

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA DESIDROGENASE DA  
GLICOSE 6-FOSFATO E HEMOGLOBINOPATIAS EM  
PACIENTES COM MALÁRIA POR *Plasmodium vivax*.**

JÉSSICA LORENA DOS SANTOS MATHIAS

MANAUS  
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JÉSSICA LORENA DOS SANTOS MATHIAS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA DESIDROGENASE DA  
GLICOSE 6-FOSFATO E HEMOGLOBINOPATIAS EM  
PACIENTES COM MALÁRIA POR *Plasmodium vivax*.**

Projeto de Defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. PhD. José Pereira de Moura de Neto

**MANAUS**  
**2013**  
JÉSSICA LORENA DOS SANTOS MATHIAS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA DESIDROGENASE DA  
GLICOSE 6-FOSFATO E HEMOGLOBINOPATIAS EM  
PACIENTES COM MALÁRIA POR *Plasmodium vivax*.**

BANCA EXAMINADORA

---

**Prof<sup>o</sup>. PhD. José Pereira de Moura Neto (Presidente da Banca) - UFAM.**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Marilda de Souza Gonçalves (Membro) – FIOCRUZ (BAHIA).**

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr. Wuelton Marcelo Monteiro (Membro) - FMT-HVD**

**Manaus-Am, 8 de abril de 2013 .**

**DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação a toda minha família, composta por meus verdadeiros mestres, modelos reais de perseverança, parceria, dedicação, paciência e ética.

*Aos meus pais, Itelvanda dos Santos Mathias e Armino Teles Mathias  
dos Santos – pelo incentivo, compreensão e amor;*

*Ao meu irmão Saulo dos Santos Mathias – pela amizade e  
companheirismo;*

*Ao meu amigo e companheiro, José Pereira de Moura Neto – pela  
atenção, paciência e apoio.*

*“Antes de sentirmos que somos bons mestres,  
estejamos seguros de que somos bons estudantes”.*

**PITÁGORAS**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a minha família e a Deus, por serem meus alicerces em todos os momentos;

Ao meu orientador, José Pereira de Moura Neto, por toda dedicação, paciência e ensinamentos prestados durante os dois anos do desenvolvimento deste trabalho;

Ao programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM, pela estrutura disponibilizada para a execução deste trabalho;

À Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, mas precisamente ao Dr. Marcus Lacerda, por ter cedido as amostras e todos os dados necessários para a pesquisa;

À banca examinadora pelo intercâmbio de ideias, sugestões e discussões construtivas que delinearão durante a qualificação e defesa desta dissertação;

À CAPES pelo suporte financeiro através da concessão de bolsa de estudos;

Aos membros do Laboratório de Biologia Molecular (Fundação Alfredo da Mata) e Laboratório de Análises Especializadas em Anemias (FF/UFBA) pela infra estrutura cedida para realização das análises complementares.

As minhas companheiras de laboratório Rita de Cássia Mascarenhas Netto, Jaqueline Silva de Jesus e Brena Aguiar de Lima, pelo auxílio prestado durante a parte experimental deste estudo;

Ao Marco Aurélio, pela colaboração com a língua inglesa;

A todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram com a execução deste trabalho.

## RESUMO

**Introdução.** A compreensão da doença malária tem aumentado muito nos últimos anos. Apesar de décadas de pesquisa contra a doença, esta continua a ser um dos principais problemas de saúde pública. Um dos desafios na luta contra esta doença é avaliar suscetibilidade genética e decifrar os mecanismos envolvidos para utilizá-los como novos alvos contra a malária. **Objetivo.** Caracterizar molecularmente a Desidrogenase da Glicose 6-Fosfato (G6PD) e determinar o perfil de hemoglobinas em pacientes com Malária vivax de Manaus-AM. **Metodologia.** A caracterização molecular da G6PD foi realizada pelas técnicas de RFLP-PCR e q-RT-PCR em 162 pacientes. O perfil de hemoglobinas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em 178 pacientes. Os achados clínicos, hematológicos e bioquímicos foram associados com as hemoglobinas variantes e as mutações para a G6PD na tentativa de identificar possíveis biomarcadores de gravidade clínica da malária vivax. **Resultados.** O perfil de hemoglobina apresentou 106 AA (92,7%), 09 AS (5,05%) e 04 AC (2,25%). Malária grave acometeu 25% em AC e 44,4% em AS. Diminuição significativa dos valores de Neutrófilos ( $p=0,019$ ); VCM ( $p=0,004$ ) e HCM ( $p=0,008$ ) e aumento de Bastonetes ( $p=0,049$ ) e Eosinófilos ( $p=0,046$ ), ocorreram apenas nos pacientes AC. RDW apresentou elevado em ambos, AS ( $p=0,039$ ) e AC ( $p=0,019$ ) quando comparados AA. A parasitemia febril foi o evento clínico mais freqüente 92,30% nos pacientes AS/AC. A densidade parasitária foi menor nos AS ( $9.352,4 \pm 11.622,8$ ) e AC ( $11.604,8 \pm 11.931,9$ ), quando comparado com AA ( $32.431,6 \pm 88.719,6$ ), porém, sem significância estatística ( $p=0,854$ ). O estudo molecular para G6PD demonstrou 15,85% (13/82) para as mutações 202A/376G (A-) concomitantemente nos homens e pela primeira vez descrita na Região Amazônica, a mutação 1003A (Chatham) em 6,10% (05/82), enquanto nas mulheres 11,25% (09/80) heterozigostas e 1,25% (1/80) homozigostas para a A-. Homens A- demonstraram associação significativa para malária grave (RR=2,01,  $p=0,020$ ) e episódios anteriores de malária (RR=2,35,  $p=0,004$ ), aumento de plaquetas ( $p=0,009$ ), lactato desidrogenase ( $p<0,001$ ) e bilirrubina direta ( $p=0,045$ ) e diminuição da gama-glutamil transferase ( $p=0,035$ ). Ambos os gêneros, homens e mulheres, apresentaram diminuição das hemácias ( $p=0,002$ ) ( $p=0,015$ ), hemoglobina ( $p=0,017$ ) ( $p=0,031$ ) e hematócrito ( $p=0,013$ ) ( $p=0,020$ ), respectivamente. Foi demonstrado decréscimos significativos para hemoglobina ( $p=0,018$ ), hematócrito ( $p=0,014$ ), plaquetas ( $p=0,003$ ), reticulócitos ( $p<0,001$ ) e glicose ( $p=0,031$ ) entre homens A- com malária grave quando comparado com homens normais para G6PD com malária grave. **Conclusão.** Acreditamos que com o aumento do número de participantes para o estudo do perfil de hemoglobina, conseguiremos aprofundar o conhecimento de como os seres humanos se adaptaram a esta terrível doença, enfatizando algumas hipóteses importantes para fornecer caminhos que levem a uma solução duradoura e até permanente para a Malária. Além disso, poucos estudos das mutações para G6PD foram realizados em comunidades amazônicas. Outras pesquisas sobre a deficiência de G6PD em áreas de alta endemicidade para *P. vivax* seria valioso, especialmente focado em áreas de alta densidade populacional.

**Palavras-chave:** Malária Vivax; Hemoglobinopatias estruturais; Desidrogenase da glicose 6-fosfato; Aspectos Clínicos

## ABSTRACT

**Background:** The understanding of malaria disease has greatly improved in the last few years. Despite decades of research against the disease, it continues to be a major public health problem. The genetic component of malaria susceptibility is complex and evaluating these determinants of susceptibility and deciphering the mechanisms involved may lead to the discovery of new vaccines or targets for pharmacological agents. **Main.** Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and hemoglobin profile in patients with vivax malaria from Manaus-AM. **Methods.** For molecular characterization of G6PD were performed RFLP-PCR technique and qRT-PCR in 162 patients. Hemoglobin profile was determined by High-performance liquid chromatography in 178 patients. **Results.** The hemoglobin profile showed 106 AA (92.7%), 09 AS (5.05%) e 04 AC (2.25%). These results demonstrated a lower frequency of severe malaria in AC (25%). Our results demonstrated the presence of nine (09) AS and four (04) AC, totaling 7.30% of the patients. Our results showed a lower frequency of severe malaria in AC group. This correlation among hemoglobin genotypes showed significant correlation between AA and AC (Neutrophils ( $p = 0.019$ ), Band neutrophils ( $p = 0.049$ ), Eosinophils ( $p = 0.046$ ), Mean Cell Volume ( $p=0.004$ ), Mean Cell Hemoglobin ( $p =0.008$ ), there was no correlation between AA and the AS. The RDW was our only correlation between AA v/s AS ( $p=0.039$ ) and AA v/s AC ( $p=0.019$ ). The parasitaemia fever was the most frequent event in our study patients, occurring at 92.30% (12/13) of patients with AS/AC. The parasite density was lower in patients with AS ( $9352.35 \pm 11622.78$ ) and AC ( $11604.80 \pm 11931.85$ ) when compared with AA genotype ( $32431.57 \pm 88719.63$ ), but without statistical significance ( $p = 0.854$ ). Of male presented 15.85% (13/82) for A<sup>-</sup> and 6.10% (05/82) Chatham variants, while 11.25% (09/80) of female presented A<sup>-</sup> in heterozygous and 1.25% (1/80) in homozygous. Male with G6PD A<sup>-</sup> demonstrated a higher frequency of severe malaria (OR=2.01,  $p=0.020$ ) and strongly associated with previous malaria episodes (OR=2.35,  $p=0.004$ ). When compared with G6PD wild type, male patients A<sup>-</sup> presented high platelet ( $p=0.009$ ), lactate dehydrogenase ( $p<0.001$ ) and direct bilirubin ( $p=0.045$ ), while decreased in Gamma-Glutamyl transpeptidase ( $p=0.035$ ). Both gender presented decreased of erythrocytes ( $p=0.002$ ) ( $p=0.015$ ), hemoglobin ( $p=0.017$ ) ( $p=0.031$ ) and hematocrit ( $p=0.013$ ) ( $p=0.020$ ), male and female, respectively. We observed decreased hemoglobin ( $p=0.018$ ), hematocrit ( $p=0.014$ ), platelets ( $p=0.003$ ), reticulocyte count ( $p<0.001$ ) and glucose level ( $p=0.031$ ) among male patients in severe malaria with G6PD A<sup>-</sup> compared to severe malaria patients with wild type allele. **Conclusion.** These results reveal important roles for malaria's hemoglobin genotypes clinical patients outcomes, and studies are warranted to determine their involvement in severe malaria as well as it possible mechanism of action. In summary, few G6PD mutations studies were performed from Amazonian communities. Additional G6PD deficiency surveys in both these areas of high P. vivax endemicity would be valuable, particularly focused in areas of high population density.

**Key-words: Vivax malaria; Structural Hemoglobinopathies; Dehydrogenase Glucose 6-phosphate; Clinical Data.**

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>XIII</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>XV</b>
2.1 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA.....	XVII
2.2 CICLO BIOLÓGICO DO PLASMODIUM SP.....	XVIII
2.3 ASPECTOS CLÍNICOS.....	XX
2.4 <i>Malária Não Grave</i> .....	XXI
3. <i>Malária Grave</i> .....	XXI
3.2 MALÁRIA VIVAX.....	XXIII
3.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO HOSPEDEIRO E A MALÁRIA .....	XXV
3.4 DESIDROGENASE DA GLICOSE 6-FOSFATO (G6PD).....	XXVIII
4. <i>Aspectos Genéticos da G6PD</i> .....	XXIX
5. <i>Deficiência da G6PD</i> .....	XXIX
6. <i>Aspectos Epidemiológicos da deficiência da G6PD</i> .....	XXXI
7. <i>Desidrogenase da Glicose 6-fosfato e Malária</i> .....	XXXIII
7.2 HEMOGLOBINOPATIAS.....	XXXV
<b>9. OBJETIVOS.....</b>	<b>XXXIX</b>
3.1 GERAL.....	XXXIX
9.2 ESPECÍFICOS.....	XXXIX
<b>10. METODOLOGIA.....</b>	<b>XL</b>
4.1 TIPO DE ESTUDO.....	XL
10.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	XL
10.3 LOCAL DO ESTUDO.....	XL
10.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	XL
10.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	XLI
10.6 PROCEDIMENTOS DE COLETA DE SANGUE VENOSO.....	XLI
10.7 ANÁLISE MOLECULAR.....	XLI
12. <i>PCR-RFLP (Polimorfismos de tamanhos de fragmentos de restrição)</i> .....	XLIII
13. <i>Análise de Fragmentos de Restrição de Tamanhos Polimórficos (RFLP)</i> .....	XLVII
14. <i>q-RT PCR e G6PD</i> .....	XLVIII
15. <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)</i> .....	XLVIII
15.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	XLIX
16. <i>Distribuição das Variáveis</i> .....	XLIX
17. <i>Análise de Variáveis Qualitativas ou Categóricas</i> .....	XLIX
<b>18. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>LI</b>
5.1 ARTIGO 1.....	LI
18.2 ARTIGO 2.....	LXXXV
<b>19. CONCLUSÃO FINAL.....</b>	<b>115</b>
<b>20. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>117</b>
<b>21. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>118</b>
<b>22. ANEXOS.....</b>	<b>131</b>
9.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA PACIENTES COM MALÁRIA VIVAX.....	131
22.2 DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO PROJETO EM COMITÊ DE ÉTICA (CONEP).....	134
22.3 ROTEIRO PARA COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	137
22.4 CRONOGRAMA.....	140

## LISTA DE FIGURAS



<b><u>FIGURA 1. ÁREAS DE RISCO DE TRANSMISSÃO DE MALÁRIA NO MUNDO.</u></b>	<b><u>XVII</u></b>
<b><u>FIGURA 2. DISTRIBUIÇÃO DE CASOS CONFIRMADOS DE MALÁRIA NO BRASIL (POR 1000 HABITANTES) (WORLD MALARIA REPORT, 2011).....</u></b>	<b><u>XVIII</u></b>
<b><u>FIGURA 3. CICLO BIOLÓGICO DO PLASMODIUM SP. ....</u></b>	<b><u>XX</u></b>
<b><u>FIGURA 4. DISTRIBUIÇÃO DA DEFICIÊNCIA DA G6PD NO BRASIL (MARQUES E CAMPOS 1975; KUHN ET AL., 1983; HAMEL ET AL., 2002; KATSURAGAWA ET AL., 2004; CASTRO ET AL., 2006; OLIVEIRA ET AL., 2009; SANTANA ET AL., 2009; MAIA ET AL., 2010; CARDOSO ET AL., 2012).....</u></b>	<b><u>XXXII</u></b>
<b><u>FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DESENHO DO ESTUDO..</u></b>	<b><u>.XLII</u></b>

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1 - SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS SINTÉTICOS (PRIMERS)  
PARA INVESTIGAÇÃO DAS MUTAÇÕES 202 E 376 NO GENE DA  
DESIDROGENASE DA GLICOSE 6-FOSFATO (HIRONO & BEUTLER, 1988).  
.....XLIV**

**LISTA DE QUADROS**

**QUADRO 1. CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA MALÁRIA GRAVE POR  
PLASMODIUM FALCIPARUM. ....XXIII**

**QUADRO 2. MUTAÇÕES/POLIMORFISMOS GENÉTICOS RELACIONADOS À SUSCEPTIBILIDADE / RESISTÊNCIA POR MALÁRIA.....XXVII**

**QUADRO 3 - REAGENTES PARA O PREPARO DA PCR DA VARIANTE 376 E 202.....XLV**

**QUADRO 4 - TERMOCICLAGEM DA PCR PARA VARIANTE 376.....XLVI**

**QUADRO 5 - TERMOCICLAGEM DA PCR PARA VARIANTE 202.....XLVI**

### **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

µL	-	Microlitro
AHNEC	-	Anemia hemolítica não esferocítica crônica
ALT	-	Alanina Amino Transferase
AST	-	Aspartato Amino Transferase
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	-	Desoxinucléico trifosfato

FMT/AM	-	Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado
G6PD	-	Desidrogenase da Glicose 6-fosfato
Hb	-	Hemoglobina
HbA	-	Hemoglobina A
HbC	-	Hemoglobina C
HbD	-	Hemoglobina D
HbE	-	Hemoglobina E
HbS	-	Traço falciforme
HIV	-	Vírus da Imunodeficiência Humana
Ht	-	Hematócrito
KD	-	Kilodalton
LDH	-	Lactato Desidrogenase
MG	-	Malária Grave
MgCl <sub>2</sub>	-	Cloreto de magnésio
NADP	-	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NADPH	-	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
OPS	-	Organização Pan-Americana de Saúde
qRT-PCR	-	Do Inglês <i>quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
<i>P.falciparum</i>	-	<i>Plasmodium Falciparum</i>
<i>P.vivax</i>	-	<i>Plasmodium vivax</i>
PB	-	pares de bases
PCR	-	Reação da Polimerase em Cadeia
pH	-	Potencial Hidrogeniônico

PHHF	-	Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal
RDW	-	Do Inglês <i>Red Blood Cells</i> (Células vermelhas sanguíneas)
RFLP	-	Do Inglês <i>Restriction fragment length polymorphism</i> (Polimorfismos por tamanho de fragmentos de restrição).
RNs	-	Recém-nascidos
SIVEP	-	Sistema de vigilância epidemiológica
SNP	-	Do Inglês Single nucleotide polymorphisms (Polimorfismo de base única)
UFAM	-	Universidade Federal do Amazonas
WBC	-	Do Inglês <i>White Blood Cells</i> (Células brancas sanguíneas)
WHO	-	Do Inglês World Health Organization (Organização Mundial de Saúde).
$\alpha$ -thal	-	Talassemia Alfa
$\beta$ -thal	-	Talassemia Beta
$\gamma$ -GT	-	Gama Glutamil Transferase

## 1. INTRODUÇÃO

A malária é a doença parasitária endêmica mais prevalente no mundo, afetando cerca de 250 milhões de pessoas ao ano (VENTURA, 1999; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Considerada problema de saúde pública em mais de 107 países, cerca de 3 bilhões de pessoas (50% da população mundial) convivem com os riscos de contágio. Anualmente, principalmente no continente africano, cerca de 300 a 500 milhões de

novos casos com 1 milhão de mortes ao ano em consequência da doença (FREVERT & NARDIN, 2005).

A maioria dos casos de malária nas Américas ocorre no Brasil, onde o *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) é responsável por 84% dos casos registrados, dos quais 99,8% ocorrem na Amazônia brasileira. Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (FVS, 2010), 66.508 casos de malária foram confirmados em Manaus entre os 133.483 casos registrados no Estado do Amazonas no período entre janeiro de 2010 à dezembro de 2011 (SIVEP-MALÁRIA, 2011). Até outubro do ano de 2012 foram registrados 72.246 casos de malária confirmados no Amazonas, sendo 7.997 na capital. (FVS/AM, 2012).

Uma particularidade da malária *vivax* são as recaídas, definida como o reaparecimento da doença causada pela sobrevivência de hipnozoítas (formas latentes de *P. vivax* no fígado), nos quais podem ser responsáveis pela grande morbidade da doença, comprometendo o desenvolvimento sócio-econômico e intelectual dos indivíduos que vivem em áreas endêmicas (OLIVEIRA – FERREIRA *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, tem sido observado um aumento na frequência dos casos da malária grave por *P. vivax* em áreas endêmicas do Brasil (ALEXANDRE *et al.*, 2010; SIQUEIRA *et al.*, 2010; LACERDA *et al.*, 2012), Indonésia (TRIIJA *et al.*, 2008; POESPROPRODJO *et al.*, 2009) e Índia (KOCHAR *et al.*, 2005; 2009).

Estudos demonstraram que inúmeros são os fatores moduladores nos aspectos clínicos da malária, em que características individuais, do patógeno e do hospedeiro podem participam na suscetibilidade aos agentes infecciosos como na gravidade da infecção ou levar a uma resistência natural à doença (BOULOS *et al.*, 1986; ANSTEY *et al.*, 2009). Ainda não estão claros quais são os mecanismos fisiopatogênicos relacionados à malária *vivax* grave. O grande desafio para o entendimento da clínica da doença é estabelecer sob quais circunstâncias a infecção se torna grave ou mesmo fatal.

A literatura atual demonstra frequências menores para malária causada pelo *P. vivax* em indivíduos portadores do traço falciforme (HbAS) quando comparado a indivíduos normais (HbAA) (MILLER et al., 1976; GALINSKI et al., 2008; LAWALY et al., 2010; WILLIAMS et al., 2011; TAYLOR et al., 2012). Além disso, trabalhos envolvendo as hemoglobinopatias de síntese como as talassemias alfa e beta (O'DONNELL et al., 2009; MESTIASHVILI et al., 2010; ROSANAS-URGELL et al., 2012), e a enzimopatia pela deficiência da desidrogenase da glicose 6-fosfato (G6PD) (LOUICHAROEN et al., 2009; SANTANA et al., 2009; LESLIE et al., 2010; KUWAHATA et al., 2010; RAMOS JÚNIOR et al., 2010; GAMA et al., 2011; LACERDA et al., 2012) podem modificar a clínica dos indivíduos portadores da malária vivax (LOUICHAROEN et al., 2009; LESLIE et al., 2010).

Dessa forma, estudos com populações de nossa região amazônica, onde a malária é endêmica, julga-se importante para correlacionar a distribuição dessa doença com a presença de polimorfismos genéticos e a clínica do paciente. Tais questões motivam a investigação, uma vez que o conhecimento desses processos permite a criação de estratégias efetivas de prevenção, controle e tratamento dessas doenças, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida dos grupos populacionais envolvidos, além do conhecimento dos polimorfismos genéticos na população brasileira.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

A malária é a mais importante doença parasitária em todo o mundo representando um importante problema de saúde pública. Apesar de ser uma doença infecciosa prevenível e tratável, continua causando grande impacto na saúde pública das áreas tropicais e subtropicais do globo, devido ao seu alto grau de morbidade e mortalidade, onde as condições socioeconômicas são precárias (Figura 1) (WHO, 2011).

Cerca de 3,3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco de malária anualmente, e são estimados 225 milhões de casos da doença com aproximadamente 781.000 mortes anuais, dos quais 91% dos óbitos ocorreram entre crianças abaixo de cinco anos de idade e mulheres grávidas, habitantes do continente africano (WHO, 2011; WHO, 2012 ).

A malária é uma doença parasitária aguda, que eventualmente se manifesta de forma crônica. Os protozoários responsáveis pela malária pertencem à ordem *Haemosporidia*, família *Plasmodidae*, gênero *Plasmodium*. Quatro espécies causam doença humana: *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale* (LAVERAN, 1881; GRASSI, 1890; WELCH, 1897; STEPHENS, 1922), e são transmitidas por mosquitos do gênero *Anopheles* (SILVA *et al.*, 2002).

Estima-se que a malária por *P. falciparum* seja responsável pela morte de mais de um milhão de crianças com idade inferior a cinco anos na África todos os anos (KREUELS *et al.*, 2010). Destas quatro espécies, o *P. vivax* é o mais amplamente distribuído pelas zonas tropicais e subtropicais do globo, responsável por 25-40% dos casos clínicos de malária relatados em todo o mundo (WESTENBERGER *et al.*, 2010).





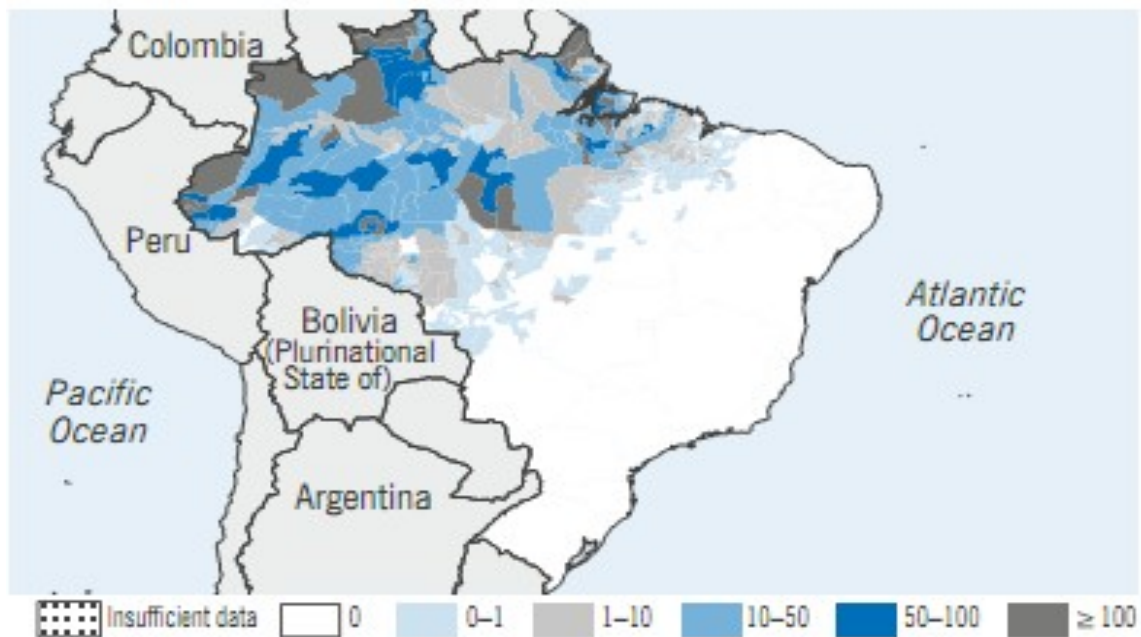
**Figura 1.** Áreas de risco de transmissão de malária no mundo.

**Fonte:** Adaptado de World Malaria Report 2009.

## **2.1 Epidemiologia da Malária**

De acordo com a Organização Panamericana de Saúde, a malária é prevalente em 90 países, com 36% da população global vivendo em área de risco de transmissão. Destes, 7% residem em área sem programa para o controle da malária e 29% em regiões com baixa transmissibilidade (PAHO, 2010).

No Brasil, aproximadamente 99,8% dos casos de malária são registrados na região Amazônica, com média de 500.000 casos anuais (SVS/MS, 2010). Embora o principal mosquito vetor (*Anopheles darlingi*) esteja presente em cerca de 80% do país, atualmente o risco de transmissão da malária não é uniforme, a área endêmica é a Amazônia Legal, composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e parte do Maranhão (Figura 2) (SVS/MS, 2010), em áreas onde existem condições precárias de habitação e trabalho, as quais se encontram próximas as florestas e as coleções de água (GONÇALVES E ALECRIM, 2004; BRASIL, 2005).



