expression of individual cytochrome p450s in human hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet.*, v.22, p.276–286, 2007.

MOTULSKY, A.G. Drug reaction, enzymes and biochemical genetics. *J Am Med Assoc.*, v.165, p.835-37, 1957.

NIEMI, M.; LEATHART, J. B.; NEUVONEN, M.; BACKMAN, J. T.; DALY, A. K.; NEUVONEN, P. J. Polymorphism in CYP2C8 is associated with reduced plasma concentrations of repaglinide. *Clin Pharmacol Ther.*, v.74, p.380–387, 2003.

NURFADHLINA, M.; FOONG, K.; THE, L.K.; TAN, S.C.; MOHD ZAKI, S.; ISMAIL, R. CYP2A6 polymorphisms in Malays, Chinese and Indians. *Xenobiotica.*, v.36(8), p.684-92, 2006.

OMURA, T.; SATO, R. A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem.*, v.237, p.1375-6, 1962.

OSHIMA-FRANCO, Y.; MADALENO FRANCO, L. Biotransformação: importância e toxicidade. *Saúde Rev.*, v.5(9), p. 69-76, 2003.

ROSSINI, A.; LIMA, S.S.; RAPOZO, D.C.; FARIA, M.; ALBANO, R.M.; PINTO, L.F. CYP2A6 and CYP2E1 polymorphisms in a Brazilian population living in Rio de Janeiro. *Braz J Med Biol Res.*, v.39(2), p.195-201, 2006.

SANTANA, M.S.; ROCHA, M.A.F.; ARCANJO, A.R.L.; SARDINHA, J. F. J.; ALECRIM, W.D.; ALECRIM, M.G.C. Associação de metemoglobinemia e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com malária tratados com primaquina. *Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.*, v.40(5), p.533-536, 2007.

SHARGEL, L.; YU, A.B.C. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, 2 ed. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil Ltda, 1985.


SILVA, I.B. Modulação da atividade de monooxigenases hepáticas (CYP1A2, 2B e 2E) pela vacina pertussis em camundongos. Dissertação apresentada à Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca da Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Mestre em Saúde Pública – Área de Concentração: Toxicologia. Rio de Janeiro, Brasil, 2005.

TABACHNICK, B.G.; FIDELL, L.S. Using multivariate statistic. 50 ed. Pearson, 2000.

6. ANEXOS

6.1 Anexo 1 - Documento de Aprovação do Projeto “*Caracterização clínica da malária complicada por Plasmodium vivax*”, em Comitê de Ética (CONEP)

16/06/09 15:41 RS 33153701 p. 1

 **MINISTÉRIO DA SAÚDE**
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 343/2009

Registro CONEP 15243 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE 0054.1.114.000-08 Processo nº 25.000.011.792/2009-15

Projeto de Pesquisa: “*Caracterização clínica da malária complicada por Plasmodium vivax*”. Protocolo versão final de 25/07/2008. TCLE versão final de 16/06/08 com Emenda 1 de 30/03/09.

Pesquisador Responsável: Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda
Instituição: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMT/MT/AM
CEP de origem: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMT/MT/AM
Área Temática Especial: Pesquisa com cooperação estrangeira
Patrocinador: Centro Internacional de Pesquisa em Saúde de Barcelona - *Centro de Recerca en Salut Internacional de Barcelona* (CRESIB)

Sumário geral do protocolo

A malária é endêmica em 82 países e possui foco de transmissão em um adicional de 8 países.

Em documento recente da OMS, há uma afirmação de que a malária vivax, embora seja considerada uma doença benigna, com baixa letalidade, pode provocar doença febril grave e debilitante. Ocasionalmente, resulta em graves doenças, como a malária falciparum. Várias manifestações graves de malária vivax vêm sendo relatadas, a saber: malária cerebral, anemia severa, plaquetopenia severa, pancitopenia, icterícia, ruptura esplênica, insuficiência renal aguda e síndrome da angústia respiratória aguda. Os mecanismos das manifestações graves não são bem compreendidos.

