

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

Recorrências na malária por *Plasmodium vivax*: variabilidade genética da enzima do complexo citocromo P450 2D6 (CYP2D6) e sua influência na falha terapêutica por primaquina

por

Ana Carolina Rios Silvino



Belo Horizonte
2019

Ana Carolina Rios Silvino

Recorrências na malária por *Plasmodium vivax*: variabilidade genética da enzima do complexo citocromo P450 2D6 (CYP2D6) e sua influência na falha terapêutica por primaquina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde – Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática – BCM-GB.

Orientadora: Dra. Taís Nóbrega de Sousa

Coorientadora: Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito

Belo Horizonte
2019

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

S587r Silvino, Ana Carolina Rios.
2019

Recorrências na malária por *Plasmodium vivax*: variabilidade na enzima do complexo citocromo P450 2D6 (CYP2D6) e sua influência na falha terapêutica por primaquina / Ana Carolina Rios Silvino. – Belo Horizonte, 2019

XVI, 122 f., Il, 210 x 297 mm

Bibliografia: f. 105-122

Dissertação de mestrado – Dissertação para obtenção do título de Mestra 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 – BCM-GB

1. Malária 2. *Plasmodium vivax*/efeitos dos fármacos 3. CYP2D6. 4. primaquina . I. Título. II. Sousa, Taís Nóbrega (Orientação). III. Brito, Cristiana Ferreira Alves (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.936

Ana Carolina Rios Silvino

Recorrências na malária por *Plasmodium vivax*: variabilidade genética da enzima do complexo citocromo P450 2D6 (CYP2D6) e sua influência na falha terapêutica por primaquina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde – Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática – BCM-GB.

Prof. Dra. Simone Ladeira-Andrade (Presidente)

Prof. Dra. Luiza Carvalho Mourão

Prof. Dra. Isabela Penna Cerávolo

Dissertação defendida e aprovada em: 27/02/2019

Dedicatória

Às minhas orientadoras,
Dra. Taís Nóbrega de Sousa e Dra. Cristiana Brito,
por toda a dedicação e incentivo.

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem”.

Guimarães Rosa

Agradecimentos

À **Deus**, por Tua existência em cada detalhe. Só Tu, Senhor, és a chave para o sucesso de tudo. Obrigada por tornardes as minhas conquistas expressão fiel da Tua vontade, por me dar forças e sabedoria para alcançar tudo que eu sempre sonhei. Obrigada por Teu amor incomensurável, por estar ao meu lado nas adversidades e por realizar todos os Teus propósitos em minha vida, da maneira mais linda possível. Foi um tempo de sonhos, conquistas e realizações!

Agradeço à minha orientadora e amiga, **Dra. Taís Nóbrega**, que muito mais do que transmitir o saber, me ensinou a pesquisar, a refletir e a questionar, e assim, abriu as portas para a construção das minhas próprias opiniões. Obrigada, Taís, por ser tão amorosa e por permitir-me chegar onde estou hoje. Obrigada pela confiança, pelo incentivo e pelos obstáculos, pois foram eles que me permitiram amadurecer e crescer. Desejo um dia ser o reflexo de toda a sua exímia dedicação, exemplo e incentivo!

À minha coorientadora e incentivadora, **Dra. Cristiana Brito**, que me fez apaixonar e vislumbrar o mundo da pesquisa. Obrigada, Cris, por trazer luz às minhas escolhas e me impulsionar, sempre, a percorrer um caminho de conquistas e sucesso! Você é muito especial para mim!

À **Dra. Luzia Carvalho**, sempre solícita, por sua objetividade e dedicação durante toda a minha trajetória científica. Obrigada, Luzia, pelos conselhos e ensinamentos que refletem toda a sua competência. Você é uma pesquisadora brilhante, a quem muito admiro! À **Dra. Flora Kano**, pelo apoio e auxílio que me iluminaram durante toda a minha caminhada.

À **CAPES**, pela concessão da minha bolsa de mestrado, pela oportunidade e incentivo à realização da nossa pesquisa! Este trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. À **FAPEMIG**, pelo grande investimento em nosso projeto, minimizando as necessidades de recursos advindas na condução do estudo. Ao **CNPq**, pela oportunidade de Iniciação Científica (PIBIC), precedente a realização do meu mestrado. O impacto da ciência neste período inicial da minha formação ultrapassou o conhecimento das questões científicas e de suas aplicações práticas; trouxe um elemento de rigor e precisão, particularmente útil em várias outras esferas da minha vida. À **Fiocruz Minas** – Instituto René Rachou (IRR), pelo espaço e infraestrutura destinados à pesquisa. A perspectiva da importância da pesquisa científica e tecnológica no SUS reforça e guia minha busca por um desenvolvimento verdadeiramente sustentável e voltado a realidade da sociedade como um todo. Agora, faz parte de minha responsabilidade social entrar em debate para apontar falhas e práticas para melhorias da ciência brasileira.

Agradeço ao **Pedro Aguiar, Fernanda Raad e Sandra Gava**, pela presteza e carinho no acompanhamento e utilização da Plataforma de PCR do IRR. Obrigada pela disponibilidade, ajuda e confiança! Aos **pesquisadores do IRR**, pelas disciplinas e construção do conhecimento. À **Embaixada da França**, pela experiência incrível de ter sido selecionada a conhecer um pouco da ciência e do desenvolvimento do país. A oportunidade de fazer pesquisa no exterior, de fato, abriu novos horizontes e perspectivas. À **UFMG**, por proporcionar-me uma formação completa no âmbito da genética e farmacogenética. Agradeço ao **Dr. Renan Pedra**, pela disponibilidade, apoio e por compartilhar comigo tantas experiências e conhecimento em genética e estatística. Obrigada por fazer parte da minha formação! À **Dra. Simone Ladeia, Dra. Luiza Mourão e Dra. Isabella Cerávolo**, pela oportunidade de avaliar e discutir nosso projeto. As sugestões de vocês contribuíram de forma significativa para a conclusão deste trabalho!

Agradecimentos

Ao **Dr. André Siqueira**, **Dra. Anielle Pina** (INI – Rio de Janeiro) e **Dr. Marcelo Urbano** (USP), grandes exemplos de pesquisadores e colaboradores, pela parceria e auxílio nas investigações das falhas terapêuticas. Obrigada pela oportunidade e confiança no trabalho que realizamos juntos!

