

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Resposta terapêutica na malária por *Plasmodium vivax*: variabilidade genética de enzimas metabolizadoras da primaquina e o *clearance* de gametócitos

por

Yanka Evellyn Alves Rodrigues Salazar

Belo Horizonte

2022

DISSERTAÇÃO

MCS – IRR Y. E. A. R. SALAZAR

2022

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Resposta terapêutica na malária por *Plasmodium vivax*: variabilidade genética de enzimas metabolizadoras da primaquina e o *clearance* de gametócitos

por

Yanka Evellyn Alves Rodrigues Salazar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Orientação: Dra. Taís Nóbrega de Sousa

Coorientação: Dra. Cristiana F. Alves de Brito

Belo Horizonte

2022

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 3740/00

S316r
2022

Salazar, Yanka Evellyn Alves Rodrigues.

Resposta terapêutica na malária por *Plasmodium vivax*: variabilidade genética de enzimas metabolizadoras da primaquina e o clearance de gametócitos / Yanka Evellyn Alves Rodrigues Salazar. – Belo Horizonte, 2022.

XVII, 85 f. il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 76-85

Dissertação de Mestrado – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

1. Gametogênese 2. *Plasmodium vivax* 3. Citocromo P-450 CYP2D6 4. NADPH-Ferri-Hemoproteína Redutase I. Título. II. Sousa, Taís Nóbrega (Orientação). III. Brito, Cristiana Ferreira Alves (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 2

YANKA EVELLYN ALVES RODRIGUES SALAZAR

Resposta terapêutica na malária por *Plasmodium vivax*: variabilidade genética de enzimas metabolizadoras da primaquina e o *clearance* de gametócitos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Taís Nóbrega de Sousa (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dra. Letusa Albrecht (ICC/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dra. Anna Caroline Campos Aguiar (UNIFESP) Titular

Dra. Lara Cotta Amaral Pimenta (IRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 19/05/2022

Aos meus pais e à minha irmãzinha por acreditarem em mim quando nem eu mesma acredito.

À todos que estão sujeitos à infecção por *Plasmodium spp.* Espero que este estudo possibilite que estejamos um passo à frente na luta contra a malária.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por sempre apoiarem as minhas escolhas, mesmo sabendo que a distância é o que mais dói.

À minha irmã por ser a luz na minha vida, sei que um dia ela vai ler essa página e entender o que eu faço e por quê eu faço.

Ao meu avô que não conseguiu assistir a minha defesa de Mestrado e que acabou nos deixando logo em seguida. Você me inspira todos os dias, sentimos muito a sua falta em todos momentos. Você me chamava de Doutora antes de eu ser, mas eu sei que iria ficar todo bobo ao saber que durante a correção deste manuscrito eu já estou aprovada no Doutorado. Obrigada por tanto.

À minha avó que me apoia em todos os momentos, esta que lecionou por tantos anos, hoje é uma grande influência pra minha carreira.

Ao meu companheiro por estar ao meu lado nos momentos difíceis, por acreditar em mim e por ser um dos meus maiores incentivadores.

Às minhas amigas de Manaus, Soraya Lorena, Sara Ferreira, Cássia Alencar, Luciana Sarmento, Ketelles Garcia, Suelen Pinheiro, Sabrina Illan e Emanuelle Lira por estarem ao meu lado mesmo à distância.

À minha roommate e companheira de laboratório, Maria Carolina, por me incentivar a vir para Belo Horizonte, por contribuir para o meu aprendizado mesmo que eu esqueça a mesma coisa várias vezes e principalmente por fazer a minha estadia mais leve e feliz.

À minha orientadora Dra. Taís Sousa por aceitar embarcar comigo nesse projeto, acreditar no meu potencial e aguentar os meus surtos. Obrigada por me ensinar a questionar, pesquisar e, melhor ainda, incentivar todos os dias.

À Dra. Luzia Carvalho e Dra. Cristiana Brito por me receberem de braços abertos e sempre estarem à disposição.

Um agradecimento especial à Dra. Flora Kano por sempre se fazer presente nos momentos mais necessários, eu sei que posso contar com suas palavras acolhedoras mesmo no momento mais inesperado.

Ao Dr. José Luiz Vieira e aos seus alunos que me receberam tão bem no Laboratório de Toxicologia da Universidade Federal do Pará, muito obrigada por compartilharem um conhecimento tão amplo e complexo sobre cromatografia líquida de alta eficiência.

À Dra. Viviane Fernandes da Plataforma de PCR em Tempo Real por sempre estar disponível para tirar dúvidas, por ser uma professora excelente e, principalmente, uma boa amiga.

Ao Eduardo Fernandes, consultor de estatística do Instituto René Rachou, que foi essencial para a análise dos nossos resultados. Meus sinceros agradecimentos por ser tão compreensivo e didático.

À Fiocruz Minas – Instituto René Rachou (IRR), pelo espaço e infraestrutura destinados à pesquisa. Ao CNPq e FIOCRUZ por me permitirem realizar um Mestrado de excelência.

Aos meus amigos Sâmick Layene e Arthur Cheloni por tornarem as aulas mais divertidas e fazer o meu dia-a-dia no laboratório mais legal. Aos alunos do BMIM por serem bons amigos e ótimos professores, eu aprendi muito com cada um de vocês.

Aos pacientes com malária que possibilitaram a realização deste estudo. Esperamos retribuir, de alguma forma, o apoio e confiança de todos vocês.

“É preciso recordar sempre que, por detrás de cada tabela, de cada relatório, ou de cada material de exame, existe vida, existe gente, existe sofrimento, à espera do nosso esforço e da nossa solidariedade humana”.

Carlyle Macedo

RESUMO

A cura radical da malária causada por *P. vivax* requer a administração de cloroquina (CQ) e primaquina (PQ) para eliminação dos estágios do parasito que permanecem na circulação sanguínea e nos hepatócitos. A PQ é o único medicamento utilizado para eliminar os estágios latentes do parasito no fígado, os hipnozoítos. No entanto, a metabolização da PQ pode variar de acordo com o background genético do indivíduo, visto que enzimas do complexo citocromo P450 (CYP450) são responsáveis pela metabolização de antimaláricos e outras drogas. A CYP2D6 é a principal enzima envolvida na metabolização da PQ e, a NADPH-citocromo P450 redutase (POR) é responsável pela transferência de elétrons que possibilita a funcionalidade adequada das CYPs. O gene destas enzimas é altamente polimórfico, o que pode interferir na metabolização de antimaláricos, ocasionando falha terapêutica. Apesar de estudos anteriores já terem apresentado dados que a CYP2D6 e POR estão envolvidas no clearance de gametócitos de *P. falciparum*, não há estudos publicados que investigaram o papel destas enzimas no clearance de gametócitos de *P. vivax*. Dessa forma, o objetivo deste estudo é avaliar a influência de polimorfismos em CYP2D6 e POR na atividade da PQ sobre os gametócitos de *P. vivax*. Para isso foi realizada a genotipagem de CYP2D6 e POR, bem como a análise da variação do número de cópias de CYP2D6. Além disso, avaliamos a concentração plasmática de PQ nos indivíduos 72 horas após o início do tratamento. Neste estudo a prevalência de indivíduos com atividade reduzida de CYP2D6 foi de 32%, enquanto 35% apresentaram mutação em POR. Apesar do status de CYP2D6 não ter demonstrado associação com o clearance de gametócitos, indivíduos com mutação em POR apresentaram menor redução de gametócitos no terceiro dia de tratamento quando comparados com indivíduos sem mutação ($P = 0,02$ – Modelo linear generalizado). Estes dados reforçam a hipótese de que a variabilidade genética de POR é um fator determinante para a manutenção da densidade de gametócitos em *P. vivax*. Além disso, indivíduos com o fenótipo de metabolização nula de CYP2D6 (gPM) apresentaram maiores concentrações de PQ e clearance reduzido de gametócitos em 72 horas. Em conjunto, nossos achados reforçam a necessidade da realização de mais estudos relacionando fatores farmacogenéticos à manutenção da densidade de gametócitos, buscando determinar novos esquemas terapêuticos personalizados para reduzir a transmissão da malária.

Palavras-chave: Gametócitos; *Plasmodium vivax*; primaquina; CYP2D6; POR

ABSTRACT

The radical cure of malaria caused by *P. vivax* requires the administration of chloroquine (CQ) and primaquine (PQ) to eliminate the stages of the parasite that remain in the bloodstream and in the hepatocytes. PQ is the only drug used to eliminate the latent stages of the liver parasite, the hypnozoites. However, PQ metabolism may vary according to the individual's genetic background since enzymes of the cytochrome P450 (CYP450) complex are responsible for the metabolism of antimalarials and other drugs. CYP2D6 is the main enzyme involved in the metabolism of PQ, and NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR) is responsible for the electron transfer that enables the proper functionality of CYPs. The gene for these enzymes is highly polymorphic, which can interfere with the metabolism of antimalarials, causing therapeutic failure. Although previous studies have already presented data that CYP2D6 and CPR are involved in *P. falciparum* gametocyte clearance, there are no published studies that investigated the role of these enzymes in *P. vivax* gametocyte clearance. Thus, the aim of this study is to evaluate the influence of CYP2D6 and CPR polymorphisms on PQ activity on *P. vivax* gametocytes. For this, the genotyping of CYP2D6 and CPR was performed, as well as the analysis of the variation in the number of copies of CYP2D6. In addition, we evaluated the plasma concentration of PQ in the subjects 72 hours after the start of treatment. In this study, the prevalence of individuals with reduced CYP2D6 activity was 32%, while 35% had a POR mutation. Although CYP2D6 status was not associated with gametocyte clearance, subjects with CPR mutation had a lower reduction in gametocytes on the third day of treatment when compared with subjects without mutation ($P = 0.02$ – Generalized linear model). These data reinforce the hypothesis that the genetic variability of CPR is a determining factor for the maintenance of gametocyte density in *P. vivax*. In addition, subjects with the CYP2D6-null metabolizing (gPM) phenotype had higher PQ concentrations and reduced gametocyte clearance at 72 hours. Together, our findings reinforce the need for further studies relating pharmacogenetic factors to the maintenance of gametocyte density, seeking to determine new personalized therapeutic regimens to reduce malaria transmission.

Keywords: Gametocytes; *Plasmodium vivax*; primaquine; CYP2D6; CPR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do número de casos de malária causada por <i>P. vivax</i> registrados em 2019.	19
Figura 2. Risco de infecção por malária de acordo com o município.....	20
Figura 3. Ciclo biológico do <i>Plasmodium vivax</i>	21
Figura 4. Esquemas das recorrências de malária causada por <i>P. vivax</i>	25
Figura 5. Alvos de ação de antimaláricos no ciclo biológico do <i>Plasmodium spp</i>	27
Figura 6. Cluster do gene de CYP2D6 e alguns dos polimorfismos de base única encontrados nesse gene.....	30
Figura 7. Envolvimento da POR como doadora de elétrons em diversas funções biológicas.	32
Figura 8. Organização do domínio em POR.....	33
Figura 9. Estrutura e mecanismo de transferência de elétrons em POR.....	33
Figura 10. Análise das frequências fenotípicas previstas para CYP2D6 na população de estudo.	55
Figura 11. Frequência fenotípica de CYP2D6 de acordo com o número de recorrências de malária causada por <i>P. vivax</i>	56
Figura 12. Frequência do polimorfismo A503V em <i>POR</i> de acordo com o número de recorrências de malária causada por <i>P. vivax</i>	57
Figura 13. Proporção geral de <i>Pvs48/45</i> detectado por qPCR.....	59
Figura 14. Proporção de transcritos de <i>Pvs48/45</i> detectados por qPCR em relação a presença ou ausência de mutação em <i>POR</i>	60
Figura 15. Proporção de transcritos de <i>Pvs48/45</i> detectados por qPCR em relação ao status de CYP2D6.	61
Figura 16. Proporção de transcritos de <i>Pvs25</i> detectados por qPCR.....	62
Figura 17. Distribuição do status de CYP2D6 e <i>POR</i> para os intervalos interquartis das taxas de redução de <i>Pvs25</i>	63
Figura 18. Relação entre quantidade de transcritos de <i>Pvs25</i> e os status de CYP2D6 e <i>POR</i> em 0 e 72 horas.....	64
Figura 19. Concentrações plasmáticas de PQ em 72 horas em relação ao fenótipo de CYP2D6.	65

Figura 20. Concentrações plasmáticas de PQ em 72 horas em relação aos principais haplótipos de atividade normal de CYP2D6.....66

Figura 21. Distribuição do fenótipo de CYP2D6 para o primeiro, segundo (mediana) e terceiro quartil da concentração de PQ em 72 horas.....67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de ciclagem para genotipagem de polimorfismos em CYP2D6..	39
Tabela 2. Parâmetros de ciclagem para a determinação do número de cópias em CYP2D6.	40
Tabela 3. Variantes alélicas estudadas e as suas características.....	41
Tabela 4. Valores atribuídos aos alelos utilizando o sistema AS para determinação de fenótipo predito.....	42
Tabela 5. Polimorfismo em POR selecionado para o estudo e suas características.	42
Tabela 6. Parâmetros de ciclagem para a genotipagem de SNP em POR.	43
Tabela 7. Sequências dos iniciadores para os genes alvo Pvs25, 18s e Pv48/45.	45
Tabela 8. Parâmetros de ciclagem estabelecidos para PCR convencional.	45
Tabela 9. Parâmetros de ciclagem para a quantificação de gametócitos.....	49
Tabela 10. Dados demográficos dos indivíduos incluídos no estudo.....	52
Tabela 11 - Frequência dos alelos de CYP2D6 observada na população de estudo.	53
Tabela 12. Frequência de recorrências na população de estudo em relação ao escore de atividade enzimática de CYP2D6.	54
Tabela 13. Frequência de recorrências de malária causada por P. vivax de acordo com o status de CYP2D6 e POR.	58
Tabela 14. Proporção de Pvs48/45 detectado por qPCR em relação ao status de POR.	59
Tabela 15. Frequência de fenótipos de CYP2D6 para o primeiro, segundo (mediana) e terceiro quartil da concentração de PQ em 72 horas.	67

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ABS	Síndrome de Antley Bixler
AS	Escore de atividade enzimática
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
cDNA	DNA complementar
CNV	Variacão do número de cópias
Cq	Ciclo de quantificaco
CQ	Cloroquina
CYP2D6	Citocromo P450 2D6
CYP450	Citocromo P 450
D0	Dia de admissão
D3	Terceiro dia
DDS	Distúrbios do desenvolvimento sexual
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAD	Dinucleotídeo de flavina adenina
FMN	Mononucleotídeo de flavina
gIM	Fenótipo predito de metabolizaco intermediária
gNM-F	Fenótipo predito de metabolizaco normal
gNM-S	Fenótipo predito da variante lenta do fenótipo de metabolizaco normal
gPM	Fenótipo predito de metabolizaco lenta
gUM	Fenótipo predito de metabolizaco ultrarrápida
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina

HCL	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IPTG	Isopropil β -d-1-tiogalactopiranosídeo
IQR	Intervalo interquartil
LB	Meio de cultivo Lúria Bertani
LOD	Limite de detecção
MAO-A	Monoamina oxidase A
MTBE	Éter metil-terc-butílico
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaOH	Hidróxido de sódio
OH-PQm	Metabólito hidroxilado de primaquina
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PCN	Número de cópias do plasmídeo
PCR	Reação da cadeia da polimerase
Pharmvar	Consórcio de Variação Farmacogênica
POR	NADPH-citocromo P450 redutase
PORd	Deficiência de NADPH-citocromo P450 redutase
PQ	Primaquina
qPCR	Reação da cadeia da polimerase em tempo real
RDT	Teste rápido imunocromatográfico
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real

SIVEP	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica de Malária
SNP	Polimorfismo de base única
SSIV	<i>SuperScript® IV Reverse Transcriptase</i>
TM	Domínio transmembrana
UFPA	Universidade Federal do Pará
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Malária.....	18
1.1.2 Ciclo biológico do parasito	20
1.1.2.1 Gametocitogênese	22
1.1.3 Manifestações clínicas e diagnóstico da malária por <i>P. vivax</i>	24
1.1.4 Tratamento da malária causada por <i>P. vivax</i>	27
1.1.4.1 Mecanismo de ação dos antimaláricos	28
1.2 Citocromo P 450 e farmacogenética.....	29
1.2.1 CYP2D6	30
1.2.2 Citocromo P 450 oxidoreductase	31
2 JUSTIFICATIVA.....	36
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivos Específicos	37
4 MATERIAS E MÉTODOS	38
4.1 População e Área de Estudo	38
4.1.2 Aprovações éticas e consentimento dos participantes.....	38
4.2 Extração de DNA genômico a partir de amostras de sangue total	39
4.3 Discriminação alélica de <i>CYP2D6</i> por PCR em Tempo Real (qPCR)	39
4.3.1 Determinação do número de cópias gênicas de CYP2D6.....	39
4.3.2 Predição dos haplótipos e classificação dos fenótipos de metabolização de CYP2D6	40
4.4 Genotipagem de polimorfismo do gene <i>POR</i>	42
4.5 Extração de RNA	43
4.5.1 Digestão de DNA	44

4.5.2	Transcrição reversa	44
4.6	Construção de plasmídeos para a quantificação de gametócitos	45
4.6.1	Iniciadores utilizados para os alvos Pvs25, 18s e Pv48/45	45
4.6.2	Estabelecendo a temperatura de anelamento dos primers	45
4.7	Clonagem molecular	46
4.7.1	Ligação do gene alvo no vetor pGEM-T Easy	46
4.7.2	Transformação para obtenção de plasmídeos.....	47
4.7.3	Digestão do plasmídeo e confirmação da clonagem molecular	47
4.8	Padronização do protocolo de qPCR para quantificação de gametócitos.....	47
4.8.1	Linearização dos plasmídeos.....	47
4.8.2	Obtenção de curva padrão e quantificação de gametócitos.....	47
4.9	Dosagem de primaquina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	49
4.9.1	Extração de PQ.....	49
4.9.2	Quantificação de PQ por HPLC	49
4.10	Análise estatística	50
5	RESULTADOS	51
5.1	Frequências alélicas e fenótipos preditos de CYP2D6	52
5.2	Frequência de polimorfismos em <i>POR</i>	56
5.2.1	Frequência de recorrências de malária causada por <i>P. vivax</i> versus status de CYP2D6 e <i>POR</i>	57
5.3	Detecção e quantificação de gametócitos	58
5.3.1	Detecção de transcritos de Pvs48/45 por qPCR	58
5.3.2	Detecção de transcritos de Pvs25 por qPCR	61
5.3.3	Concentrações plasmáticas de PQ em pacientes com malária causada por <i>P. vivax</i>	64
6	DISCUSSÃO	68
6.1	Variabilidade genética de <i>CYP2D6</i> e <i>POR</i>	68

6.2 Densidade de gametócitos em infecções maláricas	70
6.2.1 O papel de mutações em genes de enzimas metabolizadoras no clearance de gametócitos.....	71
6.2.2 Envolvimento de fatores do hospedeiro na concentração plasmática de PQ .	73
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS	76

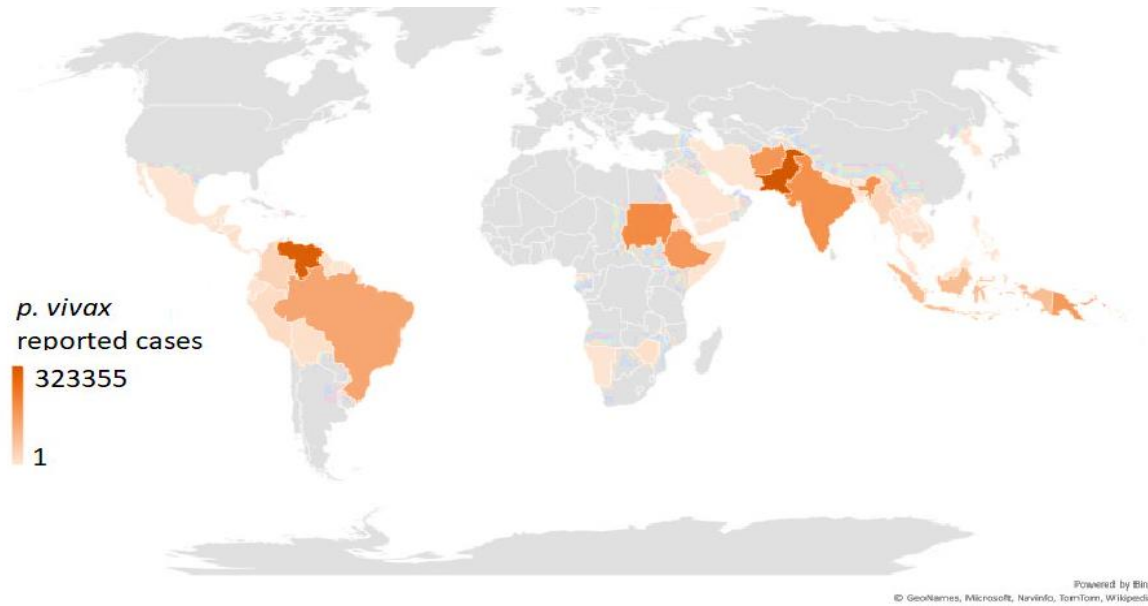
1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A malária é uma doença infecciosa febril aguda, potencialmente grave, causada por protozoários do gênero *Plasmodium spp.*, que são transmitidos ao homem através da picada de fêmeas do mosquito *Anopheles spp.* Atualmente, existem cinco espécies capazes de infectar o homem, sendo *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* as espécies mais prevalentes. As infecções causadas por *P. falciparum*, responsável pelas formas mais graves da doença, são mais prevalentes na África, enquanto os casos de malária por *P. vivax* são mais frequentes no Sudeste Asiático e no Pacífico Ocidental, apresentando também alta endemicidade em regiões das Américas (HOWES et al., 2016; WHO, 2021).

As regiões tropicais e subtropicais são as principais áreas de transmissão de malária (Figura 1), onde estão presentes as populações mais vulneráveis à doença devido a questões sociais e demográficas. Nos últimos anos, houve uma redução de 40% no número de casos e de 56% nas taxas de incidência da doença na região das Américas, no entanto aumentou novamente para 59% em 2020. Estima-se que em 2020 foram registrados cerca de 241 milhões de casos em 85 países, houve um aumento de aproximadamente 14 milhões de casos registrados desde 2019, isso ocorreu principalmente pelos altos índices de casos relatados na região africana. Em 2020, as mortes ocasionadas por malária aumentaram 12% quando comparadas com o ano anterior, totalizando 627 mil mortes em todo o mundo, permanecendo presente em países da África, Sudeste Asiático e América Latina, sendo Colômbia, Venezuela e Brasil os responsáveis por aproximadamente 77% dos casos de malária nesta região (WHO, 2021).