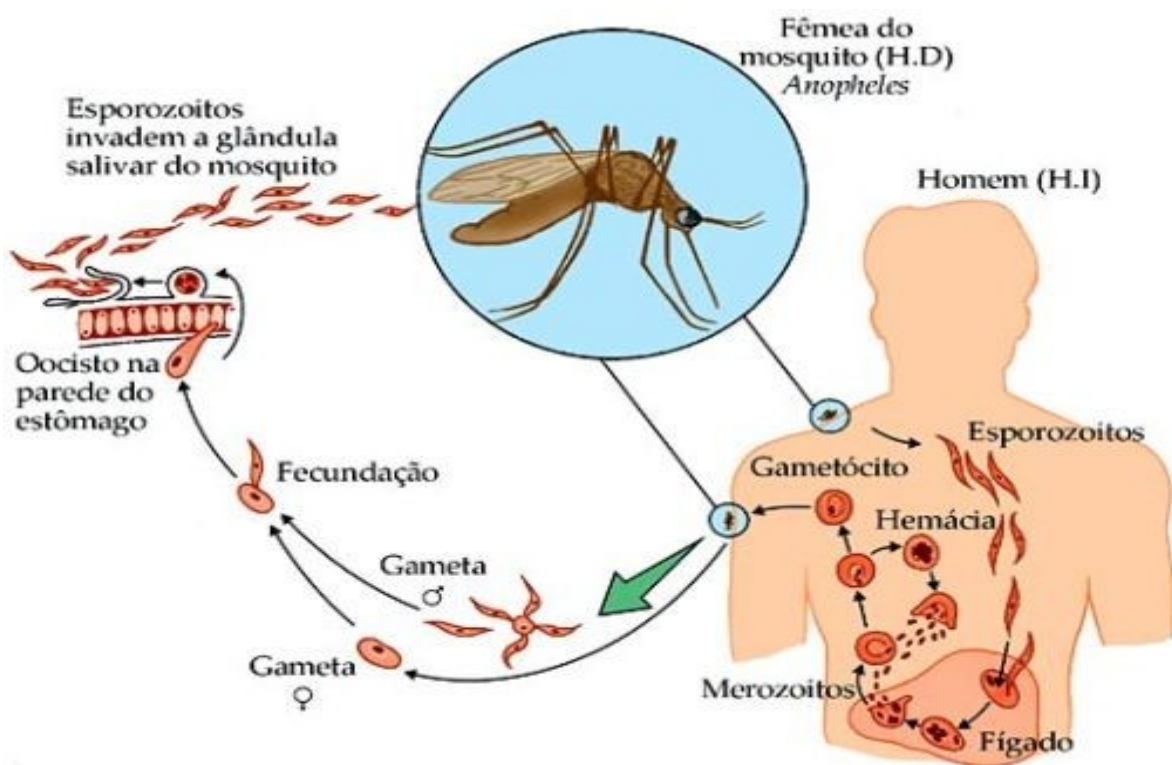
**Figura 2.** Distribuição de casos confirmados de Malária no Brasil (por 1000 Habitantes) (World Malaria Report, 2011).

A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) é um centro de atendimento terciário para o tratamento de doenças infecciosas, atendendo cerca de 30% dos casos de malária da cidade de Manaus (OLIVEIRA – FERREIRA et al., 2010). Até outubro do ano de 2012 foram registrados 72.246 casos de malária confirmados no Amazonas, sendo 7.997 na capital. (FVS/AM, 2012).

## 2.2 Ciclo biológico do *Plasmodium sp.*

O ciclo biológico da malária é basicamente o mesmo para todas as espécies do gênero *Plasmodium*, com duas fases reprodutivas: uma fase em que o parasito se reproduz assexuadamente e que ocorre no homem (hospedeiro intermediário), e outra fase denominada sexuada que ocorre no mosquito (hospedeiro definitivo) (Figura 3). Ao

realizar o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, inocula através da derme e vasos sanguíneos, as formas denominadas esporozoítos, os quais migram através da corrente sanguínea para células do parênquima hepático, onde se multiplicam assexuadamente (esquizogonia), produzindo os esquizontes teciduais primários. Estas formas se rompem, liberando os merozoítos, inicialmente em vesículas (merossomos), e em seguida atingem as células sanguíneas, fixando-se nas hemácias, transformando-se aí em trofozoítos jovens, podendo ainda alcançar a forma de esquizonte. Os merozoítos diferenciam-se nas formas sexuadas do parasito, denominadas gametócitos, e quando ingeridos pelo mosquito, dão origem ao ciclo de vida do parasito no invertebrado. Nas infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos permanecem nos hepatócitos, formando hipnozoítos, responsáveis pelas recaídas da doença (Thibergue et al., 2007). No tubo digestivo do mosquito, os gametócitos masculinos sofrem gametogênese e fertilizam o gametócito feminino. O zigoto desenvolve-se na parede do tubo digestivo sob a forma de oocisto, originando os esporozoítos que migram para as glândulas salivares do mosquito, onde poderão ser novamente transmitidos ao homem.



**Figura 3.** Ciclo biológico do *Plasmodium* sp.

**Fonte:** Google – Imagem (Ciclo evolutivo do Plasmodium)  
<http://nossomeioprinteiro.files.wordpress.com>

### 2.3 Aspectos Clínicos

## 2.4 Malária Não Grave

A malária, em sua forma mais freqüente, a não grave, é uma doença febril aguda, caracterizada por febre alta, acompanhada de calafrios, sudorese profunda e cefaléia, que ocorrem em padrões cíclicos, dependendo da espécie do *Plasmodium sp.* infectante (BRASIL, 2010).

As manifestações clínicas da malária se iniciam após um período de incubação variável segundo a espécie do *Plasmodium sp.* causadora da infecção (média de 12 dias para o *P. falciparum* e 14 dias para o *P. vivax*) (REY, 2008).

## 3. Malária Grave

As manifestações da malária grave são variadas e dependem do órgão envolvido. Em geral, o diagnóstico das formas graves da doença é realizado pelos achados clínicos e laboratoriais preconizados pela OMS (Quadro 1) (GOMES et al., 2011). As principais causas da serevidade da doença são caracterizadas por diversas disfunções sistêmicas, como complicações cerebrais, renais, pulmonares, hematológicas, circulatórias e hepáticas (ALVES et al., 2007).

A malária grave está freqüentemente associada a infecções causadas por *P. falciparum*. Apesar disso, crescentes relatos na literatura têm destacado casos de malária grave por *P. vivax* (PRICE et al., 2009; ACHARYA et al., 2011).

A anemia grave, definida por  $Hb < 7g/dl$  e  $Ht < 20\%$ , é uma conseqüência inevitável da malária grave, sendo a icterícia (bilirrubina sérica total  $> 3 mg/dL$ ) bastante comum nos pacientes, principalmente naqueles com insuficiência renal aguda e parasitemia acima de  $100.000/mm^3$  (WHO, 2000).



**Quadro 1.** Critérios diagnósticos para Malária Grave por *Plasmodium Falciparum*.

<b>Critérios para Malária Grave segundo a OMS 1990, 2000.</b>	
<b>Manifestações Clínicas</b>	<b>Características</b>
<b>Malária cerebral</b>	Coma não atribuído a outras causas, com Glasgow $\leq 9$
<b>Anemia severa</b>	Hemoglobina $< 5\text{g/dL}$ , Hematócrito $< 15\%$ com parasitemia $> 10.000\mu\text{l}$
<b>Insuficiência renal aguda</b>	Diurese $< 400\text{ml}/24$ horas em adultos ( $< 12\text{ml}/\text{kg}/24$ horas em crianças) e creatinina sérica $> 3,0\text{ mg/dl}$
<b>Edema pulmonar</b>	Alterações radiográficas e hipoxemia severa
<b>Hipoglicemia grave</b>	Glicemia $< 40\text{ mg/dl}$
<b>Choque</b>	Pressão arterial sistólica $< 70\text{mmHg}$ em pacientes com idade superior a 5 anos ( $< 50\text{mmHg}$ em crianças)
<b>Sangramento anormal e/ou coagulação intravascular disseminada</b>	Sangramento espontâneo nasal, trato gastrointestinal ou evidência laboratorial de coagulação intravascular disseminada
<b>Convulsões generalizadas repetidas</b>	$\geq 3$ episódios observados em 24 horas
<b>Acidose metabólica</b>	pH arterial $< 7,25$ ou $\text{HCO}_3 < 15\text{mmol/l}$
<b>Hemoglobinúria macroscópica</b>	Hemólise não secundária a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase
<b>Prostação ou Fraqueza</b>	
<b>Comprometimento do estado de consciência</b>	Alteração de nível de consciência
<b>Hiperparasitemia</b>	$>5\%$ dos eritrócitos parasitados ou $> 250.000$ parasitas/ $\mu\text{l}$ em indivíduos não imunes
<b>Hiperpirexia</b>	Temperatura corporal $> 40^\circ\text{C}$
<b>Hiperbilirrubinemia</b>	Bilirrubina total $> 2.5\text{mg/dl}$

Fonte: Adaptado de Gomes et al., 2011

### 3.2 Malária Vivax

Negligenciada por muitos anos, a malária *vivax* foi considerada uma doença benigna e auto limitada, na qual os casos graves e fatais eram associados à infecção por

*P. falciparum* (PICOT, 2006). No entanto, recentes trabalhos demonstraram que a espécie *P. vivax* causa grande morbidade em áreas endêmicas, sendo mais difícil de ser controlada e eliminada do que a malária por *P. falciparum* devido à capacidade de causarem recaídas tardias da doença (hipnozoítos – formas latentes de *P. Vivax* no fígado) (WHITE, 2011), como também pela preferência do parasita em infectar uma menor população de reticulócitos resultando em parasitemias significativamente mais baixas, necessitando o uso de esfregaços de gota espessa e maior capacidade microscópica para o diagnóstico apropriado (LACERDA, 2007).

No entanto, tem-se observado, que algumas infecções pelo *P. vivax* podem evoluir para casos graves, muito semelhantes aos relacionados com o *P. falciparum* (ALEXANDRE *et al.*, 2010; SIQUEIRA *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2010).

Devido não existir critérios de gravidade específicos para a malária *vivax*, em sua forma grave utilizam-se os critérios de gravidade para malária *falciparum* preconizados pela OMS (Quadro 1) (ALEXANDRE *et al.*, 2010).

Estudos clínicos têm apresentado achados de síndrome respiratória aguda, malária cerebral e plaquetopenia em pacientes com malária *vivax* (KOCHAR *et al.*, 2005; LOMAR *et al.*, 2005; LACERDA *et al.*, 2008). Resistência do *P. vivax* à cloroquina (ALECRIM *et al.*, 1999; SWMAWINATA *et al.*, 2003) ou limitação do tratamento por deficiência da glicose 6-fosfato-desidrogenase (G6PD) também são aspectos desafiantes no estabelecimento da cura parasitológica dessa espécie de malária.

Na FMT-HVD em Manaus, em estudo retrospectivo de 2001 a 2002, 12,8% (43/336) dos pacientes hospitalizados com malária *vivax*, apresentaram diagnóstico para a forma grave da infecção, e as complicações clínicas mais frequentes foram anemia severa, hiperbilirrubinemia, insuficiência renal aguda, edema pulmonar e malária álgida (ALEXANDRE, 2004).



A complicação grave tem proporcionado internação de vários pacientes em unidades de terapia intensiva, com prognóstico ruim, ainda pelo desconhecimento de uma terapia eficaz. A única intervenção atual eficaz na reversão do quadro clínico, infelizmente ainda é o tratamento antimalárico agressivo, com esquizotomicidas de ação rápida (LACERDA, 2007; 2009).

### **3.3 Polimorfismos Genéticos do hospedeiro e a Malária**

Diferenças na biologia das espécies dos *Plasmodium sp.* podem explicar parcialmente as diferenças nos padrões da doença. Principal destaque se dá a preferência por determinado estágio de vida das hemácias, enquanto o *P. vivax* infecta somente hemácias jovens ou reticulócitos, o *P. falciparum* parasita indiferentemente qualquer tipo de hemácia, resultando em maior parasitemia. Segundo destaque refere-se à capacidade de multiplicação de determinada espécie. Durante o ciclo hepático, para cada esporozoítio de *P.falciparum* que penetra no hepatócito, 40.000 merozoítos são liberados, enquanto o *P. vivax*, em torno de 10.000 merozoítos. Além disso, ao fim de cada ciclo eritrocítico, cada hemácia parasitada pelo *P. falciparum* libera de 8 a 32 novos merozoítos, enquanto *P. vivax* libera de 12 a 18 (MILLER et al., 2002; REY, 2009).

A malária, por ser uma doença antiga e de grande impacto na saúde da população, exerceu grande pressão seletiva no genoma humano (KWIATKOWSKI, 2005; LONGLEY et al., 2011). Centenas de polimorfismos genéticos de enzimas e proteínas estruturais das hemácias surgiram nas populações em áreas endêmicas para malária, conferindo certa proteção contra formas graves e potencialmente fatais da doença (DRISS et al., 2011; LONGLEY et al., 2011).

Existem algumas condições relacionadas às características das hemácias que podem conferir uma resistência natural à doença, as quais representam formas de proteção apenas parciais, porém suficientes para evitar situações de gravidade. Podemos incluir entre estes fatores as hemoglobinopatias, as talassemias, o antígeno Duffy, o sistema ABO, a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), e a deficiência de piruvato kinase (PK) (ROWE et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2010; BERGHOUT et al., 2012; MILLIMONO et al., 2012).

**Quadro 2.** Mutações/Polimorfismos genéticos relacionados à susceptibilidade / resistência por malária.

<b>GENE</b>	<b>FENÓTIPO</b>	<b>MECANISMO DE PROTEÇÃO PROPOSTO</b>
Hemoglobina C ( <i>HbC</i> )	Diminuição da Malária Grave e Não Grave.	Redução da citoaderência nos eritrócitos infectados
Hemoglobina E ( <i>HbE</i> )	Diminuição da Malária Grave e queda da parasitemia.	Redução da invasão dos eritrócitos por merozoítos, menor crescimento do parasita intra-eritrocitário e fagocitose dos eritrócitos infectados.
Hemoglobina S ( <i>HbS</i> )	Diminuição da Malária Grave e Não Grave.	Falcização seletiva de eritrócitos infectados levando à depuração aumentada pelo baço. Redução da invasão de eritrócitos, fagocitose precoce, e inibição do crescimento do parasita pelo estresse oxidativo em microvênulas. Aumento da imunidade inata e adquirida.
$\alpha$ - Talassemia ( $\alpha$ - <i>thal</i> )	Diminuição da Malária Grave e da anemia causada por malária.	Redução do reajuste. Aumento da contagem de reticulócitos em homozigotos reduzindo a quantidade de hemoglobina perdida para uma densidade parasitária, protegendo assim contra a anemia grave.
$\beta$ - Talassemia ( $\beta$ - <i>thal</i> )	Diminuição da Malária Grave.	
Desidrogenase da Glicose 6-fosfato (G6PD)	Diminuição da Malária Grave e Não Grave.	Aumento da vulnerabilidade do eritrócito com deficiência de G6PD ao estresse oxidante, provocando uma proteção contra parasitismo.

**Fonte:** DRISS *et al.*, 2011.

Estudos têm demonstrado que a severidade da malária a várias infecções varia significativamente entre os indivíduos e as populações (GREENWOOD, 1991). Várias mutações que causam doenças hereditárias foram relatadas por influenciar a severidade da malária (VERRA *at al.*, 2009). Estudos recentes têm relatado que em diferentes populações, os resultados têm sido muitas vezes contraditórios, onde um polimorfismo inicialmente associada com o aumento do risco da Malária Grave (MG) em um dado estudo, pode estar associado com a proteção contra a severidade em outro (WEATHERALL & CLEGG, 2002).

### **3.4 Desidrogenase da Glicose 6-fosfato (G6PD)**

A Desidrogenase da glicose 6-fosfato (G6PD) possui localização citoplasmática responsável pela catálise da primeira etapa da via metabólica da hexose monofosfato, que atua no primeiro passo do ciclo das hexoses, participando da produção de NADPH. A G6PD é importante para a manutenção da estrutura tridimensional das proteínas da membrana eritrocitária, atuando como doadora de hidrogênio em várias vias metabólicas (STRYER, 1995).

Atua especialmente na manutenção da integridade dos eritrócitos, evitando a oxidação da hemoglobina e de outras proteínas celulares. Assim, o eritrócito maduro, em seu metabolismo utiliza a glicose como principal fonte para gerar energia (ATP) e potencial redutor (NADPH), metabolizada por meio da via glicolítica e pela via das pentoses-fosfato (LUZZATTO & MEHTA, 1995).

A atividade enzimática da G6PD gera NADPH que é utilizado para a redução da glutatona. A glutatona reduzida restaura então a hemoglobina para a forma solúvel. Assim, a manutenção de altas concentrações de glutatona reduzida representa a

principal defesa contra danos oxidativos à hemoglobina (PRCHAL E GREGG, 2005; BEUTLER E DUPARC, 2007).

#### **4. Aspectos Genéticos da G6PD**

A enzimopatia possui um padrão de herança ligada ao sexo e define as representantes do gênero feminino como deficientes homozigotas ou heterozigotas, enquanto os representantes do gênero masculino deficientes em hemizigotos (BEUTLER, 1996). A heterozigoze feminina ocorre devido a certo grau de lyonização (LYON, 1961), ou seja, inativação aleatória do cromossomo X, apresentando uma população mista de hemácias, uma parte deficiente e outra com função normal da G6PD (DAVIDSON et al., 1963), o que dificulta muitas vezes o diagnóstico da enzimopatia feminina por métodos bioquímicos. O mesmo pode ser feito com segurança através de técnicas moleculares.

Esta enzima é considerada uma das mais polimórficas da população humana (frequência alélica > 1%) nas populações onde correm, enquanto outras, consideradas raras (frequência alélica < 1%), estão restritas a determinadas regiões, sendo as principais causas de anemia hemolítica não-esferocítica crônica – AHNEC (WHO, 1990; NOTARO *et al.*, 2000).

#### **5. Deficiência da G6PD**

Devido ao fenômeno de inativação do cromossomo X, as mulheres apresentam hemácias que expressam tardiamente genes normais ou variantes. (SENOZAM & THIELMAN, 1991). Este fenômeno concede vantagem evolucionária nas mulheres heterozigotas, o que parece conferir resistência à infecção pelo *Plasmodium falciparum*, quando comparadas aos homens hemizigotos deficientes da G6PD (BEUTLER, 1975; MEHTA & MEHTA, 1991).

Indivíduos deficientes da G6PD são normalmente assintomáticos. No entanto, uma vez que as hemácias sejam expostas a agentes oxidantes, ocorre desnaturação da hemoglobina e rompimento da membrana celular. As principais consequências clínicas da deficiência incluem anemia hemolítica aguda, anemia hemolítica crônica, dor abdominal, cefaléia, dispnéia, icterícia neonatal, podendo, em alguns casos, ser fatal (BEUTLER, 1996).

As variantes de G6PD diferem uma das outras em relação à atividade da enzima, mobilidade eletroforética, Km (constante de Michaelis) para seus substrato (G6P e NADP), uso de substratos análogos, estabilidade ao calor e pH ótimo. Com base nesses critérios, cerca de 400 variantes da G6PD foram descritas, tendo a maioria atividade reduzida, sendo assim caracterizadas como variantes deficientes (SAHA & SAMUEL, 1991).

De acordo com Luzzatto & Mehta (1995), as variantes da G6PD determinam diferentes graus de alterações na atividade enzimática e podem ser agrupadas em cinco classes com base na atividade residual:

#### **Variantes de classe 1**

Caracterizam-se por uma actividade enzimática extremamente baixa (inferior a 10%), levando a uma forma rara de anemia hemolítica não esferocítica

#### **Variantes de classe 2 e 3**

Nelas se incluem 90% das deficiências de G6PD. Estas variantes não se associam a hemólise crônica, mas esta surge durante stress oxidativo. A variante Mediterrânica é variante de classe 2 mais comum. Não é apenas instável pois também é sintetizada em quantidades subnormais e tem baixa atividade. A variante A- é a variante de classe 3 mais representativa.

#### **Variantes de classe 4**

Têm atividade enzimática normal e não se associam a patologia. Nesta classe encontram-se as variantes ditas normais, A e B.

#### **Variantes de classe 5**

Têm atividade enzimática aumentada e não se encontra patologia associada. Um exemplo é a variante Hektoen.

### **6. Aspectos Epidemiológicos da deficiência da G6PD**

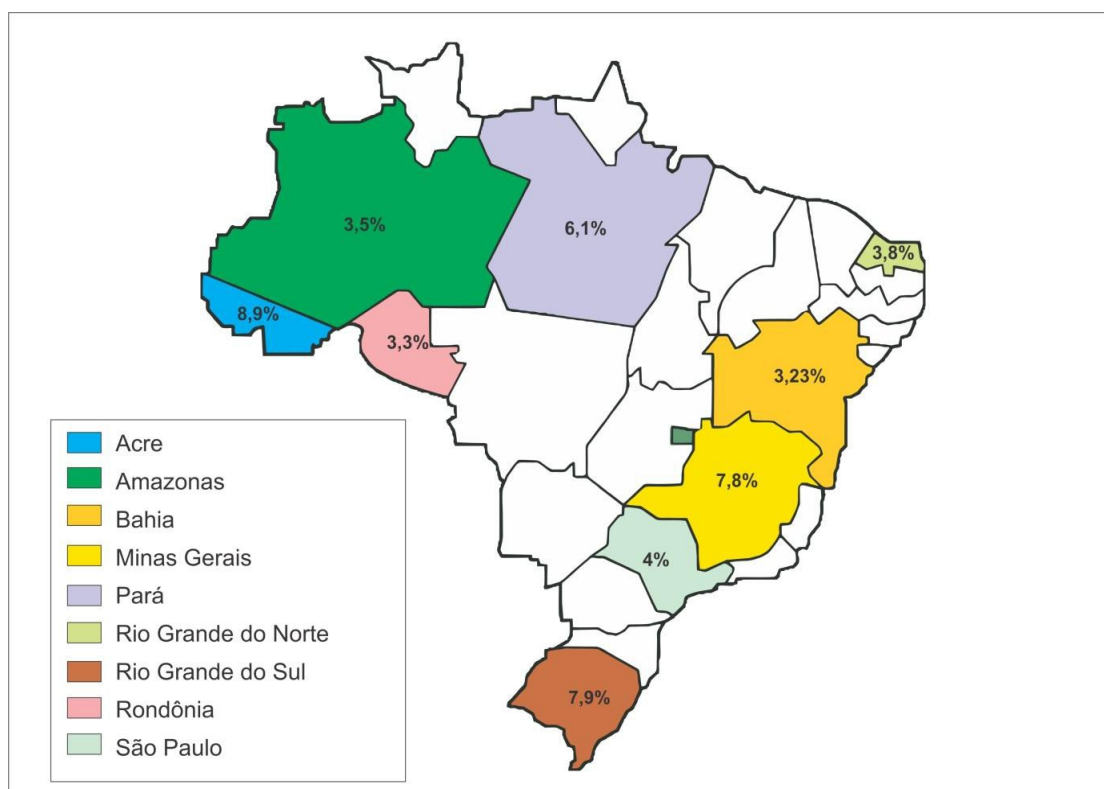
A prevalência da deficiência da G6PD coincide com regiões onde a malária foi uma doença endêmica. Esta distribuição é típica de outras alterações genéticas, como a HbS, HbE, talassemia e persistência hereditária da hemoglobina fetal (PHHF) (ORZALESI et al., 1984; MEHTA, 1994; CLARK et al., 1997).

Cerca de 400 milhões de pessoas da população mundial são afetadas pela deficiência da enzima G6PD (BEUTLER et al., 1989a; NKHOMA et al. 2009). As frequências dessa enzimopatia na população mundial podem alcançar índices de 70%, como é o caso dos judeus kurdos (NKHOMA et al., 2009) e até sua total ausência ( WEIMER et al., 1993).

A heterogeneidade do gene G6PD encontra-se amplamente distribuída na população brasileira com predominância das variantes Africana/G6PD A- (202 G-A; 376 A-G) e G6PD Mediterrânea (563 C-T) (SAAD et al., 1997; COMPRI et al., 2000; CASTRO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; CARDOSO et al., 2012). Outras variantes já forma descritas como G6PD Seattle (844 G-C) (WEIMER et al., 1998; HAMEL et al., 2002; MEZZACAPPA et al., 2010), G6PD Chatam (SAAD et al., 1997), G6PD Santamaria (542 A-T, 376 A-G e G6PD Tokyo (1246 G-A) (HAMEL et al., 2002), assim como a identificação de novas variantes: G6PD Campinas (1463G-T) (BARONCIANI et al.,

1993); G6PD Sumaré (1272 T-G) (ARRUDA et al., 1997); Lages (40G--A), Farroupilha (977C-A) (WEIMER et al., 1998); G6PD Belém (409 C-T), G6PD Ananindeua (376 A-G, 871 G-A), G6PD Crispim (375 G-T, 379 G-T, 383 T-C, e 384 C-T) e G6PD Amazonia (185 C-A) (HAMEL et al., 2002).

Estudos desenvolvidos em diferentes regiões do Brasil demonstraram prevalências dessa enzimopatia em torno de 3.23 % e 8.9%, principalmente estudos realizados entre indivíduos do gênero masculino (MARQUES & CAMPOS 1975; KUHN et al., 1983; HAMEL et al., 2002; KATSURAGAWA et al., 2004; CASTRO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009; SANTANA et al., 2009; MAIA et al., 2010; CARDOSO et al., 2012) (Figura 4).



**Figura 4.** Distribuição da deficiência da G6PD no Brasil (Marques e Campos 1975; Kuhn et al., 1983; Hamel et al., 2002; Katsuragawa et al., 2004; Castro et al., 2006; Oliveira et al., 2009; Santana et al., 2009; Maia et al., 2010; Cardoso et al., 2012).



Hamel e colaboradores (2002), relataram a variante G6PD A<sup>-</sup> (202G → A, 376 → G) a mais prevalente (82,1%) em doadores da cidade de Belém-PA. Santos *et al*, (2006) demonstraram uma frequência 12% da deficiência da G6PD em populações susceptíveis à malária no município de Porto Velho, enquanto katsuragawa e colaboradores (2004), nesta mesma localidade demonstraram 3,3%. Sardinha (2007) encontrou prevalência de 3% da deficiência em pacientes atendidos pela Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. A mesma frequência também foi demonstrada por Santana e colaboradores (2009), através de um estudo de base populacional realizado em uma comunidade da cidade de Manaus.

## **7. Desidrogenase da Glicose 6-fosfato e Malária**

A malária é considerada a maior fonte de pressão seletiva conhecida na história recente da humanidade. A distribuição de vários polimorfismos associados com os antígenos de superfície dos eritrócitos (grupos sanguíneos), genes da globina (HbS, HbC, HbE, talassemias, o stress oxidativo (G6PD), citoaderência e o sistema imunitário têm sido associados com a proteção contra a malária (MILLER, 1994; KWIATKOWSKI, 2005).

O conhecimento de que algumas drogas antimaláricas podem induzir hemólise diante da deficiência da G6PD (ALVING et al., 1956) fez sobressair a observação sobre extensas áreas geográficas endêmicas de malária onde coincidentemente existem altas prevalências da deficiência da G6PD (MOTULSKY, 1960; PETERS & NOORDEN, 2009). Quanto às espécies de malária, a maioria dos estudos tem sugerido que a deficiência da desidrogenase da glicose-6 fosfato (G6PD) possui efeito protetor à malária falciparum (ROTH et al., 1983; GUINDO et al., 2007), havendo escassos estudos relacionados ao *P. vivax*.

Altas prevalências da G6PD na África, Mediterrâneo e no meio Oeste já foram relatadas, regiões onde o *P. vivax* é endêmico. Devido à larga distribuição geográfica da deficiência da G6PD, tem se levantado a hipótese que essa deficiência pode conferir proteção contra a infecção malárica por *vivax*. Daí o investimento em pesquisas que buscam avaliar a relação entre a malária e a deficiência da G6PD, as quais buscam sustentar esta hipótese.