Aos meus **amigos do laboratório de Malária** por me guiarem e auxiliarem em todos os momentos. Ao meu querido amigo, **Daniel**, que compartilhou comigo todos os momentos durante meu mestrado – disposto a me ajudar sempre que necessário. Às minhas grandes amigas **Gabi** e **Denise**, por serem o meu ponto de apoio e tornarem meus dias mais leves e agradáveis. Obrigada por fazerem minha trajetória ser especial de alguma maneira e me mostrarem que nunca estou sozinha! Às minhas princesas, **Dani R.**, **Michelle**, **Raianna** e **Letícia**, pela delicadeza, amor e cuidado nos pequenos detalhes. Obrigada por estarem comigo em todos os momentos! À **Danielle**, minha duplinha de trabalho e companheira, por compartilhar comigo tantos momentos e resultados bons. À **Mika**, **Camila B.**, **Helena** e **Ruth**, pela doçura e delicadeza, sempre prontas a me ajudar. Ao **Luíz**, meu grande exemplo de persistência e força de vontade. À **Camilla Valente**, **Jéssica**, **Marina** e **Bárbara**, pelo carinho e apoio em todos os momentos. Vocês são especiais! À **Aracele**, **Gabriel**, **Carolina M.** e **Laura** pelo suporte e ajuda durante a minha caminhada. Ao **Pedro Sucupira**, meu amigo e companheiro de mestrado por ser o meu parceiro e compartilhar comigo tantos momentos bons, em congressos e na vida.

Agradeço ao **Comitê Estudantil** do IRR, por estarmos sempre aliados na execução de cursos e projetos científicos em nossa Instituição. Ao **Dr. Rubens do Monte**, nosso mentor, pelos conselhos, carinho e companheirismo. Seus exemplos e iniciativas nos fazem caminhar em busca de uma ciência com autonomia, relevância e com implicações consequentes para o desenvolvimento científico e tecnológico do país. Obrigada pelo incentivo e por estar presente em todos os momentos – memoráveis!

Aos meus amigos do Laboratório de **Triatomíneos, Mosquitos e Vetores e Imunopatologia (LAIM)**, pelas viagens e momentos de descontração. À **Irene** (equipe de limpeza do IRR), por alegrar todas as minhas manhãs com humildade e amor. Ao meu amigo e exemplo de pesquisador, **Benoît Malleret**, pela ajuda durante o início da minha caminhada. Aos meus grandes amigos da **Neurociência** (UFMG), por caminharem comigo em prol da ciência, em outro universo e perspectiva.

Agradeço aos meus pais, **Clayton** e **Ana Cristina**, por serem o meu alicerce e exemplo de amor e confiança. Obrigada por me incentivarem na realização de todos os meus sonhos e me darem o suporte necessário para chegar até aqui. Ao meu pai, agradeço por sua tranquilidade e lealdade, sempre me dando segurança e apoio nos momentos de fragilidade. À minha mãe, pelo olhar que tantas vezes me acalmou, pelo silêncio que me conforta e pelo colo que me envolveu a sensação de nunca estar só! Vocês são o que tenho de mais precioso nessa vida! À minha **vovó**, por ser meu maior exemplo de força e fé, sempre presente em meu coração. Seus exemplos me sustentam em todos os meus desafios e me fazem ir à busca de me tornar uma pessoa melhor. Ao amor da minha vida, **Wassim Balbessi**, por abrir as portas dos meus sonhos, do meu coração e caminhar comigo – lado a lado – na mesma direção. À minha **família e amigos**, por entenderem os meus momentos de ausência e mesmo assim estarem ao meu lado, me apoiando e incentivando.

Finalmente, aos **pacientes** com malária, sem os quais nosso trabalho não seria possível. Nossa dedicação à realização desta pesquisa foi estruturada para retribuir, de alguma forma, a confiança e o apoio de vocês. Vocês são o real reflexo da importância da pesquisa brasileira!

RESUMO

Plasmodium vivax representa um grande desafio para a eliminação da malária devido à sua capacidade de causar infecções recorrentes, a partir da reativação de parasitos latentes no fígado, os hipnozoítos. A primaquina (PQ) é o único medicamento antimalárico aprovado com efeito hipnozoiticida e sua eficácia depende da ativação metabólica pela enzima do complexo citocromo P450 2D6 (CYP2D6). Estudos recentes sugerem que a função reduzida de CYP2D6, causada por polimorfismos na enzima, leva à falha terapêutica da PQ, comumente administrada com a cloroquina, no tratamento para cura radical da malária por *P. vivax*. Aqui, analisamos as implicações da variabilidade genética do gene *CYP2D6* nas falhas terapêuticas por PQ na comunidade de Rio Pardo, área de transmissão instável de malária no estado do Amazonas. Na área de estudo, as recorrências de *P. vivax* foram responsáveis por aproximadamente 18% dos casos clínicos relatados anualmente (2003 e 2013). A prevalência de indivíduos com atividade reduzida de CYP2D6 (fenótipos gPM, gIM e gNM-S) foi de 25,4% (64/252 indivíduos). Para avaliar a associação entre CYP2D6 e o número de recorrências na malária por *P. vivax*, um modelo de Regressão Binomial Negativo foi ajustado para local e tempo de residência na área endêmica de malária. Um achado importante foi que indivíduos com níveis reduzidos de atividade de CYP2D6 apresentaram o dobro do risco de recorrência em comparação a indivíduos com enzima funcional (gNM-S e gUM) (Razão de risco = 1,75, IC 95% 1,2 – 2,6; $P = 0,003$). O risco de recorrência também foi maior para indivíduos que vivem em áreas ribeirinhas, às margens do rio que atravessa a comunidade (Razão de risco = 2,68, IC 95% 1,9-2,8; $P < 0,0001$). No entanto, indivíduos que viviam por mais tempo na região amazônica apresentaram um menor risco de recorrência da infecção por *P. vivax* (Razão de risco 0,97, IC 95% 0,96 – 0,98; $P < 0,0001$). Quando analisado a influência da atividade reduzida da enzima no tempo de recorrência, o fenótipo de CYP2D6 não influenciou o intervalo entre o episódio inicial e a recorrência ($P = 0,357$, Teste de *Log-rank*). Em conjunto, nossos achados têm implicações diretas para o controle da malária, uma vez que foi demonstrado que 25% dos indivíduos, em área de transmissão instável de malária, podem não responder adequadamente ao tratamento com PQ-CQ devido à redução da atividade de CYP2D6. Além disso, sugerimos que: a resposta imune individual e a exposição à transmissão da malária modulam e influenciam a susceptibilidade a recorrências por *P. vivax*, em pacientes com atividade reduzida da enzima. Essa associação pode ser válida como resultado para a otimização do uso de antimaláricos, sugerindo a terapia individualizada, com ajuste da dosagem de PQ e acompanhamento do paciente, como alternativa eficaz para o controle e eliminação dos hipnozoítos de *P. vivax*.