Um grande número de casos de malária vivax grave é relatado no continente africano, porém, todos foram diagnosticados por exame de gota espessa de sangue, o que pode ter associado uma infecção por *P. falciparum*. Estudos demonstram que outros exames são necessários para definição de monoinfecção por *P. vivax*, tais como teste de detecção de antígeno *P. falciparum/P. vivax* e teste de PCR.

Neste estudo, serão realizados teste de lâmina de gota espessa de sangue, extração de DNA e PCR em tempo real para diagnóstico de *P. falciparum* e *P. vivax* com utilização de primers específicos, exames laboratoriais para acompanhamento do quadro clínico dos pacientes e autópsias nos casos de óbito.

O objetivo do estudo é “descrever o espectro clínico de malária vivax em pacientes internados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Manaus, Brasil”, tendo como objetivos secundários: estimar a frequência de hospitalizações devido à malária por *P. vivax* na FMT – AM; descrever as apresentações clínicas dos pacientes com infecção por *P. vivax* que precisam de UTI e evoluem para a morte; verificar a frequência de pacientes com monoinfecção confirmada para *P. vivax* que preenchem os critérios da OMS para malária vivax; descrever causas incomuns de internação em pacientes com malária vivax; descrever outras doenças infecciosas agudas concomitantes que podem alterar a apresentação clínica benigna da malária vivax; avaliar os fatores de risco de hospitalização em pacientes com infecção pelo *P. vivax* exclusivo; e descrever a patologia associada com infecção letal por *P. vivax* através de autópsias.

Trata-se de estudo epidemiológico, multicêntrico, prospectivo descritivo, desenvolvido em dois centros de referência para atendimento e tratamento de malária: um no Brasil e outro na Índia.

1/3 JF

Cont. Parecer CONEP nº 343/08

No Brasil, os pacientes serão recrutados dentre os assistidos no ambulatório/emergência da Faculdade de Medicina Tropical do Amazonas – FMT/AM. Participarão do estudo pacientes que necessitarem de internação e que cumprirem os critérios da OMS para malária grave. Os critérios de inclusão e de exclusão estão bem claros no protocolo, na folha 12 verso.

Os pacientes do estudo serão admitidos no hospital e avaliados diariamente por um médico até a alta. Será utilizado um questionário padronizado para anotações de sinais, sintomas, evolução clínica, resultados de exames complementares, tratamento e resultado para cada paciente. O manejo clínico e tratamento serão realizados de acordo com os protocolos nacionais. Aqueles que apresentarem malária vivax grave serão tratados segundo protocolo de tratamento para infecção grave por *P. falciparum*.

No Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (folha 22 do protocolo) se lê: "Nós gostaríamos de sua permissão para fazer testes com as parasitas de malária na amostras de sangue coletadas e para guardar o restante do sangue para ser usado em estudos sobre malária no futuro. Isto pode exigir armazenamento mais prolongado de seu sangue em laboratórios da FMT-AM. Para isso seu sangue será guardado com um código e não deverá identificar seu nome." Ainda, na folha 44 do protocolo, consta um termo de compromisso do patrocinador de não utilização de materiais e dados para outros estudos e de não efetuar armazenamento de material biológico. Já na folha 52, consta termo de compromisso do pesquisador para armazenamento de material biológico e na folhas 51 e 53 constam diretrizes normativas do banco de materiais biológicos da FMT-AM e formulário para armazenamento de material biológico, respectivamente.

Local de realização

A pesquisa será realizada nos centros de referência em tratamento de malária Fundação de Medicina Tropical em Manaus-AM – Brasil e Faculdade de Medicina Sarder Patel em Bikaner - Índia, com patrocínio do Centre de Recerca de Salut Internacional de Barcelona.

Apresentação do protocolo

O *currículo vitae* do pesquisador responsável o qualifica para a realização deste estudo.

O orçamento financeiro foi apresentado de forma detalhada.

O cronograma de realização da pesquisa prevê sua conclusão em 3 anos.

Foi apresentado contrato com patrocinador onde fica estabelecido o compartilhamento dos dados e resultados da pesquisa entre os pesquisadores e patrocinador.