Inúmeras são as evidências que suportam a hipótese de proteção da malária em fenótipos da deficiência da G6PD. , tais como: (i) A deficiência da G6PD está fortemente associada com a distribuição de endemicidade da malária (OPPENHEIM *et al.*, 1993; ALLISON & CLEYDE, 1961; MOTULSKY, 1961); (ii) Estudos *in vitro*, comparando o crescimento dos parasitas em eritrócitos com e sem a deficiência da G6PD mostrou que o crescimento prolongado em células com a deficiência (FRIEDMAN, 1979; ROTH *et al.*, 1983; ROTH & SCHULMAN, 1988) (iii) Ruwende e colaboradores (1995), demonstraram que a deficiência de G6PD pode reduzir o risco de infecção por malária entre 46 a 58%, tanto em mulheres heterozigotas quanto em homens hemizigóticos.

Beutler (1973) relatou que a deficiência de G6PD foi protetora em soldados afro-americanos no Vietnã que nunca foram expostos a infecção por malária. As taxas de parasitismo causadas por *P. vivax* e *P.falciparum* foram significativamente maiores em indivíduos do sexo masculino com G6PD normal em comparação com deficientes em Nagaland, na Índia (Kar *et al.*,1992). Menores taxas da densidade parasitária foram encontradas em crianças de ambos os sexos para a variante G6PD A- em comparação com as crianças normais da G6PD (ALLISON & CLYDE, 1967; GILLES *et al*, 1967).

Roth e colaboradores (1983) demonstraram *que os* níveis de parasitemia em homens hemizigotos e mulheres heterozigotas deficientes eram três vezes menores do que em

indivíduos normais. Concluíram que a deficiência de G6PD é protetora contra a malária em homens hemizigotos e em mulheres heterozigotas.

No entanto, enquanto estudos buscam evidências clínicas para dar suporte à hipótese que a deficiência da G6PD confere diminuição do risco de infecção malárica grave em homens hemizigotos (GUINDO et al., 2007) e mulheres heterozigotas para a deficiência da G6PD (PARIKH et al., 2004), ainda há muitas controvérsias em ambos os casos (BIENZLE et al., 1972; RUWENDE et al., 1995; GUINDO et al., 2007; CLARK et al., 2008), tanto em mostrar que não há efeito algum sobre a ocorrência de malária não complicada em homens hemizigotos ou mulheres heterozigotas (ENEVOLD et al., 2005), devido à diversidade nos modelos dos estudos, nos vários métodos diagnósticos empregados na detecção da deficiência da G6PD ou ainda da variabilidade de fenótipos enzimáticos.

## **7.2 Hemoglobinopatias**

As hemoglobinas (Hb) humanas constituem um grupo de moléculas com função de promover a absorção, o transporte e a liberação do oxigênio aos tecidos, além do transporte de parte do CO<sub>2</sub> (gás carbônico) (BUNN & FORGET, 1986).

As hemoglobinopatias constituem um grupo de doenças genéticas, caracterizadas por alterações da porção globínica da molécula de hemoglobina, sendo classificadas em dois grupos: estruturais e de síntese. As alterações estruturais incluem mutações gênicas decorrentes de substituições, deleções e inserções de um ou mais nucleotídeos, e as alterações na síntese da hemoglobina (talassemias), ocorrem devido a mutações que promovem a redução ou ausência da síntese de um ou mais tipos de cadeias (BUNN, 1994; BUNN, 1997; NAOUM, 1997).

A grande maioria das variantes estruturais da hemoglobina é consequência de mutações pontuais que podem ocorrer nos códons dos genes da globina, resultando na

substituição de um único aminoácido. Entre as variantes estruturais mais frequentemente encontradas, podemos citar as HbS, HbC, HbD e HbE (CHARACHE, 1990).

## **8. Hemoglobinopatias e Malária**

O metabolismo do parasita necessita da hemoglobina como principal fonte de aminoácido para catálise do pigmento malárico (hemozoína) (EGAN et al, 2002; DEHARO et al., 2003; BECKER et al., 2004;). A existência de uma correlação entre as modificações estruturais na hemoglobina em áreas endêmicas para a malária pode estar indicando manutenção de polimorfismos nas populações humanas. (CHOTIVANICH, et al., 2002).

As hemoglobinopatias, distúrbios genéticos na molécula de hemoglobina, incluindo as talassemias e anemia falciforme, possui frequência elevada em regiões onde a malária é endêmica, evidenciando papel de proteção contra malária grave. Hemoglobinopatias, como HbS ou HbC, são conhecidas por proteger contra a manifestação mais severa e fatal da infecção por *Plasmodium*, ou seja, a malária grave (AIDOO et al., 2002; Mockenhaupt et al., 2004; Williams et al., 2005; May et al., 2007; Agarwal et al., 2000; Modiano et al., 2001). É óbvio que uma redução de risco neste nível fornece uma vantagem de sobrevivência em um ambiente endêmico. No entanto, traços de proteção ao hospedeiro podem também influenciar as infecções assintomáticas mais frequentes e, possivelmente, com um maior efeito (Danquaha et al., 2010).

O efeito protetor de HbS contra a malária por *Plasmodium falciparum* teve sua primeira suspeita há 60 anos atrás, quando Beet (BETT, 1946) e, em seguida, Allison (ALLISON, 1954), destacou a notável coincidência nas distribuições geo-espaciais dessas duas condições importantes. Evidências semelhantes surgiram posteriormente para HbC (LIVINGSTONE, 1973; CAVALLI et al., 1994). Nos anos que se seguiram, a

evidência clínica da proteção contra a malária por *P. falciparum* por HbS e HbC foi fornecida por vários estudos (resumidos nas referências (WILLIAMS, 2006; FLINT et al., 1998). No caso de HbC, a proteção é maior em indivíduos homocigotos com HbCC (AGARWAL et al., 2000), pois a situação com a HbS é menos clara.

No geral, ambas as HbAS e HbCC estão associadas a 90% da redução no risco da malária grave e fatal (MODIANO et al., 2001; WILLIAMS et al., 2005), embora podem existir diferenças importantes no que se refere ao espectro clínico da malária severa contra os quais cada um protege (MAY et al., 2007).

Um estudo realizado com 3.000 crianças que viviam na Costa do Quênia demonstrou que a HbA HbS protege contra a malária causada pelo *P. falciparum*. A incidência de casos leves de malária (93 contra 1.195) e incidência de internação para casos graves de malária (6/191) foram significativamente menor em crianças com HbAS. Densidade parasitária durante dois episódios de malária grave e suave foram significativamente menores em crianças com HbAS (WILLIAMS et al., 2005).

Estudo epidemiológico realizado na Nigéria mediu o número de parasitas de *P. falciparum* em amostras de sangue de crianças com doença falciforme, e observaram um decréscimo na frequência dos parasitas e menos infecções maláricas. Concluíram que a provável queda na frequência parasitária foi devido principalmente, à destruição das hemácias infectadas (INFORMATION CENTER FOR SICKLE CELL AND THALASSEMIC DISORDERS, 2006).

Na região hiperendêmica do Norte de Gana, foi analisado a influência de HbC e HbS com os índices malariométricos entre mais de 2.000 crianças predominantemente assintomáticas, HbAC ocorreu em 19,7% e HbAS em 7,4% (HbSC, 0,8%; HbCC, 0,8%;

HbSS, 0,3%). As crianças com HbAS apresentaram parasitemia significativamente menor, com menores densidades parasitárias, e uma proporção maior de infecção submicroscópica por *P. falciparum* (DANQUAHA et al., 2010).

Uma meta-análise de estudos epidemiológicos clínicos confirmou recentemente que 62 indivíduos portadores de HbAS, HbCC e HbAC estão significativamente protegidos contra malária severa por *P. falciparum* mas, com exceção da HbAS, que apresentou apenas uma proteção moderada contra a malária não-complicada ou parasitemia assintomático (TAYLOR et al., 2012).

Trabalhos na literatura comprovam que efeitos potenciais das hemoglobinopatias podem contribuir para uma melhor compreensão da epidemiologia da malária, do mecanismo de proteção, e da interação das variantes da hemoglobina com o reaparecimento da parasitemia ou da malária clínica após a intervenção antimalárica (CROMPTON et al., 2008; SOKHNA et al., 2000).

Apesar da correlação espacial global entre malária e hemoglobinopatias, diferenças interpopulacionais têm sido observadas em todo o mundo. Muitos estudos correlacionando hemoglobinopatias e malária têm demonstrado diferentes graus significativos de proteção contra formas clínicas graves, porém, a grande maioria relacionada à malária falciparum, onde maior carga parasitária gera maior gravidade e aumento no número de mortes.

Todavia, hemoglobinopatias podem diferir substancialmente no grau de proteção, conferindo proteção leve ou não contra a malária não complicada e parasitemia assintomática, sendo ainda não totalmente compreendida, principalmente quando correlacionada à malária vivax.

## **9. OBJETIVOS**

### **3.1 Geral**

Caracterizar molecularmente polimorfismos relacionados à Desidrogenase da Glicose 6-fosfato e hemoglobinopatias estruturais em pacientes com malária por *Plasmodium vivax*.

### **9.2 Específicos**

Determinar a frequência de polimorfismos nos genes da enzima da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato;

Determinar a frequência das hemoglobinopatias estruturais;

Identificar a participação dos polimorfismos encontrados com a clínica dos pacientes;

Investigar associações dos polimorfismos como os dados hematológicos e bioquímicos, identificando possíveis marcadores moleculares na gravidade clínica;

Encontrar possíveis biomarcadores moleculares de risco ou proteção da malária *vivax* grave;

## **10. METODOLOGIA**

### **4.1 Tipo de Estudo**

Baseou-se em um estudo descritivo e retrospectivo. A casuística foi composta por pacientes com diagnóstico de malária grave (internados) e não grave (ambulatoriais) de ambos os sexos, oriundos da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HDV), atendidos na Enfermaria de Pesquisa Clínica (PESCLIN) deste hospital, com os dados obtidos dos prontuários atendidos no período março de 2009 a abril de 2010.

### **10.2 População de Estudo**

Foram utilizadas amostras de sangue total de 225 pacientes diagnosticados com malária por *P. vivax* grave e não-grave, de pacientes atendidos na FMT-HVD. Estas amostras se encontravam armazenadas no criobanco na Gerência de Malária da FMT-HVD, aguardando processamento.

### **10.3 Local do Estudo**

O estudo foi realizado na cidade de Manaus (AM), Brasil. A coleta de amostras foi realizada na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado a partir de pacientes atendidos na Enfermaria de Pesquisa Clínica (PESCLIN) deste hospital. Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular (LAEBM), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

### **10.4 Critérios de inclusão e exclusão**

Foram selecionados pacientes internados e ambulatoriais na FMT/AM com diagnóstico de malária *vivax*, de ambos os sexos, a partir dos 18 anos de idade. O diagnóstico foi realizado pela gota espessa e expresso em cruces, sendo confirmado pela



técnica de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) (posteriori) para excluir *P. falciparum* e infecção mista.

Foram considerados pacientes com malária *vivax* grave os que apresentaram um dos critérios de gravidade de acordo com a Organização Mundial de Saúde. Foram excluídos os pacientes com história de alguma comorbidade (portadores do vírus HIV, vírus da Hepatite B, vírus da Hepatite C e dengue).

### **10.5 Considerações Éticas**

A pesquisa foi iniciada após a liberação formal e aceitação por parte da instituição em questão, FMT/AM, aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa (CEP) e após assinatura do Termo de Compromisso Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1) pelos indivíduos que foram sujeitos à pesquisa, tendo em vista o atendimento às disposições da resolução CNS nº196/96, visando o bem estar dos participantes.

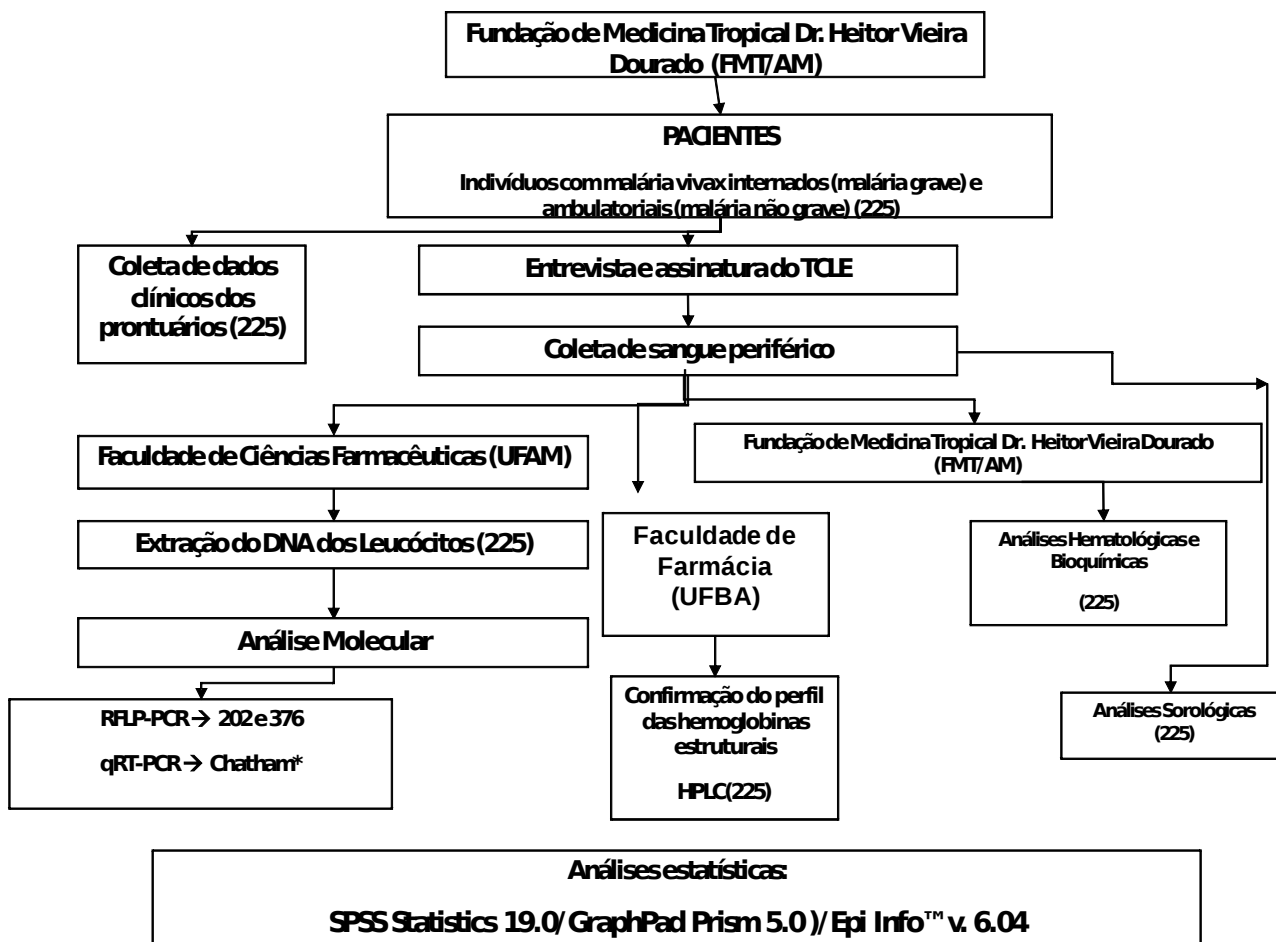
As amostras utilizadas no estudo foram obtidas por meio do projeto maior “*Caracterização clínica da malária complicada por Plasmodium vivax*”, e o mesmo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), em junho de 2009, pelo parecer nº343/2009, protocolo de nº 25.000.011.792/2009-15 (Anexo 2).

### **10.6 Procedimentos de Coleta de Sangue Venoso**

Os pacientes que preencherem os critérios de inclusão foram convidados a participar da pesquisa assinando o TCLE. Amostras de sangue venoso foram coletadas de cada paciente com malária *vivax* grave e não grave conforme descrito no Anexo 3.

### **10.7 Análise molecular**

As etapas executadas no laboratório de Biologia Molecular estão organizadas no fluxograma a seguir.



\*Etapa realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Alfredo da Mata.

Figura 5. Representação esquemática do desenho do estudo.

## **11. 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. Após a extração, o DNA será armazenado a -20°C até o momento das análises moleculares.

## **12. PCR-RFLP (Polimorfismos de tamanhos de fragmentos de restrição)**

A caracterização molecular das mutações 202 e 376 no gene da enzima G6PD foi investigada pela técnicas da Reação da Polimerase em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) (MULLIS & FALLONA, 1987), e RFLP (Fragmentos de restrição de tamanhos Polimórficos), no qual foram empregados oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) específicos para o gene da G6PD (Tabela 1) (MOMBO et al., 2003). Após a amplificação das regiões contendo as mutações 202 e 376, foi realizado a digestão do produto desta amplificação com as enzimas de restrição *FokI* e *NlaIII* (*New England BioLabs Inc.*) para as mutações 376 e 202, respectivamente. A reação de PCR foi realizada em termociclador, o produto da amplificação foi corado pelo brometo de etídeo e analisado por eletroforese em gel de agarose (SIGMA) a 1,5% em tampão TAE 1X pH 8.3 (tris-base 40mM, NaOAC, 20mM, EDTA 1mM)). A análise do produto digerido foi realizada em gel de poliacrilamida (SIGMA) a 7%, corado pelo brometo de etídio a 0,002% e visualizado sob luz ultravioleta. Os polimorfismos foram analisados pela técnica RFLP-PCR, técnica que utiliza digestão dos fragmentos obtidos com enzimas de restrição (SUTTON *et al.*, 1989).

**Tabela 1** - Sequências dos oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) para investigação das mutações 202 e 376 no gene da **Desidrogenase da Glicose 6-fosfato** (HIRONO & BEUTLER, 1988).

MUTAÇÃO	SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS SINTÉTICOS 5'- 3'	PARES DE BASES (PB)	ÉXON	ENZIMA DE RESTRIÇÃO
A <sup>-</sup> (202 G→A)	5'CGTGTCCCCAGCCACTTCTA3' 5'CACGCTCATAGAGTGGTGGG3'	919	III-V	NlaIII
A <sup>-</sup> (376 A→G)	5'CTGCGTTTTCTCCGCCAATC3' 5'AGGGCAACGGCAAGCCTTAC3'	585	V	FoKI

A reação da PCR foi realizada utilizando-se o protocolo de preparo da PCR, conforme descrito no Quadro 3.

**Quadro 3** - Reagentes para o preparo da PCR da variante 376 e 202.

<b>REAGENTES</b>	<b>QUANTIDADES (<math>\mu</math>L)</b>
<b>H2O MilliQ</b>	36
<b>Tampão Tris-HCl (pH:8,4) 5X</b>	5,0
<b>MgCl<sub>2</sub> (50Mm)</b>	2,5
<b>dNTP (10 Mm)</b>	3,0
<b>Iniciadores <i>Forward</i> G6PD*376 25pmol</b>	0,5
<b>Iniciador <i>Reverse</i> G6PD*376 25pmol</b>	0,5
<b>Taq DNA polimerase 5U/<math>\mu</math>L</b>	0,5
<b>DNA</b>	2,0
<b>TOTAL</b>	50,0

As etapas da termociclagem estão especificadas nos Quadros 4 e 5.

**Quadro 4** - Termociclagem da PCR para variante 376.

<b>NÚMERO DE CICLOS</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>TEMPO</b>	<b>REAÇÃO</b>
1	94	10 minutos	Pré-Desnaturação
35	94	1 minuto	Desnaturação
	56	1 minuto	Anelamento
	72	1 minuto	Extensão
1	72	12 minutos	Extensão final
1	4	10 minutos	Manutenção

**Fonte:** (HIRONO & BEUTLER, 1988).

**Quadro 5** - Termociclagem da PCR para variante 202.

<b>NÚMERO DE CICLOS</b>	<b>TEMPERATURA(°C)</b>	<b>TEMPO</b>	<b>REAÇÃO</b>
1	94	10 minutos	Pré-Desnaturação

30	94	1 minuto	Desnaturação
	68	1 minuto e 10 segundos	Anelamento
	72	1 minuto	Extensão
1	72	12 minutos	Extensão final
1	4	10 minutos	Manutenção

**Fonte:** (HIRONO & BEUTLER, 1988).

Após a reação obteve-se um produto final de 585 pares de bases (pb) para 376 e 919 pares de bases (pb) para 202. Controles negativos e positivos foram incluídos, com a finalidade de testar a presença de contaminantes e confirmar a fidelidade da reação (SAMBROOK *et al.*, 1989).

### **13. Análise de Fragmentos de Restrição de Tamanhos Polimórficos (RFLP)**

A digestão dos produtos da reação de PCR foi realizada utilizando-se as endonucleases de restrição *FokI* e *NlaIII*, para as mutações 376 e 202, respectivamente. As reações foram incubadas a 37°C, sendo composta por 15 µl do produto da PCR (≅ 200 a 500 ng de DNA amplificado); 6,0 U da enzima de restrição (*New England BioLabs Inc.*); 5,0 µl do tampão 10X concentrado pH 7.9 (50 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1 mM de DTT) e 2,6 µl de água destilada estéril, em um total de 20 µl. No protocolo com a enzima *NlaIII*, adicionou-se 0,20 µl de BSA (Soro Albumina Bovina).

A digestão dos produtos da PCR pela endonuclease de restrição *NLAIII* gerou fragmentos de 919 pb para o padrão normal; com dois sítios de corte gerando fragmentos aproximadamente de 749, 590, 329 e 170 pb para os hemizigotos. Na pesquisa da mutação 376 utilizou-se a endonuclease de restrição *FokI*; que gerou

fragmentos de 585 pb para o padrão normal; sítios de cortes com fragmentos de aproximadamente 330, 210 e 125 (130), mantendo o fragmento de 585 pb normal para os heterozigotos.

Os fragmentos gerados foram analisados através de corrida eletroforética em gel de poliacrilamida a 8% durante 90 minutos a 60 volts, corados durante cinco minutos com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

#### **14. q-RT PCR e G6PD**

A caracterização molecular da mutação 1003A (Chatham) foi investigada pela técnica da PCR em Tempo Real (qReal-Time PCR). A dicriminação alélica foi realizada em duplicata utilizando o equipamento Step One Plus™ com ensaios TaqMan® .

Os primers e sondas foram customizados utilizando Software Builder File (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com as sequências de DNA obtidas a partir do Genbank™. Os primers e sondas seguem abaixo:

- Sequência do Iniciador Direto: GGCCACCAAAGGGTACCT;
- Sequência do Iniciador Reverso: GAGGACGACGGCTGCAA;
- Sequência Reporter 1: TCCACCACCGCCACTT;
- Sequência Reporter 2: TCCACCACCACCACTT.

As condições de amplificação seguiram a sequencia: 95°C durante 20s, seguido por 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C durante 30 segundos.

#### **15. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

O perfil de hemoglobinas estruturais foi confirmado por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) no equipamento automatizado VARIANT I (BIO-RAD, CA, USA) que utiliza o princípio de troca iônica. O procedimento para as análises requer a adição de 5 µl de amostra de sangue em 500 µl de água destilada, adicionadas a cubetas



de 1mL de capacidade. Os calibradores foram avaliados antes de cada processamento das amostras, de acordo com as recomendações do fabricante. Etapa realizada no Laboratório de Análises Especializadas em Anemias (LAEA – UFBA).

## **15.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Foram utilizados os programas IBM SPSS Statistics 19.0 (CDC, Atlanta, Georgia), EPI-INFO versão 6.04 e GraphPad Prism 5,0.

## **16. Distribuição das Variáveis**

A análise de normalidade da distribuição das variáveis foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A partir desta informação foram utilizados os testes paramétricos ANOVA ou não-paramétrico de Kruskal-Wallis. O teste paramétrico ANOVA foi utilizado para a análise da distribuição de médias de variáveis quantitativas ou numéricas, com distribuição normal dentro de categorias. Além disso, verificando se é provável haver uma diferença entre as médias dos valores, buscou-se dentre as médias apresentadas diferenças significativas conduzidas de múltiplas comparações de médias através do teste de Bonferroni (ou post-hoc). O teste não-paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para as distribuições fora do normal.

## **17. Análise de Variáveis Qualitativas ou Categóricas**

A análise de variáveis qualitativas ou categóricas de três ou mais grupos foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), devidamente corrigido pelos testes de Mantel-Haenszel e Yates. Nas análises de valores inferiores a 4, estas foram realizadas pelo teste exato de Fisher. Os intervalos de confiança em 95% e a razão de prevalência foram calculados para essas variáveis. Os testes de Mann-Whitney e o teste T independente foram utilizados para a análise de duas variáveis numéricas, na

comparação de dois grupos de valores dentro de uma mesma variável, levando-se em consideração a distribuição de cada variável.

## **18. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Artigo 1**

#### **Structural Hemoglobinopathies: A Prevalence Study and Clinical implications in Malaria Patients of *Plasmodium Vivax***

Mathias JLS, Lacerda MVG, Gonçalves, MS, Cerqueira, BAV, Moura-Neto, JP, 2013.  
Haemoglobin profiles: a prevalence study and implications of clinical malaria patients  
of plasmodium vivax.

A ser enviado para a revista Journal of Infectious Disease.

**Structural Hemoglobinopathies: A Prevalence Study and Clinical implications in  
Malaria Patients of *Plasmodium Vivax***

**Jéssica L. Santos Mathias<sup>1</sup>, Marcus V. Guimarães Lacerda<sup>2</sup>, Marilda Souza  
Gonçalvez<sup>3</sup>, Bruno A. Veloso Cerqueira<sup>5</sup>; José Pereira de Moura Neto<sup>1</sup>**

1 -Universidade Federal do Amazonas - UFAM

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

3 - Universidade Federal da Bahia - UFBA

4 - Instituto Leônidas e Maria Deane - FICORUZ/AM

5 - Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC/BA

Correspondence: José Pereira de Moura Neto, Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/UFAM), Manaus, Amazonas, Brasil, Rua Comendador Alexandre Amorim, 330. CEP – 69010-300. Aparecida – Manaus-AM-Brasil.

E-mail: **jp-mn@hotmail.com**.

## ABSTRACT

**Background.** Current studies about the prevalence of hemoglobin S gene and C populations in many tropical and endemic malaria countries, has exerted natural selection, conferring a survival advantage against *Plasmodium* although not fully understood, especially when correlated with *Plasmodium vivax*.

**Methods.** Through a descriptive and retrospective study, we investigated the frequency of structural hemoglobinopathies, between August and December of 2011 in 225 patients diagnosed with malaria by *Plasmodium vivax*, at Amazonas Tropical Medicine Foundation, Manaus-AM (FMT-AM).