Palavras-chave: Malária; *Plasmodium vivax*; Primaquina; CYP2D6; Falha terapêutica.

ABSTRACT

Plasmodium vivax relapse is one of the major reasons for sustained global malaria transmission. Primaquine (PQ) is the only approved antimalarial drug for preventing relapses and its efficacy is dependent on the metabolic activation by cytochrome P450 2D6 (CYP2D6). Impaired CYP2D6 function, caused by allelic polymorphisms, leads to the therapeutic failure of PQ as a radical cure for *P. vivax* malaria. Here, we hypothesized that host genetics, immune response and epidemiological factors modulate susceptibility to *P. vivax* recurrences in association with reduced CYP2D6 metabolism status. To further investigate this association, we performed a community-based study by genotyping *CYP2D6* polymorphisms in individuals with varied number of *P. vivax* recurrences from the Brazilian Amazon region. We evaluated the variability of nine polymorphisms by Real Time PCR System using *Taqman Drug Genotyping Assays*, specific for each polymorphism and the gene copy number. *CYP2D6* alleles were inferred by PHASE and *CYP2D6* phenotypes were classified using *Activity Score System*. In the study area, we showed that *P. vivax* recurrences were responsible for approximately 18% of clinical cases reported annually between 2003 and 2013. The prevalence of individuals with reduced CYP2D6 activity was 25%. Individuals with CYP2D6 reduced activity had almost double the risk of recurrence compared to subjects with normal enzyme function (risk ratio 1.75, 95% CI 1.2 – 2.6, $P = 0.003$). The risk of recurrence was also higher for individuals living along the local streams (riverine population) (risk ratio 2.68, 95% CI 1.9 – 3.8, $P < 0.0001$). However, subjects living for a longer time in the Amazon region showed a reduced risk of *P. vivax* malaria recurrences (risk ratio 0.97, 95% CI 0.96 – 0.98, $P < 0.0001$). Thus, we provided strong evidence for role of the host and epidemiological factors in modulation of risk of recurrence in an area of unstable malaria transmission. Our findings have direct implications for malaria control since it has been shown that the presence of individuals that do not respond adequately to the treatment due to reduced CYP2D6 activity can still transmit the disease, due the increased susceptibility to recurrences, challenging sustainable progress towards *P. vivax* malaria elimination.

Keywords: Malaria; *Plasmodium vivax*; Primaquine; CYP2D6; Therapeutic failure.

Lista de Figuras

Figura 1. Distribuição geográfica de áreas de risco de malária no mundo, 2018.....	19
Figura 2. Mapa de risco para malária por município de infecção	20
Figura 3. Evolução do número de casos de malária no Brasil de 1959 a 2016.....	22
Figura 4. Fêmeas do mosquito vetor transmitem parasitos de <i>Plasmodium vivax</i> no estágio de esporozoítos para o hospedeiro humano durante o repasto sanguíneo.....	24
Figura 5. Mecanismo proposto e sequência de ativação de recaídas de <i>Plasmodium vivax</i> em área endêmica de malária	27
Figura 6. Incidência global de recaída, ajustada por tempo médio de recaída.....	29
Figura 7. Recorrências da malária por <i>Plasmodium vivax</i>	31
Figura 8. Tratamento atual de primeira linha para a cura radical da infecção por <i>Plasmodium vivax</i>	34
Figura 9. Processo de biotransformação da primaquina no fígado	39
Figura 10. Vias metabólicas envolvidas na farmacocinética da primaquina, mediadas por CYP2D6 e Monoamina Oxidase-A	40
Figura 11. Polimorfismos no locus CYP2D6.....	42
Figura 12. Frequências alélicas de CYP2D6 em todas as populações do mundo	44
Figura 13. Esquema das relações genótipo-fenótipo de CYP2D6 e suas consequências farmacocinéticas e clínicas	46
Figura 14. Classificação fenotípica baseada no Sistema de Pontuação de alelos de <i>CYP2D6</i> (<i>Activity Score System</i>)	48
Figura 15. Assentamento agrícola de Rio Pardo	54
Figura 16. Estimativa da proporção de indivíduos que apresentou episódios de recorrência de infecção por <i>Plasmodium vivax</i> após tratamento com CQ-PQ no assentamento de Rio Pardo	65
Figura 17. Mapa de Desequilíbrio de Ligação no gene <i>CYP2D6</i> gerados pelo <i>Haploview</i>	69
Figura 18. Haplótipos preditos para os indivíduos do estudo com as suas respectivas classificações alélicas e atividade fenotípica de CYP2D6	70
Figura 19. Frequência das variantes alélicas de CYP2D6 encontradas na comunidade de Rio Pardo nos grupos sem recorrência e com recorrência da infecção por <i>Plasmodium vivax</i>	71
Figura 20. Comparação das frequências fenotípicas preditas para CYP2D6 em indivíduos de Rio Pardo (n = 261)	73
Figura 21. Barplot da ancestralidade individual estimada para os indivíduos de Rio Pardo com o software <i>Structure</i> para Africanos (azul), Nativo Americanos (vermelho) e Europeus (vermelho escuro).....	75
Figura 22. Proporção de ancestralidade africana, nativo americana e europeia entre os grupos sem recorrência (n = 69), com única (n = 19) e múltiplas recorrências (n = 35) na comunidade de Rio Pardo	75
Figura 23. Frequência dos alelos de <i>CYP2D6</i> entre indivíduos com ancestralidade nativo americana (n cromossomos = 50), europeia (n cromossomos = 57) e miscigenado (n cromossomos = 120).....	76