O TCLE apresenta-se conciso e objetivo, formulado em linguagem apropriada ao público e objetivo a que se destina. Os procedimentos estão bem claros, riscos e desconfortos a que o paciente possa estar submetido, garantias de acordo com a Resolução CNS 196/96.

Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP Nº.074/2009, relativo ao projeto de pesquisa em questão:

1. Durante a leitura do protocolo não fica clara a criação de banco de materiais biológicos a partir deste estudo, uma vez que na folha de rosto consta a não criação de banco. No projeto de pesquisa não há qualquer citação sobre coleta de material biológico para armazenamento ou criação de banco de materiais biológicos, no entanto, os documentos: TCLE, Portaria da FMT-AM com diretrizes para banco de material biológico, Termo de Compromisso do pesquisador para armazenamento de material biológico e formulário para armazenamento de material biológico apresentam fortes indícios de formação de banco. Solicita-se esclarecimento sobre o armazenamento de material biológico e, caso esteja prevista esta atividade, que todos os documentos

Cont. Parecer CONEP nº 343/09

No Brasil, os pacientes serão recrutados dentre os assistidos no ambulatório/emergência da Faculdade de Medicina Tropical do Amazonas – FMT/AM. Participarão do estudo pacientes que necessitarem de internação e que cumprirem os critérios da OMS para malária grave. Os critérios de inclusão e de exclusão estão bem claros no protocolo, na folha 12 verso.

Os pacientes do estudo serão admitidos no hospital e avaliados diariamente por um médico até a alta. Será utilizado um questionário padronizado para anotações de sinais, sintomas, evolução clínica, resultados de exames complementares, tratamento e resultado para cada paciente. O manejo clínico e tratamento serão realizados de acordo com os protocolos nacionais. Aqueles que apresentarem malária vivax grave serão tratados segundo protocolo de tratamento para infecção grave por *P. falciparum*.

No Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (folha 22 do protocolo) se lê: "Nós gostaríamos de sua permissão para fazer testes com as parasitas de malária nas amostras de sangue coletadas e para guardar o restante do sangue para ser usado em estudos sobre malária no futuro. Isto pode exigir armazenamento mais prolongado de seu sangue em laboratórios da FMT-AM. Para isso seu sangue será guardado com um código e não deverá identificar seu nome." Ainda, na folha 44 do protocolo, consta um termo de compromisso do patrocinador de não utilização de materiais e dados para outros estudos e de não efetuar armazenamento de material biológico. Já na folha 52, consta termo de compromisso do pesquisador para armazenamento de material biológico e na folhas 51 e 53 constam diretrizes normativas do banco de materiais biológicos da FMT-AM e formulário para armazenamento de material biológico, respectivamente.

Local de realização

A pesquisa será realizada nos centros de referência em tratamento de malária Fundação de Medicina Tropical em Manaus-AM – Brasil e Faculdade de Medicina Sarder Patel em Bikaner - Índia, com patrocínio do Centre de Recerca de Salut Internacional de Barcelona.

Apresentação do protocolo

O *currículo vitae* do pesquisador responsável o qualifica para a realização deste estudo.

O orçamento financeiro foi apresentado de forma detalhada.

O cronograma de realização da pesquisa prevê sua conclusão em 3 anos.

Foi apresentado contrato com patrocinador onde fica estabelecido o compartilhamento dos dados e resultados da pesquisa entre os pesquisadores e patrocinador.

O TCLE apresenta-se conciso e objetivo, formulado em linguagem apropriada ao público e objetivo a que se destina. Os procedimentos estão bem claros, riscos e desconfortos a que o paciente possa estar submetido, garantias de acordo com a Resolução CNS 196/96.

Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP Nº.074/2009, relativo ao projeto de pesquisa em questão:

1. Durante a leitura do protocolo não fica clara a criação de banco de materiais biológicos a partir deste estudo, uma vez que na folha de rosto consta a não criação de banco. No projeto de pesquisa não há qualquer citação sobre coleta de material biológico para armazenamento ou criação de banco de materiais biológicos, no entanto, os documentos: TCLE, Portaria da FMT-AM com diretrizes para banco de material biológico, Termo de Compromisso do pesquisador para armazenamento de material biológico e formulário para armazenamento de material biológico apresentam fortes indícios de formação de banco. Solicita-se esclarecimento sobre o armazenamento de material biológico e, caso esteja prevista esta atividade, que todos os documentos

6.2 Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para pacientes com malária *vivax*

Você está sendo convidado para participar do projeto intitulado **Marcadores bioquímicos e moleculares das modificações oxidativas em pacientes com malária *vivax***. Você foi selecionado por ter sido assistido pelo médico responsável no Ambulatório ou estar internado na FMT-AM, hospital de referência para o tratamento da malária em Manaus. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição. O acompanhamento da sua doença e tratamento continuará sendo realizado independentemente de você estar na pesquisa ou não. Você será retirado do estudo caso você deixe de seguir as orientações para a participação no estudo. Trata-se de um estudo observacional sobre malária *vivax* diagnosticada como grave e não grave, em pacientes atendidos no Ambulatório e/ou internados na unidade hospitalar da FMT-AM e terá duração de **36 meses**. Você não precisa fazer qualquer coisa especial para participar desse projeto e receberá o mesmo tratamento e acompanhamento estabelecido de acordo com as normas do Ministério da Saúde. Como parte do estudo, nós vamos estabelecer um sistema de monitoramento para malária durante sua internação até o momento em que você puder receber alta hospitalar ou durante seus retornos ambulatoriais. Nós coletaremos além de várias informações clínicas, amostras de sangue nos seguintes dias: primeiro (18 mL), segundo (9mL) e no último dia (22,5 mL) através de uma agulha (venopunção) para fazer o teste de malária (gota espessa) e outros exames laboratoriais. Nós gostaríamos de sua permissão para fazer testes com as parasitas de malária nas amostras de sangue coletadas e para guardar o restante do sangue para ser usado em estudos sobre malária no futuro.

Você pode sentir alguma dor por causa da picada no dedo ou pela coleta de amostra de sangue na veia do braço. Mas qualquer dor deve durar apenas alguns instantes. Existe um risco muito pequeno de infecção onde o sangue for coletado, mas qualquer infecção será monitorada e tratada pela equipe médica. A amostra de sangue colhida é muito pequena e não representa nenhum risco à sua saúde. O benefício em estar participando deste estudo será um aumento de informações sobre malária *vivax* e seus riscos na nossa cidade, mas você não será pago nem receberá incentivo financeiro durante o acompanhamento. Se você concordar em participar, todas as informações coletadas serão confidenciais, usadas somente no estudo. Nós não compartilharemos suas informações, e um código será usado para identificar você em vez de seu nome. Nós não tornaremos público qualquer detalhe sobre você. No caso de algum pesquisador tirar uma foto sua, ele cuidará para que você não seja identificado. Esta imagem sua será publicada apenas em revistas para médicos.

Pessoas para contato

Se você tiver qualquer pergunta ou preocupação sobre o estudo, por favor, vamos esclarecer isso agora. Mesmo assim, se depois você desejar esclarecer suas dúvidas sobre a pesquisa ou sobre ser um sujeito de pesquisa, por favor, sinta-se à vontade para contatar **Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda**, pesquisador principal do projeto na **Fundação de Medicina Tropical do Amazonas**. O endereço do hospital é Av. Pedro Teixeira, nº 25, Dom Pedro e o número do telefone é (92) 36560620. O endereço do Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-AM (que é um grupo de pessoas que avaliam este projeto e acompanham a pesquisa) é também na Av. Pedro Teixeira, nº 25, Bairro Dom Pedro, e o telefone para contato é o (92) 2127 3432. O presidente deste comitê é o Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira.

Eu, _____, participante desse estudo ou responsável pelo paciente _____, entendi todas as informações dadas a mim sobre o estudo **Caracterização da Malária Grave por *Plasmodium vivax* na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Brasil**, com subprojeto intitulado **Biomarcadores do estresse oxidativo em pacientes com malária *vivax* grave e não grave**, inclusive o seu propósito e a forma como será executado. Eu tive a chance de fazer perguntas sobre o estudo e concordo em participar do mesmo.