**Results.** Our results demonstrated the presence of nine (09) AS and four (04) AC, totaling 7.30% of the patients. Our results showed a lower frequency of severe malaria in AC group. This correlation among hemoglobin genotypes showed significant correlation between AA and AC (Neutrophils ( $p = 0.019$ ), Band neutrophils ( $p = 0.049$ ), Eosinophils ( $p = 0.046$ ), Mean Cell Volume ( $p=0.004$ ), Mean Cell Hemoglobin ( $p =0.008$ ), there was no correlation between AA and the AS. The RDW was our only correlation between AA v/s AS ( $p=0.039$ ) and AA v/s AC ( $p=0.019$ ). The Parasitaemia fever was the most frequent event in our study patients, occurring at 92.30% (12/13) of patients with AS/AC. The parasite density was lower in patients with AS ( $9352.35 \pm 11622.78$ ) and AC ( $11604.80 \pm 11931.85$ ) when compared with AA genotype ( $32431.57 \pm 88719.63$ ), but without statistical significance ( $p = 0.854$ ).

**Conclusions.** These results reveal important roles for malaria's hemoglobin genotypes clinical patients outcomes, and studies are warranted to determine their involvement in severe malaria as well as it possible mechanism of action.

Keywords: *Plasmodium vivax*; Malaria; Structural Hemoglobinopathies; Clinical Data

## INTRODUCTION

Current studies about the prevalence of hemoglobin S gene and C populations in many tropical and endemic malaria countries has exerted natural selection, conferring a survival advantage against *Plasmodium* [1-6]. However, traces of protection in the host may have an influence on asymptomatic infections more frequent and possibly with greater effect [7].

Numerous studies have demonstrated the correlation of hemoglobinopathies conferring protection against the severe clinical form of malaria by *Plasmodium falciparum*, which causes high parasite load gravity and increases the number of deaths, however, it's still not fully understood, especially when correlated with *Plasmodium vivax*. Most of the malaria cases in Brazil are related to *P. vivax* [8], approximately 99.8% of the cases are stated in the Amazon region, with an average of 500.000 cases annually [9]. Amazonian urban agglomerations are under continuous economical development, triggering intense migration flows, such as in the city of Manaus (in the western Brazilian Amazon), helping to maintain the disease under endemic levels [10-11].

Although often regarded as causing a benign infection, there is recent increasing evidence that the overall burden, economic impact, and severity of *P. vivax* have been underestimated, in part due to a bias in the scientific literature, which traditionally devoted most of its attention to the more lethal parasite *Plasmodium falciparum*, probably as a reflection of a more substantial funding [12]. In summary, *P. vivax*, which has long been neglected and mistakenly considered benign [13], is receiving an increasing amount of importance in the debates, taking place on malaria's epidemiology and control, drug resistance, pathogenesis and vaccines [14].

Despite the global spatial correlation between malaria and hemoglobinopathies, interpopulation differences have been observed worldwide. Moreover, vivax malaria has been neglected for too long, underestimating the real impact of this disease in terms of mortality, and are few studies that provide some data about the clinical manifestations and correlate with individual characteristics that may influence the severity of disease in this vivax malaria endemic region [15-18].

Thus, the present study aimed to determine the frequency of structural hemoglobinopathies in patients with malaria by *Plasmodium vivax* in a referral hospital for tropical diseases in the city of Manaus, Amazonas, in addition to identifying the involvement of polymorphisms found on clinical patients in order to find potential molecular biomarkers of risk or protection in malaria's severity.

## **PARTICIPANTS, MATERIALS AND METHODS**

This was a descriptive and retrospective study, consisting of individuals living in east, west and north areas of the city of Manaus, Amazonas. It was conducted between August and December of 2011.

Analysis of medical history and infection as age, gender and patient data were obtained from medical records. The study comprised 225 patients with vivax malaria, of both sexes (50.56% men). The mean age of the patients was  $19.59 \pm 28.14$  years (minimum 1, maximum 88).

Those treated and admitted were classified by the criterion of severe and non-severe malaria, as outlined by the World Health Organization for *P. falciparum*, since there are no specific criteria for *P. vivax*. All patients were treated at Amazon Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado (FMTAM). The study was approved by the National Committee of Ethics and Research, Manaus, Amazon, n°343/2009, procedure n° 25.000.011.792/2009-15, and individuals who were subject to search, signed the Free Informed Consent Form (ICF).

The biochemical analyses were measured by immunochemistry assay (A25 system, BIOSYSTEMS SA, Barcelona, Spain). Haematological analyses were performed using an electronic cell counter, Coulter Count T-890 (Coulter Corporation, FL, USA). The haemoglobin (Hb) profile and HbF levels were investigated by high-performance liquid chromatography (HPLC/VARIANT I; Bio-Rad, CA, USA).

### **Exclusion criteria**

All patients had a history of chronic disease as comorbidities, and mixed falciparum malaria (falciparum and vivax), carriers of the HIV virus, Dengue and Hepatitis B and C were excluded from the study.



### **Inclusion criteria**

All patients aged  $\geq 18$  years and with a diagnosis of malaria by the method of tick blood films, expressed in crosses and confirmed by the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) for *Plasmodium vivax*, excluding cases of *Plasmodium falciparum* and mixed infections. Haematological, biochemical and parasitological analysis were performed in the laboratories of the Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

### **Hemoglobin Genotype**

The hemoglobin genotyping was performed at the Laboratory of Molecular Biology and Pathology, Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ / BA).

### **Laboratory Procedure**

Venous blood samples were collected in a tube containing anticoagulant EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (05mL) for hematological analysis of hemoglobin's and structural profile. Body temperature was measured at the moment of the interview. The fever was characterized with axillary temperature  $\geq 37.5$  ° C. The malaria parasites were counted from 200 leukocytes stained by Giemsa method of tick blood films and parasite density was calculated assuming an average score of 8000 parasites/L.

### **Statistical Analyses**

Baseline characteristics were summarised as means and proportions of selected variables. The distribution of quantitative variables was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. Bivariate correlation analyses and were conducted to determine any correlations between pairs of variables using Spearman's rho correlation. The parametric ANOVA test confirmed by the Bonferroni post hoc test and the nonparametric Kruskal-Wallis test were used to compare means among two or more

groups of interval variables that were normally distributed and not normally distributed, respectively. The interactions between specific categorical clinical variables were tested for significance using a  $\chi^2$  test corrected by Yates's  $\chi^2$  and Fisher's exact tests, taking into account the expected frequency in the table cells.

The statistical analysis was developed to test dependent variables associated with hospitalisations for febrile parasitaemia, body weakness, jaundice, unconsciousness, vomiting, bleeding, headaches, fatigue, weight loss, abdominal pains and others. The cause of hospital admission and all demographic, epidemiological and clinical information and management were collected from hospital records. This information included age, gender, genotype, time of hospitalisation, clinical follow-up, use of blood transfusion and pattern of clinical evolution.

The data analysis was performed using IBM SPSS Statistics 19.0 (CDC, Atlanta, Georgia), the Statistics Data Analysis (STATA) SE 10 (StataCorp, Texas, USA) and GraphPad Prism 5.0. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## **RESULTS**

### **Study population and physical characteristics**

*P. vivax* positive (n= 178) patients attending the Tropical Medicine Foundation of Amazonas, hospital in Manaus, Brazil with confirmed diagnosis for mono-infections were enrolled to study genotype hemoglobin and its implications in disease pathogenesis. Patients with comorbidities, mixed plasmodium infections and virus infection were excluded from this study. As no specific criteria exists for classification of *P. vivax* patients into uncomplicated or severe malaria, we used the criteria described for *P. falciparum* by World Health Organization [19].

Table 1 represents epidemiological and severity criteria used to classify the study group. Patients presenting with uncomplicated malaria (n= 120) and severe malaria represented (n= 58) represented 67.42 and 32.58% of the study population, respectively. Majority of severe malaria cases were characteristic of Jaundice (86.20%), Choloria (75.86%) and Hemoglobinuria (26.09%).

### **Haemoglobin profiles in *P.vivax* infection**

The results for all the haemoglobin profiles in uncomplicated and severe malaria vivax patients are represented on Table 2. We observed no statistically significant differences in haemoglobin genotypes AA, AS and AC frequency between uncomplicated and severe vivax malaria cases in our study population (Table 2).

### **Influence of haemoglobin profiles on protection of severe malaria**

*P. vivax* infections have long been neglected and mistakenly considered 'benign' but several studies have observed thrombocytopenia, anemia, jaundice and acute respiratory distress syndrome related complications in vivax infections. We next compared haemoglobin profiles with hematological and biochemical parameters described as indicators of severe falciparum in malaria patients by WHO.

The correlation between haemoglobin profiles and hematological data showed all values within the normal range (Table 3). However, when correlated by pairs (AA v/s AS and AA v/s AC), significant correlation occurred only of AA v/s AC. The important data result to both correlations occurred among AA v/s AS ( $p=.039$ ) e AA v/s AC ( $p=.019$ ) was RDW (Table 4).

The table 5 showed renal e hepatic dysfunction and function markers. Altered hepatic profile in patients were moderately found and no differences were observed with exception of gamma-glutamyl transferase ( $p<.001$ ), with the parameters measured in AC ( $35.25\pm15.95$  U/L), while AS levels had higher levels ( $240.71\pm184.85$  U/L).

After, we divided uncomplicated and severe malaria cases with two groups, normal to haemoglobin profile (AA) and variant haemoglobin (AS/AC). Due to our low prevalence AC and AS patients found many comparative analyzes could not be made and confirmed. Only mean platelet volume (VPM) and Glucose were significant. We observed decreased VPM and Glucose in uncomplicated malaria patients with AS/AC haemoglobin ( $p=.046$ ;  $p=0.13$ , respectively) compared to severe malaria patients with AA haemoglobin (Table 6).

### **Influence of haemoglobin profiles in Parasitaemia and parasite density data in malaria patients according to haemoglobin genotype.**

The poisson distribution was used to calculate the likelihood of sampling a parasite within the blood volume examined in microscopy. The mean Parasitaemia was obtained from reading three microscipist. Results did not vary according to staining protocol (Giemsa or Field stain) or by microscipist (Figure 1A-1B).

The mean Parasitaemia among haemoglobin genotype was lower in patients with AA, followed by the AS and AC without statistical significance ( $p=0.975$ ). The parasite

density showed the reverse, being greater in the AA, followed by the AC and then AS (Figure 2A-2B). There were no major differences between the media of gametocytes between the genotypes of hemoglobin, differing only in AA gametocytes density was  $293.1 \pm 606.2$  and  $135.5 \pm 134.5$  (AS/AC), no statistical significance ( $p=0.823$ ) (Figure 3A-3B).

## DISCUSSION

In this study, we set out to identify haemoglobin profiles in uncomplicated and severe vivax malaria infected patients to identify influence those on clinical manifestation presentation. Specifically, we measured hematological and biochemical parameters in these patients and examined the association between haemoglobin profiles and *P. vivax* disease. Moreover, to the best of our knowledge, our investigation is the first report to evaluate an association between hemoglobins profiles and biochemical levels in clinical vivax malaria and their association with disease in an adult population residing in a high *P. vivax* prevalent region (Amazon, Brazil).

Lacerda et al. (2009) [15] demonstrated that there is a significant presence of severe vivax malaria cases in the endemic areas of Brazil. Previous studies have shown that the prevalence of hemoglobin variants exerted a natural selection to Plasmodium species in tropical endemic areas in Latin America, particularly those associated with falciparum [5,6,1,2,3,7]. Hemoglobins S and C variants confer significant protection in severe malaria, however, show low or no protection in uncomplicated clinical malaria cases [20]. However, there are no studies that have addressed the correlation of vivax malaria and hemoglobinopathies.

Due to comorbidities, 20.89% (47/225) of patients were excluded from the study. The results showed a prevalence of 7.30% (13/178) of variant hemoglobin (5.06% [9/178] HbAS and 2.24% [4/178] AC) (Table 1). Our study also found 5.06% (9/178) of patients with AA profile were associated with Hereditary Persistence of Fetal Haemoglobin (HPFH). As HPFH is not a structural hemoglobinopathy, these patients were excluded from this study.

The fetal hemoglobin (HbF) actually is considered an alternative strategy for the reduction of malaria-associated morbidity and mortality in patients with sickle cell disease and suggests a model of malaria protection in which high HbF in parasitized RBCs in the first few months of birth [21-22]. Increased of HbF or HPFH demonstrates a resistance to infection by *Plasmodium falciparum*, several reports suggest that infected red blood cells interfere in the development of the parasite [23-25]. On the contrary to the expectation we observed AS patients may have a higher risk of developing severe malaria compared with AA (OR: 1.4,  $p=0.685$ -Yates Corrected) and AC (OR: 1.8,  $p=0.489$ -Yates Corrected), however the results were statistically not significant.

We observed a lower frequency of severity in the AC group, corroborating which other studies which was associated with an reduction in severe malaria by 73% and 20% for homozygous for heterozygous HbC, respectively [26, 6, 4, 2]. HbC has been reported to protect against severe malaria [27], but it is unclear whether relative resistance affects infection, disease, or both. HbAC does not prevent infection but reduced the odds of developing severe malaria and severe anemia [6]. These data support the notion that natural selection of HbC occurs because of the relative resistance it confers against severe malaria but argue against the notion that HbC offers resistance to infection [1, 28 ].

There is correlation that *Plasmodium* infected erythrocytes HbS or HbC bind weakly efficiently to endothelium capillaries that have been implicated in both the pathogenesis of severe malaria and in the evasion of parasite from immunological removal. However, we understand that when the parasite infected erythrocytes containing hemoglobin variants, for example, S, C, D or E they be removed more rapidly from circulation. This evidence of early removal of infected erythrocytes is attributed due macrophage phagocytosis by a series of oxidative damage including increased hemoglobin

denaturation, free iron, stronger aggregation stronger membrane protein band 3 primarily and deposition of complement C3c fragments (29). Also, early and increased destruction of RBCs by the spleen and other immune mechanisms may be involved (30-31). These mechanisms suggested the protection afforded by HbAS might not only be innate, but may include an acquired immune component [32-34].

There are conflicting results described for white cell counts in falciparum malaria patients and its association with disease. In our study, the differential WBC counts were within the normal range as demonstrated by several others [35-37].

Next, on comparing the hematological data we saw no changes in malaria vivax patients. However, on comparing different hemoglobin's, we observed decreased neutrophils counts in HbAS and HbAC patients (Table 3). Other research also demonstrated a decreased neutrophils count and increased lymphocyte numbers in falciparum malaria cases 28 days post malaria infection. [38-39]

Furthermore, when we compared AA v/s AS we observed no significant differences in neutrophils and eosinophils counts in these group of patients. However, we found statistically significant differences in neutrophils ( $p=.019$ ), band neutrophils ( $p=.049$ ), eosinophils ( $p=.046$ ) counts and Mean Cell Volume ( $p=.004$ ), Mean Cell Hemoglobin ( $p=.008$ ), when we compared AA v/s AC (Table 4). Several published studies support our findings that there are changes in the lymphocyte counts in patients with AC [37, 40-42].

Reticuloendothelial system hyperplasia had been defined by previous authors in the form of hepatosplenomegaly and monocytosis [3-4]. Even though monocytosis was present in all haemoglobin profiles, no significant differences in monocyte counts ( $p=0.466$ ) was present on comparing AA, AS and AC. Patients with AC hemoglobin had decreased monocytes ( $5.75\pm 6.02$ ) compared to AA ( $8.59\pm 4.68$ ) and AS ( $9.04\pm 2.83$ )



). In our study hepatomegaly was present in 48.06%, 44.44%, 75% of AA (75/156), AS (4/09) and AC (3/4), respectively (data not shown). Whereas, splenomegaly was observed in 26.28%, 33.33% and 50% of AA (41/156), AS (3/09) and AC (2/4) patients respectively (data not shown). Our results are in agreement with a recent study that have demonstrated an insignificance of hepatomegaly (P=0.525) and splenomegaly (P=.550) in vivax malaria [43]. Individuals with AC hemoglobin had a very significance eosinophilia compared to other groups. This may be due to some parasitic infections that were not ruled out.

On the other hand there was a statistical difference in RDW in individual AA v/s AS (p=0.039) and AA v/s AC (p=0.019) (Table 3, 4). Published studies have shown a slight increase in the RDW is directly proportional to increased Parasitaemia. Increased RDW has been observed in the most malaria studies, and has been attributed to the red cell response to malarial parasite.

We found no differences in hepatic enzymes measured in the serum except for gamma-glutamyl transferase. The levels of GGT (p<0.001) varied with the hemoglobin profile AA (97.59 ± 88.07), AS (240.71 ± 184.85), AC (35.25 ± 15.95). Abnormalities in hepatocellular disease such as hepatitis concomitants of *P. falciparum* were consistent with the literature [49]. Others studies showed Alkaline phosphatase and GGT were elevated in a small number of malaria cases and in the majority of the hepatitis patients [50] A moderate increase in liver enzymes (AST/ALT) is indicative of hepatic cholestasis [51] and viral hepatitis [52]. In falciparum malaria patients, liver enzymes are generally not altered in accordance with our results [53], (Table 5). Further studies are required with more patients to confirm the role of HbAC in protection of severe vivax malaria.

The Parasitaemia feverish was the most frequent event in our study patients, occurring at 92.30% (12/13) of patients with AS/AC. The mean Parasitaemia among hemoglobins profiles was lower in patients with AA, followed by the AS and AC without statistical significance ( $p=0.975$ ). The parasite density showed the reverse, greater in AA, followed by the AC and then AS. No differences gametocytes media of haemoglobin profiles was found, corroborating with the reduction of parasitaemia and density serious decrease parasite in patients with HbAS demonstrated [20]. This observation contradicts an observation increased gametocyte in individuals with HbC [54].

Indeed high fever tends to be more evident in vivax disease even with lower Parasitaemia, due to its recognized lower fever-threshold (no Fever:  $237.64\pm 219.39$ ; Fever:  $352.46\pm 191.06$ ) [55].

Numerous studies have been reported to *P falciparum* Parasitaemia, showed reduced prevalence of Parasitaemia in children with haemoglobin AS when compared with haemoglobin AA [56, 27, 57, 58]. Other studies reported an increased prevalence [59-60]. Parasite densities were reported in children with haemoglobin AS reduced [56, 61, 7, 62, 33] or similar [27, 63-65] to those in children with haemoglobin AA. The effect of hemoglobinopathies on *P vivax* Parasitaemia and malaria incidence is poorly studied despite geographical overlap in south Asia [66], in a cross-sectional study, showed that HbE decreased Parasitaemia when homozygous or heterozygous individuals (7.7%) than in individuals with haemoglobin AA (29.1%;  $p<0.001$ ).

Therefore, any description of these classical symptoms, together or isolated, should be regarded by any experienced clinical as non-severe malaria, regardless of their intensity, because they are not associated to increased rates of hospitalization or fatality [15]. Alternatively, it is also possible that innate protective processes might alter the

dynamics of parasite infection in subtle ways that result in a more generalized upregulation of the malaria specific immune response.

Currently, the role of submicroscopic parasite densities or infections on the potential risk of malaria vivax is totally unknown, besides the difficult interpretation, by originates from many research studies of limited aspects of malaria, and performed in various transmission areas and distinct species assessment (reviewed in Roberts et al. [67]). In addition, studies have not established associations between haemoglobin variants S and C with malaria vivax.

The association of gametocytes with severe malaria has yet to be explored genetically, despite a high prevalence of inherited blood disorders that induce anemia, such as HbS in regions endemic for malaria [68-71]. One case-control study reported much the same prevalences of haemoglobin AS in asymptomatic children with (23%) and without (24% ) Parasitaemia. [72]. In two prospective studies, [34, 73], rates of Parasitaemia were the same in children with haemoglobin AS and haemoglobin AA, suggesting haemoglobin AS does not consistently protect from *P falciparum* Parasitaemia [20].

Genetics studies with markers are concentrated on their role in susceptibility and protection from malaria disease [74]. The most genetic disease involved is hemoglobinopathies, include S and C hemoglobin, which confers protection against severe malaria in heterozygous, but can be fatal in homozygous [75].

Nevertheless, through attenuation of the virulence of malaria parasites, hemoglobinopathies offer an attractive natural experiment to help elucidate malaria's pathogenic mechanisms and potentially translate models of pathogenesis and immunity into clinical application.

Research among hemoglobinopathies and malaria is old and long. There are in literature a large number of hypotheses and many of them are contradictory. The most likely

mechanisms by which these conditions confer malaria protection are becoming more complicated to understand. However, studies like ours continue to be an important exercise that may help in a more simple and real understanding of the biology of severe malaria.

Malaria is still placed as an unbearable burden in many vulnerable populations around the world. We believe that with the increase in the number of participants, as well as studies of other polymorphisms, we can deepen the knowledge of how humans have adapted to this terrible disease, emphasizing some important assumptions in our knowledge and the need for more studies and perhaps provide paths that lead to a lasting solution and even a permanent one.

We agree that in our study seeking to a large number of responses with limited numbers of subjects included (09 HbAS and 04 HbAC) and were too small for the study to be considered definitive to answer all questions. Moreover, the combination of small numbers of subjects and a large number of comparisons made their search for significant differences is a pretty tall order. Nevertheless, the study can provide a new approach to an old question, and would be well worth repeating in larger cohorts, in this or other settings, and extending to the investigation of other malaria-protective traits.

In summary, there are few studies that have linked hemoglobin variants and patients with vivax malaria. In this one of the first studies undertaken we demonstrate a clinical correlation of structural hemoglobinopathies and vivax malaria in the Amazon region of Brazil.

## CONCLUSION

Our data corroborate other studies concerning the reduction of parasite density in patients with HbAS;

Paradoxically, one must note that AC patients had lower risk of developing severe malaria;

Our results no established an association between vivax malaria and hematological data from different hemoglobins profiles;

Red Cell Distribution Width (RDW) was correlated among variants hemoglobins (HbAS/AC) in malaria infection, making it a possible hematological marker in malaria patients;

Our study seeking had limited numbers of subjects included and was too small for the study to be considered definitive to answer all questions.

The study can provide a new approach to an old question, and would be well worth repeating in larger cohorts, in this or other settings, and extending to the investigation of other malaria-protective traits.

In summary, there are few studies that have linked hemoglobin variants and patients with vivax malaria. In this one of the first studies undertaken we demonstrate a clinical correlation of structural hemoglobinopathies and vivax malaria in the Amazon region of Brazil.

No other study to determine the profile of hemoglobin in patients with vivax malaria was published in the Amazon region, which is a pioneering study on the severity of vivax malaria and genotypic frequency of hemoglobins.

**Acknowledgements:** We thank medical staff of the hospital in which the patients were studied, and we also thank the patients who gave their informed consent to participate in the study.

**Funding:** This work was supported by grants from the Brazilian National Council of Research (CNPq).

**Conflict of interest:** None. The sponsors of this study were public or non-profit organizations that support science in general. They had no role in gathering, analyzing or interpreting the data.

**Ethical approval:** The study was approved by The National Committee of Ethics and Research, Manaus, Amazon, and provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

## REFERENCES

1. Aidoo M, Terlouw DJ, Kolczak, MS, Mc Elroy PD, Ter Kuile FO, Kariuki S. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet* **2002**; 359:1311–2.
2. Mockenhaupt FP; Ehrhardt, S.; Cramer, J. P.; Otchwemah, R. N.; Anemana SD, Goltz, K. et al. Hemoglobin C and resistance to severe malaria in Ghanaian children. *Journal Infectious Diseases* **2004**; 190:1006–9.
3. Williams TN, Mwangi TW, Wambua S, Alexander ND, Kortok M, Snow RW, et al. Sickle cell trait and the risk of *Plasmodium falciparum* malaria and other childhood diseases. *Journal Infectious Disease*. **2005**;192:178 – 86.
4. May J, Evans JA, Timmann C, et al. Hemoglobin variants and disease manifestations in severe *falciparum* malaria. *JAMA* **2007**; 297:2220–6.
5. Agarwal A, Guindo A, Cissoko Y, et al. Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. *Blood* **2000**; 96:2358–63.
6. Modiano D, Luoni G, Sirima BS, et al. Haemoglobin C protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **2001**; 414:305–8.
7. Danquah, I, Ziniel P, Teunis BC, Eggelstedt A, Ehrhardt S, Mockenhaupt FP. Influence of haemoglobins S and C on predominantly asymptomatic *Plasmodium* infections in northern Ghana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 104:713–719. **2010**.
8. World Health Organization. Roll Back Malaria. World Malaria Report. **2011**. Acesso em: 2 fev 2013. Disponível na URL: <http://www.rbm.who.int/wrm>.

9. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília: *Ministério da Saúde*, **2010**. 36p.
10. Gonçalves MJF, Alecrim WD: Non-planned urbanization as a contributing Factor for malaria incidence in Manaus-Amazonas, Brazil. *Ver Salud Publica (Bogota)* **2004**, 6:156-166.
11. Saraiva, MG; Amorim RD, Moura MA, Martinez-Espinosa FE, Barbosa MG: Urban expansion and spatial distribution of malaria in the municipality of Manaus, State of Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop* **2009**, 42:515-522.
12. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM: Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg* **2007**, 77:79-87.
13. Picot S: Is *Plasmodium vivax* still a paradigm for uncomplicated malaria? *Med Mal Infect* **2006**, 36:406-413.
14. Galinski MR, Barnwell JW: *Plasmodium vivax*: who cares? *Malar J* **2008**, 7(Suppl1): S9.
15. Lacerda, M. V. G. Protocol for Characterization of severe *P. vivax* malaria. April; **2009**.
16. Alexandre MA; Ferreira OC, Siqueira, MD, Magalhães, LB, Mourão, MPG.; Lacerda, VL, Alecrim MGC. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, v. 16, n. 10, **2010**.
17. Siqueira, AM, Alexandre MA, Mourão MP, Santos VS, Nagahashi-Marie SK, Lacerda, M. V. Severe Rhabdomyolysis Caused by *Plasmodium vivax* Malaria in the Brazilian Amazon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.*; v. 83, n. 2, p. 271–273, **2010**.



18. Carvalho BO et al. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. Brazilian Journal of Infectious Diseases. v202, n 4, p 638-47, **2010**.
19. World Health Organization. Practical Chemotherapy of Malaria. Geneva; **1990**. p. 34-5.
20. Taylor SM, Parobek CM, Fairhurst RM. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infectious Disease **2012**; 12: 457–68.
21. Amaratunga C, Lopera-Mesa TM, Brittain NJ, Cholera R, Arie T, Fujioka H, Keefer JR, Fairhurst RM. A role for fetal hemoglobin and maternal immune IgG in infant resistance to Plasmodium falciparum malaria. PLoS One. **2011** Apr 12;6(4):e14798.
22. Aneni EC, Hamer DH, Gill CJ. Systematic review of current and emerging strategies for reducing morbidity from malaria in sickle cell disease. Trop Med Int Health. **2013** Mar;18(3):313-27.
23. Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson FJM. Effects of foetal haemoglobin on susceptibility of red cells to Plasmodium falciparum. Nature **1997**;270:171.
24. Shear HL, Grinberg L, Gilman J, Fabry ME, Stamatoyannopoulos G, Goldberg DE, Nagel RL. Transgenic mice expressing human fetal globin are protected from malaria by a novel mechanism. Blood **1998**;92:2520-26.
25. Souza, WC; Torres, FR; Salvador, AR; Távora, JA; Machado, RL. Bonini-Domingos, CR. Evaluation of Hb A2 and Hb F by HPLC in blood donors from the malaria endemic region of Eastern Amazon of Brazil. Rev. Bras. hematol. hemoter; 25(4):263-265, **2003**.
26. Gilles HM, Fletcher KA, Hendrickse RG, Lindner R, Reddy S, Allan N. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency, sickling, and malaria in African children in South Western Nigeria. Lancet **1967**; 1: 138–40.