Lista de Figuras

Figura 24. Frequência da atividade enzimática de CYP2D6 predita entre os grupos de indivíduos sem recorrência (n = 130) e indivíduos com um único (n = 51) ou múltiplos (n = 71) episódios de recorrência.....	78
Figura 25. Número predito de recorrências em indivíduos com atividade reduzida e normal de CYP2D6 na população ribeirinha e não ribeirinha de Rio Pardo.....	79
Figura 26. Razão de chance de recorrência em indivíduos com atividade normal e reduzida de CYP2D6	81
Figura 27. Curva <i>Kaplan-Meier</i> para o efeito da atividade de CYP2D6 no tempo da primeira recorrência da infecção por <i>Plasmodium vivax</i>	82
Figura 28. Fluxograma representando os principais resultados do estudo.....	95
Figura 29. Periodicidade das recaídas reportadas no caso clínico #1 do Rio de Janeiro e respectivos tratamentos terapêuticos, com ajuste de drogas nos episódios de recaída por <i>Plasmodium vivax</i>	98
Figura 30. Periodicidade das recaídas reportadas no caso clínico #2 do Rio de Janeiro e respectivos tratamentos terapêuticos, com ajuste de drogas nos episódios de recaída por <i>Plasmodium vivax</i>	99
Figura 31. Periodicidade das recaídas reportadas no caso clínico #3 do Rio de Janeiro e respectivos tratamentos terapêuticos, com ajuste de drogas nos episódios de recaída por <i>Plasmodium vivax</i>	100

Lista de Tabelas

Tabela 1. Tratamento das infecções por <i>Plasmodium vivax</i> com cloroquina em três dias e primaquina em sete dias (esquema curto) preconizado pelo Ministério da Saúde	36
Tabela 2. Variantes de <i>CYP2D6</i> genotipadas na população de estudo.....	57
Tabela 3. Haplótipos de <i>CYP2D6</i> preditos por comparação aos disponíveis no banco de dados <i>Pharmaceutical Variation Consortium (PharmVar)</i>	59
Tabela 4. Valores atribuídos aos alelos de <i>CYP2D6</i> identificados nas amostras do estudo através do <i>Activity Score System</i>	60
Tabela 5. Dados demográficos e epidemiológicos de 261 indivíduos da comunidade de Rio Pardo.....	66
Tabela 6. Frequência de polimorfismos (SNPs e deleção) avaliados no gene <i>CYP2D6</i> nos grupos sem, com única e múltiplas recorrências na comunidade de Rio Pardo.....	67
Tabela 7. Frequência dos alelos de <i>CYP2D6</i> observados na população de Rio Pardo nos grupos sem, única e múltiplas recorrências	71
Tabela 8. Frequência dos diplótipos de <i>CYP2D6</i> na população de Rio Pardo.....	72
Tabela 9. Frequência dos alelos <i>CYP2D6</i> entre indivíduos com ancestralidade africana, nativo americana e europeia predominantes	77
Tabela 10. Ancestralidade individual estimada pelos grupos fenotípicos de <i>CYP2D6</i>	77
Tabela 11. Escore de atividade (AS) atribuído às variantes alélicas de <i>CYP2D6</i>	78
Tabela 12. Estimativa do risco relativo de episódios de recorrências em indivíduos com atividade reduzida de <i>CYP2D6</i> , a considerar exposição e susceptibilidade a infecções por <i>P. vivax</i>	80
Tabela 13. Estimativa do risco relativo de episódios de recorrências em indivíduos com atividade reduzida de <i>CYP2D6</i> , a considerar exposição e susceptibilidade a infecções por <i>Plasmodium vivax</i>	81
Tabela 14. Alelos e fenótipos de <i>CYP2D6</i> preditos.....	1011

Lista de abreviaturas e símbolos

AIM.....	Marcadores informativos de ancestralidade
CPQ.....	Carboxiprimaquina
CNV.....	Variação do número de cópias (<i>Copy Number Variation</i>)
CQ.....	Cloroquina
EDTA.....	Ácido etilenodiaminotetracético anticoagulante
EM.....	Metabolizador extensivo/normal
G6PD.....	<i>Glicose – 6 – fosfato desidrogenase</i>
HNF4- α	<i>Hepatocyte Nuclear Factor α</i>
IM.....	Metabolizador intermediário
LD.....	Desequilíbrio de ligação (<i>Linkage disequilibrium</i>)
PM.....	Metabolizador nulo
PQ.....	Primaquina
MAO-A.....	<i>Monoamina Oxidase A</i>
Markov Chain Monte Carlo.....	MCMC
NCBI.....	Centro Nacional de Informação em Biotecnologia
SIVEP.....	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica de Malária
SNPs.....	Polimorfismos de Nucleotídeo Único (<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>)
SNVs.....	Variantes de Nucleotídeo Único (<i>Single Nucleotide Variants</i>)
TQ.....	Tafenoquina

Sumário

1. Introdução	18
1.1. Malária no Brasil e no mundo	18
1.2. A malária por <i>Plasmodium vivax</i>	23
1.3. Recorrências por <i>Plasmodium vivax</i>	25
1.4. Tratamento da malária causada por <i>Plasmodium vivax</i>	32
1.4.1. Cloroquina	32
1.4.2. Primaquina.....	33
1.5. Desafios do uso da primaquina	35
1.5.1. Adesão ao tratamento	35
1.5.2. Efeitos adversos da primaquina.....	36
1.5.3. Tratamentos alternativos à primaquina para infecções por <i>Plasmodium vivax</i> ..	37
1.6. Efeito do metabolismo de CYP2D6 na farmacocinética/atividade da primaquina.....	38
1.7. Influência da variabilidade genética de <i>CYP2D6</i> no metabolismo de drogas.....	41
1.8. Tradução do genótipo de CYP2D6 em classes fenotípicas de acordo com a atividade enzimática	45
1.9. Efeito e implicações do metabolismo reduzido de CYP2D6	49
2. Justificativa	50
3. Hipótese de estudo	52
4. Objetivos	52
5. Métodos	53
5.1. Área e população de estudo.....	53
5.2. Classificação das recorrências e pacientes incluídos no estudo.....	55
5.3. Coleta de amostras de sangue e extração de DNA.....	56
5.4. Genotipagem de polimorfismos no gene <i>CYP2D6</i> por PCR em Tempo Real (qPCR).....	57
5.5. Número de cópias gênicas de <i>CYP2D6</i>	58
5.6. Predição dos haplótipos e classificação dos fenótipos de CYP2D6 (<i>Activity Score System</i>).....	59
5.7. Análises estatísticas.....	61
5.8. Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs) e estimativa da ancestralidade genômica individual	62