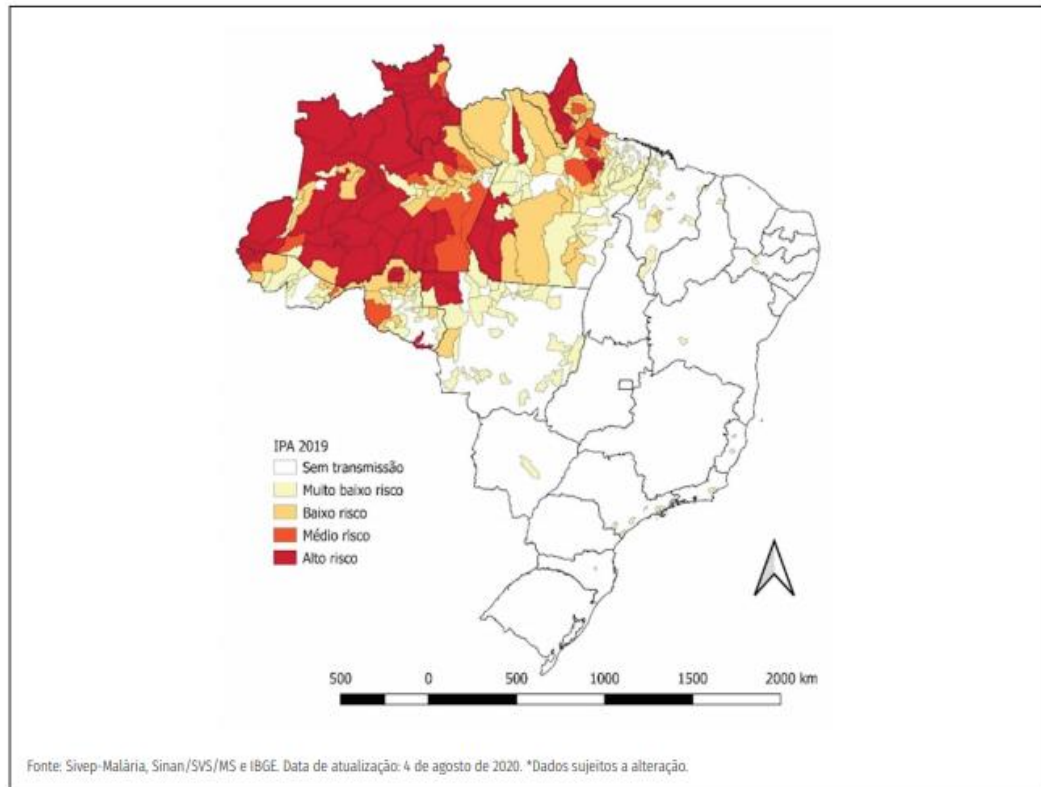
Figura 1. Mapa do número de casos de malária causada por *P. vivax* registrados em 2019.



P. vivax é a espécie mais amplamente distribuída geograficamente, sendo predominante na região das Américas onde é responsável por 72,3% dos casos estimados de malária. No Sudeste Asiático, representa 51,7% dos casos estimados e nas regiões do Pacífico Ocidental e do Mediterrâneo Oriental, *P. vivax* causa, respectivamente, 33,9% e 23,3% dos casos de malária. Fonte: (WHO, 2020).

No Brasil, as maiores taxas de incidência da doença ocorrem na região da Amazônia Legal, área que corresponde a 59% do território brasileiro e engloba nove estados (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) na região Norte do país com 99,5% dos casos (Figura 2). As altas taxas de incidência dependem principalmente de fatores que favorecem a presença de vetores, como o clima, altitude e vegetação, assim como implementação de medidas de controle eficazes. Os aspectos sociodemográficos são importantes para avaliar o risco à doença visto que a inviabilidade aos serviços de saúde, condições socioeconômicas precárias, características de moradia e a sua proximidade ao habitat natural do mosquito vetor são elementos-chave para a alta exposição à doença (WOLFARTH-COUTO et al. 2019).

Figura 2. Risco de infecção por malária de acordo com o município.

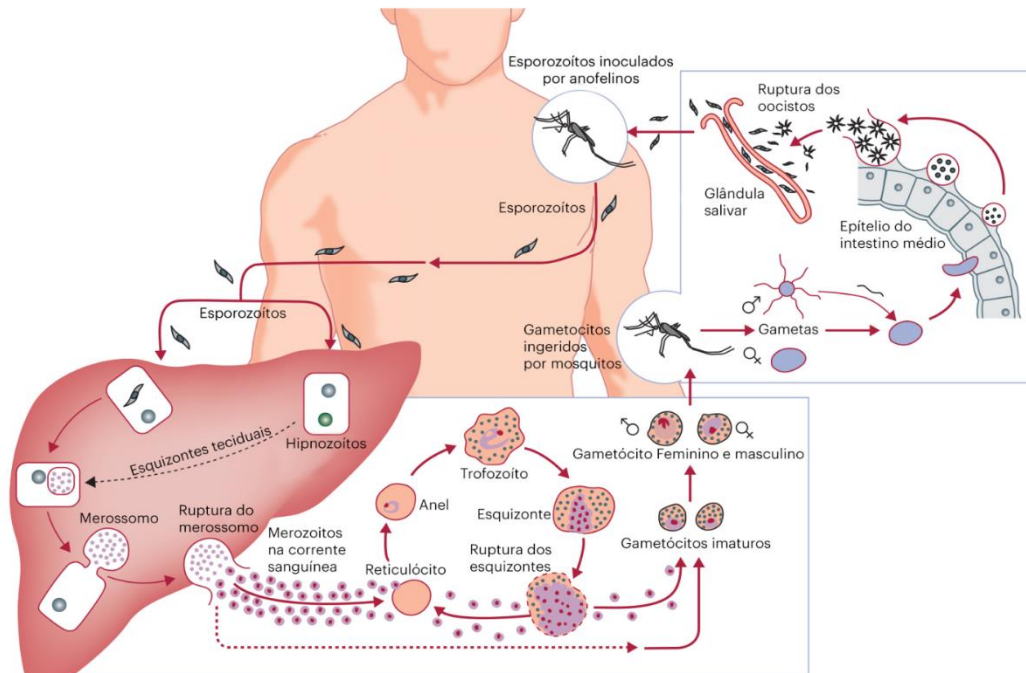


Baixo risco, Incidência Parasitária Anual (IPA) <10 casos/mil habitantes; Médio risco, IPA 10 a 49 casos mil/habitantes; Alto risco, IPA \geq 50 casos/mil habitantes. Fonte: (SVS/MS, 2020).

1.1.2 Ciclo biológico do parasito

O ciclo biológico do *Plasmodium* é complexo, envolvendo diversas transformações morfológicas e moleculares dentro de dois hospedeiros, sendo um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado (Figura 3). Nos humanos, o ciclo assexuado apresenta duas etapas principais: uma fase hepática, na qual ocorre a esquizogonia exoeritrocítica em que há multiplicação do parasito nos hepatócitos, e a fase eritrocítica, onde ocorre a multiplicação e diferenciação dentro dos eritrócitos, correspondendo à esquizogonia eritrocítica, produzindo também formas sexuadas capazes de infectar o mosquito vetor *Anopheles spp.* Esta complexidade do ciclo biológico do parasito é um dos principais motivos pelo qual ainda há dificuldades para conseguir controlar e até mesmo eliminar a malária (MUELLER et al., 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Figura 3. Ciclo biológico do *Plasmodium vivax*.



O ciclo do parasito envolve dois hospedeiros, o hospedeiro vertebrado (homem) e o invertebrado (anofelino). Para isso, o mosquito infectado é capaz de transmitir a doença para o homem através da sua picada contendo esporozoítos que migram para os hepatócitos através da circulação sanguínea. Nos hepatócitos, o parasito sofre mudanças morfológicas se diferenciando em hipnozoítos, que podem permanecer latentes por meses ou anos, ou em merossomos que liberam merozoítos que infectam eritrócitos. Estes merozoítos se desenvolvem em trofozoítos jovens, que irão amadurecer no interior dos reticulócitos. Durante o amadurecimento dos trofozoítos há então a formação dos esquizontes, o qual após sua ruptura há a liberação dos merozoítos que irão infectar novos reticulócitos dando continuidade ao ciclo. Durante o amadurecimento dos trofozoítos estes podem também se desenvolver e diferenciar-se em gametócitos que irão infectar um anofelino durante um novo repasto sanguíneo. Fonte: Adaptado de Mueller et al., 2009

A infecção nos humanos ocorre quando há inoculação de esporozoítos através da picada do mosquito fêmea *Anopheles spp.* durante o repasto sanguíneo. Os esporozoítos podem permanecer no tecido subcutâneo do indivíduo por algum tempo. No entanto aqueles que conseguem escapar do sistema imune do hospedeiro, migram para o fígado, onde ocorre a invasão nos hepatócitos, multiplicando-se e diferenciando-se dentro destes em esquizontes ou hipnozoítos (formas latentes do parasito). Os esquizontes presentes nos hepatócitos se multiplicam através de divisões esquizogônicas, após essa replicação estágios denominados merozoítos são liberados na corrente sanguínea. Geralmente, a liberação de merozoítos é relacionada à ruptura dos hepatócitos, mas isso ainda não foi observado diretamente. Estudos já demonstraram que os merozoítos de *P. berghei* não são liberados através da ruptura de hepatócitos, mas pela formação de vesículas contendo merozoítos (merossomos). Essa

liberação de merozoítos leva à invasão dos eritrócitos, o que dá início à fase eritrocítica (MONS et al., 1985; PRUDÊNCIO, RODRIGUEZ e MOTA, 2006; STURM et al., 2006).

Em infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale* pode ocorrer a formação de hipnozoítos, formas do parasito que permanecem latentes nos hepatócitos durante semanas a meses. Após a sua ativação, o ciclo biológico do parasito inicia novamente, ocasionando as recaídas com o reaparecimento dos sintomas da doença. O tratamento com antimaláricos é utilizado para eliminar as formas eritrocíticas e teciduais do parasito, impedindo também a ativação de hipnozoítos, levando à cura radical da doença (SICILIANO e ALANO, 2015; ADAPA et al., 2019).

O ciclo eritrocítico inicia quando os merozoítos se fixam e invadem os eritrócitos. Dentro do eritrócito, ocorre a multiplicação destes estágios e a digestão de hemoglobina (Hb), os merozoítos que invadiram os eritrócitos se multiplicam e se diferenciam em trofozoítos que logo amadurecem em esquizontes. Após diversos ciclos de replicação do parasito, o eritrócito se rompe, liberando merozoítos que infectam outros glóbulos vermelhos ao redor. A esquizogonia eritrocítica repete-se a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*. Em cada ciclo, cerca de 10% do parasito se desenvolve nas formas sexuadas do *Plasmodium spp.*, os gametócitos, capazes de infectar os anofelinos (KARIUKI et al., 2020).

O início do ciclo esporogônico dá-se pela ingestão de gametócitos pelo mosquito. No entanto a presença de gametócitos no sangue periférico não necessariamente resulta em infecção do vetor. Após a ingestão, a chance de infecção depende de alguns fatores como a maturidade do gametócito, a concentração de formas masculina e feminina de gametócitos, assim como a resposta imune do hospedeiro invertebrado. Quando a infecção é bem-sucedida, a reprodução sexuada se inicia no hospedeiro (BOUSEMA e DRAKELEY, 2011).

No estômago do mosquito, os microgametas penetram os macrogametas gerando zigotos. Os zigotos se desenvolvem no lúmen do intestino médio do mosquito em oocinetos móveis capazes de invadir a parede do intestino médio do hospedeiro, onde se desenvolvem em oocistos. Os oocistos crescem, rompem e liberam esporozoítos que migram para as glândulas salivares do mosquito. A inoculação dos esporozoítos em um novo hospedeiro humano dá continuidade ao ciclo de vida da malária. O desenvolvimento bem-sucedido do parasito no mosquito leva cerca de 10 a 18 dias (BOUSEMA e DRAKELEY, 2011).

1.1.2.1 Gametocitogênese

A gametocitogênese é o processo pelo qual os gametócitos masculinos e femininos se desenvolvem a partir de parasitos assexuados. Os gametócitos maduros de *P. falciparum* são

detectáveis na circulação sanguínea a partir do sétimo dia até o décimo quinto dia após a primeira aparição de parasitos assexuados, os quais estes são derivados. O estudo de Vallejo e colaboradores (2016) demonstraram por meio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) que os gametócitos de *P. vivax* são detectados a partir do sétimo dia de infecção, no entanto ainda não eram capazes de infectar o vetor no décimo terceiro dia (DAY, HAYWARD e DYER, 1998; EICHNER et al., 2001).

A formação e maturação dos gametócitos ocorrem em cinco estágios morfológicamente diferentes. Os mosquitos são infectados quando estes são capazes de ingerir gametócitos em estágio V maduro presentes no sangue periférico do hospedeiro vertebrado. Uma vez ingerido pelos mosquitos, cada gametócito forma um macrogameta fêmea ou até oito microgametas machos. No intestino médio do mosquito, a fusão dos gametas resulta na formação de um zigoto que se desenvolve em um oocineto móvel que pode penetrar na parede do intestino médio para formar oocistos. Os oocistos aumentam de tamanho com o tempo e se rompem para liberar esporozoítos que migram para a glândula salivar do mosquito, tornando-o infectante para os seres humanos (BOUSEMA e DRAKELEY, 2011).

O mecanismo molecular que inicia a gametocitogênese é pouco compreendido, assim como os fatores que determinam o sexo dos gametócitos. O *Plasmodium* não possui cromossomos sexuais, dessa forma um único clone pode produzir tanto gametócitos masculinos quanto femininos e, podem até mesmo realizar auto-fertilização. Apesar da proporção de gametócitos masculinos poder aumentar em densidades parasitárias reduzidas, os gametócitos femininos são tipicamente mais abundantes durante a infecção, sendo 3 ou 4 gametócitos femininos para cada gametócito masculino (ROBERT et al., 1996; BOUSEMA e DRAKELEY, 2011).

Os gametócitos fornecem uma ligação na transmissão da malária do hospedeiro vertebrado para o vetor, tornando-os alvos principais para estratégias de intervenção de bloqueio da transmissão. Essas estratégias dependem de vacinas ou medicamentos, que visam impedir a infecção ou o desenvolvimento do gametócito ou dos estágios presentes no intestino médio do mosquito para bloquear a transmissão da malária do homem para o mosquito vetor, evitando assim a propagação da doença (NGWA; ROSA e PRADEL, 2016).

A longevidade desses estágios é reduzida pela ação dos antimaláricos considerados eficazes tanto contra estágios sexuais jovens quanto maduros de *P. vivax*. O tempo médio do *clearance* dos gametócitos, ou seja, redução destes na circulação, é de 24 horas, e os

gametócitos são eliminados da circulação sanguínea da grande maioria dos pacientes dentro de 4 dias após o tratamento bem-sucedido com antimalárico (PUKRITTAYAKAMEE et al., 2008; BAIRD, 2009).

O estudo de Alvarez e colaboradores (2021) demonstrou que, assim como os estágios assexuados, os gametócitos possuem a capacidade de citoadesão às células endoteliais da medula óssea, o que corrobora com a hipótese de que subpopulações de parasitos se acumular e/ou são sequestrados, mecanismo semelhante ao observado em infecções por *P. falciparum*.

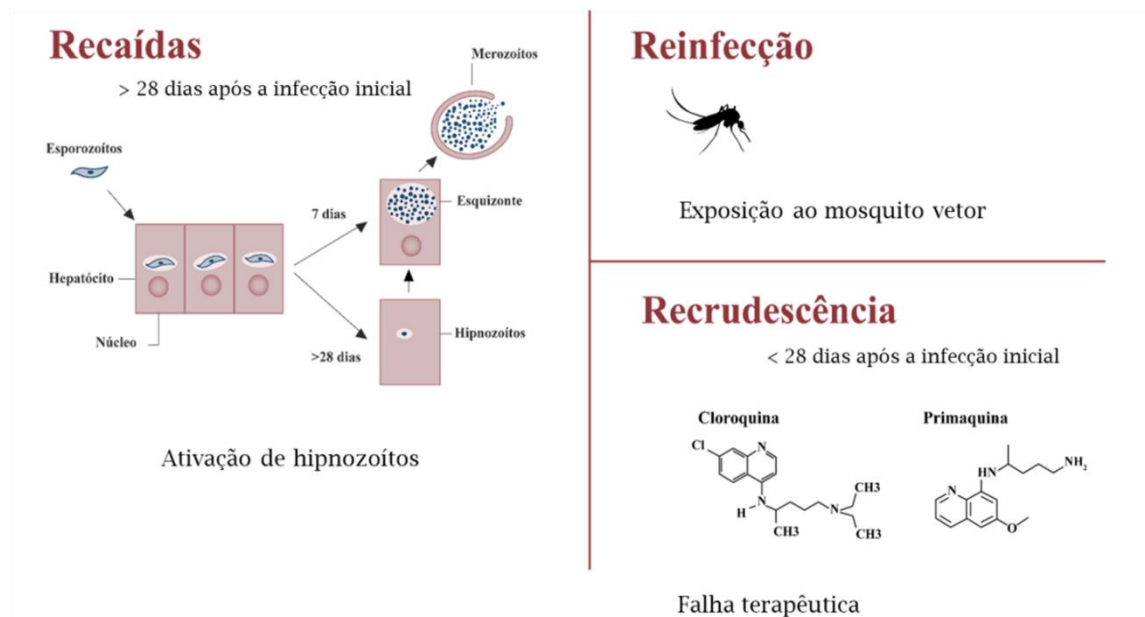
Assim como os hipnozoítos, a presença de gametócitos é mais frequente e mais abundante em infecções causadas por *P. vivax*. Dessa forma, a escolha de uma droga que seja capaz de eliminá-los é importante para evitar a disseminação da doença, visto que estes são responsáveis por infectar mosquitos que podem transmitir o parasito através da sua picada. As drogas que resultam em um *clearance* lento ou incompleto da parasitemia resultam em um maior tempo de gametocitemia, o que dificulta o controle da doença (BOUSEMA e DRAKELEY, 2011; TADESSE et al., 2017).

1.1.3 Manifestações clínicas e diagnóstico da malária por *P. vivax*

O período de incubação da malária causada por *P. vivax* é de 13 a 17 dias, variando de acordo com a espécie. Para a maioria das pessoas, os sintomas começam de 10 dias a quatro semanas após a infecção, embora uma pessoa possa se sentir doente em sete dias ou até um ano após a infecção inicial. Em condições especiais, isto é, em infecções causadas por *P. vivax* ou *P. ovale*, os sintomas podem surgir meses após a infecção devido a presença de hipnozoítos. No entanto, baseando-se apenas nas manifestações clínicas é quase impossível distinguir entre os diferentes fatores que podem levar à recorrência clínica de malária, podendo ser caracterizada por recrudescência, recaída ou reinfeção. (POPOVICI et al., 2018).

A Organização Mundial de Saúde recomenda que em até 28 dias, quando ainda há cloroquina (CQ) circulante após a administração inicial do fármaco, as recorrências podem ser consideradas recrudescências causadas por falha no tratamento, seja pela tolerância do parasito à droga ou até mesmo pela presença de mutações em genes de enzimas metabolizadoras de antimaláricos, o que pode comprometer a sua metabolização. Entre 29 e 180 dias, as recorrências podem ser consideradas recaídas, estas são classificadas dessa forma quando há reativação dos hipnozoítos nos hepatócitos. As reinfeções podem ocorrer a qualquer momento após a eliminação da droga no organismo, desde que haja o contato com o mosquito vetor infectado (Figura 4) (SIMÕES et al., 2014; POVOVICI et al., 2018).

Figura 4. Esquemas das recorrências de malária causada por *P. vivax*.



P. vivax possui a capacidade de desenvolver estágios hepáticos de longa duração, os hipnozoítos, que permanecem em latência até serem ativados causando episódio de recaída. Além das recaídas, as recidivas da doença podem ser causadas por parasitos sanguíneos não eliminados pelo tratamento (recrudescência) ou por parasitos de uma nova infecção (SIMÕES et al., 2014).

Os sintomas iniciais de malária não são específicos e são similares aos de diferentes doenças infecciosas, como dengue, leptospirose, hepatite viral ou até mesmo sepse bacteriana. O quadro clínico da malária pode variar desde leve a grave, dependendo da espécie do parasito, do tempo da doença, da idade do paciente, da sua condição nutricional e até mesmo se já teve contato com a doença previamente (TANGPUKDEE et al., 2009).

Caso não seja realizado o tratamento com antimaláricos precocemente, a doença pode evoluir para malária grave. Essa evolução pode levar dias, mas também pode ocorrer dentro de algumas horas. A infecção pode afetar múltiplos órgãos e resultar em alteração da consciência, anemia grave, edema pulmonar, falha renal, lesão renal grave, coma e morte. A anemia, considerada uma das principais complicações da malária devido a digestão de hemoglobina pelo parasito dentro do eritrócito, se não tratada pode levar à morte pessoas de grupos vulneráveis, tais como crianças e grávidas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

A malária é uma doença curável se for diagnosticada e tratada rápida e corretamente. Dessa forma, em áreas de alta endemicidade para a doença, deve-se suspeitar de malária sempre que algum paciente apresentar histórico de febre ou temperatura igual ou superior a 37,5°C sem outra causa óbvia. Em áreas de baixa endemicidade, os profissionais de saúde devem ser

treinados para identificar pacientes que tiveram exposição ao parasito, como por exemplo, pacientes que viajaram para áreas endêmicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

O diagnóstico rápido e preciso é fundamental para o manejo eficaz da malária. O diagnóstico da malária envolve a identificação de parasitos ou antígenos/produtos da malária no sangue do paciente. Embora isso possa parecer simples, a eficácia diagnóstica está sujeita a muitos fatores, como a identificação das diferentes formas das cinco espécies de malária, a presença dos diferentes estágios do parasito durante a esquizogonia eritrocítica, a endemicidade de diferentes espécies, a inter-relação entre níveis de transmissão, movimentação populacional, parasitemia, imunidade, sinais e sintomas, resistência aos medicamentos, entre outros (BELL, WONGSRICHANALAI e BARNWELL, 2006; TANGPUKDEE et al., 2009).

Atualmente, a OMS recomenda a testagem de todo os casos de suspeita de malária, visando o tratamento adequado. A microscopia e os testes rápidos imunocromatográficos (RDTs) são os dois métodos recomendados para o diagnóstico da malária, que se baseia na identificação de antígenos do parasito na amostra sanguínea. Além disso, os exames moleculares, como a PCR (reação da cadeia da polimerase), também têm sido utilizados no diagnóstico (MINISTÉRIO da Saúde, 2021)

No entanto, o método considerado padrão-ouro para o diagnóstico de malária é a gota espessa que permite a detecção do parasito em amostras sanguíneas, além da diferenciação da espécie, do estágio sanguíneo e da densidade parasitária. É um método simples e barato, mas que exige qualidade no preparo da lâmina, profissional treinado e equipamento apropriado (MATHISON e PRITT, 2017).

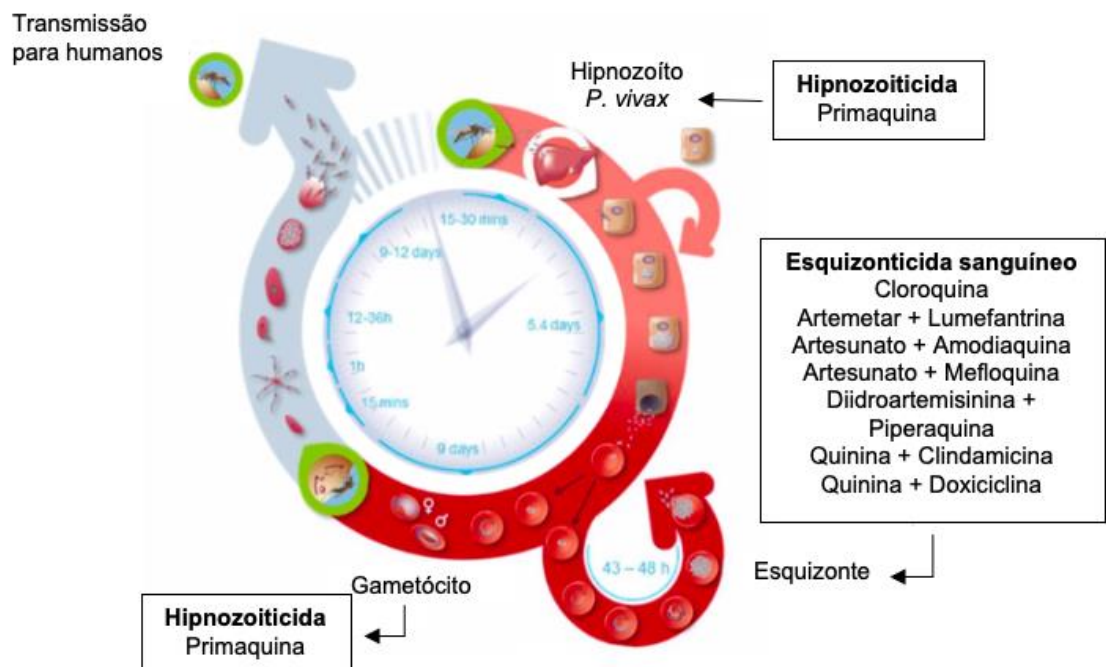
Em áreas remotas onde nem sempre há um microscopista treinado ou estrutura compatível, os RDTs são uma boa alternativa à microscopia para o diagnóstico de malária. Os testes rápidos baseiam-se na detecção de antígenos dos parasitos por anticorpos monoclonais, que são revelados por método imunocromatográfico, caracterizados por serem rápidos e de fácil execução. Alguns estudos já mostraram a eficácia de dispositivos portáteis na identificação de infecções a partir da presença de hemozoína na amostra clínica, apresentando boa sensibilidade, especificidade e acurácia quando comparado à microscopia e ao RDT (BELL, WONGSRICHANALAI e BARNWELL, 2006; MELO et al., 2021).