27. Edington GM, Laing WN. Relationship between haemoglobins C and S and malaria in Ghana. *Br Med J* **1957**; 2:143–5.
28. Rihet P, Flori L, Tall F, Fumoux F. Hemoglobin C is associated with reduced *Plasmodium falciparum* parasitaemia and low risk of mild malaria attack. *Hum Mol Genet* **2003**; 13:1–6.
29. Ayi K, Turrini F, Piga A, Arese P. Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes. A common mechanism that may explain protection against *falciparum*-malaria in sickle-trait and beta-thalassemia-trait. *Blood* **2004**; 104:3364–71.
30. Friedman MJ. Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1978**; 75:1994–7.
31. Shear HL, Roth EF Jr, Fabry ME, et al. Transgenic mice expressing human sickle hemoglobin are partially resistant to rodent malaria. *Blood* **1993**; 81:222–6.
32. Cornille-Brogger R, Fleming AF, Kagan I, Matsushima T, Molineaux L. Abnormal haemoglobins in the Sudan savanna of Nigeria. II. Immunological response to malaria in normals and subjects with sickle cell trait. *Ann Trop Med Parasitol* **1979**; 73:173–83.
33. Guggenmoos-Holzmann I, Bienzle U, Luzzatto L. *Plasmodium falciparum* malaria and human red cells. II. Red cell genetic traits and resistance against malaria. *Int J Epidemiol* **1981**; 10:16–22.
34. Le Hesran JY, Personne I, Personne P, et al. Longitudinal study of *Plasmodium falciparum* infection and immune responses in infants with or without the sickle cell trait. *Int J Epidemiol* **1999**; 28: 793–98.
35. Makkar RP, Mukhopadhyay S, Monga A, Gupta AK (2002) *Plasmodium vivax* malaria presenting with severe thrombocytopenia. *Braz J Infect Dis* 6: 263-265.
36. Abdalla SH. Leukocytes in malaria. In Abdalla SH and Pasvol G, editors. *Malaria: a hematological perspective*. Vol 4. London: Imperial College press **2004**; 129-168.

37. Agravat AH and Dhruva GA. Hematological changes in patients of malaria. Journal of Cell and Tissue Research **2010**;10: 2325-2329.
38. Cardoso GA, Siqueira GD, Borzacov LMO, Tristão FR, Cardoso LAP, Fontes CJF. Leukemoid reaction caused by *Plasmodium vivax*: case report [abstract] Rev Bras Med Trop **2008**, 41:221.
39. Oliario P, Djimdé A, Dorsey G, Karema C, Mårtensson A, Ndiaye JL, Sirima SB, Vaillant M, Zwang J. Am J Trop Med Hyg. **2011** Oct;85(4):619-25.
40. Beales PF. Anemia in malaria control: a practical approach. Ann Trop Med Parasitol **1997**;91:713-8.
41. Bashawri LAM, Mandil AA, Bahnassy AA, Ahmed MA. Malaria: hematological aspects. Annals of Saudi Medicine **2002**;22: 372-377.
42. Ladhani S, Lowe B, Cole AO, Kowuondo K, Newton CR. Change in white blood cells and platelets in children with falciparum malaria: relationship to disease outcome. Br J Hematol **2002**;119: 839-847.
43. 1. Khan MK, Kamruzzaman M, Quddus MR. Hyper reactive malarial splenomegaly (HMS). Mymensingh Med J. 2006 Jul;15(2):204-7.
44. Bunyaratvej A, Butthep P, Bunyaratvej P. Cytometry analysis of blood cells from malaria-infected patients and in vitro infected blood. Cytometry **1993**; 14:81-5.
45. Lathia TB, Joshi R. Can hematological parameters discriminate malaria from nonmalarious acute febrile illness in the tropics? Indian J Med Sci. **2004**; 58(6):239-44.
46. Koltas IS, Demirhindi H, Hazar S, Ozcan K. Supportive presumptive diagnosis of Plasmodium vivax malaria. Thrombocytopenia and red cell distribution width. Saudi Med J. **2007** Apr;28(4):535-9.

47. Ageely HM, Dawoud HA, Heiba AA. Anemia, interleukin-10, tumor necrosis factor alpha, and erythropoietin levels in children with acute, complicated and uncomplicated malignant malaria in Jazan, Saudi Arabia. *J Egypt Soc Parasitol.* **2008**; 38(2):359-70.
48. Caicedo, O; Ramirez, O; Mourão, M.P.G; Ziadeh, J; Perez, P et al; Comparative Hematologic Analysis of Uncomplicated Malaria in Uniquely Different Regions of Unstable Transmission in Brazil and Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* **2009**; 80(1):146-51.
49. Shelat SG, Lott JP, Braga MS. Considerations on the use of adjunct red blood cell exchange transfusion in the treatment of severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Transfusion.* **2010** Apr;50(4):875-80.
50. Amaral, CN, Albuquerque, YD, PINTO, AYN; SOUZA, JM. Importance of clinical and laboratory profiles for the differential diagnosis of malaria and acute viral hepatitis. *Journal of Pediatrics*; **2003** (RJ); 79(5):429-34.
51. Kochar DK, Singh P, Agarwal P, Kochar SK, Pokharna R, Sareen PK: Malarial hepatitis. *J Assoc Physicians India* **2003**, 51:1069-1072.
52. Bensabath, G; Cartágenes PRRB; Dias SLB, Crescente JAB, Miranda ECB. Hepatites por vírus. In: Leão RNQ, editor. *Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico*. São Paulo: CEJUP; **1997**. p. 313-54.
53. Ferreira, MS. Malária. In: Veronesi S, Focaccia R, editores. *Tratado de infectologia*. 9ª ed. São paulo: atheneu; **1997**. P. 1260-87.
54. Gouagna LC, Bancone G, Yao F, Yameogo B, Dabire´ KR, et al. Genetic variation in human HBB is associated with *Plasmodium falciparum* transmission. *Nat Genet* **2010**;42: 328–331.

55. Allison AC. The distribution of the sickle-cell trait in East Africa and elsewhere, and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1954**; 48:312–8.
56. Ntoumi F, Mercereau-Puijalon O, Ossari S, et al. Plasmodium falciparum: sickle-cell trait is associated with higher prevalence of multiple infections in Gabonese children with asymptomatic infections. *Exp Parasitol* **1997**; 87: 39–46.
57. Jeremiah ZA, Jeremiah TA, Emelike FO. Frequencies of some human genetic markers and their association with Plasmodium falciparum malaria in the Niger Delta, Nigeria. *J Vector Borne Dis* **2010**; 47: 11–16.
58. Ringelmann B, Hathorn MK, Jilly P, Grant F, Parniczky G. A new look at the protection of hemoglobin AS and AC genotypes against plasmodium falciparum infection: a census tract approach. *Am J Hum Genet* **1976**; 28: 270–79.
59. Allen SJ, Bennett S, Riley EM, et al. Morbidity from malaria and immune responses to defined Plasmodium falciparum antigens in children with sickle cell trait in The Gambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1992**; 86: 494–98.
60. Thompson GR. Significance of haemoglobins S and C in Ghana. *BMJ* **1962**; 1: 682–85.
61. Allen SJ, Bennett S, Riley EM, et al. Morbidity from malaria and immune responses to defined Plasmodium falciparum antigens in children with sickle cell trait in The Gambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1992**; 86: 494–98.
62. Bernstein SC, Bowman JE, Noche LK. Genetic variation in Cameroon: thermostability variants of hemoglobin and of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochem Genet.* **1980** Feb;18(1-2):21-37.

63. Motulsky AG, Vandepitte J, Fraser GR. Population genetic studies in the Congo. I. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, hemoglobin S, and malaria. *Am J Hum Genet* **1966**; 18: 514–37.
64. Ringelmann B, Hathorn MK, Jilly P, Grant F, Parniczky G. A new look at the protection of hemoglobin AS and AC genotypes against plasmodium falciparum infection: a census tract approach. *Am J Hum Genet* **1976**; 28: 270–79.
65. Kar S, Seth S, Seth PK. Prevalence of malaria in Ao Nagas and its association with G6PD and HbE. *Hum Biol* **1992**; 64: 187–97.
66. Roberts DJ, Harris T, Williams T. The influence of inherited traits on malaria infection. In: Bellamy R, ed. *Susceptibility to infectious diseases: the importance of host genetics*. Cambridge: Cambridge University Press, **2004**:139–84.
67. Weatherall DJ. Common genetic disorders of the red cell and the ‘malaria hypothesis’. *Ann Trop Med Parasitol* **1987**; 81: 539–548.
68. Trager W, Gill GS. Enhanced gametocyte formation in young erythrocytes by *Plasmodium falciparum* in vitro. *J Protozoology* **1992**; 39: 429–432.
69. Price R, Nosten F, Simpson JA, Luxemburger C, Phaipun L, et al. Risk factors for gametocyte carriage in uncomplicated falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* **1999**; 60: 1019–1023.
70. Nacher M, Singhasivanon P, Silachamroon U, Treeprasertsuk S, Tosukhowong T, et al. Decreased hemoglobin concentrations, hyperparasitemia, and severe malaria are associated with increased *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage. *J Parasitol* **2002**; 88: 97–101.
71. Mockenhaupt FP. Influence of haemoglobins S and C on predominantly asymptomatic *Plasmodium* infections in northern Ghana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 104-713–719. **2010**.

72. Stirnadel HA, Stockle M, Felger I, Smith T, Tanner M, Beck HP. Malaria infection and morbidity in infants in relation to genetic polymorphisms in Tanzania. *Trop Med Int Health* **1999**; 4: 187–93.
73. Kwiatkowski DP. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am J Hum Genet* **2005**; 77: 171–192.
74. Weatherall DJ, Ledingham JGG, Warrell DA. *Oxford Textbook of Medicine*, 4th Edition Oxford University Press **2003**; 4376 p.
75. Zimmerman PA, Mehlotra RK, Kasehagen LJ, Kazura JW: Why do we need to know more about mixed Plasmodium species infections in humans? *Trends Parasitol* **2004**, 20:440-447.

Table 1. Epidemiological and physical parameters for uncomplicated and severe *P. vivax* malaria patients from Manaus, Amazon.

	<b>Uncomplicated (n=120)</b>	<b>Severe (n=58)</b>	<b>p-value*</b>
Gender (% male)	53/120 (44.17%)	37/58(63.79%)	
Age, median	28.36±120.39	31.07±17.94	.367
Temperature, median	36.57±1.13	36.53±0.85	.790
<b>Weight (Kg)</b>	<b>50.74±27.07</b>	<b>59.79±21.28</b>	<b>.027</b>
Numbers of days in hospital	3.07±2.02	3.59±4.67	.505
Asexual Parasite Density	27612.1±68634.1	37165.56±115250.25	.545
Parasitaemia	357.92±194.29	335.25±195.96	.536
Platelet Count (x10 <sup>9</sup> /L)	111.15±127.15	120.22±132.93	.704
White Blood Cells (x10 <sup>6</sup> /L)	6.37±2.70	7.29±4.40	.166
<b>Red Blood Cells (x10<sup>6</sup>/mmL)</b>	<b>3.87±0.71</b>	<b>3.37±1.11</b>	<b>.004</b>
<b>Hemoglobin Concentration, median (g/dl)</b>	<b>10.98±2.29</b>	<b>9.80±2.90</b>	<b>.015</b>
<b>Hematocrit (%)</b>	<b>33.14±6.66</b>	<b>29.09±8.69</b>	<b>.005</b>
<b>Reticulocytes (%)</b>	<b>2.20±2.53</b>	<b>3.72±4.07</b>	<b>.031</b>
Jaundice	57/120 (47.50%)	50/58 (86.20%)	
Acute Respiratory Distress	0/61	6/52 (11.54%)	
Choluria	54/119 (45.38%)	44/58 (75.86%)	
Hemoglobinuria	5/51 (9.80%)	12/46 (26.09%)	
Hematuria	2/39 (5.13%)	3/90 (3.33%)	
Reduced Consciousness	2/61 (3.28%)	6/58 (10.34%)	

Continuous variables are presented as media ± SD

\* Independent – Samples T-tests Post Hoc/Bonferroni statistics



Table 2. Prevalence of haemoglobin profiles in clinically uncomplicated and severe malaria cases.

Haemoglobin profiles	N	Malaria N (%)	
		Uncomplicated	Severe
AA	156	106	50 (32.1)
AS	09	05	4 (44.4)
AA (HPFH)	09	06	3 (33.3)
AC	04	03	1 (25.0)
<b>Total</b>	178	120 (67.42)	58 (32.58)

N: Cases

HPFH: Hereditary Persistence of Fetal Haemoglobin

Table 3. Haematological parameters of patient's malaria disease by haemoglobin profiles.

	Haemoglobin Profiles			p-value*
	Mean ± SD			
	AA (103)	AS (09)	AC (04)	
WBC (x10 <sup>6</sup> /L)	6.87±3.63	4.33±1.50	7.05±2.53	.181
<b>Neutrophils (x10<sup>6</sup>/L)</b>	<b>59.44±14.35</b>	<b>49.69±14.15</b>	<b>41.88±16.20</b>	<b>.018</b>
Band Neutrophils (x10 <sup>6</sup> /L)	1.71±3.71	2.60±6.79	5.75±9.60	.159
Eosinophils (x10 <sup>6</sup> /L)	2.04±2.53	1.13±0.81	5.03±8.66	.080
<b>Lymphocytes (x10<sup>6</sup>/L)</b>	<b>27.56±13.96</b>	<b>37.37±15.85</b>	<b>41.13±16.79</b>	<b>.045</b>
Monocytes (x10 <sup>6</sup> /L)	8.59±4.68	9.04±2.83	5.75±6.02	.466
Basophils Granulocytes (x10 <sup>6</sup> /L)	0.69±1.05	0.17±0.11	0.48±0.55	.397
RBC (x10 <sup>6</sup> /mm L)	3.59±0.95	3.90±1.11	3.40±0.85	.647
Hb (g/dL)	10.38±2.61	10.81±2.91	8.55±2.33	.349
Hematocrit (%)	31.06±7.76	33.09±8.60	25.85±7.23	.328
<b>Mean Cell Volume (fL)</b>	<b>87.12±7.49</b>	<b>85.22±3.55</b>	<b>75.88±6.96</b>	<b>.011</b>
<b>Mean Cell Haemoglobin (pg)</b>	<b>29.16±2.97</b>	<b>27.81±1.21</b>	<b>25.12±2.08</b>	<b>.015</b>
MCHC (pg)	33.44±1.18	32.64±0.83	33.13±0.84	.193
Reticulocyte count (%)	3.11±3.66	1.20±0.86	3.45±2.33	.429
<b>RDW</b>	<b>13.33±2.28</b>	<b>15.15±.99</b>	<b>15.92±1.35</b>	<b>.012</b>
Platelet Count (x10 <sup>9</sup> /L)	116.02±133.3	110.29±114.0	93.00±115.14	.930
	0	2		
Mean platelet volume (fL)	9.40±1.24	9.04±1.06	8.23±0.10	.137
RNI	1.32±0.33	1.26±0.15	1.16±0.15	.529

\* ANOVA - SD: Standard Deviation  
 HPFH: Hereditary Persistence of Fetal Haemoglobin  
 MCHC: Mean corpuscular haemoglobin concentration  
 WBC: White Blood Cells

Table 4. Haematological parameters of patients malaria disease correlation with haemoglobin genotypes.

	Haemoglobin Profiles					
	(N) Cases					
	Mean ± SD					
	AA (103)	AS (09)	p- value	AA (103)	AC (04)	p- value
Neutrophils, (x10 <sup>6</sup> /L)	59.44 ± 14.35	49.69 ± 14.15	.085 <sup>a</sup>	<b>59.44 ± 14.35</b>	<b>41.88±16.20</b>	<b>.019<sup>b</sup></b>
Band Neutrophils (x10 <sup>6</sup> /L)	1.71 ± 3.71	2.60 ± 6.79	.565 <sup>a</sup>	<b>1.71 ± 3.71</b>	<b>5.75 ± 9.60</b>	<b>.049<sup>b</sup></b>
Eosinophils (x10 <sup>6</sup> /L)	2.04 ± 2.53	1.13 ± 0.81	.344 <sup>a</sup>	<b>2.04 ± 2.53</b>	<b>5.03 ± 8.66</b>	<b>.046<sup>b</sup></b>
Mean Cell Volume (fL)	87.12 ± 7.49	85.22 ± 3.55	.508 <sup>a</sup>	<b>87.12 ± 7.49</b>	<b>75.88 ± 6.96</b>	<b>.004<sup>b</sup></b>
Mean Cell Haemoglobin (pg)	29.16 ± 2.97	27.81 ± 1.21	.234 <sup>a</sup>	<b>29.16 ± 2.97</b>	<b>25.12 ± 2.08</b>	<b>.008<sup>b</sup></b>
RDW	<b>13.33 ± 2.28</b>	<b>15.15 ±.99</b>	<b>.039<sup>a</sup></b>	<b>13.33 ± 2.28</b>	<b>15.92 ± 1.35</b>	<b>.027<sup>b</sup></b>

a  $\chi^2$  test (Yates's corrected); b Fisher's exact test

SD: Standard Deviation  
HPFH: Hereditary Persistence of Fetal Haemoglobin  
MCHC: Mean corpuscular haemoglobin concentration  
WBC: White Blood Cells

Table 5. Hepatic and kidney metabolism between of patients malaria disease by haemoglobin genotypes.

	Haemoglobin Profiles (N) Cases Mean ± SD				p-value*
	AA (103)	AS (09)	AC (04)	Total (116)	
<b>Hepatic Function</b>					
Indirect Bilirubin (mg/dL)	1.98 ± 3.36	2.69 ± 2.76	0.73 ± 0.21	1.98 ± 3.27	.689
Direct Bilirubin (mg/dL)	1.96 ± 2.61	2.20 ± 3.12	4.25 ± 4.95	2.05 ± 2.74	.261
Total Bilirubin (mg/dL)	3.90 ± 4.88	4.89 ± 4.71	4.80 ± 4.67	4.80 ± 4.67	.826
LDH (U/L)	824.77 ± 451.39	809.29 ± 461.72	711.75 ± 324.77	819.38 ± 444.93	.884
AST (U/L)	61.66 ± 95.41	63.57 ± 68.32	66.50 ± 58.36	61.95 ± 92.44	.994
<b>Hepatic Dysfunction</b>					
Albumin (g/dL)	3.67 ± 0.54	3.67 ± 0.58	3.30 ± 0.54	3.65 ± 0.54	.402
Globulin (g/dL)	2.66 ± 1.12	2.60 ± 1.20	3.05 ± 2.10	2.75 ± 0.76	.579
Total Protein (g/dL)	6.33 ± 0.83	6.27 ± 0.89	6.35 ± 1.32	6.33 ± 0.84	.981
ALT (U/L)	58.01 ± 57.42	88.00 ± 91.98	54.25 ± 46.61	59.76 ± 59.52	.432
<b>GGT (U/L)</b>	<b>97.59 ± 88.07</b>	<b>240.71 ± 184.85</b>	<b>35.25 ± 15.95</b>	<b>104.42 ± 101.34</b>	<b>&lt;.001</b>
<b>Renal</b>					
Alkaline Phosphatase	318.39 ± 210.35	394.29 ± 128.28	263.25 ± 56.97	321.40 ± 202.59	.538
Creatinine (mg/dL)	1.07 ± 1.15	1.50 ± 1.31	0.53 ± 0.22	1.07 ± 1.14	.388
Urea (mg/dL)	39.99 ± 30.53	37.00 ± 22.15	28.75 ± 11.95	39.40 ± 29.58	.742

SD: Standard Deviation - \* ANOVA - Hb: Haemoglobin

HPFH: Hereditary Persistence of Fetal Haemoglobin

ALT: Alanine Aminotransferase

LDH: Lactate dehydrogenase

AST: Aspartate Aminotransferase

## 18.2 Artigo 2

### **G6PD A<sup>-202A/376G</sup> mutation: Molecular Characterization in *P. vivax* patients from Manaus, Brazil**

Jéssica L. Santos Mathias<sup>1</sup>; Brena L. Aguiar Lima<sup>1</sup>; Anne C. Gomes Almeida<sup>2</sup>; Marcus V. Guimarães Lacerda<sup>2</sup>; Paulo Afonso Nogueira<sup>4</sup>; Emerson Silva Lima<sup>1</sup>; Marilda Souza Gonçalves<sup>3</sup>; Rita C. Mascarenhas Netto<sup>1</sup>; José P. Moura Neto<sup>1</sup>

A ser enviado para a revista The European Journal of Human Genetics.

**G6PD A<sup>-202A/376G</sup> mutation: Molecular Characterization in**

***P. vivax* patients from Manaus, Brazil**

Jéssica L. Santos Mathias<sup>1</sup>; Brena L. Aguiar Lima<sup>1</sup>; Anne C. Gomes Almeida<sup>2</sup>; Marcus V. Guimarães Lacerda<sup>2</sup>; Paulo Afonso Nogueira<sup>4</sup>; Emerson Silva Lima<sup>1</sup>; Marilda Souza Gonçalves<sup>3</sup>; Rita C. Mascarenhas Netto<sup>1</sup>; José P. Moura Neto<sup>1</sup>

1 -Universidade Federal do Amazonas-UFAM

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

3 - Universidade Federal da Bahia - UFBA

4 - Instituto Leônidas e Maria Deane – FICORUZ-AM

Correspondence: José Pereira de Moura Neto, Laboratório de Biologia Molecular, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas (FCF/UFAM), Manaus, Amazonas, Brasil, Rua Alexandre Amorim n 330, CEP: 69010 –300.

E-mail: jp-mn@hotmail.com.

## ABSTRACT

*Plasmodium vivax* (*P. vivax*) for a long time was erroneously considered benign and threatens ~40% of the world's population, with a wide spectrum of asymptomatic to severe clinical manifestations. Several studies have suggested that the deficiency of glucose-6 phosphate dehydrogenase (G6PD) has a protective effect against *P. Falciparum*, however, there are few studies related to *P. vivax*. Using molecular tools, a total of 162 patients was screened for 202A/376G (A-) and 1003A (Chatham) mutations in patients from Manaus-Amazon. Of male presented 15.85% (13/82) for A- and 6.10% (05/82) Chatham variants, while 11.25% (09/80) of female presented A- in heterozygous and 1.25% (1/80) in homozygous. Male with G6PD A- demonstrated a higher frequency of severe malaria (OR=2.01, 95% CI: 1.23-3.31, p=0.020) and strongly associated with previous malaria episodes (OR=2.35, 95% CI: 1.58-2.52, p=0.004), while heterozygous female were statistically not significant. When compared with G6PD wild type (WT), male patients A- presented high platelet number (p=0.009), increased lactate dehydrogenase (p<0.001) and level of direct bilirubin (p=0.045), while decreased in Gamma-Glutamyl transpeptidase (p=0.035). Both gender presented decreased in number of erythrocytes (p=0.002) (p=0.015), amount of hemoglobin (p=0.017) (p=0.031) and hematocrit (p=0.013) (p=0.020), male and female, respectively. We observed decreased hemoglobin (p=0.018), hematocrit (p=0.014), platelets (p=0.003), reticulocyte count (p<0.001) and glucose level (p=0.031) among male patients in severe malaria with G6PD A- compared to severe malaria patients with wild type allele. In contrast, we did not observe any significant differences in uncomplicated malaria patients with same analysis. In summary, few G6PD mutations studies were performed from Amazonian communities. Additional G6PD deficiency surveys in both these areas of high *P. vivax* endemicity would be valuable, particularly focused in areas of high population density. Additional G6PD deficiency surveys in both these areas of high *P. vivax* endemicity would be valuable, particularly focused in areas of high population density. We consider relevant performed the molecular diagnosis in all patients who are diagnosed with malaria the 202A and 376G mutations, since, can developed severe hemolytic anemia and hyperbilirubinemia, which can worsen your clinical condition and cause death. Our results, not only indicate a direct influence of G6PD genotypes on biochemical and hematological parameters but also its diagnostic potential in assessing disease progression during clinical malaria.

## INTRODUCTION

Glucose-6-phosphatase dehydrogenase deficiency (G6PD, EC 1.1.1.49) is the most common enzymopathy in humans<sup>1</sup>. G6PD deficiency was discovered for the first time when hemolytic anemia occurred in some persons who consumed anti-malarial drug named primaquine.<sup>1,2</sup>

The enzymopathy is an X-linked disorder and is a highly polymorphic enzyme.<sup>3-5</sup>. It is geographically correlated with historical patterns of malaria, and the most common deficiency allele in Africa (G6PD A-) has been shown to confer some resistance to malaria in both hemizygous males and heterozygous females.<sup>6,7</sup>

The incidence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency fluctuates greatly among different racial groups, affecting approximately 400 million people worldwide and there is a high A- prevalence in populations with African admixture. Individuals with this African variant carry the c.376 A ® G (p.Asn126Asp) mutation in association with the c.202 G ® A (p.Val68Met), c.680 G ® T (p.Arg227Leu) or the c.967 T ® C (p.Leu323Pro) mutations.<sup>8</sup> Studies in different regions of Brazil have shown prevalence of G6PD deficiency between 3% and 12%.<sup>9-13</sup>.

*Plasmodium vivax* (*P. vivax*) for a long time was erroneously considered benign and threatens ~40% of the world's population, with a wide spectrum of asymptomatic to severe clinical manifestations.<sup>14,15</sup> Malaria control strategies have had limited success and are confounded by the lack of access to reliable diagnosis, emergence of multidrug resistant isolates, the parasite's ability to transmit early in the course of disease and relapse from dormant liver stages at varying time intervals after the initial infection.<sup>16</sup> Progress in reducing the burden of disease will require improved access to reliable diagnosis and effective treatment of both blood-stage and latent parasites, and more



detailed characterization of the epidemiology, morbidity, and economic impact of vivax malaria.<sup>17,18</sup>

Because of the wide geographical distribution of G6PD deficiency, has been hypothesized that this deficiency can confer protection against malaria infection. As to the species of malaria, the majority of studies have suggested that the deficiency of G6PD has protective effects to the falciparum malaria and there are few studies related to *P. vivax*.<sup>6,19-21</sup>

## **POPULATION, MATERIAL AND METHODS**

### **Patients**

The clinical data and DNA samples described in this study were collected between March 2009 and April 2010, in a study of clinical characterization of malaria vivax severe in the Tropical Medicine Foundation of Amazonas, Manaus. This study was approved by the National Committee of Ethics and Research, Manaus, Amazon, n°343/2009, procedure n° 25.000.011.792/2009-15. The severity of malaria was assessed according to World Health Organization (WHO) standards (formerly validated for *P. falciparum*). All individuals recruited were positive for *P. vivax* mono-infection confirmed by thick smear examination using field microscopy and were negative for mixed malaria, which was checked by Polymerase Chain Reaction (PCR). Patients were excluded when presented with co-infections such as viral hepatitis (HBV, HCV and HDV), HIV and dengue virus and Structural Hemoglobinopathy. The clinical, hematological and biochemical manifestations were analyzed and are depicted in tables.