Capítulo 1	64
6. Resultados	64
6.1. Prevalência das recorrências por <i>Plasmodium vivax</i> no assentamento agrícola de Rio Pardo	64
6.2. Frequência dos alelos e fenótipos de CYP2D6 na comunidade de Rio Pardo	66
6.3. Distribuição de frequência das variantes de CYP2D6 em relação à ancestralidade genômica de indivíduos da Amazônia brasileira	74
6.4. Atividade reduzida de CYP2D6 aumenta o número de recorrência de <i>Plasmodium vivax</i>	77
7. Discussão	83
7.1. Classificação das recorrências e contribuição dos hipnozoítos para a transmissão da malária por <i>Plasmodium vivax</i> em Rio Pardo	83
7.2. Variabilidade da frequência alélica de <i>CYP2D6</i> nos indivíduos infectados por <i>Plasmodium vivax</i> no Brasil	86
7.3. Implicações do metabolismo reduzido de <i>CYP2D6</i> nas recorrências da infecção por <i>Plasmodium vivax</i>	89
8. Considerações finais	94
Capítulo 2	97
9. Resultados	97
9.1. Caso Clínico #1	97
9.2. Caso clínico #2	98
9.3. Caso Clínico #3	99
10. Discussão	102
11. Conclusão	104
12. Referências	105

Estrutura da Dissertação

Esta dissertação foi dividida em uma parte introdutória, seguida de dois capítulos contendo os resultados do estudo. O primeiro capítulo contextualiza as investigações sobre a influência da função nula/reduzida de CYP2D6 e fatores imuno/epidemiológicos na modulação a suscetibilidade das recorrências por *P. vivax*. No segundo capítulo, foram apresentados três casos clínicos de indivíduos com múltiplas recaídas por *P. vivax*, sugerindo a efetividade curativa da PQ, através do ajuste da dose total, em indivíduos com atividade nula/reduzida de CYP2D6. Os resultados e considerações trazem as principais contribuições do estudo, fornecendo evidências sobre o risco de recorrências em uma área de transmissão instável de malária (Primeiro capítulo - Rio Pardo/Amazonas) e não endêmica para a doença (Segundo capítulo - Rio de Janeiro).

1. Introdução

1.1. Malária no Brasil e no mundo

Apesar de décadas de medidas de controle e intervenções intensivas, a malária continua a causar extensa morbidade e mortalidade em regiões tropicais e subtropicais do globo, onde se distribui de forma heterogênea. A doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida aos hospedeiros vertebrados através da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*. Cinco espécies causam infecções em humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Entre as espécies, *P. falciparum* pode evoluir para malária grave, porém complicações e óbitos em infecções causadas por *P. vivax* e *P. knowlesi*, também, foram registradas (COX-SINGH et al., 2008; SHARMA; KHANDURI, 2009). Durante muitos anos, a grande maioria das pesquisas no mundo foram dirigidas a *P. falciparum* que é a principal espécie responsável pelo risco de mortalidade e pela maioria dos casos fatais da doença em toda a África subsaariana (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). No mundo, estima-se que 3,4% de todos os casos de malária sejam causados por *P. vivax*, sendo 56% destes casos, registrados na região sudeste da Ásia. Atualmente, *P. vivax* é o parasito predominante nas Américas (74%) e responsável por 37% dos casos de malária registrados na região do Sudeste Asiático e 31% dos casos na região do Mediterrâneo Oriental (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Enquanto *P. falciparum* é mais prevalente no continente africano, *P. vivax* apresenta uma distribuição geográfica mais ampla, impondo um fardo considerável às populações locais.

A transmissão de malária está localizada nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde concentram-se as populações mais pobres e vulneráveis a doença. Atualmente, estima-se que cerca de 174 milhões de pessoas vivem em regiões sob alto risco de infecção de malária (Figura 1). Em 2017, ocorreram, aproximadamente, 219 milhões (IC 95%: 203 – 262) de casos no mundo, resultando em 435.000 mortes pela doença. Nos últimos anos, os países da América Central (Belize, Guatemala, Honduras, Nicarágua e Panamá) apresentaram uma diminuição do número de casos notificados de malária (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Entre 2010 e 2017 houve uma redução de cerca de 18% na taxa de incidência, de 72 para 59 casos por mil habitantes em risco e de 48% no número de mortes pela doença no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Apesar das medidas de controle implementadas para redução da malária em vários países endêmicos nas

Américas, em algumas regiões a incidência parasitária apresentou aumento anual, com maior morbidade populacional decorrente de infecções por *P. vivax*, principalmente nos países que fazem parte da Amazônia Internacional: Brasil, Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela, Guiana, Guiana Francesa e Suriname (LAPOUBLE; SANTELLI; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2015; RECHT et al., 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Em 2015, quatro países tornaram-se uma grande preocupação e representaram 83% dos casos de malária nas Américas: Brasil (24%), Venezuela (30%), Colômbia (10%) e Peru (19%) (CONN, 2017). Quadro semelhante a este ocorreu na Guiana, devido ao aumento da mineração do ouro nas áreas florestais da Amazônia. Apesar desse aumento, alguns países da América do Sul estão avançando em direção a uma eventual eliminação da malária, com a notável exceção da República Bolivariana da Venezuela, experimentando um aumento alarmante da malária nos últimos anos (RECHT et al., 2017).