Os testes moleculares para o diagnóstico de malária têm sido recomendados devido a sua alta sensibilidade e especificidade, sendo capazes de diferenciar as espécies de *Plasmodium sp.* e identificar parasitos em baixas concentrações. Embora sejam úteis na identificação das espécies, o tempo prolongado de análise e os custos do método impedem que a PCR seja utilizada na prática clínica (HOFMANN et al., 2015).

1.1.4 Tratamento da malária causada por *P. vivax*

O tratamento da malária busca atingir o parasito em momentos chave de seu ciclo evolutivo (Figura 5): (i) interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção; (ii) destruição de formas latentes do parasito das espécies *P. vivax*, evitando assim as recaídas tardias; (iii) interrupção da transmissão do parasito, pelo uso de drogas que impedem o desenvolvimento de formas sexuadas dos parasitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Figura 5. Alvos de ação de antimaláricos no ciclo biológico do *Plasmodium spp.*



Esquema dos antimaláricos utilizados durante a infecção e o seu alvo durante o ciclo evolutivo do parasito.

Fonte: Adaptado de Delves et al., 2012.

O tratamento preconizado pela OMS para a malária causada por *P. vivax* é a utilização de Primaquina (PQ) em associação com a Cloroquina (CQ) ou derivados de artemisinina. O regime terapêutico recomendado para tratamento de malária não grave causada por *P. vivax* é a administração de CQ durante três dias (10mg base/kg no 1º dia e 7,5 mg/kg 2º e 3º dia) e PQ durante sete dias (0,5mg/kg/dia). A PQ possui ação sinérgica com CQ contra formas assexuadas, ou seja, quando a PQ não é utilizada, o *clearance* da parasitemia é mais lento e há maiores chances de haver o reaparecimento dos sintomas. Por este motivo é realizado o

tratamento com CQ profilática em gestantes durante toda a gravidez, já que não pode usar PQ nesse grupo populacional. Considera-se que houve falha do tratamento com CQ ou PQ quando ocorre o reaparecimento dos sintomas a partir do 5º até o 60º dia após o início do tratamento. Quando o paciente volta a apresentar malária por *P. vivax* no 5º ao 60º dia, após o início do tratamento, há possibilidade de falha terapêutica dos antimaláricos. Assim, o novo guia de tratamento da malária preconiza o uso de um esquema terapêutico mais eficaz utilizando artemeter/lumefantrina ou artesunato/mefloquina durante três dias, e PQ por 14 dias, esquema com maior eficácia na ação anti-hipnozoítos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

1.1.4.1 Mecanismo de ação dos antimaláricos

Sabe-se que o *Plasmodium* utiliza a hemoglobina (Hb) como principal fonte de nutriente e libera heme na corrente sanguínea durante a ingestão. O heme sofre oxidação e produz hematina, produto tóxico para o parasito. Assim, ocorre a sua conversão em cristais de hemozoína, também conhecidos como pigmento malárico. Dessa forma, o seu ciclo eritrocítico continua. A CQ, um esquizotocida eritrocítico, bloqueia a formação destes cristais causando a intoxicação do parasito (OLAFSON et al., 2017).

A PQ é um esquizotocida tecidual que precisa ser biotransformado em metabólito ativo, isto é, por ser uma pró-droga precisa ser metabolizada para gerar moléculas que exercem função hipnozoitocida e gametocitocida. O metabolismo é rápido após a ingestão do fármaco, atingindo níveis máximos no plasma dentro de 2-3 h, depois declinando rapidamente com uma meia-vida de eliminação entre 4 e 9 horas (MIHALY et al., 1985; MELLO et al., 2018). No entanto, o principal metabólito plasmático detectado após a administração de PQ é a carboxi-primaquina, que atinge níveis dez vezes maiores do que a PQ dentro de 3 a 12 horas após a dosagem. Este metabólito resulta da desaminação oxidativa da PQ envolvendo a monoamina oxidase A (MAO-A) e a sua concentração no plasma costuma ser usada como uma forma de representar se houve administração adequada de PQ (PYBUS et al., 2013).

Estudos realizados por Rieckmann e colaboradores (1968), bem como Shekalaghe e colaboradores (2007) e Arroyo-Arroyo e colaboradores (2017) demonstraram que a utilização de PQ em infecções causadas por *P. falciparum* é capaz de reduzir o tempo do *clearance* de gametócitos. O mecanismo de ação da PQ ainda não está bem esclarecido, mas um estudo realizado por Camarda e colaboradores (2019) mostrou que em infecções causadas por *P. falciparum*, a PQ é convertida em OH-PQm com consequente formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que se acumulam em sítios de transformação metabólica levando à ação antiparasitária. Ainda não há dados publicados sobre a sua ação em *P. vivax*. Apesar dos efeitos

sobre os gametócitos de *P. vivax* serem pouco conhecidos, a PQ possui um papel importante no controle da malária causada *por P. vivax* por ser capaz de eliminar os hipnozoítos.

1.2 Citocromo P 450 e farmacogenética

As enzimas do citocromo P450 (CYP450) são essenciais para a produção de colesterol, esteroides, prostaciclina e tromboxano A₂, mas também para a detoxificação e metabolização de drogas. Estas proteínas estão presentes em quase todos os organismos, desde plantas até mesmo em mamíferos como o homem. Esta superfamília de monooxigenases recebe este nome visto que estas encontram-se ligadas à membrana de uma célula (-cito) e contém um pigmento heme (cromo e P) que absorve luz no comprimento de onda de 450 nm quando exposto ao monóxido de carbono (LYNCH; PRICE, 2007; MIZUTANI, 2012).

Estas enzimas atuam no metabolismo de medicamentos nas reações de fase I (oxidação/redução) e de fase II (conjugação/hidrólise), sendo predominantemente expressas no fígado, mas também ocorrem no intestino delgado (reduzindo a biodisponibilidade do medicamento), pulmões, placenta e rins (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Nas reações de fase I pode ocorrer a inativação de um fármaco, ou seja, a perda de atividade farmacológica, ou até mesmo a ativação de um pró-fármaco em metabólito ativo, mantendo a sua atividade terapêutica. Durante as reações de fase II ocorre a conjugação com alguma substância endógena que irá facilitar a eliminação de fármacos através dos rins e fígado. Estas enzimas do complexo CYP450 são amplamente variáveis, sendo influenciadas por fatores genéticos, ambientais e biológicos que podem interferir na metabolização correta de drogas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

As enzimas CYP são altamente variáveis geneticamente, principalmente devido à sua baixa restrição evolutiva, pois muitas delas não possuem função endógena essencial. Essa variabilidade genética é capaz de influenciar na resposta de um paciente a uma determinada droga. A metabolização de uma droga pode variar de acordo com a CYP a ser avaliada, podendo ser lenta, extensiva (i.e. normal), rápida ou ultrarrápida em casos especiais, como na CYP2D6 (GAEDIGK et al., 2018; TORNIO; BACKMAN, 2018; CAUDLE et al., 2019).

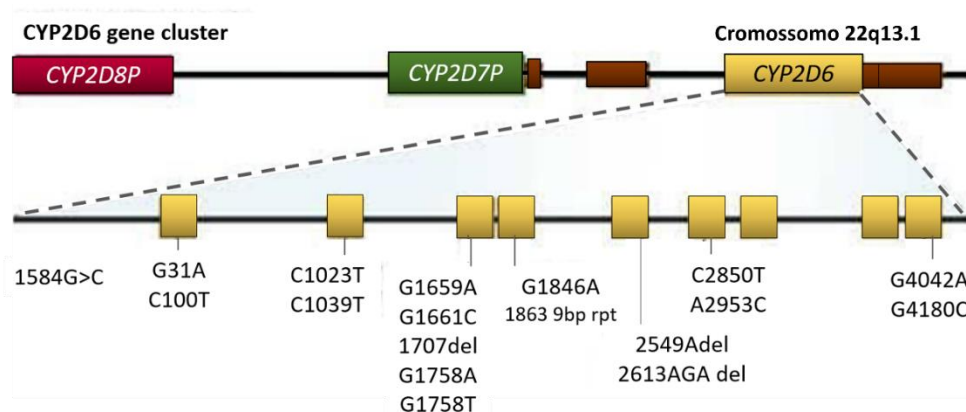
Cada enzima do CYP450 é codificada por um gene específico e, a variabilidade genética destas enzimas é caracterizada pela presença de polimorfismos de base única (SNPs) nesses genes, assim como variação no número de cópias (CNV), ocasionando duplicações ou deleções. Estas variantes são definidas de acordo com a nomenclatura de alelos estrela (*), no qual os

alelos são identificados pelo nome do gene e um número, como em *CYP2D6*1* (LYNCH; PRICE, 2007; SIM; INGELMAN-SUNDBERG, 2010).

1.2.1 *CYP2D6*

A enzima do complexo citocromo P450 2D6 (*CYP2D6*) é expressa por um gene de mesmo nome que possui 9 éxons e 8 íntrons, com uma fase de leitura aberta de 1383 pb, que codifica cerca de 461 aminoácidos e está localizado no cromossomo 22q31.1 (KOCH, 2004), em um conjunto de genes que abrange cerca de 45 kb, incluindo os pseudogenes *CYP2D7* e *CYP2D8* (Figura 6). A *CYP2D6* é expressa principalmente no fígado, mas também em órgãos extra-hepáticos como o cérebro, intestino e medula óssea (AYDIN-SAYITOGIU et al., 2006; MARCSISIN; REICHARD; PYBUS, 2016). O estudo realizado por Pybus e colaboradores (2012) demonstrou que a metabolização da PQ envolve duas vias distintas, a via da MAO-A que produz derivados de aldeído e a via da *CYP2D6* que gera metabólitos fenólicos associados à ação terapêutica. Outros estudos sugerem que o evento metabólico necessário para a eliminação de gametócitos de *P. falciparum* e hipnozoítos é a ativação da PQ pela via metabólica da *CYP2D6* (BENNETT, 2013; CAMARDA et al., 2019). A *CYP2D6* é considerada uma das principais enzimas envolvidas na biotransformação da PQ em metabólitos ativos com efeito terapêutico (PAN; NING; JEONG, 2016).

Figura 6. Cluster do gene *CYP2D6* e alguns dos polimorfismos de base única encontrados nesse gene.



Esquema do cluster do gene *CYP2D6* e os principais polimorfismos de base única que podem ser encontrados no gene. Fonte: Adaptado de Koch (2004).

Os estudos relacionados à farmacocinética da PQ demonstraram a sua dependência metabólica pela via da *CYP2D6*, indicando que a presença de polimorfismos no gene pode alterar a taxa de metabolização da PQ. Essas alterações de função enzimática poderiam

ocasionar o aumento de recorrências clínicas de malária através da ativação de hipnozoítos, visto que a sua ação terapêutica estaria comprometida (DEYE; MAGILL, 2014; PYBUS et al., 2012; SILVINO et al., 2016, 2020).

O locus de *CYP2D6* é complexo e altamente polimórfico, possuindo mais de 150 variantes alélicas já descritas que ocorrem em função de diferentes SNPs, deleções e multiplicações gênicas (CNV) que podem variar de acordo com a população estudada. Essas mutações resultam em quatro fenótipos definidos pela combinação de alelos e do número de cópias gênicas. A tradução do genótipo de *CYP2D6* em classes fenotípicas de acordo com a atividade enzimática é realizada a partir de um escore de atividade enzimática (AS). Este sistema utiliza os dados genotípicos para atribuir valores representativos aos alelos de acordo com a sua funcionalidade, permitindo inferir as atividades enzimáticas correspondentes (GAEDIGK et al., 2007; TEH e BERTILSSON, 2012).

Os indivíduos que apresentam polimorfismos no gene *CYP2D6* são capazes de metabolizar a PQ de diferentes maneiras. Nos metabolizadores normais (gNM-F), espera-se que ocorra o sucesso da terapia antimalárica. Nos metabolizadores lentos (gPM), o pró-fármaco de PQ permanece em altas concentrações e, dessa forma, o seu metabólito ativo permanece em doses subterapêuticas, seja por pouca ou nenhuma síntese deste. Em metabolizadores intermediários (gIM/gNM-S), o metabólito ativo atinge a janela terapêutica, no entanto o desfecho clínico é incerto devido à presença de fatores de confusão, tais como: peso do paciente, dosagem da droga, presença de mutações em genes transportadores de droga, entre outros. Já o metabolizador ultrarrápido pode necessitar de doses mais altas do que o recomendado para atingir os níveis terapêuticos (MARCSISIN; REICHARD e PYBUS, 2016).

1.2.2 Citocromo P 450 oxidoreductase

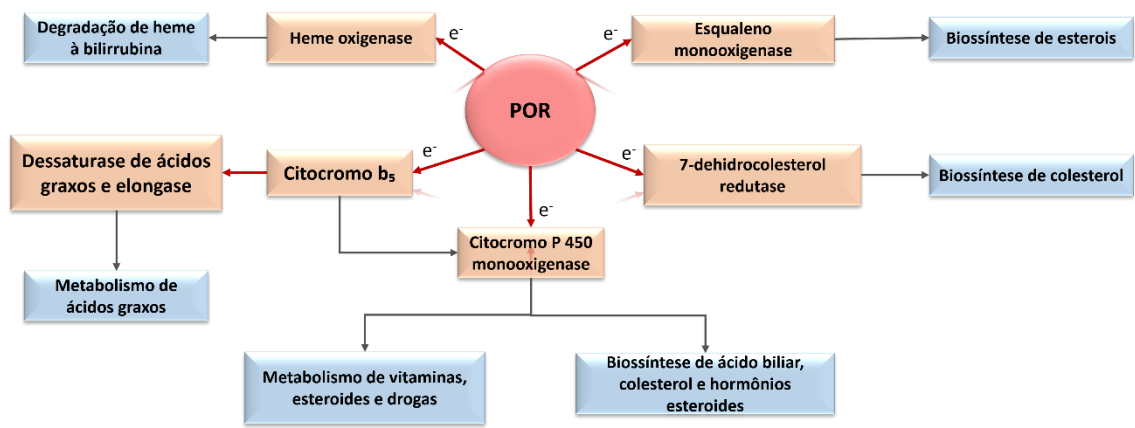
A enzima NADPH-citocromo P450 redutase (POR), codificada por um gene localizado no cromossomo 7q11.23, possui um papel importante na mediação direta do metabolismo e transformação de drogas e esteroides por meio do fornecimento de elétrons para CYP450 monooxigenases do tipo II. Estudos realizados em 1962 demonstraram que esta proteína é expressa em diversos tecidos em que se apresenta ancorada à membrana do retículo endoplasmático (PHILLIPS e LANGDON, 1962; WILLIAMS e KAMIN, 1962; GONG et al., 2017; EBRECHT et al., 2019).

A POR é responsável por mediar a transferência de dois elétrons por reação, originados do NADPH, permitindo o metabolismo de diversos compostos dependentes de CYPs, sendo estes ácidos biliares, esteroides, endobióticos, metabólitos do ácido araquidônico, assim como

muitos xenobióticos, possuindo um papel fundamental na bioquímica celular com diversas proteínas que auxiliam na transferência de elétrons e na distribuição de seus produtos, estas proteínas são chamadas de parceiros redox (Figura 7). Além disso, essa enzima é a única fonte de elétrons de heme oxigenase, esqualeno monooxigenase e elongase de ácidos graxos, garantindo a funcionalidade total dessas enzimas (PORTER, 2012; PANDEY e FLÜCK, 2013).

1.2.2.1 Estrutura de POR

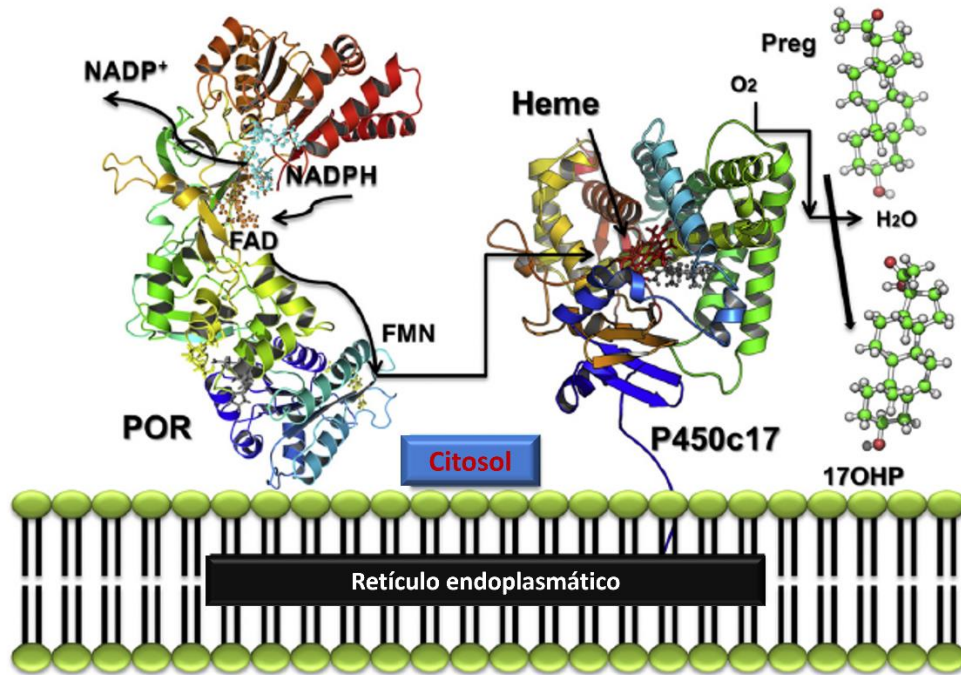
Figura 7. Envolvimento da POR como doadora de elétrons em diversas funções biológicas.



Fonte: Adaptado de Hart e Zhong, 2008.

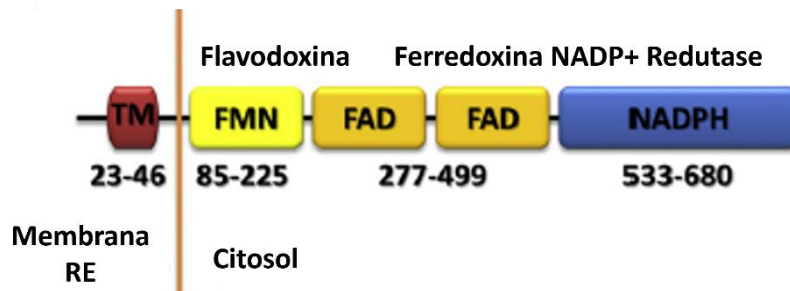
O gene consiste em 15 éxons codificadores e um não traduzido, codificando uma proteína de 82 kDA com 680 aminoácidos ligada à membrana. A POR é uma diflavina redutase que contém mononucleotídeo de flavina (FMN) e dinucleotídeo de flavina adenina (FAD) em sua estrutura (Figura 9), que atuam como cofatores e utilizam o NADPH como doador de elétrons (VERMILION et al., 1981; PANDEY e FLÜCK, 2013; GONG et al., 2017).

Figura 8. Estrutura e mecanismo de transferência de elétrons em POR.



Transferência de elétrons pela P450 oxidorreductase (POR) para enzimas microsossomais (tipo II) P450, como CYP17A1, CYP21A2 e CYP19A1. O NADPH se liga à POR, que está embutida no retículo endoplasmático, e fornece um par de elétrons, que são recebidos pelo FAD. O recebimento de elétrons para o FAD desencadeia uma mudança conformacional, permitindo que o FAD e o FMN se aproximem e que possibilitando a passagem de elétrons do FAD para o FMN. O domínio FMN de POR interage com os P450s, de modo que os elétrons atingem o ferro heme P450 para reações catalíticas (Fonte: Adaptado de Pandey e Flück, 2013).

Figura 9. Organização do domínio em POR.



POR é uma proteína diflavina, desenvolvida a partir da fusão de genes semelhantes à flavodoxina que contém FMN e ferredoxina redutase que contém FAD. TM: Domínio transmembrana. FMN: Mononucleotídeo de flavina. FAD: Dinucleotídeo de flavina (Fonte: Adaptado de Pandey e Flück, 2013).

Dessa forma, a figura 8 demonstra como ocorre a interação entre os domínios, o NADPH se liga à POR ancorado ao retículo endoplasmático e doa um par de elétrons que são recebidos pelo FAD. O recebimento de elétrons pelo FAD desencadeia uma mudança conformacional,

fazendo com que o FAD e o FMN se aproximem, permitindo a passagem de elétrons do FAD para o FMN. O domínio FMN de POR interage com CYP450, de modo que os elétrons sejam capazes de alcançar o ferro heme de P450 necessários para as reações catalisadas por CYP2D6. O domínio de ligação FMN possui um papel crítico visto que atua tanto na interação com os domínios FAD/NADPH quanto com os parceiros redox (GUTIERREZ et al., 2003; PANDEY e FLÜCK, 2013; GONG *et al.*, 2017).

1.2.2.2 Relação POR versus CYP

Sabe-se que as CYPs são responsáveis pela metabolização de aproximadamente 90% dos medicamentos utilizados rotineiramente. Esse processo ocorre em uma ação conjunta entre o sistema CYP e seus substratos, incluindo os elétrons fornecidos pela POR. Visto que a POR é a principal fonte de elétrons para enzimas do CYP450, esta enzima possui um papel crítico no metabolismo e transformação de algumas substâncias (WANG et al., 2007; GONG *et al.*, 2017).

O envolvimento da CYP2D6 na metabolização da PQ já é bem estabelecido e alguns estudos já identificaram a formação de metabólitos hidroxilados de PQ (OH-PQm) com consequente formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) durante a metabolização da PQ (VASQUEZ-VIVAR e AUGUSTO, 1992; CAMARDA *et al.*, 2019). Estes compostos se acumulam em sítios de transformação metabólica, o que levaria à ação antiparasitária contra estágios hepáticos e sexuais de *P. falciparum*. No estudo de Camarda e colaboradores (2019) observou-se que a inibição da atividade de CYP2D6 não afetou significativamente a atividade gametocitocida de OH-PQm, mas que a presença de POR no fígado e na medula óssea foi capaz de aumentá-la. O estudo de Pett e colaboradores (2019) sugere que metabolizadores gPM e gIM para CYP2D6 possuem maior tempo de *clearance* de gametócitos após o tratamento. No entanto, um estudo realizado na Tanzânia demonstrou que o tratamento com primaquina em dose única foi suficiente para reduzir os níveis de gametócitos de *P. falciparum* independente do status de CYP2D6 (MWAISWELO et al., 2022).