### **Determination of G6PD Genotypes**

DNA was extracted from each whole blood sample and dried blood spots collected on filter paper using a DNA isolation kit (*Wizard® Genomic DNA Purification*, Promega) according to the manufacturer's instructions. In order to identify the variants of G6PD a polymerase chain reaction (PCR).

To detect the genetic mutations of the G6PD (202A and 376G), amplification of the relevant DNA segments by a polymerase chain reaction (PCR), followed by restriction

fragment length polymorphism analysis were carried out as previously described (Table 1).

In summary, the amplification reaction mixture (50  $\mu$ L) contained isolated DNA (50-200 ng), 25 pmol each primer in the presence of 200  $\mu$ mol dNTPs, 10x PCR buffer, 3.5 mmol MgCl<sub>2</sub> and 2.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brazil). The reactions were performed on T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad®, USA). The PCR protocol to both mutations included an initial pre-denaturation temperature of 94 °C for 10 minutes, followed by 35 cycles of amplification (1 minutes at 94°C, 45 seconds at 56°C and 1 minute and 1 minute at 72°C). A final 12 minutes extension step at 72°C terminated the process. Approximately 25 $\mu$ l of PCR products was digested for 24h hours at 37°C with appropriate restriction enzymes (Table 1) according to the manufacturer's specifications. Restriction digests DNA was analyzed on a Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (7%) (Invitrogen) stain ethidium bromide.

The Chatham mutations amplification was performed in duplicate with ABI Step One Plus Real-time PCR system the TaqMan Fast Universal PCR Master Mix and SNP genotyping Analysis Using TaqMan® Assays. Oligonucleotide and probes for RT-PCR were designed using File Builder Software (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to DNA sequences obtained from Genbank™. The following primers and probes were used:

- Forward Primer Sequence: GGCCACCAAAGGGTACCT;
- Reverse Primer Sequence: GAGGACGACGGCTGCAA;
- Reporter 1 Sequence: TCCACCACCGCCACTT;
- Reporter 2 Sequence: TCCACCACCACACTT.

Cycling conditions were as followed: 95°C for 20s followed by 40 cycles of 95°C for 3s, 60°C for 30s.

## Statistical Analyses

Baseline characteristics were summarized as means and proportions of selected variables. The parametric ANOVA test confirmed by the Bonferroni post hoc test and the nonparametric Kruskal-Wallis test were used to compare means among two or more groups of interval variables that were normally distributed and not normally distributed, respectively. The interactions between specific categorical clinical variables were tested for significance using a  $\chi^2$  test corrected by Yates's  $\chi^2$  and Fisher's exact tests, taking into account the expected frequency in the table cells.

The statistical analysis was developed to test dependent variables associated with clinical data and cause of hospital admission and all demographic, epidemiological and clinical information and management were collected from hospital records. The data analysis was performed using EPIinfo 6.04 (CDC, Atlanta, Georgia, USA), the Statistics Data Analysis (STATA) SE 10 (StataCorp, Texas, USA), GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) and using IBM SPSS Statistics 19.0 (CDC, Atlanta, Georgia). A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### Study population and physical characteristics

*P. vivax* positive (n= 162) patients attending the Tropical Medicine Foundation of Amazonas, hospital in Manaus, Brazil with confirmed diagnosis for mono-infections were enrolled to study G6PD genotypes and its implications in disease pathogenesis. Patients with comorbidities, Structural Hemoglobinopathy, mixed plasmodium infections and virus infection were excluded from this study. As no specific criteria exists for classification of *P. vivax* patients into uncomplicated or severe malaria, we used the criteria described for *P. Falciparum* by World Health Organization (WHO)<sup>22</sup>. The table 2 represented epidemiological and physical parameters for uncomplicated and severe *P. vivax* malaria patients from Manaus, Amazon. Majority of severe malaria male cases were characteristic of Jaundice (85.3%), Anorexia and Cholera (78.4%), Vomiting (75.7%), Leukocyturia (48.4%) and Hemolysis (47.1%), while in female had Jaundice, Vomiting and Anorexia (76.2%), Choloria (71.4%) and Leukocyturia (40.0%). Significance decrease of RBC, Hemoglobin and hematocrit was presented in Female patients, (p=0.005) (p=0.049) (p=0.025), respectively.

The clinical data between the three G6PD groups (WT/ A- /Chatham) were similar regarding the occurrence of headache, cold/chills, nausea/vomiting and body aches. Exploratory linear regression analysis among uncomplicated and severe malaria and G6PD genotypes did not revealed a statistical significant result (Data not showed).

Table 3 represent genotypic distribution of G6PD among uncomplicated and severe *vivax* malaria patients, gender and ethnic origin. Patients presenting with uncomplicated

malaria (n=109) and severe malaria represented (n=53) represented 67.28 and 32.72% of the study population, respectively.

### **G6PD genotypes in *P.vivax* infection**

For all uncomplicated and severe malaria cases DNA sample was extracted from whole blood to study the relation between human genetic factors and malaria disease presentation. DNA was amplified by PCR-restriction-enzyme digested and visualized on gel for 202A and 376G mutations and Real Time PCR (qRT-PCR) to 1003A mutation.

We screened 162 malaria patients from Manaus-AM (82 male and 80 female) for the A<sup>-</sup> mutations by polymerase chain reaction/endonuclease cleavage (RFLP-PCR) and Chatham by Real Time PCR (Table 3).

Twenty eight of the patients (a total of 38 alleles), 18 (73.7%) were male and 10 (26.3%) were women. G6PD A<sup>-</sup> was present in 23 of 28 cases. Of these, we found 13 hemizygous and 10 heterozygous, this gave a 0.868 allele frequency for this mutation. The G6PD Chatham mutation showed a frequency of 0.132 with 05 hemizygous.

The results demonstrated that 82.7% (134/162) of the analyzed individuals presented G6PD wild type (WT), 14.2% (23/162) A<sup>-</sup> and 3.1% (05/162) Chatham variants. All positive subjects to G6PD Chatham were male. When analyzed by gender, the results of male individuals presented 15.85% (13/82) for A<sup>-</sup> and 6.10% (05/82) Chatham, while 11.5% (09/80) of female presented A<sup>-</sup> in heterozygous and 1.25% (1/80) in homozygous (01) (Table 3). Because of the low prevalence in homozygous G6PD females (01 patient), this was excluded from the analysis. Thereby, all analysis that involved female patients was performed with G6PD A<sup>-</sup> in heterozygous.

Furthermore, when was compared clinical of malaria with G6PD genotypes and gender, male individuals with G6PD A<sup>-</sup> demonstrated a higher frequency of severe malaria (RR=2.01, 95% CI: 1.23-3.31, p=0.020) and strongly associated with previous malaria episodes (RR=2.35, 95% CI: 1.58-2.52, p=0.004), while heterozygous female were statistically not significant. Significant differences was found in G6PD A<sup>-</sup> v/s Chatham of previous malaria episodes (RR=4.23, 95% CI: 0.72-24.80, p=0.022) (Table 4).

Seven of the patient's positive for deficient screening using the phenotypic Methaemoglobin Reduction Test/ Brewer's Test (MRT) (Brewer et al., 1962), 06 were carriers of the A<sup>-</sup> mutation (05 hemizygous men; 01 homozygote woman) and hemizygous male presented Chatham mutation. Furthermore, the MRT not detected 42.86% (6/14) hemizygous male G6PD A<sup>-</sup> and heterozygous woman (Table 5).

Next we measured biochemical and hematological parameters in *P. vivax* infected patients to identify markers that may be associated with G6PD genotypes contributing to malaria clinical disease. The male patients analysis, relatively high platelet count were measured in patients A<sup>-</sup> when compared with WT (p=0.009) (Table 6). In addition, significant an increased lactate dehydrogenase (p<0.001) in patients A<sup>-</sup> (Table 6). Moreover, a statistically significant decreased in Gamma-Glutamyl transpeptidase (p=0.035) was present in A<sup>-</sup> patients (Table 6). In contrast, an increased level of direct bilirubin (p=0.045) was detected in patient serum that had G6PD A<sup>-</sup> (Table 6). Furthermore, we also observed decreased number of RBCs (p=0.002), amount of hemoglobin (p=0.017) and hematocrit (p=0.013) patients with an A<sup>-</sup> compared to patients WT (Table 6). However, we observed no significant differences in any of the leukocyte measured except for eosinophils (p=0.03) A<sup>-</sup> vivax patients when compared WT (data not shown). The same analysis among female patients, as the results demonstrated in male, we detected decreased number of RBCs (p=0.015), amount of

hemoglobin (p=0.031) and hematocrit (p=0.020) patients with a A- compared to patients G6PD WT and we observed no significant differences in any of the leukocyte measured (Table 7). However, we found significant increase differences in RDW measured in G6PD A- (p=0.033) (Table 7).

### **Influence of G6PD genotypes on indicators of severe malaria**

The *Plasmodium vivax* is one of the most important species in human malaria, representing a major social and economic burden worldwide. However, for a long time, its consequences were neglected for having been erroneously considered “benign” compared with *Plasmodium falciparum*. As to the malaria’s species, most of the studies have suggested that the deficiency of G6PD has a protective effect against P. Falciparum. Several studies have observed thrombocytopenia, anemia, jaundice and acute respiratory distress syndrome related complications in vivax infections.

The next we compared male G6PD genotypes with hematological and biochemical parameters described as indicators of severe falciparum in malaria patients by WHO.<sup>22</sup> We divided uncomplicated and severe malaria cases with two G6PD genotypes (WT and A-) depending on hemoglobin and hematocrit amounts, platelets numbers, reticulocyte count and Glucose level. In addition, we observed the same with hemolysis (Table 8). We observed decreased hemoglobin (p=0.018) and hematocrit amounts (p=0.014), platelets numbers (p=0.011) (p=0.003), reticulocyte count (p<0.001) and glucose level (p=0.031) among severe malaria patients with G6PD A- compared to severe malaria patients with wild type allele. In contrast, we did not observe any significant differences in uncomplicated malaria patients with same analysis (Table 8).

### **DISCUSSION**



We set out to identify variant allele 202A/376G (G6PD A-) and 1003A (Chatham) in uncomplicated and severe vivax malaria infected patients to verify the influence of those on clinical manifestations. Our study was designed to determine G6PD genotypes frequency and possible protection of this sex-linked polymorphism, and if would be more evident in male or female vivax malaria patients. Specifically, we measured hematological and biochemical parameters in these patients and examined the association between G6PD genotypes and *P. vivax* disease.

The present study demonstrated for the first time the presence of G6PD Chatham polymorphism in the Amazon population. G6PD Chatham is recognized as one of the most common variants worldwide.<sup>24</sup> This mutation causes a class II deficiency of G6PD with mild or severe enzyme deficiency can be produce neonatal jaundice.<sup>25,26</sup> Presently, was detected in several places around the world, such as Indonesia (36.4%),<sup>27</sup> Kuwait (7.1%),<sup>28</sup> and Brazil (0.66%)<sup>29</sup>. We didn't observed significant differences in clinical, hematological or biochemical data in uncomplicated or severe malaria in our patients carriers of Chatham mutations (Table 4,6).

No significant differences in G6PD genotypes among uncomplicated and severe vivax malaria patients, gender and ethnic origin were demonstrated (Table 3).

Unfortunately the only drug licensed for the relapse prevention of *P. Vivax* is a primaquine. Studies showed that can trigger severe hemolytic anemia in G6PD deficient individuals. This primaquine-induced hemolysis was re-affirmed by a Brazilian study with severe hemolysis in G6PD deficient *P. vivax* patients treated with 30 mg daily doses of primaquine over 5 or 7 days.<sup>29</sup> In our study, all patients received orally chloroquine and primaquine.

Methemoglobinemia is a consequence of primaquine; however, clinical effects are not usually described.<sup>30</sup> Santana et al. (2007)<sup>31</sup> demonstrated the developing of methemoglobinemia following primaquine therapy in 51% of G6PD but without significant severe effects. However, Ferreira et al., (2011)<sup>20</sup> didn't found similar association. Several symptoms in patients treated with primaquine were described for Ramos Júnior et al., (2010)<sup>32</sup> as jaundice (18/18), pallor (17/18), choluria (14/18), fever (12/18) and vomiting (10/18).

Perhaps this chloroquine and primaquine treatment explains the high frequency among male carriers of G6PD A- with severe malaria in our study. Our results are contrary a many studies in the literature, although, some studies are searching for clinical evidences to support the hypothesis that G6PD deficiency confers decreased risk of severe malaria infection in hemizygous male<sup>6,15,33</sup> and heterozygous female,<sup>34</sup> there are still many controversies in both cases<sup>35,36</sup> showing no effect on the occurrence of uncomplicated malaria in hemizygous males and heterozygous females. However, our results in women carriers of G6PD A- confirm no protection against severe malaria in heterozygous women. Heterozygous females may be either phenotypically deficient or dependent on the relative proportion of circulating deficient and no deficient erythrocytes, because females exhibit mosaicism in expression of G6PD.<sup>7</sup> In our sample, all heterozygous females were phenotypically normal, although there was a tendency protection in this group.

Hypoglycemia has been detected in approximately 8% of adults<sup>37</sup> and is considerate a clinical and laboratory features of severe malaria<sup>22</sup>. Careful glucose monitoring should be targeted to these complications, especially those patients with G6PD deficiency. Our found of A- mutation with low level glucose in severe malaria patients can predict severe symptoms and give prompt support and appropriate treatment.

In an X-linked recessive disorder, the frequency of affected males is expected to be equal to the number of heterozygote females, but our screening method failed to produce this result. The sensitivity of our screening by Methaemoglobin Reduction Test (Brewer's Test) might not be sufficient to detect all heterozygous females, maybe the G6PD activities are highly variable. This also might be explained by the fact that G6PD has different genetic types in Brazil. Kaplan (1999)<sup>21</sup> e Krzelj (2001)<sup>38</sup> using the MRT test among newborns with neonatal jaundice had sensitivity (85.7%) and specificity (98.1%). Therefore, the sensitivity of MRT in jaundiced infants was low (60.0%) whereas the specificity was acceptable (92.1%). The negative predictive values were more than 90 per cent while the positive predictive values were low (61-65%). Sampavat et al., (2001) demonstrated that hyperbilirubinemia in the heterozygous G6PD A- can mask the screening test result. They suggest an optimally performing screening test that shouldn't misclassify a G6PD deficient patient as normal (false negative), and should misclassify a G6PD normal patient as deficient in only few cases (false positive).

Consideration our results, including diagnosis and clinical of primaquine/chloroquine induced hemolysis is required to assess the risks and benefits of applying some treatments in vivax patients. We agree that hemolytically drugs will likely be the only therapeutic options for the coming years. A number of drugs have also been identified as induced hemolysis<sup>39</sup> and for *P. vivax* malaria, the most pertinent is primaquine. Our results support the idea to know and understand in depth G6PD deficiency and drugs induced hemolysis and why not, to perform molecular diagnostics of the most frequent G6PD mutations in all patients diagnosed with malaria in our region, to used in the treatment and monitoring of the patients to determine safe and effective therapeutic strategies to overcome this hurdle and achieve malaria elimination.

In summary, few G6PD mutations studies were performed from Amazonian communities. Additional G6PD deficiency surveys in both these areas of high *P. vivax* endemicity would be valuable, particularly focused in areas of high population density. Particularly, we consider reasonable and relevant performed the molecular diagnosis in all patients who are diagnosed with malaria *vivax* or *falciparum* the most prevalent G6PD variants found for several authors in the Amazon region, especially the 202A and 376G mutations that after treatment with the unique effective drugs against malaria (chloroquine and primaquine), can developed severe hemolytic anemia and hyperbilirubinemia, which can worsen your clinical condition and cause death.

## CONCLUSION

This study reports the primary frequency of some G6PD mutations in Manaus-Amazon;

G6PD A- (202A/376G) was demonstrated as to be the most prevalent;

The 1003A mutation (Chatham) was first time demonstrated in Amazon population;

No significance associations was found with severe clinical in vivax malaria in patients with Chatham variant;

202A/376G mutations was a risk factor for develop severe vivax malaria in male individuals after treatment with primaquine and chloroquine;

Performed the molecular diagnosis in patients diagnosed with malaria the 202A and 376G before treatment is necessary in Amazon population;

Functional implications of G6PD mutations may not only improve our understanding of malaria pathogenesis but also help us comprehend the individual variation in response to antimalarial drug therapy.

## **ACKNOWLEDGEMENTS:**

We thank medical staff of the hospital in which the patients were studied, and we also thank the patients who gave their informed consent to participate in the study.

### **Funding:**

This work was supported by grants from the Brazilian National Council of Research (CNPq).

**Conflict of interest:** None. The sponsors of this study were public or non-profit organizations that support science in general. They had no role in gathering, analysing or interpreting the data.

**Ethical approval:** The study was approved by The National Committee of Ethics and Research, Manaus, Amazon, and provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

## REFERENCES

1. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood*, **1994**; 84(11): 3613-36.
2. Mehta A, Mason PJ, Vulliamy TJ. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Best Prac Res Clin Haematol*, **2000**; 13: 21-38. 2.
3. Senozan NM, Thielman, CA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency - an inherited ailment that affects 100 million people. *Journal of Chemical Education* **1991**; 68(1), pp7-10.
4. Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, **1961**; 190:372–373.
5. Davidson RG, Nitowsky HM, Childs B. Demonstration of two populations of cells in the human female heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1963**; 50:481–485.
6. Guindo A, Fairhurst RM, Doumbo OK, Wellemes TE, Diallo DA. X-Linked G6PD Deficiency Protects Hemizygous Males but Not Heterozygous Females against Severe Malaria. *PLoS Med*. **2007**; 4(3): e66.
7. Peters AL, Van Noorden CJF. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: cytochemical detection of heterozygous G6PD deficient women. *J Histochem Cytochem*. **2009**;57:1003–11.
8. Beutler E, Vulliamy TJ. Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood Cells Mol Dis*. **2002**; 28(2):93-103.
9. Weimer TA, Salzano FM, Westwood B, Beutler E Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants from Brazil. *Hum Biol* **1993**;65: 41–47.
10. Saad STO, Salles TSI., Carvalho MH, Costa FF. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in blood donors from Brazil. *Hum Hered*. **1997**;47:17–21.
11. Santana MS, da Rocha MA, Arcanjo AR, Sardinha JF, Alecrim WD, Alecrim MG: Association of methemoglobinemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in malaria patients treated with primaquine. *Rev Soc Bras Med Trop* **2007**.
12. Moura Neto, JP; Dourado, MV; Reis, MG; Gonçalves, MS. A novel c.197T ® A variant among Brazilian neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Genet Mo. Bio.* vol.31 no.1 São Paulo- **2008**.
13. Maia, UM; Batista, DCA; Pereira, WO; Fernandes, TAAM. Prevalência da deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase em doadores de sangue de Mossoró, Rio Grande do Norte. *Rev Bras Hematol Hemoter* vol.32 no.5 São Paulo **2010**.

14. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg.* **2007**; 77(6 Suppl):79-87.
15. Chamchod F, Beier JC. Modeling Plasmodium vivax: relapses, treatment, seasonality, and G6PD deficiency. *J Theor Biol.* **2013**; 7;316:25-34
16. Breman JG, Alilio MS, Mills A. Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. *Am J Trop Med Hyg.* **2004**; 71: 1–15.
17. Williams TN, Maitland K, Phelps L, Bennett S, Peto TE, Viji J, Timothy R, Clegg JB, Weatherall DJ, Bowden DK, 1997. Plasmodium vivax: a cause of malnutrition in young children. *QJM* 90: 751–757.
18. Snow RW, Hay SI. Comparing methods of estimating the global morbidity burden from Plasmodium falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* **2006**; 74: 189–190.
19. Cappadoro M, Giribaldi G, O'Brien E, Turrini F, Mannu F, et al. Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by Plasmodium falciparum may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood* 92: 2527–2534. **1998**.
20. Ferreira ME, Gomes Mdo S, Vieira JL: Methemoglobinemia in patients with **Plasmodium vivax** receiving oral therapy with primaquine] (in Portuguese). *Rev Soc Bras Med Trop* **2011**.
21. Kaplan M, Beutler E, Vreman H, Hammerman C, Levy-Lahad E, Renbaum P, et al. Neonatal hyperbilirubinemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient heterozygotes. *Pediatrics* **1999**;1:104:68-74.
22. Brewer GJ, Tarlov AR, Alving AS. The methaemoglobin reduction test for primaquine-type sensitivity of erythrocytes. A simplified procedure for detecting a specific hypersusceptibility to drug haemolysis. *JAMA* **1962**; 180: 386–388.
23. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Second Edition ed: World Health Organization; **2010**.
24. Lwai K, Hirono A, Matsuoka H, et al. Distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Southeast Asia. *Hum Genet.* **2001**;108:445–449.
25. Vulliamy TJ, D'Urso M, Battistuzzi G, Estrada M, Foulkes NS, Martini G, Calabro V, Poggi V, Giordano R, Town M, et al. Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1988**;85(14):5171-5.
26. Ainoon O, Yu YH, Amir Muhriz AL, Boo NY, Cheong SK, Hamidah NH. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Malaysian Malays. *Hum Mutat.* **2003**;21(1):101.
27. Kawamoto F, Matsuoka H, Kanbe T, Tantular IS, Pusarawati S, Kerong HI, Damianus W, Mere D, Dachlan YP. Further investigations of glucose-6-phosphate



dehydrogenase variants in Flores Island, eastern Indonesia. *J Hum Genet.* **2006**;51(11):952-7.

28. Samilchuk E., Al-Suliman I., Usanga E. and Al-Awadi S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations and UDP-glucuronosyltransferase promoter polymorphism among G6PD deficient Kuwaitis. *Blood Cells Mol. Dis.* **2003**; 31, 201–205.

29. Silva, M.C., Santos, E.B., Costal, E.G., Filho, M.G., Guerreiro, J.F., Povoas, M.M.,. Clinical and laboratorial alterations in Plasmodium vivax malaria patients and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency treated with primaquine at 0.50 mg/kg/day]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2004**; 37, 215–217.

30 Hill DR, Baird JK, Parise ME, Lewis LS, Ryan ET, Magill AJ: Primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. *Am J Trop Med Hyg* **2006**; 75:402-415.

31. Santana MS, Arcanjo ARL, Rocha MAF, Sardinha JFJ, Alecrim WD, et al. Association of methemoglobinemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in malaria patients treated with primaquine. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007;40: 533–536.

32. Ramos WM Jr, Sardinha JF, Costa MR, Santana MS, Alecrim MG, Lacerda MV: Clinical aspects of hemolysis in patients with P. vivax malaria treated with primaquine, in the Brazilian Amazon. *Braz J Infect Dis* **2010**, 14:410-412.

33. López C, Saravia C, Gomez A, Hoebcke J, Patarroyo MA. Mechanisms of genetically based resistance to malaria. *Gene.* **2010**; 1;467(1-2):1-12.

34. Parikh S, Dorsey G, Rosenthal PJ. Host polymorphisms and the incidence of malaria in Ugandan children. *Am J Trop Med Hyg* **2004**;71: 750–753.

35. Bienzle U, Guggenmoos-Holzmann I, Luzzatto L (1979) Malaria and erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in West Africa. *Am J Trop Med Hyg* **1979**; 28: 619–621.

36. Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, Yates SN, Kwiatkowski D, et al. Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* **1995**; 376: 246–249.

37. White NJ. Malaria. In: Manson's tropical diseases. Edited by Cook GC, Manson P, Zumla A. Twenty-second ed: Saunders; **2009**. pp. 1201-1300.

38. Krzelj V, Zlodre S, Terzic J, Mestrovic M, Jaksic J, Pavlov N. Prevalence of G-6-PD deficiency in the Croatian Adriatic Coast Population. *Arch Med Res.* **2001**;32:5:454-7.

39. Youngster I, Arcavi L, Schechmaster R, Akayzen Y, Popliski H, Shimonov J, Beig S, Berkovitch M. Medications and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: an evidence-based review. *Drug Saf.* **2010**; 33, 713–726.

Table 1: Sequences of the primers used for RFLP reactions.

<b>Base substitution (G6PD)</b>		<b>Primer sequence</b>	<b>Length (base pairs)</b>	<b>Restriction Endonuclease</b>
202 G→A	Forward	CGT GTC CCC CAG CCA CTT CTA	919	<i>Nla</i> III (+)
	Reverse	CAC GCT CAT AGA GTG GTG GG		
376 A→G	Forward	CTG CGT TTT CTC CGC CAA TC	473	<i>Fok</i> I (+)
	Reverse	AGG GCA ACG GCA AGC CTT AC		

\* G6PD: Glucose-6-phosphate dehydrogenase

A base substitution creates (+) or abolishes (-) a specific restriction endonuclease site

Table 2. Epidemiological and physical parameters for uncomplicated and severe *P. vivax* malaria patients from Manaus, Amazon.

	MALE			FEMALE		
	Uncomplicated (n=49)	Severe (n=33)	p-value*	Uncomplicated (n=60)	Severe (n=20)	p-value*
Age, median	27.58±19.86	28.54±16.0	---	31.31.31±21.89	29.89±17.95	---
Temperature, median	36.66±1.19	36.47±0.89	0.417	36.47±1.08	36.55±0.80	0.757
Weight (Kg)	48.70±29.56	62.49±21.97	<b>0.018</b>	52.10±25.37	55.0±19.59	0.633
Numbers of days in hospital	2.88±1.96	3.44±4.93	0.659	3.2±2.1	3.3±3.5	0.950
Asexual Parasite Density	32185.2±74387.6	21512.6±68588.2	0.587	16746.6±33340.4	51123.3±146486.9	0.943
Parasitaemia	347.8±197.8	316.7±180.8	0.551	360.8±194.66	357.1±208.5	0.099
Platelet Count x10 <sup>9</sup> /L	138.7±173.8	136.8±143.9	0.963	96.73±86.63	79.48±98.37	0.491
WBC x10 <sup>6</sup> /L	6.64±2.72	8.01±4.71	0.211	6.10±2.69	5.38±2.38	0.308
RBC x10 <sup>6</sup> /mm L	3.90±0.85	3.48±1.19	0.146	3.84±0.63	3.27±0.82	<b>0.005</b>
Hemoglobin (g/dl)	11.25±2.74	10.0±3.07	0.118	10.84±2.01	9.71±2.18	<b>0.049</b>
Hematocrit (%)	33.76±8.05	29.66±9.08	0.081	32.82±5.82	28.91±6.88	<b>0.025</b>
Reticulocytes (%)	3.17±3.60	4.16±4.69	0.445	1.61±1.25	2.77±2.72	0.057
Glucose mg/dL	121.83±70.54	102.35±30.29	0.148	103.2±38.0	97.61±34.41	0.581
Hemolysis	1/17 (5.9%)	8/17 (47.1%) ↑	---	0/31	1/08 (12.5%) ↑	---
Jaundice	21/48 (43.8%)	29/34 (85.3%) ↑	---	24/58 (41.8%)	16/21 (76.2%) ↑	---
Acute Respiratory Distress	0/23	4/37 (10.8%) ↑	---	0/37	2/21 (9.5%) ↑	---
Vomiting	28/45 (62.2%)	28/37 (75.7%) ↑	---	47/59 (79.7%) ↑	16/21 (76.2%)	---
Intensive Care Unit	1/23 (4.3%)	3/37 (8.1%) ↑	---	0/36	1/21 (4.8%) ↑	---
Anorexia	31/45 (68.9%)	29/37 (78.4%) ↑	---	43/59 (72.9%)	16/21 (76.2%) ↑	---
Hepatosplenomegaly	3/50 (6.0%)	10/32 (31.3%) ↑	---	17/59 (28.8%)	8/21 (38.1%) ↑	---
Dyspnea	12/49 (24.5%)	10/33 (30.3%) ↑	---	20/58 (34.5%)	12/21 (57.1%) ↑	---
Hemoglobinuria	1/17 (5.9%)	8/31 (25.8%) ↑	---	4/33 (12.1%)	4/15 (26.7%) ↑	---
Hematuria	0/12	2/19 (10.5%) ↑	---	2/26 (7.7%) ↑	0/11	---
Choluria	22/52 (42.3%)	29/37 (78.4%) ↑	---	26/59 (44.1%)	15/21 (71.4%) ↑	---
Leukocyturia	2/17 (11.8%)	15/31 (48.4%) ↑	---	14/33 (42.4%) ↑	6/15 (40.0%)	---
Reduced Consciousness	2/21 (9.5%) ↑	3/34 (8.82%)	---	2/36 (5.6%) ↑	0/20	---

\* Independent – Samples T-tests Post Hoc/ Bonferroni test

Continuous variables are presented as mean ± SD

WBC: White Blood Cells

RBC: Red Blood Cells

↑↓: Increase or decrease of frequency

N: Cases

Table 3. Genotypic distribution of G6PD among uncomplicated and severe vivax malaria patients, gender and ethnic origin.