_____ Data ____/____/____

Assinatura do participante ou responsável

_____ ou impressão do nolegar direito

Data ____/____/____

Nome do entrevistador

Assinatura

do

_____ Data ____/____/____

Nome do pesquisador

Assinatura do pesquisador

6.3 Anexo 3 – Delineamento experimental

1. Roteiro para Coleta e Preparação das Amostras

1. Coletar 1 tubo de EDTA;
2. Ligar centrífuga BIOPHAR 2 e incubadora ambas a 37 grau;
3. Identificar;
 - 1 tubo de EDTA: Polimorfismos de enzimas, dosagem qualitativa de G6PD
 - 1 tubo S/AC: BIOQUÍMICA
4. Separar 1 mL de sangue total para PDNA **sem conservante**.
5. Separar 1 mL de sangue total para FO.
6. Separar soro por 10 min a 3500 rpm. Reservar o soro para perfis bioquímicos (fostase alcalina, gama GT, bilirrubinas totais e frações, acido úrico, creatinina, uréia, perfil lipídico completo, glicose).

2. Extração de DNA

Reagentes

REAGENTES PARA AS ETAPAS DE EXTRAÇÃO	ARMAZENAMENTO
Isopropanol	Temp. ambiente
Etanol 70%	Temp. ambiente
Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)	Temp. ambiente

Obtenção de Sangue Total

Obter 300-400 μ L de sangue total, em tubo microcentrífuga estéril de 1,5 mL identificado contendo 15 μ L de EDTA.

Procedimentos para extração do DNA a partir de tubo

- Protocolo de extração retirado da “bula” do Wizard® Genomic DNA Purification Kit.

Volume de amostra sanguínea: 300µL

Obs: Antes de dar início ao procedimento homogeneizar o tubo com sangue até o mesmo ficar completamente homogeneizado.

Procedimentos:

1. Adicione 900µL de solução Cell Lysis. Inverta o tubo 5 a 6 vezes para misturar o sangue e a solução de lise.
2. Incube por 10 minutos à temperatura ambiente, homogeneizando por inversão duas a três vezes.
3. Centrifugue entre 13.000 e 16.000 x g por 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Descarte o sobrenadante.
5. Agite o tubo vigorosamente no vortex. Ressuspenda completamente as células brancas.
6. Adicione 300 µL de solução Nuclei Lysis. Pipete a mistura 5-6 vezes para lisar as células brancas.
7. OPCIONAL: Adicione 1,5 µL de solução RNAase ao lisado nuclear e misture as amostras invertendo o tubo 2-5 vezes. Incube a mistura a 37°C por 15 minutos e esfrie a temperatura ambiente.
8. Adicione 100µL de solução Protein Precipitation ao lisado nuclear e homogeneíze vigorosamente no vórtex de 10-20 segundos.
9. Centrifugue o tubo entre 13.000-16.000 x g por três minutos à temperatura ambiente.
10. Transfira o sobrenadante para um tubo limpo de 1,5mL contendo 300µL de isopropanol a temperatura ambiente.
11. Gentilmente misture a solução por inversão até que as brancas cadeias de DNA formem uma cadeia visível.
12. Centrifugue entre 13.000-16.000 x g por um minuto à temperatura ambiente.

13. Decante o sobrenadante e adicione uma amostra de um volume de etanol a 70% à temperatura ambiente. Gentilmente inverta o tubo algumas vezes para lavar o precipitado de DNA e os lados do microtubo.

14. Centrifugue como na etapa 11.

15. Cuidadosamente aspire o etanol. Inverta o tubo em um papel absorvente limpo e seque ao ar o precipitado por 10 a 15 minutos.

16. Adicione 100 μ L da solução DNA rehydration ao tubo e reidrate o DNA incubando à 65°C por uma hora. Periodicamente homogeneíze gentilmente a solução. Alternativamente reidrate o DNA incubando a solução overnight à temperatura ambiente.

17. Armazene o DNA entre 2-8°C.