Assim como CYP2D6, POR é altamente polimórfico. Diversas variantes no gene POR já foram descritas em diferentes estudos ao longo dos anos. Estas variantes englobam mais de 130 mudanças nos aminoácidos da proteína, que podem levar a diversas alterações no metabolismo de esteroides assim como de medicamentos (PANDEY e SPROLL, 2014; GONG et al., 2017). Compreendendo a importância e o modo como a POR atua na transferência de elétrons, entende-se que a presença de polimorfismos no gene pode ser capaz de interferir na atividade enzimática das CYPs, dado que algumas mutações podem alterar a atividade de POR

ou até mesmo mudar a afinidade entre os domínios de ligação. Alguns estudos já demonstraram que mutações presentes nos domínios FAD/FMN ou próximos a estes são capazes de resultar em efeitos graves na atividade de POR. Uma grande variedade de mutações no gene podem ocasionar alterações na fase de leitura, o que resulta em fragmentos de proteína truncados que não poderiam produzir uma enzima funcional (PANDEY e FLÜCK, 2013; XIAO et al., 2015).

As mutações em *POR* podem levar à deficiência da enzima (PORd), o que pode ocasionar doenças autossômicas recessivas como a síndrome de Antley-Bixler (ABS). A PORd é uma forma de hiperplasia adrenal congênita, sendo um distúrbio com um amplo espectro fenotípico, incluindo deficiência de cortisol, síntese alterada de esteroides sexuais, distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) e malformações esqueléticas presentes na ABS. Esses efeitos ocorrem devido a diversas reações de biossíntese de esteroides mediados por POR (IDKOWIAK et al., 2017). Uma das mutações mais frequentes é a A503V que está presente no domínio FAD, promovendo uma alteração no códon do aminoácido alanina para valina, caracterizando uma mutação *missense*, possivelmente levando a alterações na funcionalidade da enzima, resultando no alelo *POR*28*, sendo o polimorfismo de *POR* mais frequente (GONG et al., 2017).

O estudo de Sandee e colaboradores (2010) determinou os efeitos potenciais de variantes de *POR* na catálise por CYP2D6 a partir da avaliação do metabolismo de substratos de CYP2D6 expressos em *E. coli*, o que mostrou que o impacto de uma mutação em *POR* deve ser avaliada individualmente com cada CYP. Além disso, A503V teve um efeito moderado (entre 40-50%) na atividade de CYP2D6, possivelmente contribuindo à variabilidade genética no metabolismo de drogas e xenobióticos.

Levando em consideração os estudos realizados a fim de avaliar o efeito de *POR* na atividade de enzimas do CYP450, levantamos a hipótese que a presença de mutações em *POR* pode levar a ausência ou redução da atividade da enzima, reduzindo a capacidade metabólica de CYP2D6, interferindo na eficácia da PQ. Como consequência, seria observado um *clearance* tardio da parasitemia, o que pode contribuir para a disseminação da malária, impedindo o controle da doença (HART et al., 2007; PANDEY e FLÜCK, 2013; GONG et al., 2017).

2 JUSTIFICATIVA

A malária causada por *P. vivax* ainda é considerada uma doença negligenciada visto que por possuir menor letalidade quando comparado a *P. falciparum* não atrai investimentos por parte da saúde pública nos países endêmicos. No entanto há diversos casos de malária grave causados por essa espécie reportados em regiões da Amazônia Brasileira (WHO, 2021).

Diversos fatores podem influenciar na suscetibilidade à doença, tais como fatores ambientais e características genéticas do hospedeiro vertebrado. Os componentes genéticos do hospedeiro têm se mostrado complexos e multigênicos. A presença de polimorfismos em genes de enzimas metabolizadoras de antimaláricos é um evento crucial que pode levar à falha terapêutica.

A falha do tratamento pode estar associada à disseminação da doença pelo mosquito vetor em função da permanência de gametócitos na circulação sanguínea do hospedeiro. A ausência de estudos abrangendo a variabilidade genética de CYP2D6 e POR e os seus efeitos na longevidade de gametócitos de *P. vivax* na corrente sanguínea faz com que seja necessário explorar como esses fatores podem influenciar na transmissão da doença. Além disso, verificar como a variabilidade genética de enzimas metabolizadoras de antimaláricos influencia no *clearance* de gametócitos é de grande importância por conta da ampla incidência da infecção e, principalmente, pela dificuldade no controle da malária causada por *P. vivax*.

Dessa forma, determinar quais os mecanismos que levam à redução da eficácia da resposta terapêutica ou aumento de reações adversas possibilitarão que novos estudos sejam realizados. Isso auxiliará na compreensão dos fatores que influenciam na falha terapêutica, conseqüentemente na disseminação da doença, permitindo aprimorar as ferramentas moleculares utilizadas na detecção e monitoramento da infecção.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência de polimorfismos em *CYP2D6*, principal enzima responsável pela metabolização de PQ, e em *POR* na atividade da PQ sobre os gametócitos de *Plasmodium vivax*.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Analisar a frequência de polimorfismos nos genes *CYP2D6* e *POR* na população de estudo;

3.2.2 Avaliar a influência dos polimorfismos estudados no fenótipo das enzimas *CYP2D6* e *POR*;

3.2.3 Investigar a influência dos polimorfismos em *CYP2D6* na atividade gametocitocida da PQ em indivíduos infectados por *P. vivax*;

3.2.4 Determinar se polimorfismos no gene *POR* interferem na atividade gametocitocida da PQ.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 População e Área de Estudo

Este estudo obteve amostras de pacientes com monoinfecção por *P. vivax* atendidos na Policlínica Cosme e Silva em Boa Vista, Roraima, em colaboração com o Prof. Dr. Jaime Louzada da Universidade Federal de Roraima. As coletas foram realizadas nos anos de 2019 e 2020 em dois momentos diferentes, no dia de admissão (D0) do paciente, no qual ainda não ocorreu a administração do tratamento e, no terceiro dia (D3) durante o uso de antimaláricos. O D3 foi escolhido para realizar a coleta de amostras visto que o nosso objetivo foi avaliar o *clearance* de gametócitos. As coletas em dias posteriores poderiam inviabilizar o estudo caso não houvesse mais gametócitos devido o tratamento com antimaláricos. A coleta de amostras clínicas no D3 foi realizada por meio de busca ativa, onde os colaboradores foram até a casa do paciente para obtenção da amostra.

Os critérios gerais de inclusão no estudo foram: (1) Confirmação de monoinfecção por *P. vivax* por microscopia óptica e por RDT; (2) Temperatura axilar de $\geq 37,5$ °C ou febre nas últimas 48h; (3) Ausência do uso de antimaláricos nos últimos 30 dias anteriores à data de inclusão no estudo; (4) Em caso de inclusão de pacientes do sexo feminino, ausência de gravidez.

O município de Boa Vista é a capital do estado de Roraima que está localizado na Região Norte do país e possui cerca de 437 mil habitantes. A região é considerada endêmica para malária, sendo registrados cerca de 30 mil casos no ano de 2020, destes 29 mil eram casos autóctones e 24 mil causados por *P. vivax* (dados obtidos da Plataforma Sivep – Malária). Além disso, a região possui área de mineração no qual as condições de trabalho são consideradas um grande problema para o controle da doença.

Apesar do município ser considerado uma área de baixo risco para a transmissão de malária, foram registrados muitos casos importados nos últimos anos. Esse alto índice de casos contribui para o aumento da transmissão visto que há presença de vetores em áreas urbanas, o que favorece surtos e epidemias nessa região (LOUZADA et al., 2020).

4.1.2 Aprovações éticas e consentimento dos participantes

Os aspectos éticos e metodológicos do estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisas em Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou (Nº parecer: 2.751.310 e 2.243.058).

4.2 Extração de DNA genômico a partir de amostras de sangue total

O DNA das amostras foi extraído usando o kit comercial de extração *QIAamp® DNA mini kit (Qiagen)*, de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante para amostras de sangue total. Assim, 200 µl de sangue total foram utilizados para extração e o DNA foi eluído em 70 µl de água livre de DNAsas e RNAses.

4.3 Discriminação alélica de *CYP2D6* por PCR em Tempo Real (qPCR)

Foram selecionados os polimorfismos em *CYP2D6* mais frequentes na população brasileira de acordo com Silvino et al. (2020), observando também os efeitos destes na atividade enzimática da CYP: G1846A [rs3892097], G2988A [rs28371725], G3183A [rs59421388], C100T [rs1065852], C1023T [rs28371706], C1584G [rs1080985], C2850T [rs16946], G4180C [rs1135840] e 2615_2617delAAG [rs5030656].

A genotipagem destes polimorfismos foi realizada seguindo o protocolo: 0,25 µl de *TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)* específico para cada SNP, 2,5 µl de *Taqman® 2x Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, New Jersey, USA)*, 1,25 µl de água livre de DNAsas e RNAses e 1 µl de DNA (\cong 10 ng/µl) em placas de 384 poços. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 5 µl. Os parâmetros de ciclagem estão descritos na tabela 1. A amplificação e detecção de fluorescência foram realizadas no *ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*, na Plataforma de PCR em Tempo Real do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas (RPT09D). Os resultados da genotipagem foram analisados no *QuantStudio Real Time PCR Software v1.3.7*.

Tabela 1. Parâmetros de ciclagem para genotipagem de polimorfismos em *CYP2D6*.

Ciclos	Temperatura	Tempo
1	50°C	2 minutos
	95°C	10 minutos
50	92°C	15 segundos
	60°C	1 minutos e 30 segundos
1	60°C	30 segundos

4.3.1 Determinação do número de cópias gênicas de *CYP2D6*

O número de cópias do gene *CYP2D6* foi determinado por qPCR utilizando o ensaio Hs00010001_cn (*Applied Biosystems*) para avaliar a presença de deleções/duplicações do gene. Para determinar o número de cópias gênicas foi realizada a comparação da amplificação do gene alvo (*CYP2D6*) com um gene de referência (RNase P), já descrito por não ser polimórfico para duplicações e deleções.

As reações de amplificação foram realizadas utilizando 0,5 µl do ensaio Hs00010001_cn, 5,0 µl de *Taqman® 2x Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, New Jersey, USA)*, 0,5 µl de Copy Number Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 3 µl de água livre de DNAses e RNAses e 1 µl de DNA ($\cong 10$ ng/µl). A detecção do número de cópias no gene foi realizada em triplicata usando placa de 384 poços, obedecendo o volume final da reação de 10 µl/poço. Os parâmetros de ciclagem estão descritos na tabela 2.

A amplificação e detecção da fluorescência foram realizadas utilizando o equipamento *Vii7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* da Plataforma de PCR em Tempo Real do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas (RPT09D) e, posteriormente, analisadas no software CopyCaller® v2.0.

Tabela 2. Parâmetros de ciclagem para a determinação do número de cópias em CYP2D6.

Ciclos	Temperatura	Tempo
1	50°C	2 minutos
	95°C	10 minutos
40	95°C	15 segundos
	60°C	1 minuto

4.3.2 Predição dos haplótipos e classificação dos fenótipos de metabolização de CYP2D6

Os haplótipos foram inferidos utilizando o software Haplo pelo nosso grupo de pesquisa. A genotipagem dos polimorfismos permite identificar as variantes alélicas *CYP2D6*1*, *CYP2D6*2*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*5*, *CYP2D6*9*, *CYP2D6*10*, *CYP2D6*17*, *CYP2D6*29*, *CYP2D6*34*, *CYP2D6*41* e duplicações/deleções (Tabela 3), de acordo com a nomenclatura estabelecida pelo Consórcio de Variação Farmacogênica (*PharmVar*).

Tabela 3. Variantes alélicas estudadas e as suas características.

Variante	Consequência	Variante alélica	Frequência global ^a	Atividade enzimática
G1846A	Defeito no <i>splicing</i>	*4	18%	Ausente
G2988A	<i>Splicing</i> aberrante	*41	9%	Reduzida
G3183A	Mutação <i>missense</i>	*29	0,7%	Reduzida
C100T	Mutação <i>missense</i>	*4 e *10	21%	Ausente/Reduzida
C1023T	Mutação <i>missense</i>	*17	2%	Reduzida
C-1584G	Mutação no promotor	*2, *35 e *41	21%	Normal/Reduzida
C2850T	Mutação <i>missense</i>	*2, *17, *34, *29, *35 e *41	46%	Normal/Reduzida/ ND ^b
G4180C	Mutação <i>missense</i>	*2, *4, *10, *17, *29, *35, *39 e *41	59%	Normal/Ausente/ Reduzida
2615_2617 delAAG	Deleção <i>inframe</i>	*9	1%	Reduzida

^aAlelo de menor frequência e/ou mutado.

^bND: Atividade enzimática ainda não foi determinada em estudos anteriores.

Fonte: SNP [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 2020.

Os fenótipos preditos foram inferidos a partir da análise genotípica utilizando o Sistema Escore de Atividade (AS) estabelecido por Gaedigk e colaboradores (2007) e atualizado no estudo de Caudle e colaboradores (2019). Este sistema utiliza classificações genotípicas para determinar valores aos alelos e suas atividades enzimáticas correspondentes (Tabela 4). Os diferentes valores de AS dão origem a quatro fenótipos preditos (gPM, gIM, gNM e gUM), entretanto o grupo diplótipo gNM abrange uma ampla faixa de atividade. Assim, os indivíduos com AS = 1 são designados gNM-slow (gNM-S), indivíduos com AS = 1,5 e AS = 2 são gNM-fast (gNM-F).

Após a inferência do fenótipo de CYP2D6, os pacientes foram alocados em dois grupos distintos (metabolizadores lentos e normais) para prosseguir com a genotipagem de polimorfismos em *POR* e quantificação de gametócitos.

Tabela 4. Valores atribuídos aos alelos utilizando o sistema AS para determinação de fenótipo predito.

AS	Alelo	Fenótipo ^a
0	*4, *4xN, *5	gPM
0,25	*10	gIM
0,5	*9, *17, *29, *41, *44, *49	gIM
1	*1, *2, *35, *39, *43, *45	gNM
>2	*1xN, *2xN, *35xN	gUM

^agPM: Metabolizador lento; gIM: Metabolizador intermediário; gNM: Metabolizador normal;

gUM: Metabolizador ultrarrápido.

Fonte: Caudle *et al.*, 2019.

4.4 Genotipagem de polimorfismo do gene *POR*

Visto que a maior parte das mutações que ocorrem em *POR* são deletérias e possuem baixa frequência na população, foi selecionado apenas um polimorfismo para a realização de genotipagem. O A503V [rs1057868], descrito na tabela 5, apresenta maior frequência na população quando comparado com os polimorfismos já descritos para *POR* em estudos anteriores. Este polimorfismo ocasiona uma mudança conservativa na estrutura do domínio FAD que é importante para a transferência de elétrons.

Tabela 5. Polimorfismo em *POR* selecionado para o estudo e suas características.

Variante alélica	Alteração	Consequência	Atividade enzimática
<i>POR</i> *28	A503V	Mutação <i>missense</i>	Reduzida ^a
Frequência			
		Global	0,286
		Europa	0,285
		África	0,197
		Ásia	0,389
		América Latina	0,278

^aA presença do polimorfismo A503V em *POR* está associado a atividade reduzida de CYP2D6.

Fonte: SNP [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 2022.

Neste estudo foi realizada a padronização de um protocolo para a genotipagem do SNP em *POR* volume final de 5 µl: 2,5 µl de *Taqman*® 2x Universal PCR Master Mix (*Applies Biosystems, New Jersey, USA*), 0,25 µl de *TaqMan*® SNP Genotyping Assays (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) específico para o SNP, 1,25 µl de água livre de DNases e

RNAses e 1 µl de DNA (\cong 10 ng/µl) em placas de 384 poços. Os parâmetros de ciclagem estão descritos na tabela 6.

A amplificação e detecção de fluorescência foram realizadas no *ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*, na Plataforma de PCR em Tempo Real do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas (RPT09D). Os resultados da genotipagem foram analisados no *QuantStudio Real Time PCR Software v1.3.7*

Tabela 6. Parâmetros de ciclagem para a genotipagem de SNP em POR.

Ciclos	Temperatura	Tempo
1	50°C	2 minutos
	95°C	10 minutos
50	92°C	15 segundos
	60°C	1 minutos e 30 segundos
1	60°C	30 segundos

4.5 Extração de RNA

Para a realização da extração de RNA, no momento da coleta das amostras clínicas foram preparadas duas alíquotas de 200 µl de sangue total juntamente com 1 mL de *RNAprotect (Qiagen)* para cada amostra para armazenar em -20°C até o transporte das amostras para o Instituto René Rachou em Belo Horizonte, Minas Gerais, onde foram armazenadas a -80°C até o momento da extração. Durante o estudo padronizamos um protocolo de extração a partir de amostras de sangue total utilizando o kit comercial *RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen)*.

As alíquotas de amostras foram centrifugadas a velocidade máxima por 40 minutos. Em um microtubo de 2 mL foram adicionados 50 µl do pellet, para esta etapa foram utilizadas duas alíquotas de cada amostra resultando em 100 µl de pellet adicionados. Em seguida, adicionamos 600 µl do tampão de lise RLT com β-mercaptoetanol, realizando a homogeneização no vórtex por 30 segundos. Em seguida adicionou-se 600 µl de Álcool 70%, homogeneizando com a pipeta. 700 µl de amostra foram transferidos para a coluna RNeasy spin e centrifugados por 15 segundos a 10.000 rpm, descartando o filtrado em seguida. O restante da amostra foi transferido novamente para a coluna e repetiu-se a centrifugação, descartando o filtrado. 700 µl de tampão RW1 foram adicionados na coluna RNeasy spin, repetindo a centrifugação (essa etapa de adição do tampão RW1 e centrifugação foi realizada duas vezes). Adicionou-se 500 µl de tampão RPE na coluna RNeasy spin e realizou-se a centrifugação, descartando o filtrado. Em seguida, o tampão foi adicionado novamente, no entanto a centrifugação foi realizada durante dois minutos a 10.000 rpm. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor, adicionamos 30 µl de água

livre de DNases e RNases diretamente na membrana da coluna e aguardamos um minuto. Centrifugamos por um minuto a 10.000 rpm, em seguida o RNA eluído foi coletado e adicionado novamente na membrana. Após um minuto foi realizada a centrifugação, resultando em 30 µl de RNA

4.5.1 Digestão de DNA

Para remover qualquer vestígio de contaminação por DNA durante a extração de RNA, foi realizado a digestão de DNA utilizando o kit comercial *Turbo DNA-free™ Kit (Invitrogen)*. Assim, qualquer DNA contaminante foi digerido para níveis abaixo do limite de detecção de um ensaio de qPCR.

Dessa forma, foram adicionados 5 µl do Tampão 10x DNase Turbo, 1,5 µl de DNase Turbo e 8,5 µl na amostra de RNA. Esse mix foi incubado em termociclador *PTC-100® Programmable Thermal Controller (Bio-Rad Laboratories, Inc.)* a 37°C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 5 µl do reagente inativador da enzima incubando durante 5 minutos, homogeneizando em vórtex até 3 vezes. Foi realizada a centrifugação por 1,5 minutos a 10.000 rpm para facilitar a remoção do RNA sobrenadante livre do reagente inativador.

4.5.2 Transcrição reversa

Para a obtenção de DNA complementar (cDNA) foi realizada a transcrição reversa utilizando a enzima *SuperScript® IV Reverse Transcriptase [SSIV] (Invitrogen, Life Technologies)* juntamente com primers randômicos de acordo com o protocolo do fabricante, realizando apenas a adaptação do volume utilizado de SSIV, sendo este 0,5 µl.

Considerando um volume final de cDNA de 20 µl, em um microtubo de 0,2 mL foram adicionados 1 µl de 50 µM de *random* hexâmeros, 1 µl de 10mM de dNTP, até 11 µl de RNA (até 500 ng de mRNA, reduzindo o volume se necessário), até 13 µl de água livre de DNases e RNases. Em seguida, esse mix foi incubado a 65°C por cinco minutos e então deixado em gelo por pelo menos um minuto. Em seguida, foram adicionados 4 µl de 5x tampão SSIV, 1 µl de 100 mM DTT, 1 µl de *RNaseOUT™ Recombinant Rnase Inhibitor* e 0,5 µl de SSIV.

As reações ocorreram no termociclador *Veriti 96-well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific)* de acordo com os seguintes parâmetros de ciclagem: 23°C por 10 minutos, 53°C por 10 minutos e 80°C por 10 minutos (apenas um ciclo para todas as etapas).

4.6 Construção de plasmídeos para a quantificação de gametócitos

4.6.1 Iniciadores utilizados para os alvos *Pvs25*, *18s* e *Pv48/45*

Os pares de iniciadores para o alvo *Pv48/45* foram desenhados tomando-se como base as sequências disponíveis no GenBank, priorizando as sequências que flanqueiam junções exon-exon. Utilizando o software OligoAnalyzer, os primers foram avaliados com relação a sua capacidade de formação de heterodímeros, homodímeros, proporção de CG, formação de *hairpins*, assim como a sua temperatura de anelamento. As sequências dos iniciadores utilizados estão descritas na tabela 7. Para os alvos *rRNA 18s* e *Pvs25* utilizamos os primers descritos no estudo de Wampfler e colaboradores (2013).

Tabela 7. Sequências dos iniciadores para os genes alvo *Pvs25*, *18s* e *Pv48/45*.

Gene	Iniciadores	Sequências (5'>3')	Tamanho do fragmento
<i>Pvs25</i>	Senso	ACA CTT GTG TGC TTG ATG TAT GTC	115 pb
	Anti-senso	ACT TTG CCA ATA GCA CAT GAG CAA	
<i>18s</i>	Senso	GCT TTG TAA TTG GAA TGA TGG GAA T	216 pb
	Anti-senso	ATG CGC ACA AAG TCG ATA CGA AG	
<i>Pv48/45</i>	Senso	CTCTACCGGAACCATGTTGAAG	109 pb
	Anti-senso	GACGTACTIONGACCTCTCCTTTG	

4.6.2 Estabelecendo a temperatura de anelamento dos primers

Utilizando o *PCR Master mix (Promega)* e seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante, estabelecemos as seguintes temperaturas de anelamento para os primers: 57°C para o *Pvs25* e *18s* e, 60°C para *Pv48/45*. As reações ocorreram no termociclador *Veriti 96-well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific)*. Os parâmetros de ciclagem estão descritos na tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros de ciclagem estabelecidos para PCR convencional.

Ciclos	Temperatura	Tempo
1	95°C	3 minutos
32	95°C	1 minuto
	Específica para cada primer	30 segundos
	72°C	1 minuto
1	72°C	5 minutos
	4°C	∞

O resultado das reações foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

4.7 Clonagem molecular

Para a obtenção de plasmídeos para a realização de quantificação absoluta de gametócitos por meio de curva padrão foi necessário realizar a clonagem molecular no vetor *pGEM-T Easy* (Promega). Este é um vetor linearizado que possui uma timidina em ambas as extremidades 3', o que aumenta a eficiência da ligação dos produtos de PCR evitando a recircularização do vetor. Essa característica faz com que este seja compatível com os produtos de PCR gerados por algumas polimerases termoestáveis.

Inicialmente, células de *Escherichia coli* de linhagem TOP10 foram tornadas competentes pelo método químico de cloreto de cálcio (CaCl_2) seguindo o protocolo: 50 mL de cultura saturada de células *E. coli* (TOP10) foram cultivadas em 5 mL de meio Luria Bertani (LB) líquido sem antibiótico a 37°C em agitação por 12 a 16h. Em seguida, 1 mL desta cultura foi transferido para um Erlenmeyer contendo 99 mL de meio LB líquido, incubando-o a 37°C sob agitação constante até atingir a densidade óptica (OD600) entre 0,4 a 0,8. Ainda no Erlenmeyer, as células foram resfriadas no gelo por 10 a 15 minutos. A partir deste ponto, todas as etapas foram realizadas a 4°C. A cultura de células foi transferida para dois tubos Falcon de 50 mL e centrifugadas a 7.000 rpm por sete minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 50 mL (25 mL por tubo) de CaCl_2 100mM + Hepes 10 mM (pH 7). Todas as soluções foram esterilizadas e resfriadas antes de adicioná-las. Após a ressuspensão do pellet, as células foram mantidas no gelo por 20 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas a 7.000 rpm por 4°C, descartou-se o sobrenadante com pipeta estéril. As células foram ressuspensas em 1 mL de CaCl_2 100mM + Hepes 10 mM (pH 7), em seguida 100 μL células foram adicionadas em tubos eppendorf gelados e estéreis com 20% de glicerol estéril para o congelamento). As alíquotas foram armazenadas a -80°C.