<b>G6PD</b>	<b>MALARIA</b>		<b>p-value*</b>	<b>ETHNIC ORIGIN</b>		<b>p-value*</b>	<b>GENDER</b>		<b>p- value*</b>
	<b>Uncomplicated</b>	<b>Severe</b>		<b>Caucasians</b>	<b>Afro</b>		<b>Male</b>	<b>Female</b>	
<b>Genotypes</b>				<b>(%)</b>	<b>(%)</b>				
<b>Wild Type</b>	95	39		23	112		64	70	
<b>A-</b>	11	12	0.088	03	19	.368	13	10	0.060
<b>Chatham</b>	3	2		02	03		05	0	
<b>Total</b>	109	53		28	134		82	80	162

A- : Variant allele -202A/376G

\* $\chi^2$  test (Yates's corrected)

Table 4. Genotypic distribution of G6PD among uncomplicated and severe vivax malaria and previous malaria episodes in male patients.

Gender	G6PD Genotypes	MALARIA				PREVIOUS MALARIA EPISODES			
		Uncomplicated	Severe	RR (CI)	p-value*	(N)	(N%)	RR (CI)	p-value*
		(N)	(N%)						
Male	A-	04	09 (69.23)	<b>2.01</b>	<b>0.020</b>	02	11	<b>2.35</b>	<b>0.001</b>
	Wild Type	42	22 (34.78)	<b>(1.23-3.31)</b>		41	23	<b>(1.58-3.52)</b>	
Male	Chathan	03	02 (40.0)	1.16	0.573	04	01	0.56	0.651
	Wild Type	42	22 (34.78)	(0.38-3.59)		41	23	(0.09-3.31)	
Male	A-	04	09 (69.23)	1.73	0.325	02	11	<b>4.23</b>	<b>0.022</b>
	Chatham	03	02 (40.0)	(0.56-5.37)		04	01	<b>(0.72-24.80)</b>	
Female	A-	07	02 (22.22)	0.92	0.662	07	02 (22.22)	0.62	0.710
	Wild Type	53	17 (24.29)	(0.25-3.33)		45	25 (35.71)	(0.18-2.20)	

\*Fisher's exact test

RR: Relative Risk; (CI): Intervals of Confidence

N: cases

Table 5. Genotypic distribution of G6PD among Methaemoglobin ReductionTest (Brewer's Test) results and Gender patients.

		<b>G6PD GENOTYPES</b>				<b>Total</b>	<b>p-value</b>
		<b>(GENDER)</b>					
		<b>MEN</b>					
		<b>WT</b>	<b>A-</b>	<b>CHATHAM</b>			
<b>Brewer's test</b>	<b>Negative</b>	48	05	03	56	<b>&lt;0.001*</b>	
	<b>Positive</b>	02	05	01	08	<b>*</b>	
		<b>WOMEN</b>					
		<b>WT</b>	<b>A-</b>				
			<b>HETEROZYGOUS</b>	<b>HOMOZYGOUS</b>			
<b>Brewer's test</b>	<b>Negative</b>	56	6	0	62	<b>&lt;0.001*</b>	
	<b>Positive</b>	0	0	1	01		

\* Independent – Samples T-tests Post Hoc/Bonferroni statistics      \*\*Anova  
A-: Variant allele -202A/376G      WT: Wild Type

Table 6. Haematological parameters in vivax malaria male patients among G6PD genotypes.

HAEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL DATA	G6PD GENOTYPES (N) CASES Mean±SD			P-value*	WT / A-	WT / CHT	A- / CHT
	WT (64)	A- (13)	Chatham (05)		(64/13)	(64/05)	(13/05)
					p-value*	p-value*	p-value*
WBC x10 <sup>3</sup> /mm L	7.27±3.70	8.96±4.66	3.63±0.70	0.064	0.214	0.058	<b>0.044</b>
RBC, x10 <sup>6</sup> /mm L	3.87±1.10	2.74±0.77	3.33±0.69	<b>0.007</b>	<b>0.002</b>	0.341	0.202
Hb, g/dL	10.96±3.02	8.49±2.49	9.78±2.69	<b>0.049</b>	<b>0.017</b>	0.456	0.402
Hematocrit, %	32.69±8.94	25.07±7.35	25.58±7.19	<b>0.035</b>	<b>0.013</b>	0.379	0.427
MCV, fL	85.08±9.50	91.66±5.62	85.25±4.46	0.090	<b>0.034</b>	0.973	0.062
MCH, pg	28.54±3.51	31.00±1.93	29.04±2.35	0.088	<b>0.031</b>	0.784	0.122
MCHC, pg	33.51±1.21	33.84±1.20	34.02±1.01	0.565	0.426	0.421	0.796
Reticulocyte count, %	2.65±2.75	8.01±6.25	2.18±2.28	< <b>0.001</b>	< <b>0.001</b>	0.743	0.097
RDW	13.89±2.90	12.19±1.84	13.13±0.90	0.171	0.072	0.605	0.356
Indirect Bilirubin (mg/dL)	2.55±4.48	0.38±0.18	1.60±2.42	0.298	0.134	0.678	0.118
Direct Bilirubin (mg/dL)	2.48±3.11	4.99±4.81	1.75±2.13	0.095	<b>0.045</b>	0.648	0.224
Total Bilirubin (mg/dL)	4.98±6.50	5.34±4.95	3.35±2.91	0.851	0.866	0.626	0.469
LDH (U/L)	776.8±458.8	1372.4±524.6	808.3±274.4	<b>0.003</b>	< <b>0.001</b>	0.895	0.068
AST (U/L)	59.71±47.82	43.90±21.34	77.0±51.12	0.389	0.295	0.498	0.089
ALT (U/L)	61.52±66.05	29.63±14.27	85.75±59.63	0.181	0.121	0.486	<b>0.009</b>
GGT (U/L)	91.18±74.95	37.60±22.07	83.0±61.63	0.093	<b>0.035</b>	0.835	0.056
Alkaline Phosphatase	306.66±222.1	186.25±97.8	310.0±158.6	0.304	0.133	0.998	0.121
Creatinine (mg/dL)	1.25±1.32	1.12±0.38	0.75±0.13	0.701	0.767	0.461	0.081
Urea (mg/dL)	51.55±41.72	44.91±22.48	32.25±6.70	0.577	0.616	0.366	0.297
Glucose (mg/dL)	114.11±57.9	95.36±20.62	119.75±18.8	0.527	0.299	0.849	0.059
Albumin (g/dL)	3.63±0.61	4.22±0.56	3.65±0.29	<b>0.032</b>	<b>0.011</b>	0.966	0.085
Platelet count, x10 <sup>9</sup> /L	113.6±149.8	254.9±160.7	115.3±99.8	<b>0.026</b>	<b>0.009</b>	0.983	0.132
VPM, fL	9.60±2.25	8.60±0.97	9.20±0.80	0.342	0.158	0.726	0.290
INR	1.33±0.30	1.17±0.09	1.19±0.04	0.179	0.100	0.370	0.605

\* Independent – Samples T-tests Post Hoc/Bonferroni statistics      \*\* Anova  
**WT:** Wild Type      **CHAT:** G6PD Chatham  
**RBC:** Red Blood Cells A-: Variant allele -202A/376G  
**ALT:** Aspartate Aminotransferase      **LDH:** Lactate dehydrogenase  
**AST:** Aspartate Aminotransferase      **RDW:** Red Cell Distribution Width  
**MPV:** Mean Platelet Volume      **INR:** International Normalized Ratio



Table 7. Haematological parameters in vivax malaria female patients among G6PD genotypes.

HAEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL DATA	G6PD GENOTYPES (N) CASES		p-value*
	WT (49)	A- (04)	
WBC x10 <sup>3</sup> /mm L	5.84±2.37	6.77±5.52	0.501
RBC, x10 <sup>6</sup> /mm L	3.79±0.74	2.77±0.59	<b>0.015</b>
Hb, g/dL	10.67±2.12	8.25±1.73	<b>0.031</b>
Hematocrit, %	32.25±6.39	24.35±5.62	<b>0.020</b>
MCV, fL	86.57±6.09	87.87±6.98	0.688
MCH, pg	28.70±2.58	29.86±2.38	0.389
MCHC, pg	33.13±1.10	33.90±0.85	0.127
Reticulocyte count, %	2.04±2.07	2.08±1.34	0.972
RDW	13.79±1.91	11.68±0.41	<b>0.033</b>
Indirect Bilirubin (mg/dL)	1.94±2.69	3.43±3.60	0.304
Direct Bilirubin (mg/dL)	1.29±1.41	1.38±0.52	0.894
Total Bilirubin (mg/dL)	3.19±3.46	4.82±3.69	0.386
LDH (U/L)	728.6±317.7	755.3±91.9	0.886
AST (U/L)	73.42±132.65	27.0±12.19	0.491
ALT (U/L)	69.49±64.05	27.50±16.36	0.201
GGT (U/L)	135.29±51.75	51.75±3.04	0.185
Alkaline Phosphatase	366.3±201.0	290.0±183.9	0.601
Creatinine (mg/dL)	0.86±0.67	0.75±0.26	0.739
Urea (mg/dL)	30.06±15.40	35.25±12.53	0.516
Glucose (mg/dL)	102.08±38.66	102.25±8.54	0.993
Albumin (g/dL)	3.65±0.45	3.40±0.30	0.348
Platelet count, x10 <sup>9</sup> /L	80.37±77.88	88.75±60.00	0.835
VPM, fL	9.50±1.17	9.98±0.91	0.436
INR	1.40±0.37	1.04±0.09	0.057

\* Independent – Samples T-tests Post Hoc/Bonferroni statistics

RBC: Red Blood Cells A-: Variant allele -202A/376G

ALT: Aspartate Aminotransferase

AST: Aspartate Aminotransferase

VPM: Mean Platelet Volume

WT: Wild Type

CHAT: G6PD Chatham

LDH: Lactate dehydrogenase

RDW: Red Cell Distribution Width

RNI: International Normalized Ratio

Table 8. Genotypic and allelic distribution of G6PD A- in uncomplicated and severe vivax malaria male patients.

HAEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL DATA		G6PD GENOTYPES				G6PD GENOTYPES			
		Uncomplicated Malaria		RR (CI)	p-value*	Severe Malaria		RR (CI)	p-value*
		A-	WT			A-	WT		
<b>Hb, g/dL</b>	≤ 11.5	01	07	1.50	0.652	08	09	<b><u>6.59</u></b>	<b><u>0.018</u></b>
	> 11.5	01	11	(0.11-20.68 )		01	13	(1.09-26.53 )	
<b>Hematocrit, %</b>	≤ 25.0	01	02	5.67	0.284	07	06	<b><u>4.85</u></b>	<b><u>0.014</u></b>
	> 25.0	01	16	(0.47-68.43 )		02	16	(1.19-19.66 )	
<b>Reticulocyte count, %</b>	≥ 3.0	01	04	2.20	0.541	08	02	<b><u>12.80</u></b>	<b><u>&lt;0.001</u></b>
	< 3.0	01	10	(0.17-28.43 )		01	15	(1.87-87.56 )	
<b>Glucose mg/dL</b>	> 99.0	01	09	0.90	0.736	01	12	<b><u>0.17</u></b>	<b><u>0.031</u></b>
	≤ 99.0	01	08	(0.07-12.38 )		08	10	(0.02-0.98)	
<b>Platelet count, x10<sup>9</sup>/L</b>	≤ 50.0	02	12	----	0.478	09	11	----	<b><u>0.011</u></b>
	> 50.0	0	06			0	11		
<b>Platelet count, x10<sup>9</sup>/L</b>	< 150.0	02	05	----	0.110	06	02	<b><u>5.75</u></b>	<b><u>0.003</u></b>
	≥ 150.0	0	13			03	20	(1.76-17.77 )	
<b>Clinical Data</b>									
<b>Hemolysis</b>	No	1	13	----	0.331	0	9	----	<b><u>0.004</u></b>
	Yes	1	0			5	2		

\* Independent – Samples T-tests Post Hoc/Bonferroni statistics a  $\chi^2$  test (Yates's corrected); b Fisher's exact test RR: Risk Ratio; (CI): Intervals of Confidence

## 19. CONCLUSÃO FINAL

De acordo com os resultados apresentados podemos concluir que:

- Nossos dados corroboram outros estudos sobre a redução da densidade de parasitas em pacientes com HbAS;
- Pacientes portadores da hemoglobina AC apresentaram menor risco de desenvolvimento de malária grave;
- Nossos resultados não estabeleceram uma associação entre malária vivax e dados hematológicos de perfis diferentes hemoglobinas;
- Os valores da amplitude de distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW ) pode ser usado como marcador de gravidade entre portadores de hemoglobinas normais (AA) e hemoglobinas (HbAS/AC) na infecção por malária;
- O estudo pode fornecer uma nova abordagem para uma questão antiga, e seria bem vale a pena repetir em coortes maiores;
- Nenhum outro estudo associou hemoglobinopatias Estruturais e malária vivax na região da Amazônia, tornando este um estudo pioneiro sobre o assunto;
- Este estudo relata a frequência primária de algumas mutações G6PD em Manaus-Amazonas;
- G6PD A-(202A/376G) foi demonstrada a mais prevalente na Região Amzônica;
- A mutação 1003A (Chatham) foi pela primeira vez demonstrado na população amazônica;
- Não houve associações significativas entre a clínica grave da malária vivax em pacientes com variante Chatham;

- Mutações 202A/376G foi um fator de risco para desenvolver a malária vivax grave em indivíduos do sexo masculino após o tratamento com cloroquina e primaquina;
- Este estudo demonstra a necessidade da realização molecular das mutações 202A/376G de todos os pacientes diagnosticados com malária na região amazônica, afim de evitar tratamento inadequado que poderia agravar a doença;
- Implicações funcionais de mutações na G6PD pode melhorar a nossa compreensão da patogênese da malária e ajudar a compreender sua variação individual na resposta à terapia com drogas anti-malária.

## 20. PERSPECTIVAS

A doença malária acompanha o ser humano a milhares de anos. No Brasil, 99% dos casos acontecem na Amazônia legal. Diversos fatores genéticos relativos ao parasita como do hospedeiro humano já foram descritos e muito já predizem maior ou menor susceptibilidade para desenvolver malária grave ou não complicada. Os principais fatores genéticos humanos envolvidos nesta pré-disposição de para malária grave são principalmente àqueles ligados às proteínas e enzimas do eritrócito, com as hemoglobinopatias estruturais S, C, D e E e a deficiência da G6PD. Atualmente no estado do Amazonas, poucos estudos foram direcionados para pesquisa destas, destacando o nosso estudo foi muito promissor por aumentar um pouco mais do conhecimento sobre estes marcadores genéticos do homem e a clínica grave da malária vivax. Nossas perspectivas futuras são relacionadas em estudos de outras mutações já descritas em nossa região para a G6PD, como a variante mediterrânea que já foi demonstrada em até 10% de pacientes com malária vivax na região de Manaus e que pode levar a uma clínica mais grave, principalmente após o único tratamento disponível para os pacientes que são a Primaquina e Cloroquina. Além do mais, estudos relacionados com as hemoglobinopatias de síntese, como as talassemias alfas e betas, bem como pesquisas envolvendo a concentração da hemoglobina fetal poderiam esclarecer alguns estudos que demonstram correlação positiva, enquanto outros, negativas ou neutras. Desta forma, acreditamos que abordagens com maior números de indivíduos podem corroborar com resultados mais precisos e corretos para o estabelecimento de associações fortes entre estes marcadores genéticos de susceptibilidade com a clínica grave da malária.

## 21. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, P, PALLAUI, R, CHANDRAN, S, DANDAVATI, V, SAYEED, S. K. **Clinical Proteomics of the Neglected Human Malarial Parasite Plasmodium vivax.** *Plos One*, v. 6, issue. 10, p. 1-9, 2011.

AGARWAL A, GUINDO A, CISSOKO Y, et al. **Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S.** *Blood* 2000; 96:2358–63.

AIDOO M, TERLOUW DJ, KOLCZAK, MS, MC ELROY PD, TER KUILE FO, KARIUKI S. **Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality.** *Lancet* 2002; 359:1311–2.

ALBUQUERQUE SR, CAVALCANTE F de O, SANGUINO EC, TEZZA L, CHACON F, CASTILHO L, DOS SANTOS MC. **FY polymorphisms and vivax malaria in inhabitants of Amazonas State, Brazil.** *Parasitol Res.* 2010 Apr; 106(5): 1049-53.

ALECRIM MG, ALECRIM WD, MACEDO V. **Plasmodium vivax resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region.** *Rev Soc Bras Med Trop* 1999 Jan-Feb; 32(1): 67-8.

ALEXANDRE MAA. **Estudo clínico e epidemiológico dos casos graves de malária vivax em pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical, Brasil.** Mestrado [dissertação]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas; 2004.

ALEXANDRE MA, FERREIRA OC, SIQUEIRA MD, MAGALHÃES LB, MOURÃO, MPG, LACERDA, VL, ALECRIM, MGC. **Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon.** *Emerging Infectious Diseases*, v. 16, n. 10, 2010.

ALLISON AC. **Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection.** *Br Med J.* 1954 Feb 6;1(4857):290-4.

ALVES A, MARTINS A, ADOLPHSSON S, BOCKOMY B, CARLETI G, CABRAL G, SOUZA ACP, VIANNA A. **Malária Grave Importada. Relato de Caso.** *Revista Brasileira de Terapia Intensiva.* v.19, issue 2, p. 323-236, 2007.

ALVING AS, CARSON PE, FLANAGAN CL, ICKES CE. **Enzymatic deficiency in primaquina sensitive erythrocytes.** *Science* 1956 Sep 14; 124(3220): 484-5.

ANSTEY NM, RUSSELL B, YEO TW, PRICE RN. **The pathophysiology of vivax malaria.** *Trends Parasitol.* 2009; (5):220-7.

ARRUDA VR, SONATI MF, SAAD ST, SALLES TS, COSTA FF. **G6PD Sumare: a novel mutation in the G6PD gene (1292 T→G) associated with chronic nonspherocytic anemia.** *Hum Mutat* 1997; 10(3): 245-7.

BARONCIANI L, TRICTA F, BEUTLER E. **G6PD "campinas:" a deficient enzyme with a mutation at the far 3' end of the gene.** *Hum Muta.* 1993; 2(1): 77-8.

BECKER K, TILLEY L, VENNERSTROM JL, ROBERTS D, ROGERSON S, GINSBURG H. **Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions.** *International Journal of Parasitology*, v. 34, n. 2, p. 163-189, 2004.

BERGHOUT J, HIGGINS S, LOUCOUBAR C, SAKUNTABHAI A, KAIN KC, GROS P. **Genetic diversity in human erythrocyte pyruvate kinase.** *Genes Immun.* 2012; 13(1): 98-102.

BEUTLER E. **Diagnosis of G6PD. deficiency.** *Lancet*, 2:1032-1033, 1975.

BEUTLER E, GAETANI G, DER KALOUSTION V, LUZZATTO L, NIWA S, PANNICH V, SODEINDE O, BELSEY M, KULIEV AM, MODELL B, SHAH PM. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency.** *Bull World Health Organ* 1989a; 67(6): 601-11.

BEUTLER E. **G6PD: population genetics and clinical manifestations.** *Blood Rev* 1996; 10(1): 45-52.

BEUTLER E, Duparc S (2007) **G6PD Deficiency Working Group. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and antimalarial drug development.** *Am J Trop Med Hyg* 77: 779-789.

BIENZLE U, AYENI O, LUCAS AO, LUZZATTO L. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase and malaria: greater resistance of female heterozygous for enzyme deficiency and of males with non-deficient variant.** *Lancet* 1972; 1(7742): 107-10.

BOULOS M, DI SANTI SM, BARATA LCB. **Some aspects of treatment, prophylaxis and chemoresistance of *Plasmodium falciparum* malaria.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 81 (2):255-7. 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância Epidemiológica. Indicadores de Saúde.** Brasília: *Ministério da Saúde*, 2005. 22p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil.** Brasília: *Ministério da Saúde*, 2010. 36p.

BUNN HF. **Pathogenesis and treatment of sickle cell disease.** *New England Journal of Medicine.* 337: 762-769, 1997.

BUNN HF. **The Molecular Basis of Blood Diseases.** In: STAMATOYANNOPOULOS, G, NIENHUIS, A. W., MAJERUS, P. W, VARNUS, H. 2 ed. Philadelphia: *W. B. Saunders Company.* 6 p. 207-56. 1994.

BUNN HF, FORGET GG. **Hemoglobin: molecular, genetic, and clinical aspects**; Philadelphia, PA: W. B. Saunders Company, 1986.

BUTLER, T. **G6PD deficiency and malaria in black Americans in Vietnam**. *Military Medicine*, 138:153-5. 1973.

CARDOSO MA, SCOPEL KK, MUNIZ PT, VILLAMOR E, FERREIRA MU. **Underlying factors associated with anemia in Amazonian children: a population-based, cross-sectional study**. *PLoS One*. 2012; 7(5): e36341.

CARVALHO BO *et al.* **On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes**. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. v202, n 4, p 638-47, 2010.

CASTRO S, WEBER R, DADALT V, TAVARES V, GIUGLIANI R. **Prevalence of G6PD deficiency in newborns in the south of Brazil**. *J Med Screen* 2006; 13(2): 85-6.

CASTRO S, WEBER R, MATTE U, GIUGLIANI R. **Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in patients from the southern Brazilian city of Porto Alegre, RS**. *Genet Mol Biol* 2008; 31(2): 423-26.

CAVALLI P, TANZI E, VILLA D, BEDOSCHI D, ZANETTI A. **Anti-HIV screening of blood donors**. *Vox Sang*. 1994;67(4):40

CHARACHE S. **Fetal hemoglobin, sickling, and sickle cell disease**. *Adv Pediatr*. 1990;37:1-31.

CHOTIVANICK K, UDOMSANGPETCH R, PATTANAPANYASAT K. **Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe *P. falciparum* malaria**. *Blood*; 100(4):1172-6. 2002.

CLARK TG, FRY AE, AUBURN S, CAMPINO S, DIAKITE M, GREEN A, RICHARDSON A, TEO YY, SMALL K, WILSON J, JALLOW M, SISAY-JOOF F, PINDER M, SABETI P, KWIATKOWSKI DP, ROCKETT KA. **Allelic heterogeneity of G6PD deficiency in West Africa and severe malaria susceptibility**. *Eur J Hum Genet* 2009 Aug; 17(8): 1080-5.

CLARK IA, AL YAMAN FM, JACOBSON, L. S. **The biological basis of malarial disease**. *International Journal for Parasitology*; 27:1237-1249, 1997.

COMPRI MB, SAAD ST, RAMALHO AS. **Genetic-epidemiological and molecular investigation of G-6-PD deficiency in a Brazilian community**. *Cad Saúde Pública*; 2000; 16: 335-342

CROMPTON PD, TRAORE B, KAYENTAO K, DOUMBO S, ONGOIBA A, DIAKITE SA. *et al.* **Sickle cell trait is associated with a delayed onset of malaria: implications for time-to-event analysis in clinical studies of malaria**. *Brazilian Journal of Infectious Disease*; 198:1265-75. 2008.

DANQUAH I, ZINIEL P, TEUNIS BC, EGGELTED A, EHRHARDTE S, MOCKENHAUPTA FP. **Influence of haemoglobins S and C on predominantly**



**asymptom Plasmodium infections in northern Ghana.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 104-713–719. 2010.

DANQUAHA I, ZINIEL P, TEUNIS BC, EGGELTED A, EHRHARDTE S, MOCKENHAUPTA FP. **Influence of haemoglobins S and C on predominantly asymptom Plasmodium infections in northern Ghana.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 104-713–719. 2010.

DAVIDSON RG, NITOWSKY HM, CHILDS B. **Demonstration of two populations of cells in the human female heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase variants.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1963 Sep; 50: 481-5.

DEHARO E, BARKAN D, KRUGLIAK M, GOLENSER J, GINSBURG H. **Potential of the antimalarial action of chloroquine in rodent by drugs known to reduce cellular glutathione levels.** *Biochemical Pharmacology*. 66, 809-817, 2003.

DRISS A, HIBBERT J. M, WILSON NO, IQBAL SA, KIEWICZ TVA, STILES JK. **Genetic polymorphisms linked to susceptibility to malaria.** *Malaria Journal*; 10:271. 2011.

EGAN TJ, COMBRINCK JM, HEARNE GR, MARQUES HM, NTENTENI S, SEWELL BT, SMITH PJ, TAYLO D, VAN SCHALKWYK DD, WALDEN JC. **Faten of haem iron in the malaria parasite Plasmodium falciparum.** *Biochemical Journal*. 365, 343-347, 2002.

ENEVOLD A, VESTERGAARD LS, LUSINGU J, DRAKELEY CJ, LEMNGE MM, THEANDER TG, BYGBJERG IC, ALIFRANGIS M. **Rapid screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and haemoglobin polymorphisms in Africa by a simple high-throughput SSOP-ELISA method.** *Malar J* 2005 Dec 15; 4: 61.

EREL O, KOCYIGIT A, AVCI S, AKTEPE N, BULUT V. **Oxidative stress and antioxidative status of plasma and erythrocytes in patients with vivax malaria.** *Clinical Biochemistry*. 30: 8, 631-639, 1997.