Áreas de risco de Malária no mundo 2018

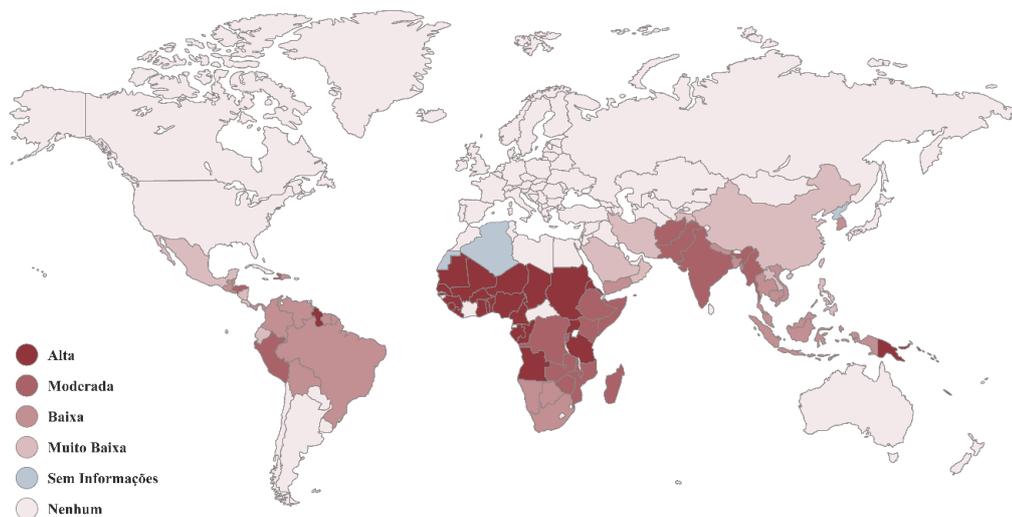


Figura 1. Distribuição geográfica de áreas de risco de malária no mundo, 2018. O risco estimado de malária nas regiões está apresentado em diferentes intensidades de cores, sendo os tons mais escuros representativos de área de maior transmissão da doença, sendo estimado, geralmente, pela Incidência Parasitária Anual (IPA), proporção de casos registrados e a área especificada de transmissão de malária. No mapa, as áreas de transmissão de malária foram classificadas pela OMS a partir do IPA (casos por 1000 habitantes), sendo: IPA = 0 – transmissão autóctone; IPA > 0 e < 1 – áreas de baixa endemicidade e IPA > 1 – áreas de alta endemicidade. Fonte: Adaptado de *Centers of Disease Control and Prevention (CDC)*, 2018.

A maioria dos casos de malária na América do Sul vem de áreas de floresta tropical amazônica nos países ao norte, onde mais da metade da malária é causada por *P. vivax*, enquanto a incidência de malária por *P. falciparum* diminuiu nos últimos anos. Brasil e

Colômbia, juntos, relataram mais de 50% dos casos de malária notificados nas Américas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Especificamente, 37% de todos os casos de malária são registrados no Brasil, sendo que a grande maioria destes (99%) se concentra na região norte e nos estados que compõem a Amazônia Legal Brasileira: Acre, Amazonas, Rondônia, Roraima, Amapá, Pará, Maranhão, Mato Grosso e Tocantins (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018) (Figura 2).

Mapa de risco da malária por município de infecção Brasil, 2017

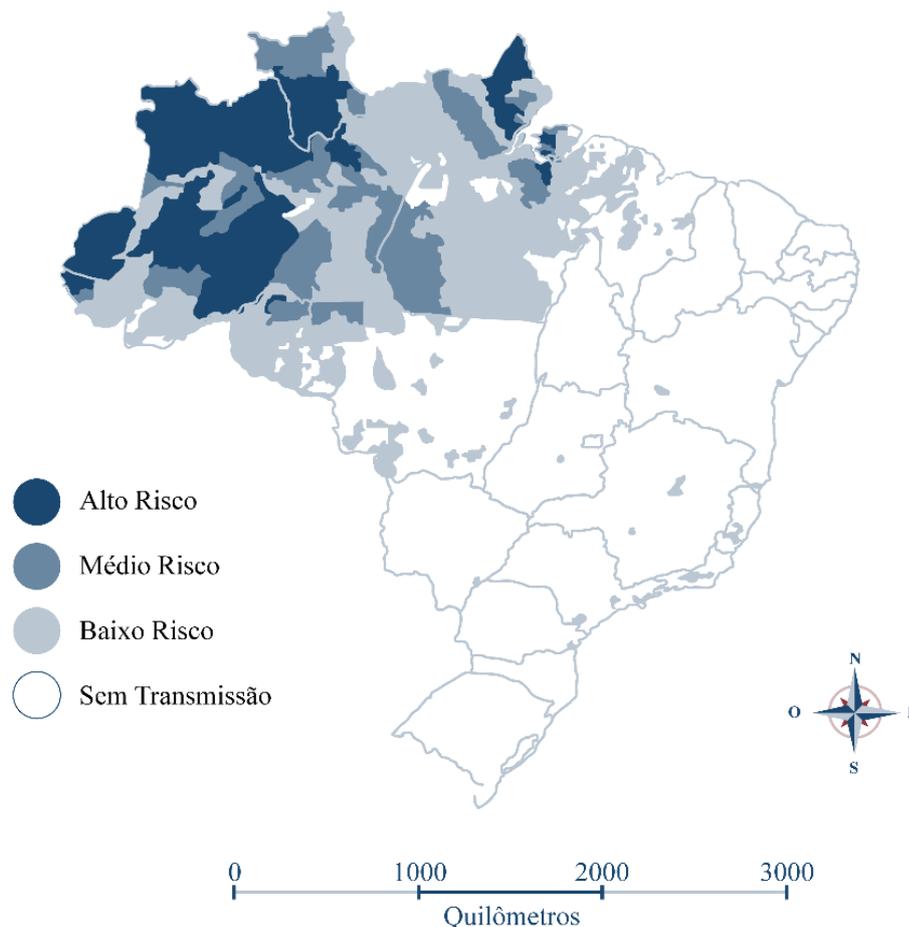


Figura 2. Mapa de risco para malária por município de infecção. Brasil. 2017. No mapa, as áreas de transmissão de malária foram classificadas pela OMS a partir do IPA (casos por 1000 habitantes), sendo: IPA = 0 – transmissão autóctone; IPA > 0 e < 1 – áreas de baixa endemicidade e IPA > 1 – áreas de alta endemicidade. Fonte: Sinan/SVS/MS e SIVEP – Malária/SVS/MS.