4.7.1 Ligação do gene alvo no vetor *pGEM-T Easy*

Para a ligação do gene alvo no vetor, foi realizada uma reação de PCR convencional para cada gene alvo utilizando o protocolo previamente descrito na seção 4.6.2. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, além de serem quantificados no espectrofotômetro *Nanodrop*® 2000 (*Thermo Fisher Scientific*). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit comercial *QIAquick PCR*

Purification (Qiagen). A ligação ao vetor foi realizada utilizando a razão 5/1 seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante.

4.7.2 Transformação para obtenção de plasmídeos

A transformação foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante, com a seguinte modificação: em um microtubo foram adicionados cerca de 8 µl da ligação e não 5 µl como é recomendado. Após a incubação overnight a 37°C em placas com meio ágar Luria Bertani (LB) contendo ampicilina, X-Gal e IPTG para seleção apenas de plasmídeos, foi possível observar o crescimento de colônias brancas. Algumas colônias foram então incubadas em meio LB líquido com ampicilina para realizar a extração de DNA plasmidial utilizando o kit comercial *QIAprep® Miniprep (Qiagen)*.

4.7.3 Digestão do plasmídeo e confirmação da clonagem molecular

Visto que o vetor possui dois sítios de restrição para a enzima EcoRI, esta foi a enzima escolhida para realizar a digestão do plasmídeo para liberação do inserto e confirmar a clonagem por meio de eletroforese em gel de agarose. Para isso, seguimos o seguinte protocolo: 2 µl de plasmídeo, 2 µl de tampão da enzima, 15 µl de água para biologia molecular e 1 µl de EcoRI, este mix foi incubado a 37°C por três horas no termociclador *PTC-100® Programmable Thermal Controller (Bio-Rad Laboratories, Inc.)*.

4.8 Padronização do protocolo de qPCR para quantificação de gametócitos

4.8.1 Linearização dos plasmídeos

A qPCR é muito sensível às mudanças conformacionais de plasmídeos e isso tem forte influência em ensaios de quantificação, visto que o sinal de fluorescência diminui quando usa DNA plasmidial em sua forma superenovelada. Assim, as formas lineares do DNA são mais acessíveis para a ligação e alongamento dos iniciadores, o que aumenta a eficiência da amplificação (CHEN; KADLUBAR e CHEN, 2007).

Deste modo, realizamos a linearização dos plasmídeos utilizando a enzima ApaI, uma vez que esta possui apenas um sítio de restrição no vetor e nenhum sítio de restrição nas sequências dos genes alvo, como avaliado no software *NebCutter* (<https://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). A linearização foi confirmada por meio da visualização em gel de agarose.

4.8.2 Obtenção de curva padrão e quantificação de gametócitos

A concentração de DNA plasmidial foi obtida a partir da quantificação fluorimétrica utilizando o *Qubit 4* (Invitrogen). Dessa forma, foi possível realizar o cálculo de número de

cópias do plasmídeo (PCN) para determinar quais seriam os pontos de diluição presentes na curva padrão. A curva padrão foi construída utilizando sete pontos: 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 e 1×10^0 .

Para os alvos *Pvs25* e *Pv48/45*, os iniciadores foram utilizados na concentração de 200 nanomolar (nM), visto que nesta concentração os alvos apresentavam maior valor de ciclo de quantificação (Cq) e menor quantidade de dímeros. A quantificação destes genes foi realizada utilizando o seguinte protocolo: 5 µl de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 0,2 µl de iniciador senso e anti-senso, 3,6 µl de água livre de DNAses e RNAses e 1 µl de cDNA. Os primers para o *rRNA 18s* foram utilizados na concentração de 900nM, concentração que apresentou maior valor de Cq. Como esse é um gene presente em maior abundância, as amostras de cDNA precisaram ser diluídas 100x para a quantificação desse alvo. A quantificação deste gene foi realizada utilizando o seguinte protocolo: 5 µl de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 0,9 µl de primer senso e anti-senso, 2,2 µl de água livre de DNAses e RNAses e 1 µl de cDNA diluído 100x.

Foram realizados ensaios para obtenção do limite de detecção (LOD) para os alvos *Pvs25* e *rRna 18s*, para isso utilizamos amostras de cDNA diluídas cinco vezes em cinco pontos de diluição. As reações foram realizadas utilizando cinco replicatas para cada ponto de diluição e, para determinar o LOD, em todas as reações foi realizada a curva padrão com plasmídeos. Dessa forma, o seguinte cálculo foi realizado para calcular o LOD:

$$\frac{\text{Concentração de RNA adicionado na transcrição reversa}}{20 \text{ (volume final na transcrição reversa)}} = \text{Concentração (ng/}\mu\text{l)},$$

onde: $\frac{\text{Concentração } (\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}})}{\text{Fator de diluição}} = \text{LOD (ng)}$. Assim, estabelecemos que as quantificações iguais ou abaixo de 0,045 são consideradas negativas, visto que a partir desse valor não houve mais a amplificação do alvo.

A amplificação e detecção de fluorescência foram realizadas no *ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*, na Plataforma de PCR em Tempo Real do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas (RPT09D). Os resultados da quantificação foram analisados no *QuantStudio Real Time PCR Software v1.3.7*. Todas as amostras foram analisadas em triplicata em placas de 384 poços. Foram omitidas da análise as replicatas com desvio padrão > 0,3. Os parâmetros de ciclagem utilizados para a quantificação de gametócitos estão descritos na tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros de ciclagem para a quantificação de gametócitos.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tempo
Amplificação	1	95°C	2 minutos
	40	95°C	15 segundos
		60°C	1 minuto
Curva de dissociação	1	95°C	15 segundos
		60°C	1 minuto
		95°C	15 segundos

4.9 Dosagem de primaquina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A dosagem de PQ em amostras coletadas 72 horas após o início do tratamento foi realizada no Laboratório de Toxicologia da Universidade Federal do Pará (UFPA) em colaboração com o Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira.

4.9.1 Extração de PQ

Os *spots* de sangue total em papel de filtro com aproximadamente 100 µL de sangue total foram recortados em pequenos pedaços e transferidos para tubos de polietileno tipo Falcon com capacidade de 15 mL. Adicionou-se 1,5 mL de ácido clorídrico (HCL) a 0.1 N e os tubos foram submetidos ao homogeneizador BHS-300, Benfer® por 20 minutos. Após 24 horas, os pedaços de papel filtro recortados foram retirados dos tubos. Em seguida, em um tubo Falcon de 50 mL adicionou-se 0,5 mL de hidróxido de sódio (NaOH), 100 µl de Quinidina (padrão interno utilizado nas análises de PQ e CPQ) e 4 mL de éter metil terc-butílico (MTBE). Os tubos foram submetidos ao homogeneizador por 20 minutos, em seguida foram centrifugados a 2000 rpm à 25°C por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 15 mL e deixado para evaporar na capela de exaustão por 48 horas.

4.9.2 Quantificação de PQ por HPLC

Para a quantificação de PQ por HPLC foram utilizados procedimentos previamente validados no Laboratório de Toxicologia da UFPA. Após evaporação, as amostras foram ressuspensas em 100 µl de metanol. A fase móvel deste experimento foi composta por acetonitrila 30%, 40% de metanol, 30% de água acidificada com pH 3 e água ultrapura.

Foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência (Varian, USA), composto por uma bomba isocrática (PROSTART 300), injetor manual reodyne (Modelo 772i), com loop de 20µl, coluna de fase reversa (XTerra): RP- 8, 15cm, 5µm e 4.6 mm de diâmetro interno (Waters,

Saint Quentin-en-Yvelines, France), pré-coluna: 2.1x 10mm detector duplo canal ultravioleta (Modelo 320) e visível (PROSTAR 220). As condições instrumentais seguidas foram: pressão de 3960 psi, comprimento de onda de 254 nm e fluxo de 0,2 mL/min. Utilizou-se a Primaquina (Sigma®) e a Quinidina (Sigma®) como padrão interno, para determinação dos tempos de retenção. As amostras foram injetadas no equipamento com microseringa de 50µL, Hamilton.

Antes do início da quantificação de PQ nas amostras clínicas, foram quantificados cinco pontos da curva padrão utilizada neste experimento. Assim, os pontos são compostos por PQ nas seguintes concentrações: 0,75 µg/mL, 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL.

4.10 Análise estatística

Os dados foram submetidos a um teste de normalidade para avaliar o padrão de distribuição. As variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias foram descritas pela média e desvio-padrão. A diferença entre as médias foi avaliada pelo *Teste T*. Variáveis que não preencheram os requisitos para análise paramétrica foram descritas como medianas e quartis e a diferença de medianas intergrupos foram testadas pelo Teste de *Mann-Whitney*. As diferenças entre a frequência de indivíduos com polimorfismos em *CYP2D6* e *POR* e recidiva por *P. vivax* foram testadas pelo teste qui-quadrado, com nível de significância de 5%. A análise das variáveis representativas dos valores de quantificação de *18s*, *Pvs25*, bem como variáveis categóricas foram analisadas utilizando o modelo de equações de estimações generalizadas (GEE) para a análise dos dados longitudinais.

5 RESULTADOS

Neste estudo foram incluídos um total de 100 indivíduos que procuraram o Pronto Atendimento Cosme e Silva em Roraima, Boa Vista, onde foi confirmado o diagnóstico positivo para malária causada por *P. vivax*.

Os indivíduos considerados elegíveis ao estudo foram classificados em três grupos de acordo com o número de recorrências: sem recorrência (n = 61), um episódio de recorrência (n = 23) e múltiplas recorrências (n = 16; de 2 a 6 episódios de recorrência por *P. vivax* a partir do 29º dia até 180 dias após o tratamento). O agrupamento desses pacientes foi fundamentado em dados anteriores do nosso grupo de pesquisa, no qual foi demonstrado que o status de metabolização da CYP2D6 influencia no número de recorrências em infecções causadas por *P. vivax* (SILVINO et al., 2016;2020). Os indivíduos do estudo tinham uma mediana de idade de 33 anos (IQR = 26 – 42 anos) e não houve diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos (zero, uma e múltiplas recorrências) para idade e sexo (Tabela 10).

Observa-se que uma grande parte dos pacientes se infectaram em regiões de garimpo (79%), onde estão sujeitos a novas infecções com maior frequência. Dentre esses, 30% apresentaram recorrência clínica de malária. Diversos outros locais de infecção foram citados, desde sítios e fazendas localizados no interior de Boa Vista e até mesmo na Venezuela, país que faz fronteira com Roraima.

Tabela 10. Dados demográficos dos indivíduos incluídos no estudo.

Características	Sem recorrência (n = 61)	Única recorrência (n = 23)	Múltiplas Recorrências (n = 16)	P-valor	População total (n = 100)
Idade, anos (mediana, IQR)	34 (28 - 45)	30 (22 - 37)	30 (23 - 40)	0,207 ^a	33 (26 - 42)
Sexo, n (%)					
Masculino	49 (61)	19 (24)	12 (15)	0,838 ^b	80 (80)
Feminino	12 (60)	4 (20)	4 (20)		20 (20)
Local provável de infecção, n (%)					
Garimpo	49 (62)	18 (23)	12 (15)	0,892 ^b	79 (79)
Outros ^c	12 (57)	5 (24)	4 (19)		21 (21)

^a Teste de Kruskal-Wallis;

^b Teste Qui-quadrado.

^c Categoria 'outros' inclui diversos locais de infecção: Município de Alto Alegre, Amojari, Arco Íris, Cantá, Pacaraima, Itaituba, Mucajaí, Piauí, Rorainópolis, Iracema, Tepequém, além de Guiana Inglesa, Venezuela, entre outros não citados pelos participantes do estudo.

5.1 Frequências alélicas e fenótipos preditos de CYP2D6

Foi realizada a genotipagem de *CYP2D6* e a determinação do número de cópias gênicas para todos os 100 indivíduos incluídos no estudo. Para identificar e investigar os alelos associados à atividade reduzida de *CYP2D6*, os haplótipos dos indivíduos incluídos no estudo foram construídos a partir de variantes polimórficas selecionadas na literatura. Essas variantes foram selecionadas por apresentarem maior frequência na população brasileira e serem determinantes dos principais alelos com atividade reduzida/nula de *CYP2D6*. Dentre os indivíduos incluídos no estudo, 5% (n = 5) apresentaram mais de duas cópias gênicas de *CYP2D6*. Nenhuma amostra foi identificada como homozigota para a deleção do gene.

Foram identificados dez haplótipos que permitiram a caracterização das seguintes variantes alélicas de *CYP2D6*: *1; *2/*35; *34; *39; *9; *10; *41; *29, *4 e *5, incluindo variantes caracterizadas por apresentarem aumento do número de cópias como *2xN. Os alelos *1 e *2/*35, que determinam atividade normal da enzima, foram observados em maior frequência na população estudada, enquanto alelos associados ao aumento da função enzimática foram observados em apenas um cromossomo dentre os investigados (Tabela 11). Três indivíduos do estudo apresentaram alelos indeterminados após análise de inferência dos

haplótipos. A ausência de definição alélica pode ocorrer nos casos em que a combinação dos nucleotídeos nas posições analisadas não tem correspondência com nenhum alelo de CYP2D6 descrito no banco de dados do Consórcio de Variação Farmacogênica (*PharmVar*).

Tabela 11 - Frequência dos alelos de CYP2D6 observada na população de estudo.

Alelos	Atividade ^a	Sem	Única	Múltiplas	Total por
		recorrência, % (n)	recorrência, % (n)	recorrências, % (n)	atividade ^b , % (n)
*1	Normal	0,23 (47)	0,07 (14)	0,05 (10)	0,73 (146)
*2/*35 ^c	Normal	0,17 (35)	0,09 (18)	0,07 (14)	
*34	Normal	0,02 (5)	0,01 (2)	-	
*39	Normal	0,005 (1)	-	-	
*2xN	Aumentada	0,01 (2)	-	-	0,01 (2)
*9	Reduzida	0,01 (2)	0,01 (2)	-	0,10 (20)
*10	Reduzida	0,005 (1)	-	-	
*41	Reduzida	0,02 (4)	0,01 (2)	-	
*29	Reduzida	0,02 (5)	0,01 (2)	0,01 (2)	
*4	Nula	0,06 (12)	0,01 (3)	0,02 (4)	0,15 (30)
*5	Nula	0,04 (8)	0,005 (1)	0,01 (2)	
Outros ^d	Indeterminado	-	0,01 (2)	-	0,01 (2)

n = número de cromossomos, n = 200; Sem recorrência, n = 122; Única recorrência, n = 46; Múltiplas recorrências, n = 32. Frequências iguais a 0 estão representadas por “-”.

^aAtividade metabólica de CYP2D6 de acordo com o *PharmVar*. Normal, aumentada, reduzida, nula.

^bTotal da frequência alélica por atividade de CYP2D6.

^cNão é possível a diferenciação entre *2 (normal) e *35 (normal) a partir dos polimorfismos analisados.

^dA combinação de SNPS não foi identificada para nenhum alelo conhecido de CYP2D6 ou as duplicações não foram atribuídas a nenhum alelo em alguns indivíduos heterozigotos.

Visto que somente a análise qualitativa dos alelos é insuficiente para prever a atividade de CYP2D6, o fenótipo foi predito utilizando o sistema escore de atividade (AS). No sistema AS, valores de 0 a 1 são atribuídos a cada alelo de acordo com a sua atividade enzimática. Entre os 100 pacientes do estudo, apenas quatro indivíduos (4%) foram identificados como metabolizadores ultrarrápidos (gUM) (Tabela 12). Além disso, 64% dos indivíduos foram preditos como metabolizadores normais (gNM-F) e 32% apresentaram alteração da atividade de CYP2D6: metabolizador nulo (gPM; 2 indivíduos, 2%), intermediário (gIM; 3 indivíduos, 3%) e atividade normal-reduzida (gNM-S; 26 indivíduos, 27%).

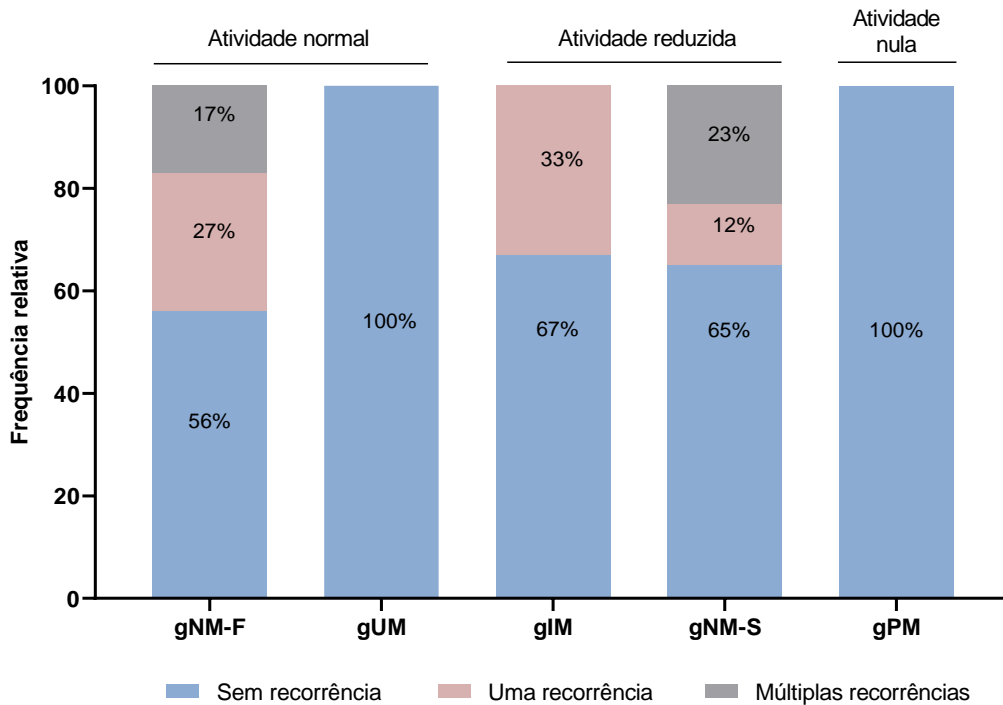
Considerando a frequência dos fenótipos de CYP2D6 de acordo com o número de episódios de recorrência, observamos que o grupo de metabolizadores normais (gUM e gNM-F) possuem maior frequência na população do estudo do que o grupo com alteração na atividade metabólica, gNM-S, gIM e gPM (Tabela 12 e Figura 10), sendo o gNM-F o fenótipo mais frequente entre os três grupos analisados.

Tabela 12. Frequência de recorrências na população de estudo em relação ao escore de atividade enzimática de CYP2D6.

Fenótipo	Escore de atividade	Sem recorrência (n)	Uma Recorrência (n)	Múltiplas recorrências (n)	Total (n)
gPM	0	0,03 (2)	-	-	0,02 (2)
gIM	0,5	0,03 (2)	0,04 (1)	-	0,03 (3)
gNM-S	1 - 1,25	0,28 (17)	0,14 (3)	0,37 (6)	0,27 (26)
Total	AS ≤ 1,25	0,35 (21)	0,20 (4)	0,37 (6)	0,32 (31)
gNM-F	1,5 - 2	0,58 (35)	0,80 (17)	0,62 (10)	0,64 (62)
gUM	> 2	0,06 (4)	-	-	0,04 (4)
Total	AS > 1,25	0,65 (39)	0,80 (17)	0,62 (10)	0,68 (66)

n = número de indivíduos, n = 97 (os três indivíduos com fenótipos indeterminados não foram incluídos nessa análise. Os fenótipos de CYP2D6 estão representados como atividade normal (gNM-F), atividade reduzida (gIM/gNM-S), atividade nula (gPM) e atividade aumentada (gUM). Frequências iguais a 0 estão representadas por “-”.

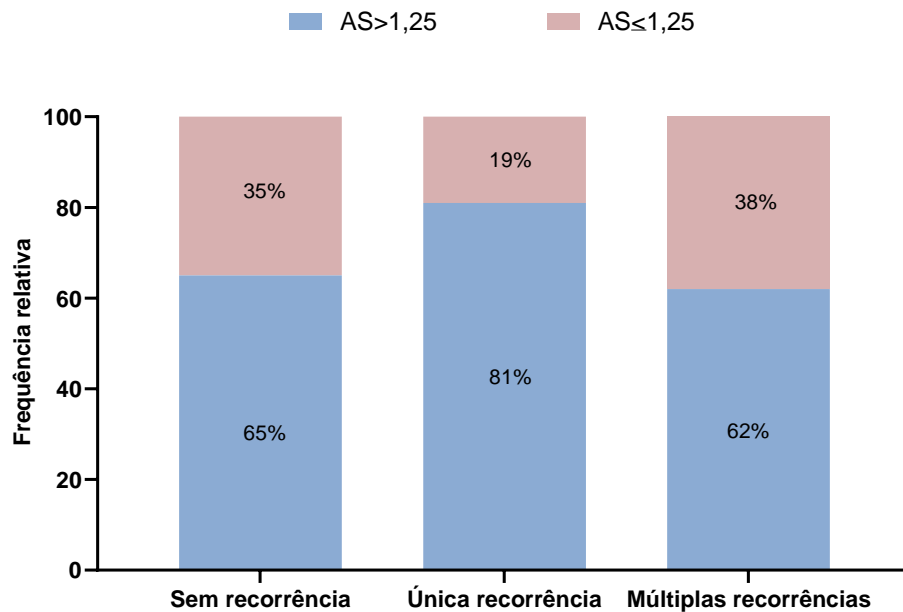
Figura 8. Análise das frequências fenotípicas previstas para CYP2D6 na população de estudo.



N = 97 indivíduos (três possuem fenótipo indeterminado e não foram incluídos nessa análise). gNM-F, metabolizador extensivo/normal; gUM, metabolizador ultrarrápido; gIM, metabolizador intermediário; gNM-S, metabolizador reduzido; gPM, metabolizador nulo.

Quando analisada a prevalência dos fenótipos agrupados por função (normal versus reduzida), 68% apresentaram atividade enzimática normal ($AS > 1,25$) e 32% apresentaram atividade alterada de CYP2D6 ($AS \leq 1,25$) (Tabela 12). No entanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos definidos de acordo com o número de recorrências ($P = 0,472$ -Teste Qui-Quadrado). Quando avaliamos os fenótipos agrupados por função em relação ao número de recorrências (Figura 11), nota-se que os grupos sem recorrências e com múltiplas recorrências apresentaram frequências semelhantes. Ao avaliar o grupo que apresentou apenas uma única recorrência, observou-se que 81% apresentaram $AS > 1,25$ enquanto 19% apresentaram $AS \leq 1,25$.

Figura 11. Frequência fenotípica de CYP2D6 de acordo com o número de recorrências de malária causada por *P. vivax*.



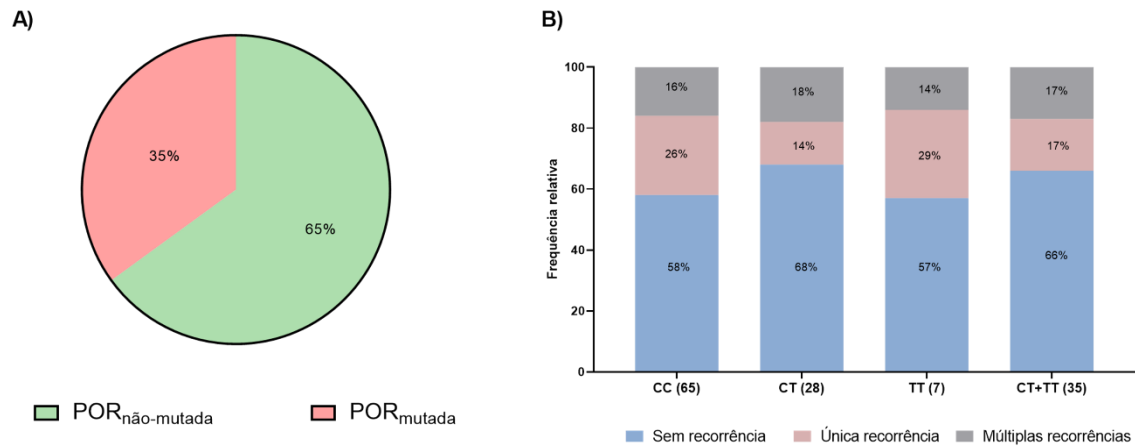
Frequência de recorrência clínica de malária de acordo com a atividade de CYP2D6 (AS > 1,25 – função normal e AS < 1,25 – função reduzida). N = 97.