FLINT J, HARDING RM, BOYCE AJ, CLEGG JB. **The population genetics of the haemoglobinopathies.** *Baillieres Clin Haematol*. 1998 Mar;11(1):1-51.

FREVERT U, NARDIN E. **Arrest in the liver – a genetically defined malaria vaccine?** *N Engl J Med*; 200: 352.

FRIEDMAN MJ. **Oxidant damage mediates variant red cell resistance to malaria.** *Nature*; 280:245-7. 1979.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO: **Estatística da em Malária.** Disponível em: [<http://www.fmt.am.gov.br/>]. 2010

FUNDAÇÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO AMAZONAS. **Boletim de Vigilância em Saúde, 2012.** Acesso em: 13 de fev 2013. Disponível na URL: <http://www.saude.am.gov.br>

FUNDAÇÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO AMAZONAS. **Boletim de vigilância em saúde**. Amazonas, 2010.

GALINSKI MR, BARNWELL JW. **Plasmodium vivax: who cares?** *Malar J* 2008; 7 (suppl 1): S9.

GAMA BE, LACERDA MVG, DANIEL-RIBEIRO CT, FERREIRA-DA-CRUZ, MF. **Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites in Brazil: consequences on disease morbidity and control**. *Memoriais Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, p. 159-166, 2011.

GILLES HM, FLETCHER KA, HENDRICKSE RG, LINDNER R, REDDY S, ALLAN N. **Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency, sickling, and malaria in African children in South Western Nigeria**. *Lancet* 1967; 1: 138–40.

GILLES NH, HENDRICKSE RG, LINDER R, REDDY S, ALLAN N. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, sickling and malaria in African children in southwestern Nigeria**. *Lancet*;1:138-40. 1967.

GOMES, A. P, VITORINO, R. R, COSTA, A. P, MENDONÇA, E. G, OLIVEIRA, M. G. A, SIQUEIRA-BATISTA, R. **Malária grave por *Plasmodium falciparum***. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 23, n. 3, p. 358-369, 2011.

GONÇALVES MJF, ALECRIM WD. **Non-planned urbanization as a contributing factor for malaria incidence in Manaus-Amazonas, Brazil**. *Rev Salud Publica* (Bogota) 2004 May-Aug; 6(2): 156-66.

GREENWOOD B, MARSH K, SNOW R. **Why do some African children develop severe malaria?** *Parasitol Today*; 7:277-281. 1991.

GUINDO A, FAIRHURST RM, DOUMBO OK, WELLEMS TE, DIALLO DA. **XLinked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria**. *PLoS Med*;2007; 4: e66.

HAMEL, A. R, CABRAL, I. R, SALES, T. S, COSTA, F. F, OLALLA SAAD, S. T. **Molecular heterogeneity of G6PD deficiency in an Amazonian population and description of four new variants**. *Blood Cells Molecules and Diseases*. 28:399-406, 2002.

HIRONO, A, BEUTLER, E. **Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-)**. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:3951–3954, 1988.

KAR S, SETH S, SETH PK. **Prevalence of malaria in Ao Nagas and its association with G6PD and HbE**. *Human Biology*; 64:187-97. 1992.

KATSURAGAWA TH, GIL LHS, STÁBILE RG, PIRES MG, BONINI-DOMINGOS CR. **Avaliação da incidência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e perfil**

**hematológico em indivíduos de uma região de Rondônia.** *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*; 26(4): 268-273. 2004.

KOCHAR DK, DAS A, KOCHAR SK, SAXENA V, SIROHI P, GARG S, KOCHAR A, KHATRI MP, GUPTA, V, **Severe Plasmodium vivax Malaria: A Report on Serial Cases from Bikaner in Northwestern India.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 80, p. 194–198, 2009.

KOCHAR, D.K, SAXENA, V, SINGH, N, KOCHAR, S.K, KUMAR, S.V, DAS, A. **Plasmodium vivax malaria.** *Emerging Infectious Diseases*, v. 11, n. 1, p. 132-134, 2005.

KREUELS, B, KREUZBERG, C, KOBBE, R, AKONOR, M.A, APIAH-THOMPSON, P, THOMPSON, B, EHMEN, C, ADJEI, S, LANGEFELD, I, ADJEI, O, MAY, J. **Differing effects of HbS and HbC traits on uncomplicated falciparum malaria, anemia, and child growth.** *The American Society of Hematology*, v. 115, p. 4551-4558, 2010.

KÜHN VL, LISBÔA V, DE CERQUEIRA LP. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in blood donors in a general hospital of Salvador, Bahia, Brazil.** *Rev Paul Med* 1983 Sep-Oct; 101(5): 175-7.

KUWAHATA M, WIJESINGHE R, HO MF, PELECANOS A, BOBOGARE A, LANDRY L, BUGORA H, VALLELY A, MCCARTHY J. **Population screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiencies in Isabel Province, Solomon Islands, using a modified enzyme assay on filter paper dried bloodspots.** *Malar J.* 2010 Aug 5;9:223. doi: 10.1186/1475-2875-9-223.

KWIATKOWSKI DP. **How Malaria Has Affected the Human Genome and What Human Genetics Can Teach Us about Malaria.** *The American Journal of Human Genetics.* 77(2): 171–192. 2005.

LACERDA MV, HIPOLITO JR, PASSOS LN. **Chronic Plasmodium vivax infection in a patient with splenomegaly and severe thrombocytopenia.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2008 Sep-Oct; 41(5): 522-3.

LACERDA MVG. **Manifestações clínicas e patogênese da plaquetopenia na malária.** 2007. 395f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical), Universidade de Brasília, Brasília.

LACERDA MVG. **Protocol for Characterization of severe P. vivax malaria.** April; 2009.

LACERDA MVG, MOURÃO MPG, COELHO HCC, SANTOS JB. **Thrombocytopenia in malaria: who cares?** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; v.106, 52-63, 2011.

LACERDA, M.V, MOURÃO, M.P, ALEXANDRE, M.A, SIQUEIRA, A.M, MAGALHÃES, B.M, MARTINEZ-ESPINOSA, F.E. **Understanding the clinical**

**spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature.** *Malar J.* 2012; 9:11:12.

LAWALY YR, SAKUNTABHAI A, MARRAMA L, KONATE L, PHIMPRAPHI W, SOKHNA C, TALL A, SARR FD, PEERAPITTAYAMONGKOL C, LOUICHAROEN C, SCHNEIDER BS, LEVESCOT A, TALMAN A, CASADEMONT I, MENARD D, TRAPE JF, ROGIER C, KAEWKUNWAL J, SURA T, NUCHPRAYOON I, ARIEY F, BARIL L, SINGHASIVANON P, MERCEREAU-PUJALON O, PAUL R. **Heritability of the human infectious reservoir of malaria parasites.** *PLoS One.* 2010;5(60).

LESLIE T, BRICEN M, MAYAN I, MOHAMMED N, KLINKENBERG E, HOPKINS CS, CHRISTOPHER S, WHITTY JM, ROWLAND M. **The Impact of Phenotypic and Genotypic G6PD Deficiency on Risk of Plasmodium vivax Infection: A Case-Control Study amongst Afghan Refugees in Pakistan.** *PLoS Medicine.* 7(5). 2010.

LOMAR AV, VIDAL JE, LOMAR FP, BARBAS CV, MATOS GJ, BOULOS M. **Acute respiratory distress syndrome due to vivax malaria: case report and literature review.** *Braz J Infect Dis* 2005 Oct; 9(5):425-30.

LONGLEY, R, SMITH, C, FORTIN, A, BERGHOUT, J, MCMORRAN, B, BURGIO, G, FOOTE, S, GROS, P. **Host resistance to malaria: using mouse models to explore the host response.** *Official Journal of International Mammalian Genome Society*, v. 22, n. 2, p. 32-42, 2011.

LOUICHAROEN C, PATIN E, PAUL R, NUCHPRAYOON I, WITONPANICH B, PEERAPITTAYAMONGKOL C, CASADEMONT I, SURA T, LAIRD NM, SINGHASIVANON P, QUINTANA-MURCI L, SAKUNTABHAI A. **Positively selected G6PD-Mahidol mutation reduces Plasmodium vivax density in Southeast Asians.** *Science.* 2009; 10.1126.

LOUICHAROEN C, MUCHPRAYOON I. **G6PD Viangchan (871 G>A) is the most common G6PD-deficient variant in the Cambodian population.** *Journal of Human Genetics;* 50:448-52. 2005.

LUZZATTO, L, MEHTA, A. **Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. In: The metabolic basis of inherited disease.**

LYON MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 1961 Apr 22; 190: 372-3.

MAIA UM, BATISTA DCA, PEREIRA WO, FERNANDES TAM. **Prevalência da deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase em doadores de sangue de Mossoró, Rio Grande do Norte.** *Rev Bras Hematol Hemoter* 2010; 32(5): 422-23.

MARQUES J, CAMPOS JO. **Incidência da deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em negros de Minas Gerais.** *Rev Assoc Med Bras* 1975; 21:111-2.

MAY J, EVANS JA, TIMMANN C, et al. **Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria.** *JAMA* 2007; 297:2220–6.

MAY, J, EVANS, J. A, TIMMANN, C, EHMEN, C, BUSCH, W, THYE, T, AGBENYEGA, T, HORSTMANN, R. D. **Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria.** *Journal of The American Medical Association*, 297:2220-2226. 2007.

MEHTA, B. C, MEHTA, J. **Interaction of sickle haemoglobin with malaria.** *Journal of the Association of Physicians of India*; 39:296-297, 1991.

MESTIASHVILI I. **Heterogeneity and gene-geography of  $\beta$ -thalassemia in Georgia.** *Georgian Med News*. 2010 Nov;(188):45-51.

MEZZACAPPA MA, FACCHINI FP, PINTO AC, CASSONE AE, SOUZA DS, BEZERRA MA, ALBUQUERQUE DM, SAAD ST, COSTA FF. **Clinical and genetic risk factors for moderate hyperbilirubinemia in Brazilian newborn infants.** *J Perinatol*. 2010 Dec; 30(12): 819-26.

MILLER RH, MASON SJ, CLYDE DF, MCGINNISS MH. **The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duff y-blood-group genotype, FyFy.** *N Engl J Med* 1976; 295:303-04.

MILLER LH. **Impact of malaria on genetic polymorphism and genetic diseases in Africans and African Americans.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 91:2415-9. 1994.

MILLER LH, BARUCH DI, MARSH K, DOUMBO OK. **The pathogenic basis of malaria.** *Nature*, v. 415, p. 673-679, 2002.

MILLIMONO TS, LOUA KM, RATH SL, RELVAS L, BENTO C, DIAKITE M, JARVIS M, DARIES N, RIBEIRO LM, MANCO L, KAEDA JS. **High prevalence of hemoglobin disorders and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in the Republic of Guinea (West Africa).** *Hemoglobin*. 2012; 36(1): 25-37.

MOCKENHAUPT FP; EHRHARDT, S, CRAMER, J. P, OTCHWEMAH, R. N, ANEMANA SD, GOLTZ, K. et al. **Hemoglobin C and resistance to severe malaria in Ghanaian children.** *Journal Infectious Diseases* 2004; 190:1006–9.

MODIANO D, LUONI G, SIRIMA BS, et al. **Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria.** *Nature* 2001; 414:305–8.

MOMBO LE, NTOUMI F, BISSEYE C, OSSARI SLU, CY, NAGEL RL, KRISHNAMOORTHY R. **Human genetic polymorphisms and asymptomatic Plasmodium falciparum malaria in Gabonese schoolchildren.** *Am. J. Trop. Med. Hyg*; 68:186-190, 2003.

MOTULSKY AG. **Metabolic polymorphisms and the role of infectious diseases in human evolution.** *Hum Biol* 1960 Feb; 32: 28-62.

MOTULSKY AG. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency haemolytic disease of the newborn and malaria.** *Lancet*;1:1168-9. 1961.

MULLIS KB, FALLONA FA. **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase - catalized chain reaction.** *Methods Enzimol.*, 155:335-350, 1987.

NAOUM PC. **Hemoglobinopatias e talassemias.** São Paulo: Sarvier, 1997. 171p.

NKHOMA ET, POOLE C, VANNAPPAGARI V, HALL SA, BEUTLER E. **The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis.** *Blood cells, molecules & diseases*, 2009;42, 267-78.

NOTARO R, AFOLAYAN A, LUZZATTO L. **Human mutations in glucose-6-phosphate dehydrogenase reflect evolutionary history.** *FASEB Journal*; 14: 485-494. 2000.

O'DONNELL A, PREMAWARDHENA A, ARAMBEPOLA M, SAMARANAYAKE R, ALLEN SJ, PETO TE, FISHER CA, COOK J, CORRAN PH, OLIVIERI NF, WEATHERALL DJ. **Interaction of malaria with a common form of severe thalassemia in an Asian population.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(44):18716-21.

OLIVEIRA RA, OSHIRO M, HIRATA MH, HIRATA RD, RIBEIRO GS, MEDEIROS TM, DE O BARRETTO OC. **A novel point mutation in a class IV glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD São Paulo) and polymorphic G6PD variants in São Paulo State, Brazil.** *Genet Mol Biol* 2009 Apr; 32(2): 251-4.

OLIVEIRA-FERREIRA J, LACERDA MVG, BRASIL P, LADISLAU JLB, TAUIL PL, RIBEIRO CTD. **Malaria in Brazil: an overview.** *Malaria Journal*, v. 9, p. 115, 2010.

OPPENHEIM A, ORON V, FILON D, FEARON CC, RACHMILEWITZ EA, KAZAZIAN HH JR, RUND D. **Sporadic alleles, including a novel mutation, characterize beta-thalassemia in Ashkenazi Jews.** *Hum Mutat.* 1993;2(2):155-7.

ORZALESI N, FOSSARELLO M, SORCINELLI R, SCHLICH U. **The relationship between glucose-6-phosphate deficiency and cataracts in Sardinia - an epidemiology and biochemical study.** *Documenta Ophthalmologica*; 57:187-201, 1984.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Health Situation in The Americas: Basic Indicators 2010.**

PARIKH S, DORSEY G, ROSENTHAL PJ. **Host polymorphisms and the incidence of malaria in Ugandan children.** *Am J Trop Med Hyg* 2004 Dec; 71(6): 750-3.

PETERS AL, VAN NOORDEN CJ. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: cytochemical detection of heterozygous G6PD deficiency in women.** *J Histochem Cytochem.* 2009 Nov; 57(11): 1003-11.

POESPOPRODJO JR, FOBIA W, KENANGALEM E, LAMPAH DA, HASANUDDIN A, WARIKAR N, SUGIARTO P, TJITRA E, ANSTEY NM, PRICE

RN. **Vivax Malaria: A Major Cause of Morbidity in Early Infancy.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 48, p. 1704-1712, 2009.

PRICE, R. N, DOUGLAS, N. M, ANSTEY, N. M. **New developments in Plasmodium vivax malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance.** *Current Opinion on Infection Disease*, v. 22, p. 430–435, 2009.

RAMOS JUNIOR WM, SARDINHA JF, COSTA MR, SANTANA MS, ALECRIM MG, LACERDA MV. **Clinical aspects of hemolysis in patients with P. vivax malaria treated with primaquine, in the Brazilian Amazon.** *Braz J Infect Dis.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Jul-Aug;14(4):410-2.

REY, Luís. **Bases da parasitologia médica.** 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 379 p.

ROSANAS-URGELL A, SENN N, RARAU P, APONTE JJ, REEDER JC, SIBA PM, MICHON P, MUELLER I. **Lack of associations of  $\alpha(+)$ -thalassemia with the risk of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infection and disease in a cohort of children aged 3-21 months from Papua New Guinea.** *Int J Parasitol.* 2012 Nov; 42(12):1107-13.

ROTH, E. F. JR, SCHULMAN, S. **The adaptation of Plasmodium. falciparum to oxidative stress in G6PD deficient human erythrocytes.** *British Journal of Haematology*; 70:363-7. 1988.

ROTH, E. F, RAVENTOS-SUAREZ, C, RINALDI, A, NAGEL, R. L. **Glucose-6-phosphate oDehydrogenase deficiency inhibits in vitro growth of Plasmodium falciparum.** *Proceedings of The National Academy of Sciences*; 80:298-9. 1983.

ROWE JA, HANDEL IG, THERA MA, DEANS AM, LYKE KE, KONÉ A, DIALLO DA, RAZA A, KAI O, MARSH K, PLOWE CV, DOUMBO OK, MOULDS JM. **Blood group O protects against severe Plasmodium falciparum malaria through the mechanism of reduced rosetting.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Oct 30;104(44):17471-6.

RUWENDE C, KHOO SC, SNOW RW, YATES SN, KWIATHOWSKI D, GRUPTA S, WARNA P, ALLSOPP CE, PESCHU N, NEWBOLD CI, GREENWOOD BM, MARSH K, HILL AVS. **Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria.** *Nature*; 376:246-249. 1995.

SAAD STO, SALLES TSI, CARVALHO MH AND COSTA FF. **Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in blood donors from Brazil.** *Hum Hered* 1997 Jan-Feb; 47(1): 17-21, 1997.

SAHA S & SAMUEL APW. **Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in the Sudan – including Gdkhartoum, a hyperactive slow variante.** *Hum Hered* 41:17-21, 1991.

SAMBROOK, J, FRITSCH, E. F, MANIATIS, T. **Molecular cloning, a laboratory manual.** 2ª ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989.

SANTANA MS, DE LACERDA MV, BARBOSA MG, ALECRIM WD, ALECRIM MG. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in an endemic area for malaria in Manaus: a cross-sectional survey in the Brazilian Amazon.** *PLoS One*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009;4(4):e5259.

SANTOS, M. G, ALECRIM, W. D, ROCHA, M. A. F, ARCANJO, A. R. L, SARDINHA, J. F. J. **Prevalência da deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase e metemoglobinemia em pacientes com malária tratados com primaquina.** [Dissertação]. Amazonas (BR): Universidade do Estado do Amazonas; 2006. P. 39 e 41.

SARDINHA JFJ, ALECRIM MGC. **Associação da metemoglobinemia e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com malária tratados com primaquina.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; 40(5): 533-36. 2007.

SEIDMAN, D. S, BECKTEL, J, SNOW, R. W, VALLE, D. 2ª ed. New York: **Mc Graw-Hill**; 1995. P. 3367-3397.

SENOZAM NM, THIELMAN CA. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency - an inherited ailment that affects 100 million people.** *Journal of Chemical Education*; 68:7-10, 1991.

SILVA LHP, OLIVEIRA VEG. **O desafio da malária: o caso brasileiro e o que se pode esperar dos progressos da era genômica.** *Ciência e saúde Coletiva*, v. 7, n. 1, p. 49-63, 2002.

SIQUEIRA, AM, ALEXANDRE MA, MOURÃO MP, SANTOS VS, NAGAHASHI-MARIE SK, LACERDA MV. **Severe Rhabdomyolysis Caused by *Plasmodium vivax* Malaria in the Brazilian Amazon.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 83, n. 2, p. 271–273, 2010.

SISTEMA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (SIVEP) - **Boletim Epidemiológico de Malária, Estado – 2010.** Acesso em: 15 de fevereiro de 2013. Disponível na URL: <http://www.saude.gov.br>.

SISTEMA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (SIVEP) - **Boletim Epidemiológico de Malária, Estado – 2011.** Acesso em: 15 de janeiro de 2013. Disponível na URL: <http://www.saude.gov.br>.

SOKHNA, C. S, ROGIER C, DIEYE, A, TRAPE J. F. **Host factors affecting the delay of reappearance of *Plasmodium falciparum* after radical treatment among a semi-immune population exposed to intense perennial transmission.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 62:266–70. 2000.

STRYER, L. **Biochemistry.** 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995. p567-568.

SUMAWINATA IW, BERNADETA, LEKSANA B, SUTAMIHARDJA A, PURNOMO, SUBIANTO B, SEKARTUTI, FRYAUFF DJ, BAIRD JK. **Very high**



**risk of therapeutic failure with chloroquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria in Indonesian Papua.** *Am J Trop Med Hyg* 2003 Apr; 68(4): 416-20.

TAYLOR SM, PAROBK CM, FAIRHURST RM. **Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis.** *Lancet Infectious Disease* 2012; 12: 457–68.

TJITRA, E, ANSTEY, N. M, SUGIARTO, P, WARIKAR, N, KENANGALEM, E, KARYANA, M, LAMPAH, D. A, PRICE, R. N. **Multidrug-Resistant *Plasmodium vivax* Associated with Severe and Fatal Malaria: A Prospective Study in Papua, Indonesia.** *PLoS Medicine*, v. 5, n. 128, p. 890-899, 2008.

VENTURA, A. M. R. S, PINTO, A. Y. N, SILVA, S. U, CALVOSA, V. S. P, SILVA FILHO, M, G; DE SOUZA, J. M. **Malária por *Plasmodium vivax* em crianças e adolescentes - aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais.** *Jornal de Pediatria*. 1999.

VERRA, F, MANGANO, V. D, MODIANO, D. **Genetics of susceptibility to *Plasmodium falciparum*: from classical malaria resistance genes toward genome-wide association studies.** *Parasite Immunology*; 31:234-253. 2009.

WEATHERALL, D. J, CLEGG, J. B. **Genetic variability in response to infection: malaria and after.** *Genes Immunity*. 3:331-337. 2002.

WEIMER TA, SALZANO FM, WESTWOOD B, BEUTLER E. **G6PD variants in three South American ethnic groups: population distribution and description of two new mutations.** *Hum Hered* 1998 Mar-Apr; 48(2): 92-6.

WEIMER TA, SALZANO FM, WESTWOOD B, BEUTLER E. **Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants from Brazil.** *Hum Biol* 1993; 65(1): 41-7.

WELCH WH. **Adaptation in pathological processes.** *Sbience*. 1897;5(126):813-32.

WESTENBERGER SJ, MCCLEAN CM, CHATTOPADHYAY R, DHARIAL V N, CARLTON JM, BARNWELL J W, COLLINS WE, HOFFMAN SL, ZHOU Y, JOSEPH M, WINZELER EA. **A systems-based analysis of *Plasmodium vivax* lifecycle transcription from human to mosquito.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*:v. 4, p. 653, 2010.

WHITE, N. J. **Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria.** *Malaria Journal*, v. 10, p. 297, 2011.

WILLIAMS TN, MWANGI TW, WAMBUA S, ALEXANDER ND, KORTOK M, SNOW RW, et al. **Sickle cell trait and the risk of *Plasmodium falciparum* malaria and other childhood diseases.** *Journal Infectious Disease*. 2005;192:178– 86.

WILLIAMS TN. **How do hemoglobins S and C result in malaria protection?** *J Infect Dis* 2011; 204: 1651–53

WILLIAMS, T. N, MWANGI, T. W, WAMBUA, S, PETO, T. E, WEATHERALL, D. J, GRUPTA, S, RECKER, M, PENMAN, B. S, UYOGA, S, MACHARIA, A, MWACHARO, J. K, SNOW, R. W, MARSH, K. **Negative epistasis between the malaria-protective effects of alpha+-thalassemia and the sickle cell trait.** *Nature Genetic*; 37:1253-1257. 2005.

WILLIAMS, T. N, WAMBUA, S, UYOGA, S, MACHARIA, A, MWACHARO, J. K, NEWTON, C. R. J. C, MAITLAND, K. **Both heterozygous and homozygous alpha+ thalassemias protect against severe and fatal Plasmodium falciparum malaria on the coast of Kenya.** *Blood*; 106:368-371. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Practical Chemotherapy of Malaria.** Geneva; 1990. p. 34-5.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World malaria report, ISBN 978 92 4 156390 1,**p. 78, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report (2010).** Disponível em: [who.int/malaria/world\_malaria\_report\_2010/en/index.html].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Malaria media centre (2011).** Disponível em: [http://www.who.int/mediacentre].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Roll Back Malaria. World Malaria Report.** 2011. Acesso em: 2 fev 2013. Disponível na URL: <http://www.rbm.who.int/wrm>.

## 22. ANEXOS

### 9.1 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) 3656 0620. 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.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante ou responsável ou  
impressão do polegar direito

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome do entrevistador


\_\_\_\_\_  
Assinatura do entrevistador

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador  
responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador  
responsável

## 22.2 Documento de Aprovação do Projeto em Comitê de Ética (CONEP)

16/06/09 15:41 MS 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 - *Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona* (CRESIB)

**Sumário geral do protocolo**

A malária é endêmica em 92 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 grave; 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 343/09**

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 necessitem 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 343/08

sejam apresentados de forma coerente, inclusive adequando-se às exigências previstas na Resolução CNS 347/2005.

**RESPOSTA:** o pesquisador esclarece que haverá formação de banco de materiais biológicos e inclui este dado no corpo do projeto. Foram apresentadas as normas de funcionamento do Banco de Matérias Biológicas, formulários para armazenamento de material, justificativa para formação de banco a partir do estudo em tela. Não foi apresentado o acordo entre as instituições brasileira e estrangeira para uso destes materiais armazenados, porém, segundo informações constantes no protocolo, o banco será brasileiro e armazenado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, considera-se a pendência atendida.

2. No Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE não consta campo para assinatura do pesquisador responsável, somente do entrevistador. Solicita-se a inclusão deste campo.

**RESPOSTA:** foi incluído o campo para aposição de assinaturas, porém o mesmo ficou fora do corpo de texto, incorporar ao TCLE a página de assinaturas. Se por questões de configuração tal página continuar constituindo-se uma folha em separado, solicita-se o cuidado de obter a rubrica do sujeito de pesquisa nas demais folhas do TCLE, considerando-se a proteção do sujeito bem como do pesquisador. Pendência atendida parcialmente.

3. Solicita-se acrescentar, no TCLE, os contatos do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP que irá acompanhar a pesquisa (telefone e endereço).

**RESPOSTA:** foram incluídos os dados solicitados no TCLE. Pendência atendida.

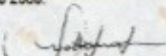
4. A Folha de Rosto encontra-se preenchida e assinada, deixando, porém, dúvida sobre a formação de banco de material biológico. Tendo em vista que é solicitada autorização do sujeito de pesquisa para armazenamento de material biológico (no TCLE), presume-se que esse campo, na Folha de Rosto, está incorretamente assinado, pois indica a "não" formação de banco. Solicita-se adequação do documento.

**RESPOSTA:** a folha de rosto foi alterada incluindo a informação de formação de banco de materiais biológicos. Pendência atendida.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposta, devendo o CEP verificar o cumprimento da questão 2 acima, antes do início do estudo.

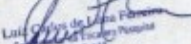
Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

Brasília, 04 de junho de 2009.

  
Gysselle Sadi Tannous  
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

*Até concordar  
do projeto para  
atender o cumprimento  
da questão 2.*

*Em 17/06/09*

  
Luzia Maria de Moraes Figueiredo  
Coordenadora da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa  
CNS/MS

33

JFR

Fundação de Medicina Tropical do Amazonas  
Diretor de Pesquisa / Comitê de Ética em Pesquisa

**PROTÓCOLO**  
Data: 16/06/09 Hora: 14h42

Resp.: 



### 22.3 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 DNA **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).

#### 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 300-400µL de sangue total, em tubo microcentrífuga estéril de 1,5 mL identificado contendo 15 µL 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 100µL 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.