No Brasil, períodos de epidemias em larga escala ocorreram ao final dos anos 80 e da década de 1990, assim, a malária tornou-se o principal problema de saúde associado a doenças transmissíveis no país (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Até meados de 1990,

foram observadas proporções semelhantes de infecções entre *P. falciparum* e *P. vivax*. Já na década seguinte, o cenário mudou, *P. vivax* tornou-se a espécie predominante, enquanto infecções por *P. falciparum* diminuíram de forma constante (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Estas tendências a aumento de *P. vivax* e flutuações na transmissão de malária podem ser explicadas por fatores, como a presença dos estágios sexuais (gametócitos) no sangue periférico, o que torna *P. vivax* menos sensível às estratégias de controle disponíveis, comparado a *P. vivax* (SHANKS, 2012).

Nas décadas de 80 – 90, mais de 50% do total de casos registrados no Brasil eram devido ao *P. falciparum* e as taxas de mortalidade entre indivíduos protegidos e recém colonizados eram extremamente altas. Porém, estas taxas foram seguidas por períodos de redução da transmissão da doença ao longo dos anos (DE PINA-COSTA et al., 2014). Parte dessas reduções foi atribuída a vários fatores, a saber, a implementação do plano de intensificação das atividades de controle da malária na Amazônia brasileira (PIACM), que foi lançado em 2000 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003); uso de estratégias integradas de gestão de vetores; terapia combinada à base de artemisinina (ACT) para coinfeções com *P. falciparum* com dose única de primaquina (PQ) (RECHT et al., 2017) e, mais importante, o apoio de líderes políticos em períodos de epidemias. Além da intensificação das medidas de controle, a expansão do diagnóstico e da rede de tratamento, tornando o tratamento oportuno e acessível mesmo em áreas remotas da Amazônia como parte do sistema universal de saúde, e as taxas decrescentes de desmatamento, refletiram em alterações na incidência da malária na Amazônia brasileira (VITOR-SILVA et al., 2016).

Pesquisas sobre tendências na incidência da malária na Amazônia brasileira, no período de 2004 a 2013, identificaram que nos estados do Acre, Amazonas, Roraima e Amapá, existe um maior risco de contrair a infecção (LIMA; LAPOUBLE; DUARTE, 2017). Em 2014, um total de 143.442 novos casos de malária foram notificados nessa região, representando uma redução de 19% no número de casos de malária em comparação a 2013. Esta foi a menor incidência relatada para a região nos últimos 35 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003) (Figura 3). No entanto, no ano de 2015, o Brasil registrou o maior número de casos da doença entre todos os países das Américas, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). O atual quadro de incidência de malária no Brasil deve-se, entre outros fatores, à colonização de áreas densamente florestadas da Amazônia que tem atraído agricultores imigrantes das regiões Sul e Sudeste (área não endêmica para malária), dando origem a uma série de novas fronteiras de assentamentos agrícolas (CONFALONIERI; MARGONARI; QUINTÃO, 2014). Nessas

regiões, geralmente, o desmatamento induz grandes mudanças na biologia do vetor, através da criação e expansão de habitats favoráveis a reprodução do *Anopheles darlingi* (principal vetor da malária na América do Sul) (LAPORTA et al., 2015). De forma geral, a transmissão da malária no Brasil é bastante afetada pelas particularidades sociodemográficas, políticas e ambientais da região amazônica. As condições de moradia inadequadas, e um ambiente abundante em vetor fornece condições para surtos rápidos e sustentam o aumento no número de casos de malária em algumas regiões. Os dados de 2017 reforçam um aumento, de 51% do número de casos de malária notificados na Amazônia brasileira, em relação a 2016 (BRAZ; BARCELLOS, 2018), reforçando, assim, a necessidade de novas intervenções e intensificação das ações de vigilância e controle da doença (Figura 3).