5.2 Frequência de polimorfismos em *POR*

Foi realizada a genotipagem do polimorfismo A503V [rs1057868], variante em que ocorre a alteração de GCC para GTC no códon 1508, no gene que codifica *POR* para todos os 100 indivíduos incluídos neste estudo. Visto que estudos anteriores já mostraram que essa variante pode reduzir a atividade de CYP2D6 (SANDEE et al., 2010), nós avaliamos os dados a partir da frequência de homozigotos mutados, heterozigotos e homozigotos não mutados para *POR*.

Avaliando a proporção de indivíduos com e sem mutação em *POR*, observou-se que 65% não apresentam mutação no gene, enquanto 35% apresentaram a variante A503V, sendo 28% heterozigotos e 7% homozigotos mutados (Figura 12A). A partir da análise da frequência de mutação em *POR* em relação ao número de episódios de recorrência de malária, nota-se que as frequências de recorrência para os indivíduos homozigotos não-mutados (CC), heterozigotos (CT) e homozigotos mutados (TT) foram semelhantes entre os grupos. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os status de *POR* ($POR_{\text{não-mutada}}$ versus POR_{mutada}) e o número de recorrências de malária observados na figura 12B ($P = 0,593$ – Teste Qui-Quadrado).

Figura 9. Frequência do polimorfismo A503V em *POR* de acordo com o número de recorrências de malária causada por *P. vivax*.



(a) Proporção de mutação em *POR*, em que o grupo *POR*_{não-mutada} é representado por aqueles que não possuem a mutação A503V, enquanto *POR*_{mutada} é representado por indivíduos que possuem essa mutação em homocigose ou heterocigose ($n = 100$ indivíduos). (b) Proporção de indivíduos que apresentaram ≤ 1 recorrência e múltiplas recorrências de malária causada por *P. vivax* nos grupos homocigoto não-mutado (CC), heterocigoto (CT), homocigoto mutado (TT), e aqueles que possuem mutação em homocigose e heterocigose (CT+TT) ($P = 0,889$ – Teste Qui-Quadrado).

5.2.1 Frequência de recorrências de malária causada por *P. vivax* versus status de *CYP2D6* e *POR*

Em seguida, foi avaliado se o status de *CYP2D6* e *POR* é capaz de influenciar no número de recorrências de malária causada por *P. vivax*. Nota-se que 40% dos indivíduos que apresentam múltiplas recorrências possuem mutação em ambos os genes avaliados. Já para os demais grupos analisados, as frequências foram semelhantes para aqueles que apresentaram única e múltiplas recorrências. No entanto, esses dados não foram considerados estatisticamente significativos.

Tabela 13. Frequência de recorrências de malária causada por *P. vivax* de acordo com o status de CYP2D6 e POR.

Status CYP/POR	Sem recorrência, % (n)	Única recorrência, % (n)	Múltiplas recorrências, % (n)	Total, % (n)
CYP2D6 _{normal} /POR _{não-mutada}	52,3% (22)	28,5% (12)	19% (8)	43,2% (42)
CYP2D6 _{alterada} /POR _{não-mutada}	71,4% (15)	19% (4)	9,5% (2)	21,6% (21)
CYP2D6 _{normal} /POR _{mutada}	70,8% (17)	20,8% (5)	8,3% (2)	24,7% (24)
CYP2D6 _{alterada} /POR _{mutada}	60% (6)	-	40% (4)	10,3% (10)

n = número de indivíduos, n = 97. Três indivíduos não foram incluídos nesta análise, visto que apresentam fenótipo indeterminado para CYP2D6. Não-mutada: Ausência de mutação em *POR*. Mutada: Presença de mutação em *POR*.

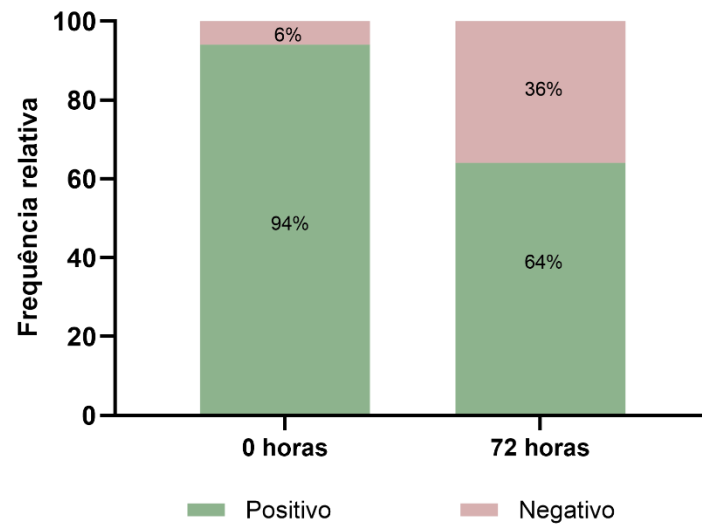
5.3 Detecção e quantificação de gametócitos

5.3.1 Detecção de transcritos de *Pvs48/45* por qPCR

Foi realizada a detecção por qPCR do alvo *Pvs48/45* para todos os 100 indivíduos incluídos no estudo. Observamos que em 0 horas (D0), momento em que os pacientes ainda não estavam realizando o tratamento com antimaláricos, foi possível detectar o alvo em 94% dos indivíduos. Ao avaliar a presença do alvo 72 horas (D3) após o início do tratamento com antimaláricos, *Pvs48/45* foi detectado em 64% dos indivíduos (Figura 13).

Ao avaliar a proporção de transcritos de *Pvs48/45* detectados por qPCR em relação à presença ou ausência de mutação em *POR*, observou-se que 96% dos indivíduos homocigotos não mutados (CC) eram positivos em 0 horas comparado a 88% dos indivíduos que possuíam mutação em heterocigose ou homocigose (CT+TT) (Tabela 14). No entanto, a proporção de positivos e negativos em 72 horas foi similar entre os grupos (Figura 14).

Figura 10. Proporção geral de *Pvs48/45* detectado por qPCR.



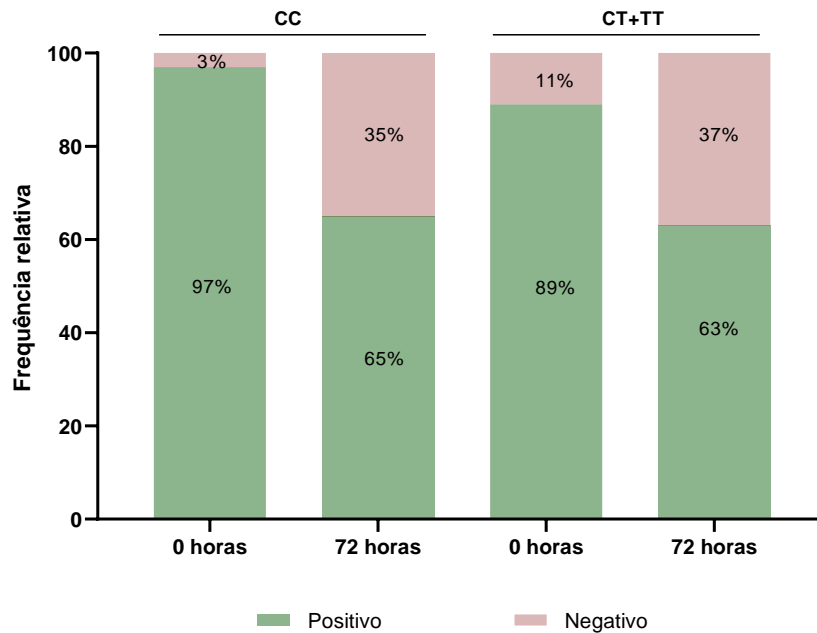
N = 100; Proporção de *Pvs48/45* detectado por qPCR na população de estudo no D0 e D3 ($P < 0,0001$ - Teste Exato de Fisher).

Tabela 14. Proporção de *Pvs48/45* detectado por qPCR em relação ao status de POR.

	Positivo	Negativo	<i>P</i> - valor ^a
CC			
0 horas	0,96 (63)	0,03 (2)	<0,0001
72 horas	0,64 (42)	0,35 (23)	
CT			
0 horas	0,89 (25)	0,10 (3)	0,014
72 horas	0,57 (16)	0,42 (12)	
TT			
0 horas	0,85 (6)	0,14 (1)	0,999
72 horas	0,85 (6)	0,14 (1)	
CT+TT			
0 horas	0,88 (31)	0,11 (4)	0,024
72 horas	0,62 (22)	0,37 (13)	

^a Teste Exato de Fisher (n = 100). CC: Homozigoto não mutado; TT: Homozigoto mutado; CT: Heterozigoto; TT+CT: Frequência de mutação em homozigose ou heterozigose.

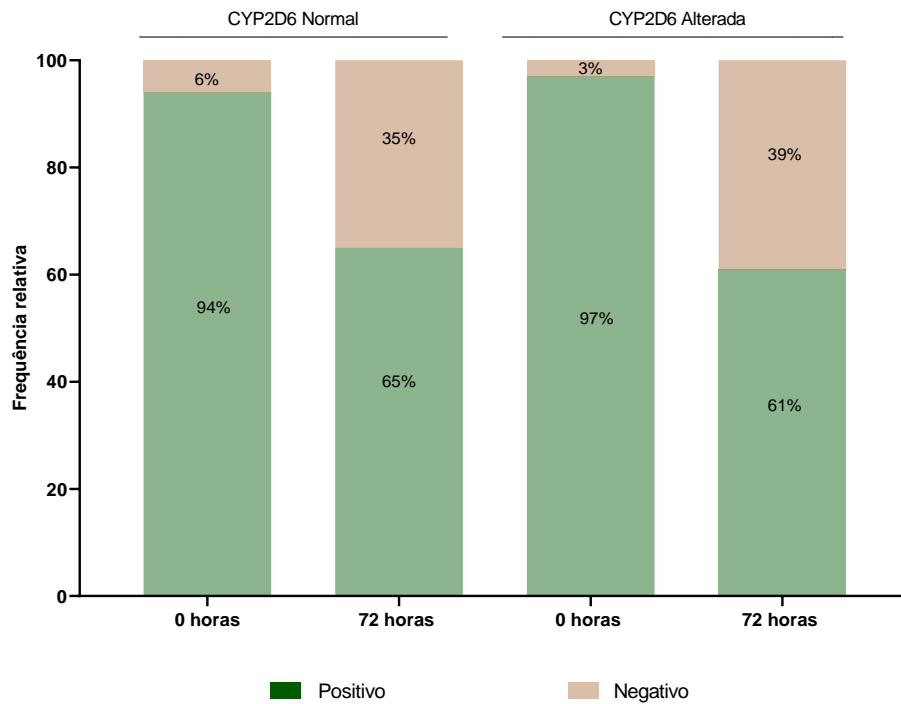
Figura 11. Proporção de transcritos de *Pvs48/45* detectados por qPCR em relação a presença ou ausência de mutação em *POR*.



Transcritos de *Pvs48/45* detectados por qPCR. Homozigotos não mutados (CC) e em heterozigotos e homozigotos mutados (CT+TT). a) Proporção de transcritos de *Pvs48/45* detectados por qPCR em 0 horas. b) Proporção de transcritos de *Pvs48/45* detectados por qPCR em 72 horas.

Quando comparamos a presença de *Pvs48/45* em relação ao status de *CYP2D6*, nota-se que a proporção de transcritos detectados foi similar entre os grupos analisados. O alvo foi detectado em 94% dos indivíduos com atividade enzimática normal em 0 horas e em apenas 65% dos indivíduos em 72 horas (Figura 15). Já para aqueles com atividade enzimática alterada, 97% dos indivíduos eram positivos em 0 horas e 61% em 72 horas.

Figura 12. Proporção de transcritos de *Pvs48/45* detectados por qPCR em relação ao status de CYP2D6.



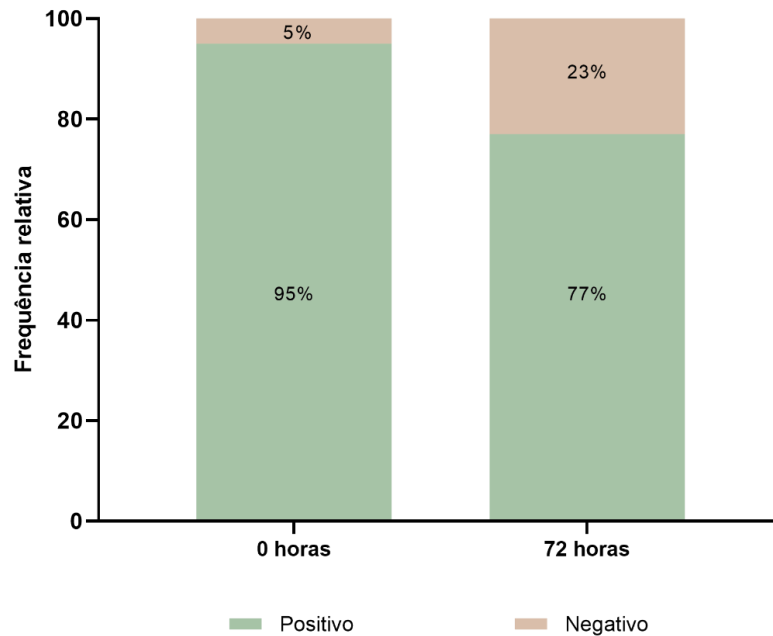
N = 97 (três indivíduos possuem fenótipo de CYP2D6 considerado indeterminado, por este motivo foram excluídos da análise).

Visto que o alvo *Pvs48/45* é encontrado em menor concentração durante a infecção, a amplificação do alvo por qPCR está sujeita a maiores variações, o que tem implicação direta na acurácia da quantificação. Deste modo, a quantificação deste alvo não foi realizada.

5.3.2 Detecção de transcritos de *Pvs25* por qPCR

Foi realizada a quantificação de transcritos de *Pvs25* por qPCR nas amostras em 0 horas e 72 horas. Na figura 16, observa-se que os transcritos de *Pvs25* foram detectados em 95% dos pacientes em 0 horas e em apenas 77% em 72 horas.

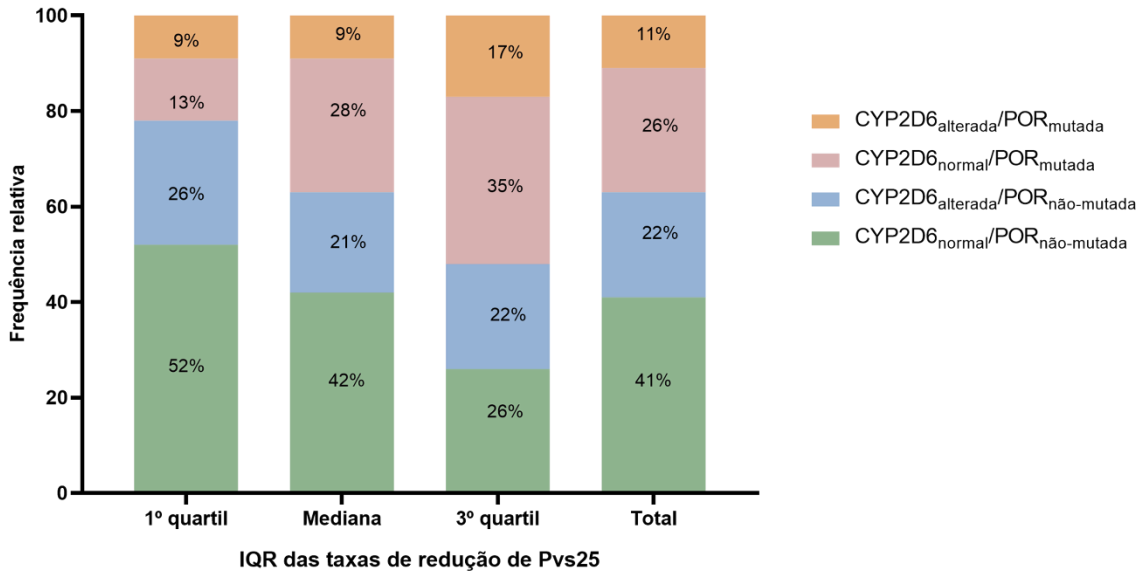
Figura 16. Proporção de transcritos de *Pvs25* detectados por qPCR.



Proporção de pacientes positivos e negativos para a detecção por qPCR de transcritos de *Pvs25* em 0 e 72 horas (n = 100).

Para analisar os níveis de redução de *Pvs25* para cada paciente, foi realizada a divisão dos valores de quantificação obtidos em 72 horas por aqueles obtidos em 0 horas, na escala logarítmica. A partir disso, foi possível calcular os intervalos interquartis (IQR) e identificar quantos pacientes estão inseridos em cada intervalo e quais os seus status de CYP2D6 e POR. Dessa forma, o grupo que inclui o primeiro quartil corresponde a uma redução de *Pvs25* igual ou inferior a -3,875, o grupo que inclui a mediana corresponde ao intervalo $>-3,875$ e $<-1,243$ e o grupo que inclui o terceiro quartil corresponde a uma redução igual ou maior do que -1,243. Cinquenta e dois por cento dos indivíduos incluídos no primeiro quartil, isto é, que tiveram maior redução de *Pvs25*, possuem CYP2D6_{normal} e POR_{não-mutada} (Figura 17). No entanto, é interessante observar que a maior parte dos indivíduos que compõem o terceiro quartil, ou seja, que apresentaram menor redução de *Pvs25*, foram aqueles que apresentaram mutação em POR (52%) quando comparados com os indivíduos inseridos no primeiro e segundo quartil. Além disso, nesse grupo apenas 26% dos indivíduos não apresentavam mutação em CYP2D6 ou POR (CYP2D6_{normal} e POR_{não-mutada}). Apesar disso, não houve diferença estatística significativa entre os grupos (P = 0,408 – Teste Qui-Quadrado).

Figura 13. Distribuição do status de CYP2D6 e POR para os intervalos interquartis das taxas de redução de *Pvs25*.



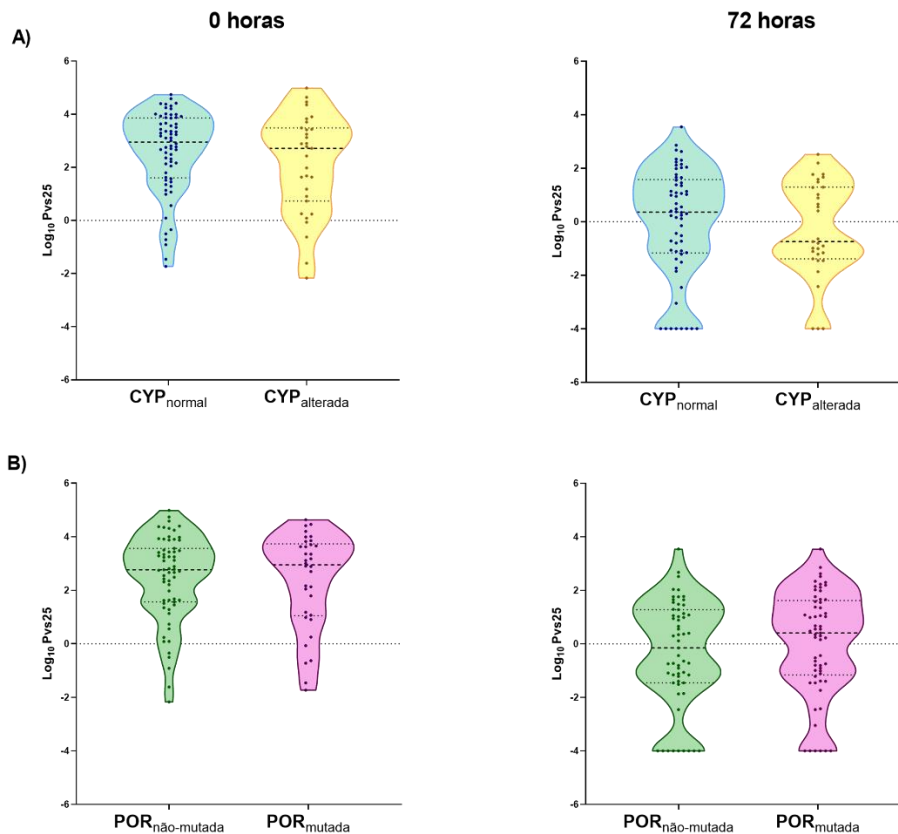
N = 97 (3 indivíduos não foram incluídos na análise visto que apresentam fenótipo de CYP2D6 indeterminado).

Para avaliar a associação entre status de CYP2D6 e POR e a densidade de gametócitos (nível de transcritos *Pvs25*), ajustamos um modelo linear generalizado (GEE) que nos permitiu realizar uma análise longitudinal dos dados. No modelo GEE ajustado, os efeitos das variáveis idade e parasitemia total (nível de transcritos *18S* rRNA) sob a densidade de gametócitos foram levados em consideração. Apesar da idade dos pacientes não ter demonstrado relação com o número de gametócitos ($P = 0,203$), a parasitemia total se mostrou significativa ($P < 0,001$), o que nos permitiu determinar que com o aumento de 20% da parasitemia, houve o aumento de 11% de *Pvs25* (IC95%: 8 – 14; Estimativa: 0,572).

Quando consideramos a relação entre o tempo (0 horas e 72 horas) e o status das enzimas CYP2D6 e POR, observamos que para CYP2D6 não houve diferença estatisticamente significativa entre as quantidades de transcritos de *Pvs25* detectados em 0 horas e 72 horas (Figura 18A). No entanto, quando avaliamos essa relação para POR (Figura 18B), observou-se que pacientes com mutação em *POR* possuem maiores quantidades de transcritos de *Pvs25* em 72 horas quando comparados com pacientes sem mutação ($P = 0,02$). Assim, em 72 horas, a média de *Pvs25* daqueles que possuem *POR*_{mutada} é 8,28 vezes maior do que indivíduos com *POR*_{não-mutada} (IC95%: 1,24 - 55,2; Estimativa: -3,698). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em 0 horas. Ao avaliar se o status CYP2D6/POR em conjunto tem

algum efeito sobre o *clearance* de *Pvs25*, nós observamos que não houve uma associação significativa entre estes fatores.

Figura 18. Relação entre quantidade de transcritos de *Pvs25* e os status de CYP2D6 e POR em 0 e 72 horas.



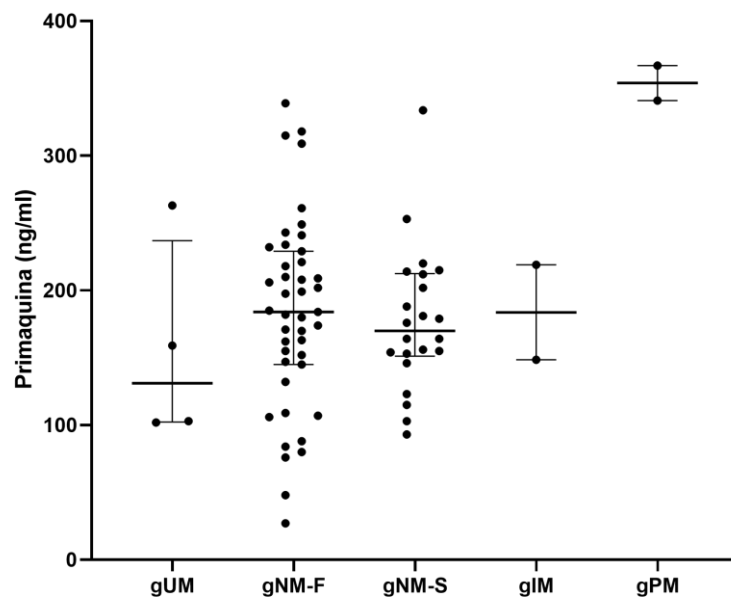
Análise da relação entre a quantidade de transcritos de *Pvs25* detectados por qPCR e os status de CYP2D6 e POR em 0 e 72 horas. A) Relação entre status de CYP2D6 e a quantidade de transcritos de *Pvs25* detectados. Não houve diferença estatisticamente significativa ($n = 97$). B) Relação entre status de POR e a quantidade de transcritos de *Pvs25* detectados. Em 72 horas pacientes com mutação em POR apresentavam mais transcritos do que aqueles sem mutação ($n = 100$, $P = 0,02$).

5.3.3 Concentrações plasmáticas de PQ em pacientes com malária causada por *P. vivax*

As concentrações de PQ em 72 horas foram obtidas para 76 indivíduos. Ao avaliar a concentração plasmática de PQ de acordo com o sexo dos indivíduos incluídos no estudo, observou-se que indivíduos do sexo masculino apresentaram, em média, 180 ng/mL (IQR: 147,8 - 218,5), enquanto indivíduos do sexo feminino apresentaram cerca de 171 ng/mL (IQR: 103 - 261). Essa diferença não foi estatisticamente significativa ($P = 0,692$ - Teste T).

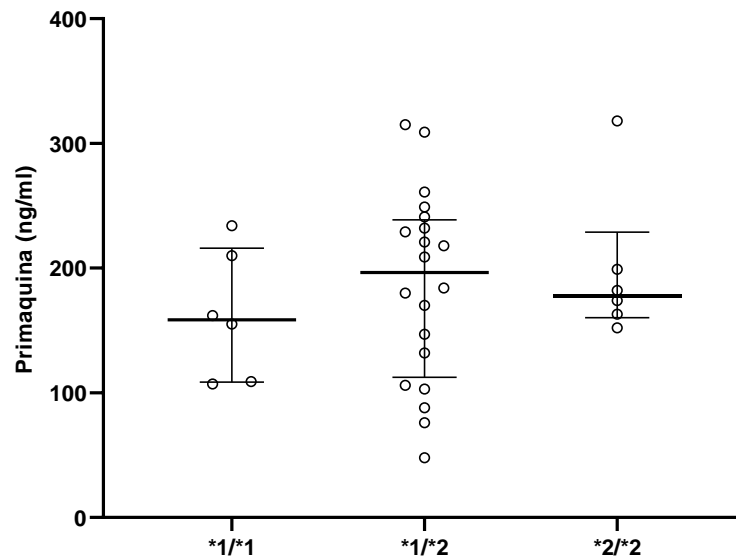
Os grupos de indivíduos gUM, gNM-F, gNM-S e gIM apresentaram uma maior distribuição de pacientes com concentrações plasmáticas de PQ em torno de 150 a 250 ng/mL (Figura 19). No entanto, nota-se que é possível observar uma diferença na mediana da concentração de PQ apenas para gUM e gPM, sendo a concentração de PQ em gUM menor do que para os outros fenótipos avaliados. Em contrapartida, o grupo de pacientes com fenótipo gPM, que corresponde à atividade nula de CYP2D6, apresentou maior concentração de PQ do que os demais, em torno de 350 ng/mL ($P = 0,160$ – Teste de Kruskal-Wallis). Uma grande variação nas dosagens de PQ pôde ser observado ao avaliar a concentração da droga em 72 horas em relação aos principais haplótipos de CYP2D6 que conferem atividade enzimática normal (Figura 20). É possível observar uma variação na concentração média de PQ mesmo em indivíduos com a mesma atividade enzimática, variando apenas o alelo estrela correspondente.

Figura 19. Concentrações plasmáticas de PQ em 72 horas em relação ao fenótipo de CYP2D6.



N = 73; 27 indivíduos foram excluídos da análise devido a apresentação de concentrações plasmáticas de PQ abaixo do limite de detecção e 3 possuem fenótipo de CYP2D6 indeterminado.

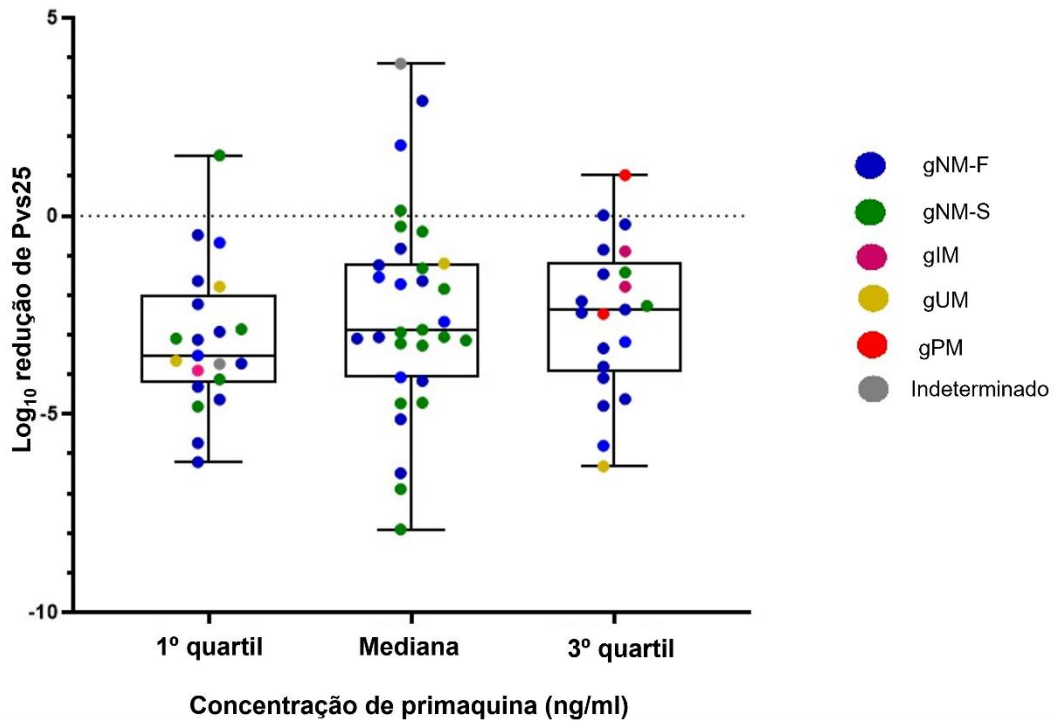
Figura 20. Concentrações plasmáticas de PQ em 72 horas em relação aos principais haplótipos de atividade normal de CYP2D6.



Na figura estão representados apenas os principais haplótipos de CYP2D6 que conferem atividade enzimática normal da enzima. N = 32.

Para avaliar como a dosagem de PQ pode estar associada à redução de *Pvs25* em relação ao fenótipo de CYP2D6, primeiramente foram calculados os IQR da concentração de PQ, no qual o primeiro quartil corresponde a valores inferiores ou iguais a 151,9 ng/ml, a mediana corresponde ao intervalo 177,5 ng/ml e o terceiro quartil equivale a valores iguais ou superiores a 216 ng/ml. Na figura 21, é possível observar que aqueles pacientes que continham maior concentração de PQ em 72 horas (terceiro quartil) apresentaram menor redução de *Pvs25* quando comparados com aqueles que continham menores concentrações de PQ (primeiro quartil e mediana). Vale ressaltar que os indivíduos agrupados no primeiro quartil e mediana são, em sua maioria, metabolizadores normais de CYP2D6. Na Tabela 15 estão descritas as frequências dos fenótipos de CYP2D6 para os grupos de concentração plasmática de PQ em 72 horas, no qual é possível observar que a frequência dos fenótipos que conferem atividade enzimática normal e alterada são semelhantes entre os grupos. No entanto, o fenótipo que confere atividade enzimática nula (gPM) está presente somente no 3º quartil, grupo de indivíduos que possui maiores concentrações de PQ e menor redução de *Pvs25* em relação aos demais grupos.

Figura 21. Distribuição do fenótipo de CYP2D6 para o primeiro, segundo (mediana) e terceiro quartil da concentração de PQ em 72 horas.



Representação gráfica da frequência de fenótipos de CYP2D6 em relação a concentração de PQ em 72 horas de acordo com a redução de *Pvs25* em escala logarítmica. Foi realizada a análise dos níveis de redução de *Pvs25* para cada paciente, levando em consideração a razão 72h/0h na escala logarítmica, calculando então os IQR. O primeiro quartil corresponde a uma redução de *Pvs25* igual ou inferior a -3,875; O grupo que inclui a mediana corresponde ao intervalo $>-3,875$ e $<-1,243$; O terceiro quartil corresponde a uma redução igual ou maior do que -1,243. N = 73 (3 amostras não foram incluídas devido à ausência de dados de quantificação de *Pvs25* em 72 horas).

Tabela 15. Frequência de fenótipos de CYP2D6 para o primeiro, segundo (mediana) e terceiro quartil da concentração de PQ em 72 horas.

Fenótipo	1º quartil	Mediana	3º quartil
gUM	9% (2)	3% (1)	5% (1)
gNM-F	57% (12)	53% (18)	62% (13)
gNM-S	24% (5)	41% (14)	14% (3)
gIM	5% (1)	-	5% (1)
gPM	-	-	9% (2)
Indeterminado	5% (1)	3% (1)	5% (1)

6 DISCUSSÃO

6.1 Variabilidade genética de *CYP2D6* e *POR*

As recorrências de malária causada por *P. vivax* podem ser ocasionadas por diversos fatores, sendo um deles, o reaparecimento dos sinais e sintomas da doença ocasionado pela ativação de hipnozoítos (KROTOSKI, 1985).

O estudo realizado por Bennett e colaboradores (2013) mostrou que a falha terapêutica em pacientes que realizaram tratamento com PQ estava associada à presença de polimorfismos que caracterizam o fenótipo de metabolização intermediária e nula para *CYP2D6*. Concomitantemente, outros estudos apresentaram a dependência da PQ pelo metabolismo da *CYP2D6*, sugerindo que a presença de polimorfismos no gene poderia influenciar na resposta terapêutica, comprometendo assim a eficácia da droga (PYBUS et al., 2013; POTTER et al., 2015).

Sabe-se que a heterogeneidade e miscigenação da população brasileira contribui para as diferenças de frequências alélicas de *CYP2D6* observadas no país (FRIEDRICH et al., 2014). Ao avaliar a frequência fenotípica de *CYP2D6* para os indivíduos incluídos neste estudo, observamos que aqueles que conferem atividade enzimática reduzida tiveram uma frequência total de 32% ($AS \leq 1,25$), que abrange os seguintes fenótipos: gPM (2%), gIM (3%) e gNM-S (27%). Um estudo recente do nosso grupo encontrou resultados semelhantes ao avaliar as frequências fenotípicas de uma população exposta à malária residentes em Rio Pardo, localizado na zona rural do município de Presidente Figueiredo no Amazonas (SILVINO et al., 2020). As frequências fenotípicas de *CYP2D6* encontrada neste estudo foi de 1% para gPM, 2% para gIM e 21% para gNM-S. Já o estudo realizado por Ladeia-Andrade e colaboradores (2019) que avaliou a eficácia da terapia com CQ e PQ em um grupo de pacientes do Vale do Juruá (AC), região endêmica para malária, encontrou as seguintes frequências fenotípicas para *CYP2D6*: 5% para gPM, 4% para gIM e 26% para gNM-S (35% para $AS \leq 1,25$). Uma frequência menor do fenótipo de metabolização reduzida (gPM, gIM, gNMS – $AS \leq 1,5$) de 19% foi observado na população residente de uma área perirurbana em Manaus no Amazonas. Este estudo de coorte realizado por Brasil e colaboradores (2018) investigou como polimorfismos e fenótipos de *CYP2D6* estão associados à presença de recorrências de malária.

Estudos anteriores já demonstraram que polimorfismos em *CYP2D6* estão associados à alteração da metabolização da enzima, o que leva ao aumento do número de recorrências de malária ocasionado por falha terapêutica (SILVINO et al., 2016; 2020). Apesar da compreensão

do papel da *CYP2D6* nos episódios de recorrência de malária, o presente estudo não evidenciou essa mesma associação. O principal fator que pode ter influenciado neste achado foi o fato de grande parte da população do estudo (79%) ser caracterizada por garimpeiros ou por indivíduos que exercem atividades em áreas de garimpo. O trabalho de mineração ocorre ao ar livre, o que os torna mais suscetíveis às picadas de mosquitos e, as moradias nessas áreas, quando existem, são precárias, o que facilita a transmissão da doença. A atividade mineradora também cria um ambiente favorável à reprodução de mosquitos vetores, pois a dragagem de barrancos gera poças de água que servem como criadouros artificiais. Além disso, a intensa migração de trabalhadores entre essas áreas favorece a circulação de pessoas infectadas, aumentando a possibilidade de transmissão (RECHT et al., 2017; COSSA et al., 2021; MURTA et al., 2021).

Neste estudo, os episódios de malária registrados na plataforma Sivep-Malária entre os dias 29^o e 180^o após o tratamento foram caracterizados como possíveis recorrências. O estudo de White (2011) traz evidências de que é possível identificar como possíveis recaídas as recorrências registradas até 180 dias após o tratamento em regiões tropicais e temperadas. No entanto a alta endemicidade da doença na região faz com que exista a possibilidade de parte das recorrências serem na verdade reinfecções, visto que 79% da população de estudo frequentou áreas de mineração. Esta pode ser a causa das discordâncias entre os resultados deste estudo e outros estudos publicados anteriormente, contudo isso não descarta a influência de *CYP2D6* no número de episódios de malária já demonstrada anteriormente.

Assim como *CYP2D6*, entende-se que *POR* também está sujeito à variabilidade genética devido à presença de mutações, porém diferente de *CYP2D6*, não há estudos relacionados à frequência alélica e genotípica de *POR* em infecções maláricas. Nesse estudo, nós avaliamos a frequência genotípica de *POR*, no qual observamos que 28% eram indivíduos heterozigotos (CT) e apenas 7% apresentavam a mutação em homozigose (TT). Como exemplo, estes dados são semelhantes aos obtidos por Zhang e colaboradores (2011) que avaliou como polimorfismos em *POR* correlacionam-se com variações interindividuais na dose de manutenção da varfarina em pacientes norte-americanos submetidos à terapia anticoagulante, no qual a frequência de heterozigotos e homozigotos mutados foi igual a 34% e 6,5%, respectivamente.

A compreensão da distribuição alélica e fenotípica desses genes de enzimas metabolizadores de antimaláricos é de extrema importância, principalmente nas regiões endêmicas para a malária, pois espera-se que estudos posteriores possam auxiliar na escolha do

regime terapêutico que seja mais adequado a cada paciente buscando evitar as recorrências de malária e os efeitos adversos ocasionados pela metabolização alterada da droga.

6.2 Densidade de gametócitos em infecções maláricas

Os gametócitos são essenciais para a transmissão da malária, mas a sua presença no sangue periférico não está diretamente associado à sua infectividade. Esta depende de vários fatores, tais como, maturidade dos gametócitos, concentração das formas masculinas e femininas, bem como da resposta imune do mosquito e hospedeiro humano (SMITH et al., 1995). Estudos publicados anteriormente já descreveram uma associação entre a densidade de gametócitos e a taxa de infecção de mosquitos. No entanto esta associação não era muito forte, além de ser variável em baixas concentrações de gametócitos (VAN DER KOLK et al., 2005; SCHNEIDER et al., 2007; OUÉDRAOGO et al., 2009; BOUSEMA e DRAKELEY, 2011). Além disso, altas densidades de gametócitos nem sempre resultam na infecção do mosquito (GRAVES, et al. 1988; GAMAGE-MENDIS et al., 1991) e baixas densidades não excluem a possibilidade de infecção (COLEMAN et al., 2004). A falha da infecção de mosquitos, mesmo em altas densidades de gametócitos, ocorre principalmente pela imaturidade dos gametócitos (LENSEN et al., 1999; HALLETT et al., 2006).

Um marcador comumente utilizado na detecção e quantificação de gametócitos maduros (estágio V) são os transcritos de *Pvs25*. Esse alvo é considerado um marcador específico de gametócitos femininos que, por sua vez, estão presentes em maior concentração nas infecções quando comparados aos gametócitos masculinos (BABIKER et al., 1999; BABIKER e SCHNEIDER, 2008). Para determinar a densidade de gametócitos com maior acurácia, também é necessário a quantificação de alvos que correspondem aos gametócitos masculinos, bem como estágios jovens e maduros de gametócitos (VAN DIJK et al., 2001). Neste estudo foi realizada a detecção de transcritos de *Pvs48/45*, um marcador de fertilização do gameta masculino encontrado em estágios iniciais de gametócitos. Como esperado, observou-se uma menor quantificação e positividade para esse alvo nos tempos analisados (0 e 72 horas) quando comparado com *Pvs25*. Esse achado está de acordo com os resultados de Demanga e colaboradores (2017) que ao induzirem a gametocitogênese em isolados de *P. falciparum*, observaram maior concentração de gametócitos femininos após o 10^o dia de infecção. Os autores sugerem que os gametócitos masculinos possuem uma vida útil mais curta, o que resulta em maior abundância de gametócitos femininos. Este é um resultado esperado visto que os gametócitos masculinos dão origem a outros oito gametas masculinos, diferentemente dos

femininos que não sofrem este tipo de modificação e multiplicação celular (BOUSEMA e DRAKELEY, 2011).

Neste estudo observamos que a parasitemia sanguínea, detectada utilizando o alvo 18S rRNA, é um fator que demonstra relação com a gametocitemia, uma vez que se observou que o número de gametócitos aumentou quando houve o aumento da parasitemia. Essa associação também foi observada por Nguitrageol e colaboradores (2017) que determinaram que com o aumento de 10 vezes da parasitemia, as chances de detectar gametócitos aumentava em aproximadamente 3 vezes. Além disso, a densidade parasitária dos estágios sanguíneos de *P. vivax* foi identificada como fator de risco para a presença de gametócitos, uma vez que a gametocitemia aumentou com a parasitemia (ALMEIDA et al., 2018).

6.2.1 O papel de mutações em genes de enzimas metabolizadoras no clearance de gametócitos

Uma vez que não há estudos que tenham avaliado como a variabilidade genética de *CYP2D6* e *POR* pode afetar o clearance de gametócitos de *P. vivax*, nós avaliamos o papel de polimorfismos nestes genes na eliminação dos gametócitos de *P. vivax* em amostras de pacientes infectados em uma região endêmica para malária no Brasil. Assim como mostrado por Mwaiswelo e colaboradores (2022) para *P. falciparum*, nós não observamos uma relação entre o status de *CYP2D6* e a densidade de gametócitos. Um resultado distinto foi obtido por Pett e colaboradores (2019) em que indivíduos com status de metabolização lenta/intermediária (gPM – 2%; gIM – 38%) para *CYP2D6* apresentaram maior prevalência de gametócitos de *P. falciparum* do que aqueles com metabolização normal/ultrarrápida. No entanto, é necessário ressaltar que em nosso estudo há poucos indivíduos com o status de metabolização lenta (gPM – 2%) e intermediária (gIM – 3%), o que não nos permitiu avaliar o efeito destes fenótipos mais extremos no clearance de gametócitos. Ainda assim, neste estudo identificamos uma associação direta entre o status de *POR* e a densidade de gametócitos em 72 horas, no qual indivíduos com polimorfismo em *POR* apresentaram menor redução da densidade de gametócitos em 72 horas quando comparados àqueles que não possuíam polimorfismo no gene. Estes achados concordam com os de Camarda e colaboradores (2019) que observaram que a atividade gametocitocida era maior na presença da enzima *POR*.

Apesar de não ser bem compreendido o papel da PQ sobre os estágios sexuais de *P. vivax*, esta droga vem sendo utilizada para a eliminação de gametócitos de *P. falciparum* há muitos anos. De 1924 até meados de 1940, o tratamento era realizado com plasmocina (PMQ). O estudo de Barber e colaboradores (1929) mostraram que a atividade gametocitocida em infecções causadas por *P. falciparum* poderia ser alcançada com doses baixas de PMQ. No

início dos anos 50, a PQ substituiu a PMQ por ser considerada mais segura e eficaz no tratamento de malária causada por *P. vivax*. No entanto, não há estudos formais que tenham sido capazes de determinar a dose adequada para a atividade gametocitocida em infecções agudas de *P. falciparum*. Embora Rieckmann e colaboradores (1968; 1969) tenham observado que as três doses testadas de PQ (15, 30 e 45 mg) tinham eficácia sobre os gametócitos em condições de baixa gametocitemia, o *clearance* ocorreu mais rapidamente quando administrados 45 mg de PQ. Até o momento, todos os estudos que avaliaram as propriedades gametocitocidas de 8-aminoquinolinas mostraram consistentemente que a transmissão é bloqueada após redução considerável do número de gametócitos (MANSON-BAHR, 1927; GREEN, 1929; CHOPRA e BASU, 1937; DICK e BOWLES, 1947; MACKERRAS e ERCOLE, 1949).

Há muitos anos a PQ é utilizada para evitar recaídas da infecção de *P. vivax*, porém apenas recentemente o seu efeito hipnozoiticida foi atribuído à produção de metabólitos ativos gerados pela CYP2D6 (PYBUS et al., 2012; BENNET et al., 2013). Apesar da CYP2D6 ser considerada a principal enzima metabolizadora da PQ, ela só é capaz de exercer esta função devido à doação de elétrons fornecidos pela POR, enzima já descrita em outros estudos por estar envolvida em diversos processos metabólicos e, assim como CYP2D6, o gene *POR* também está sujeito a variabilidade genética. Os estudos sobre as mutações em *POR* iniciaram em 2004 no qual foram fornecidos detalhes sobre a sua enzimologia e sobre a presença de mutações raras em regiões codificantes do gene que poderiam levar a PORd (ARLT et al., 2004; FLÜCK et al., 2004; HUANG et al., 2005). O estudo de Sandee e colaboradores (2010) mostrou que algumas variantes de *POR* possuem diferentes efeitos dependendo do substrato metabolizado. O polimorfismo A503V, mais frequente na população, foi capaz de reduzir a atividade de CYP2D6 entre 40 e 50%, potencialmente alterando a metabolização de drogas.

Apenas recentemente a atividade antimalárica da PQ foi associada a uma via bioquímica de duas etapas (CAMARDA et al., 2019), no qual realizaram um estudo *in vitro* que determinou a eficácia de metabólitos hidroxilados de PQ (OH-PQm) na atividade gametocitocida e contra estágios hepáticos de *P. falciparum*. Dessa forma, eles determinaram que a atividade antimalárica da PQ contra os estágios hepáticos depende do status de CYP2D6 do hospedeiro, enquanto OH-PQm exibem atividade direta e independente de CYP2D6. Além disso, observaram que OH-PQm apresentam eficácia antimalárica contra gametócitos, e a sua produção é significativamente aumentada na presença de POR. O aumento da eficácia ocorre

devido à produção direta de OH-PQm pela POR com geração concomitante e excessiva de H₂O₂, levando a atividade antiparasitária.

Embora o nosso estudo não tenha encontrado evidências que demonstrem a associação de CYP2D6 no *clearance* de gametócitos, o estudo de Camarda e colaboradores (2019) associou a atividade antimalárica da PQ em *P. falciparum* às duas enzimas do hospedeiro (CYP2D6 e POR). No entanto, é válido ressaltar que nosso estudo contou com apenas dez indivíduos com mutação em CYP/POR, o que pode ter influenciado nos resultados, impossibilitando a análise do efeito conjunto destas enzimas. Apesar disso, sabe-se que mecanismo de ação da droga em infecções causadas por *P. vivax* ainda não é bem compreendido visto que não há estudos semelhantes publicados envolvendo esta espécie. Os nossos achados, portanto, enfatizam a importância da compreensão de fatores farmacogenéticos no monitoramento de fatores de risco de transmissão, bem como a utilização de tratamento eficazes contra estágios do parasito.

6.2.2 Envolvimento de fatores do hospedeiro na concentração plasmática de PQ

Estudos anteriores demonstraram que a metabolização reduzida de CYP2D6 pode ter implicações diretas na metabolização da PQ, o que pode determinar o sucesso terapêutico a partir da disponibilização de níveis adequados da droga na corrente sanguínea (BENNET et al., 2013; INGRAM et al., 2014). O estudo de Baird e colaboradores (2018) investigou a associação entre genótipos e fenótipos de CYP2D6 com a falha terapêutica em infecções causadas por *P. vivax*. Ao analisarem a relação dextrometorfano/dextrorfano (DM/DX) urinária, droga utilizada para avaliar a atividade de CYP2D6, observaram que pacientes com maiores concentrações de DM/DX tinham mais chances de apresentarem recaídas da doença. O monitoramento dos níveis sanguíneos de PQ durante o tratamento pode fornecer uma avaliação confiável da exposição da população de parasitos ao medicamento. Além disso, a associação da concentração de PQ com desfechos clínicos e parasitológicos é capaz de fornecer informações sobre a eficácia dos níveis sanguíneos da droga contra os estágios do parasito (MELLO et al., 2018).

Nesse estudo, não foi possível observar diferenças significativas entre os fenótipos de metabolização normal e reduzida. No entanto, uma diferença clara foi observada para o fenótipo mais extremo, que confere atividade enzimática nula (gPM), com concentrações maiores da droga quando comparados com os demais grupos. Os mesmos resultados foram observados ao avaliar os principais haplótipos de CYP2D6 em relação aos níveis de PQ, no qual o *4/*4 (metabolização nula) apresentou maiores concentrações da droga. Estes dados corroboram com

os demonstrados por Bennet e colaboradores (2013) e Potter e colaboradores (2015) que avaliaram o perfil farmacocinético da PQ, observando que os níveis de PQ estavam mais elevados em indivíduos que apresentavam fenótipo de metabolização nula. No entanto, o principal metabólito da PQ manteve-se em concentrações elevadas tanto em indivíduos com fenótipo de metabolização normal quanto alterada. Estes resultados demonstram que a atividade enzimática nula impacta o metabolismo da droga e altera a exposição sistêmica dos parasitos à droga.

Além disso, nossos resultados mostram uma grande variação dos níveis de PQ para os fenótipos que conferem atividade enzimática normal. O estudo de Gaedigk e colaboradores (2018) mostra que essa variabilidade pode ocorrer devido à diversos fatores genéticos do indivíduo, como a variação dentro do próprio gene *CYP2D6*. A atividade em relação a um substrato de droga específico também pode ser afetada por mecanismos regulatórios, incluindo polimorfismos genéticos em regiões potenciadoras ou expressão diferencial de fatores de transcrição ou micro RNAs que podem modular a taxa de tradução de mRNA em proteína.

Ainda que os nossos dados estejam de acordo com o que foi demonstrado em estudos publicados anteriormente, há limitações para interpretar os níveis sanguíneos de PQ neste estudo. Apesar dos dados coletados nos permitirem avaliar a exposição dos indivíduos à droga, não foi possível realizar uma análise de farmacocinética. Isso porque não foram realizadas coletas de amostras em diferentes dias e horários, o que dificultaria a logística do estudo nesse momento. Além disso, o tratamento com antimaláricos não foi supervisionado, fato que pode influenciar na interpretação dos resultados, uma vez que não é possível afirmar se houve a administração correta do antimalárico.

Como desdobramento do presente estudo, o próximo passo é acompanhar os indivíduos por um período maior de tempo para avaliar o efeito dos polimorfismos no tempo de clearance dos gametócitos de *P. vivax*. Espera-se com esses achados contribuir para o melhor entendimento dos fatores associados à transmissão do parasito e que tem dificultado o controle da malária causada por *P. vivax*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os principais achados desta pesquisa corroboram a hipótese de que a variabilidade genética de POR é um fator determinante para a manutenção da densidade de gametócitos de *P. vivax*. Além disso, outros achados do estudo incluem:

- ✓ Gametócitos femininos estão presentes em maior concentração durante a infecção de *P. vivax*;
- ✓ A densidade de gametócitos de *P. vivax* apresenta uma correlação direta com a parasitemia sanguínea total;
- ✓ O status de CYP2D6 não está associado ao *clearance* de gametócitos;
- ✓ Indivíduos com o fenótipo de metabolização nula de CYP2D6 apresentaram maiores concentrações de PQ e redução do *clearance* de gametócitos.

Estes achados reforçam a necessidade da realização de mais estudos relacionando fatores farmacogenéticos à manutenção da densidade de gametócitos, buscando determinar novos esquemas terapêuticos personalizados com o objetivo de reduzir a transmissão de malária.

REFERÊNCIAS

ADAPA, S. R. et al. Plasmodium vivax readiness to transmit: Implication for malaria eradication. **BMC Systems Biology**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2019.

ALMEIDA, A. C. G. et al. High proportions of asymptomatic and submicroscopic Plasmodium vivax infections in a peri-urban area of low transmission in the Brazilian Amazon. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2018.

ALVAREZ, L. C. S. et al. Plasmodium vivax Gametocytes Adherence to Bone Marrow Endothelial Cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. June, p. 1–7, 2021.

AMIES, C. R. Use of plasmoquine in subtertian malaria. **Bull Inst Med Res Fed Malay States**, v. 5, p. 1–37, 1930.

ARLT, W. et al. Congenital adrenal hyperplasia caused by mutant P450 oxidoreductase and human androgen synthesis: Analytical study. **Lancet**, v. 363, n. 9427, p. 2128–2135, 2004.

ARROYO-ARROYO, M. et al. Efficacy of Different Primaquine Regimens to Control Plasmodium falciparum Gametocytemia in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 712–718, 2017.

AYDIN-SAYITOGIU, M. et al. Role of CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1, GSTT1, and GSTM1 genes in the susceptibility to acute leukemias. **American Journal of Hematology**, v. 81, n. 3, p. 162–170, 2006.

BABIKER, H. A. et al. Detection of low level Plasmodium falciparum gametocytes using reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 143–148, 1999.

BABIKER, H. A.; SCHNEIDER, P. Application of molecular methods for monitoring transmission stages of malaria parasites. **Biomedical Materials**, v. 3, n. 3, 2008.

BAIRD, J. K. Resistance to therapies for infection by Plasmodium vivax. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 3, p. 508–534, 2009.

BAIRD, J. K.; BATTLE, K. E.; HOWES, R. E. Primaquine ineligibility in anti-relapse therapy of Plasmodium vivax malaria: The problem of G6PD deficiency and cytochrome P-450 2D6 polymorphisms. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 4–9, 2018.

- BARBER, M. A.; KOMP, W. H. W.; NEWMAN, B. M. The effect of small doses of Plasmochin on the viability of gametocytes of malaria as measured by mosquito infection. **Public Health Reports**, v. 44, p. 1409–1414, 1929.
- BELL, D.; WONGSRICHANALAI, C.; BARNWELL, J. W. Ensuring quality and access for malaria diagnosis: How can it be achieved? **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 9 SUPPL., p. 7–20, 2006.
- BENNETT, J. W. . E. AL. Primaquine Failure and Cytochrome P-450 2D6 in Plasmodium vivax Malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 14, p. 1381–1382, 2013.
- BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C. Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 377–410, 2011.
- BRASIL, L. W. et al. CYP2D6 activity and the risk of recurrence of Plasmodium vivax malaria in the Brazilian Amazon: A prospective cohort study. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–6, 2018.
- BRUNTON, LAURENCE L; CHABNER, BRUCE A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12a. ed. Porto Alegre: AMGH Editora LTDA, 2012.
- CAMARDA, G. et al. Antimalarial activity of primaquine operates via a two-step biochemical relay. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.
- CAUDLE, K. E. et al. Standardizing CYP2D6 Genotype to Phenotype Translation: Consensus Recommendations from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group. **Clinical and Translational Science**, v. 13, n. 1, p. 116–124, 2019.
- CHEN, J.; KADLUBAR, F. F.; CHEN, J. Z. DNA supercoiling suppresses real-time PCR: A new approach to the quantification of mitochondrial DNA damage and repair. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 4, p. 1377–1388, 2007.
- COLEMAN, R. E. et al. Infectivity of asymptomatic Plasmodium-infected human populations to Anopheles dirus mosquitoes in western Thailand. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 2, p. 201–208, 2004.
- DAY, K. P.; HAYWARD, R. E.; DYER, M. The biology of Plasmodium falciparum

transmission stages. **Parasitology**, v. 116, n. SUPPL. 1, 1998.

DE MELO, G. C. et al. Performance of a sensitive haemozoin-based malaria diagnostic test validated for vivax malaria diagnosis in Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2021.

DELVES, M. et al. The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of plasmodium: A comparative study with human and rodent parasites. **PLoS Medicine**, v. 9, n. 2, 2012.

DEMANGA, C. G. et al. The development of sexual stage malaria gametocytes in a Wave Bioreactor. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.

DEYE, G. A.; MAGILL, A. J. Primaquine for prophylaxis of malaria: Has the CYP sailed? **Journal of Travel Medicine**, v. 21, n. 1, p. 67–69, 2014.

EBRECHT, A. C. et al. Biochemical and structural insights into the cytochrome P450 reductase from *Candida tropicalis*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

EICHNER, M. et al. Genesis, sequestration and survival of *Plasmodium falciparum* gametocytes: Parameter estimates from fitting a model to malariatherapy data. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 5, p. 497–501, 2001.

FLÜCK, C. E. et al. Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome. **Nature Genetics**, v. 36, n. 3, p. 228–230, 2004.

FRIEDRICH, D. C. et al. Distribution of CYP2D6 alleles and phenotypes in the Brazilian population. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 5–12, 2014.

GAEDIGK, A. et al. The CYP2D6 activity score: Translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 83, n. 2, p. 234–242, 2007.

GAEDIGK, A. et al. Ten years' experience with the CYP2D6 activity score: A perspective on future investigations to improve clinical predictions for precision therapeutics. **Journal of Personalized Medicine**, v. 8, n. 2, p. 1–15, 2018.

GAMAGE-MENDIS, A. C. et al. Infectious reservoir of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria in an endemic region of Sri Lanka. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, p. 479–487, 1991.

- GONG, L. et al. Polymorphisms in cytochrome P450 oxidoreductase and its effect on drug metabolism and efficacy. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 27, n. 9, p. 337–346, 2017.
- GREEN, R. The treatment of crescent carriers with plasmoquine compound. **Bull Inst Med Res Fed Malay States**, v. 3, p. 4–21, 1929.
- GUTIERREZ, A. et al. Interflavin electron transfer in human cytochrome P450 reductase is enhanced by coenzyme binding: Relaxation kinetic studies with coenzyme analogues. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 12, p. 2612–2621, 2003.
- GW, D.; RV, B. The value of plasmoquine as a gametocide in sub-tertian malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, p. 447–450, 1947.
- HALLETT, R. L. et al. Chloroquine/Sulphadoxine-Pyrimethamine for Gambian Children with Malaria: Transmission to Mosquitoes of Multidrug-Resistant Plasmodium falciparum. **PLoS Clinical Trials**, v. 1, n. 3, p. e15, 2006.
- HART, S. N. et al. Novel SNPs in cytochrome P450 oxidoreductase. **Drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 22, n. 4, p. 322–326, 2007.
- HART, S. N.; ZHONG, X. B. P450 oxidoreductase: Genetic polymorphisms and implications for drug metabolism and toxicity. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 4, n. 4, p. 439–452, 2008.
- HOFMANN, N. et al. Ultra-Sensitive Detection of Plasmodium falciparum by Amplification of Multi-Copy Subtelomeric Targets. **PLoS Medicine**, v. 12, n. 3, p. 1–21, 2015.
- HOWES, R. E. et al. Global epidemiology of Plasmodium vivax. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. Suppl 6, p. 15–34, 2016.
- HUANG, N. et al. Diversity and function of mutations in P450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler syndrome and disordered steroidogenesis. **American Journal of Human Genetics**, v. 76, n. 5, p. 729–749, 2005.
- IDKOWIAK, J. et al. Cytochrome P450 Oxidoreductase Deficiency. In: **GeneReviews**. Seattle: University of Washington, 2017. p. 1–23.
- JOAN INGRAM, R. H. et al. The clinical and public health problem of relapse despite primaquine therapy: case review of repeated relapses of Plasmodium vivax acquired in Papua New Guinea. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2014.

- KARIUKI, S. N. et al. Red blood cell tension protects against severe malaria in the Dantu blood group. **Nature**, v. 585, n. 7826, p. 579–583, 2020.
- KOCH, W. H. Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 749–761, 2004.
- KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, p. 1–11, 1985.
- LADEIA-ANDRADE, S. et al. Monitoring the Efficacy of Chloroquine-Primaquine Therapy for Uncomplicated Plasmodium vivax Malaria in the Main Transmission Hot Spot of Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 5, p. 1–14, 2019.
- LENSEN, A. et al. Plasmodium falciparum: Infectivity of cultured, synchronized gametocytes to mosquitoes. **Experimental Parasitology**, v. 91, n. 1, p. 101–103, 1999.
- LOUZADA, J. et al. The impact of imported Malaria by gold miners in roraima: Characterizing the spatial dynamics of autochthonous and imported malaria in an urban region of boa vista. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, n. 6, p. 1–10, 2020.
- LYNCH, T.; PRICE, A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. **American Family Physician**, v. 76, n. 3, p. 391–396, 2007.
- MANSON-BAHR, P. The Action of Plasmochin on Malaria. **Tropical Diseases and Parasitology**, v. 20, p. 919–926, 1927.
- MARCSISIN, S. R.; REICHARD, G.; PYBUS, B. S. Primaquine pharmacology in the context of CYP 2D6 pharmacogenomics: Current state of the art. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 161, p. 1–10, 2016.
- MATHISON, B. A.; PRITT, B. S. Update on Malaria Diagnostics and Test Utilization. v. 55, n. 7, p. 2009–2017, 2017.
- MELLO, A. G. N. C. et al. Levels of primaquine and carboxyprimaquine in patients with malaria vivax from the brazilian amazon basin. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 60, n. September, p. 1–6, 2018.
- MIHALY, G. et al. Pharmacokinetics of primaquine in man. I. Studies of the absolute bioavailability and effects of dose size. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 19, n. 6, p. 745–750, 1985.

MIZUTANI, M. Impacts of diversification of cytochrome P450 on plant metabolism. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 6, p. 824–832, 2012.

MJ, M.; QN, E. Observations on the action of quinine, atebirin and plasmoquine on the gametocytes of *Plasmodium falciparum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 455–463, 1949.

MONS, B. et al. Synchronized erythrocytic schizogony and gametocytogenesis of *Plasmodium berghei* in vivo and in vitro. **Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 423–430, 1985.

MUELLER, I. et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p. 555–566, 2009.

MURTA, F. L. G. et al. Perceptions about malaria among Brazilian gold miners in an Amazonian border area: perspectives for malaria elimination strategies. **Malaria Journal**, v. 20, n. 1, p. 1–14, 2021.

MWAISWELO, R. O. et al. A single low dose of primaquine is safe and sufficient to reduce transmission of *Plasmodium falciparum* gametocytes regardless of cytochrome P450 2D6 enzyme activity in Bagamoyo district, Tanzania. **Malaria Journal**, v. 21, n. 1, p. 1–15, 2022.

NGUITRAGOOL, W. et al. Very high carriage of gametocytes in asymptomatic low-density *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections in western Thailand. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 512, 2017.

NGWA, C. J.; ROSA, T. F. DE A.; PRADEL, G. **The Biology of Malaria Gametocytes**. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/52526>>.

OLAFSON, K. N. et al. Antimalarials inhibit hematin crystallization by unique drug–surface site interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 29, p. 7531–7536, 2017.

OUÉDRAOGO, A. L. et al. Substantial contribution of submicroscopical *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage to the infectious reservoir in an area of seasonal transmission. **PLoS ONE**, v. 4, n. 12, p. 8–12, 2009.

P M GRAVES, T. R. B. R. C. J. A. C. M. L. J. P. B. J. B. F. D. G. D. J. B. M. P. A. Measurement of malarial infectivity of human populations to mosquitoes in the Madang area, Papua New Guinea. **Parasitology**, v. 96, p. 251–263, 1988.

- PAN, X.; NING, M.; JEONG, H. Transcriptional regulation of CYP2D6 expression. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 45, n. 1, p. 42–48, 2016.
- PANDEY, A. V.; FLÜCK, C. E. NADPH P450 oxidoreductase: Structure, function, and pathology of diseases. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 138, n. 2, p. 229–254, 2013a.
- PANDEY, A. V.; FLÜCK, C. E. NADPH P450 oxidoreductase: Structure, function, and pathology of diseases. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 138, n. 2, p. 229–254, 2013b.
- PANDEY, A. V.; SPROLL, P. Pharmacogenomics of human P450 oxidoreductase. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5 MAY, n. May, p. 1–11, 2014.
- PETT, H. et al. CYP2D6 Polymorphisms and the Safety and Gametocytocidal Activity of Single-Dose Primaquine for Plasmodium falciparum . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 10, 2019.
- PHILLIPS, A. H.; LANGDON, R. G. Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: isolation, characterization, and kinetic studies. **The Journal of biological chemistry**, v. 237, n. 8, p. 2652–2660, 1962.
- POPOVICI, J. et al. Genomic analyses reveal the common occurrence and complexity of plasmodium vivax relapses in cambodia. **mBio**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2018.
- PORTER, T. D. New insights into the role of cytochrome P450 reductase (POR) in microsomal redox biology. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 2, p. 102–106, 2012.
- POTTER, B. M. J. et al. Differential CYP 2D6 metabolism alters primaquine pharmacokinetics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 2380–2387, 2015.
- PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. M. The silent path to thousands of merozoites: The Plasmodium liver stage. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 849–856, 2006.
- PUKRITTAYAKAMEE, S. et al. Effects of different antimalarial drugs on gametocyte carriage in P. vivax malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 3, p. 378–384, 2008.
- PYBUS, B. S. et al. CYP450 phenotyping and accurate mass identification of metabolites of the 8-aminoquinoline, anti-malarial drug primaquine. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 1, 2012.
- PYBUS, B. S. et al. The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP

2D6. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 1, 2013.

RECHT, J. et al. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: Current challenges in malaria control and elimination. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2017.

RIECKMANN, K. H. et al. Gametocytocidal and sporontocidal effects of primaquine and of sulfadiazine with pyrimethamine in a chloroquine-resistant strain of *Plasmodium falciparum*. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 38, n. 4, p. 625–632, 1968.

RIECKMANN, K. H. et al. Gametocytocidal and sporontocidal effects of primaquine upon two strains of *Plasmodium falciparum*. **Military medicine**, v. 134, n. 10, p. 802–819, 1969.

RN, C.; BC, B. A preliminary report of the effect of anti malarial drugs on the infectivity of the patients to the mosquitoes. **Indian Journal of Medical Research**, v. 25, p. 459–464, 1937.

ROBERT, V. et al. Effect of gametocyte sex ratio on infectivity of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 6, p. 621–624, 1996.

SANDEE, D. et al. Effects of genetic variants of human P450 oxidoreductase on catalysis by CYP2D6 in vitro. **Simulation in Healthcare**, v. 5, n. 5, p. 677–686, 2010.

SAÚDE, M. DA. **Guia de tratamento da malária no Brasil**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_>.

SCHNEIDER, P. et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 3, p. 470–474, 2007.

SHEKALAGHE, S. et al. Primaquine Clears Submicroscopic *Plasmodium falciparum* Gametocytes that Persist after Treatment with Sulphadoxine-Pyrimethamine and Artesunate. **PLoS ONE**, n. 10, p. 1–8, 2007.

SICILIANO, G.; ALANO, P. Enlightening the malaria parasite life cycle: Bioluminescent *Plasmodium* in fundamental and applied research. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAY, 2015.

SILVINO, A. C. R. et al. Variation in Human Cytochrome P-450 drug-metabolism genes: A gateway to the understanding of *plasmodium vivax* relapses. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–14, 2016.

- SILVINO, A. C. R. et al. Novel insights into Plasmodium vivax therapeutic failure: CYP2D6 activity and time of exposure to malaria modulate the risk of recurrence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 5, p. 1–14, 2020.
- SIM, S. C.; INGELMAN-SUNDBERG, M. The human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature website: A peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. **Human Genomics**, v. 4, n. 4, p. 278–281, 2010.
- SIMÕES, L. R. et al. Factors associated with recurrent Plasmodium vivax malaria in Porto Velho, Rondônia state, Brazil, 2009. **Cadernos de Saude Publica**, v. 30, n. 7, p. 1403–1417, 2014.
- SMITH, T. et al. Mapping the densities of malaria vectors within a single village. **Acta Tropica**, v. 59, n. 1, p. 1–18, 1995.
- STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287–1290, 2006.
- TADESSE, F. G. et al. The shape of the iceberg: Quantification of submicroscopic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax parasitaemia and gametocytaemia in five low endemic settings in Ethiopia. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2017.
- TANGPUKDEE, N. et al. Malaria diagnosis: A brief review. **Korean Journal of Parasitology**, v. 47, n. 2, p. 93–102, 2009.
- TEH, L. K.; BERTILSSON, L. Pharmacogenomics of CYP2D6: Molecular genetics, interethnic differences and clinical importance. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 27, n. 1, p. 55–67, 2012.
- TORNIO, A.; BACKMAN, J. T. **Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. v. 83
- VALLEJO, A. F. et al. Global genetic diversity of the Plasmodium vivax transmission-blocking vaccine candidate Pvs48/45. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2016.
- VAN DER KOLK, M. et al. Evaluation of the standard membrane feeding assay (SMFA) for the determination of malaria transmission-reducing activity using empirical data. **Parasitology**, v. 130, n. 1, p. 13–22, 2005.
- VAN DIJK, M. R. et al. A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility. **Cell**,

v. 104, n. 1, p. 153–164, 2001.

VASQUEZ-VIVAR, J.; AUGUSTO, O. Hydroxylated metabolites of the antimalarial drug primaquine. Oxidation and redox cycling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 10, p. 6848–6854, 1992.

VERMILION, J. L. et al. Separate roles for FMN and FAD in catalysis by liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 1, p. 266–277, 1981.

WAMPFLER, R. et al. Strategies for Detection of Plasmodium species Gametocytes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 6–9, 2013.

WANG, S. L. et al. Genetic variation of human cytochrome P450 reductase as a potential biomarker for mitomycin C-induced cytotoxicity. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 1, p. 176–179, 2007.

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

WHO. **World Malaria Report**. Geneva, Swiss: [s.n.]. 2021

WHO. **World Malaria Report**. Geneva, Swizz [s.n]. 2020

WILLIAMS, C. H.; KAMIN, H. Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver. **The Journal of biological chemistry**, v. 237, n. 2, p. 587–595, 1962.

WOLFARTH-COUTO, B.; DA SILVA, R. A.; FILIZOLA, N. Variability in malaria cases and the association with rainfall and rivers water levels in Amazonas State, Brazil. **Cadernos de Saude Publica**, v. 35, n. 2, 2019.

XIAO, X. et al. Functional POR A503V is associated with the risk of bladder cancer in a Chinese population. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–11, 2015.

ZHANG, X. et al. Identification of cytochrome P450 oxidoreductase gene variants that are significantly associated with the interindividual variations in warfarin maintenance dose. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 39, n. 8, p. 1433–1439, 2011.