Casos de malária notificados 1959 - 2016

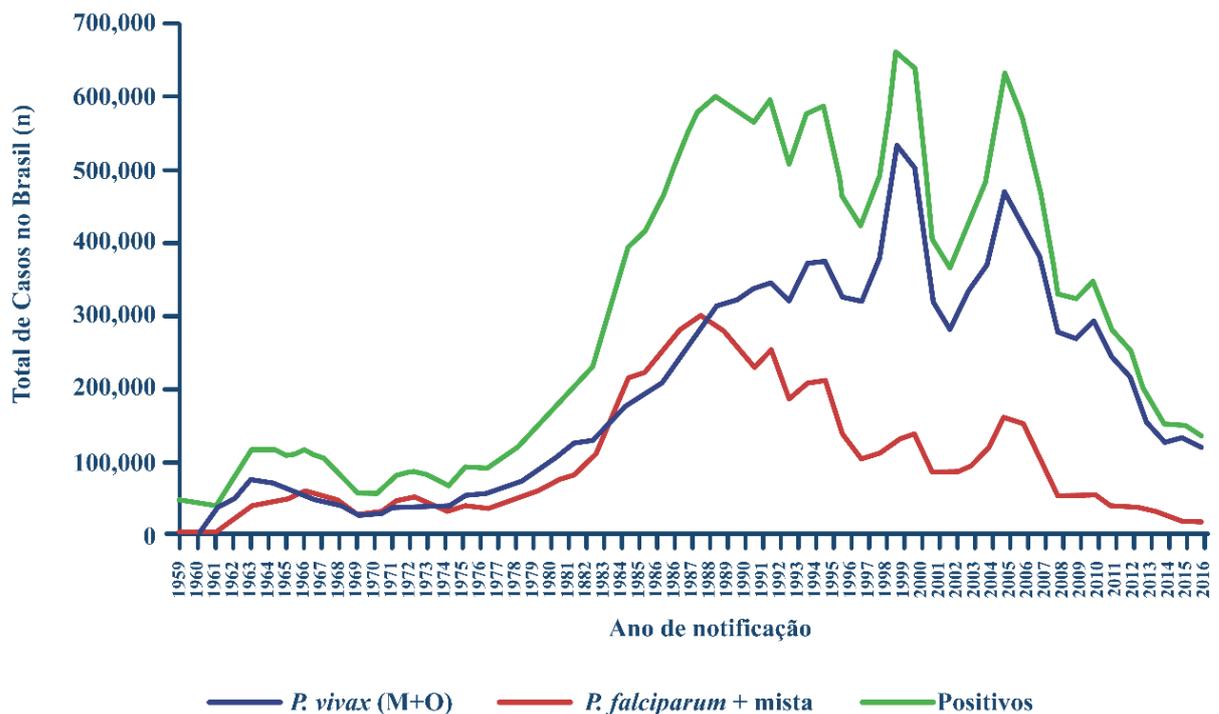


Figura 3. Evolução do número de casos de malária no Brasil de 1959 a 2016. Os baixos números de casos registrados em 1960 aumentaram em 1976, sendo a maioria dos casos registrados na Amazônia, região que passou a concentrar a maioria de casos registrados no Brasil a partir de 1967. Os números aumentaram progressivamente como resultado da intensa, rápida e desorganizada colonização da Amazônia, atingindo mais de 573 mil casos em 1989. Dois picos foram registrados em 1999 e 2005 (cerca de 630 e 600 mil casos, respectivamente), apesar de uma tendência geral de diminuição do número de casos nas últimas duas décadas. Adaptado de PINA-COSTA et al., (2014).

1.2. A malária por *Plasmodium vivax*

P. vivax é a espécie de *Plasmodium* mais disseminada geograficamente (LO et al., 2017). Apesar da infecção por *P. vivax* muitas vezes ser considerada benigna, evidências mostram que essa espécie também está associada à malária grave e fatal, tanto em pacientes de áreas endêmicas, como em viajantes não imunes à doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Embora geralmente não se pense que *P. vivax* esteja sequestrado na vasculatura, é possível que a doença grave por *P. vivax* resulte do acúmulo da maior parte da biomassa do parasito na medula óssea ou baço (BARBER et al., 2015; KEVIN BAIRD, 2013; MAYOR; ALANO, 2019).

Em áreas de transmissão onde os programas de controle da malária foram intensificados, *P. vivax* tende a ser mais resiliente que *P. falciparum* (COURA; SUÁREZ-MUTIS; LADEIA-ANDRADE, 2006). Isso se deve às características biológicas exclusivas de *P. vivax*, que aumentam sua capacidade de sobreviver em condições inadequadas. Algumas características específicas de *P. vivax* impõem desafios ao controle e eliminação da malária: (i) capacidade de formação de hipnozoítos que levam a recaídas da doença em intervalos de tempo desconhecidos, definidas como episódios clínicos com parasitemia subsequente (SHANKS; WHITE, 2013) (Figura 4); (ii) formação de gametócitos que emergem em um estágio inicial da infecção, antes das manifestações clínicas da doença (BARO et al., 2017); (iii) transmissão por uma ampla variedade de espécies de vetores anofelinos que residem em diversos *habitats* relevantes para a transmissão do parasito (DAYGENA; MASSEBO; LINDTJØRN, 2017) e, (iv) desenvolvimento mais rápido no vetor em comparação a *P. falciparum*, considerando uma mesma temperatura (MORENO et al., 2018).

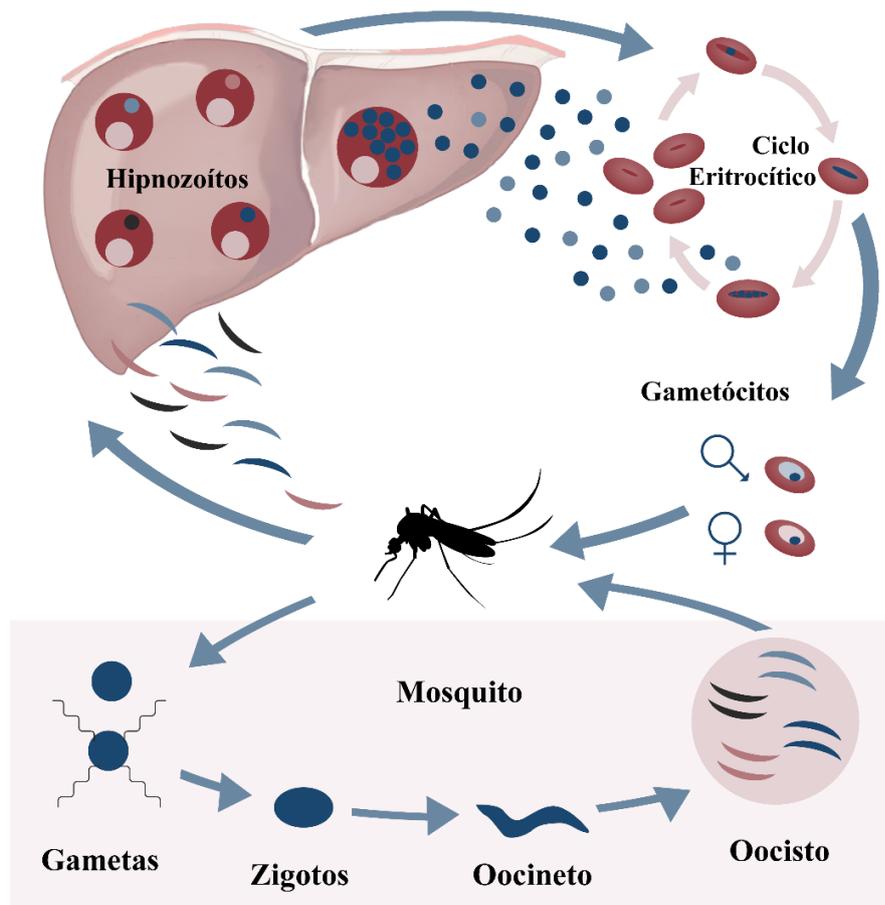


Figura 4. Fêmeas do mosquito vetor transmitem parasitos de *Plasmodium vivax* no estágio de esporozoítos para o hospedeiro humano durante o repasto sanguíneo. Dentro de 30 a 60 minutos, centenas de esporozoítos são liberados na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Os parasitos migram para o fígado – passando por alguns tipos de células, como as células de Küpfer – e formam vacúolos parasitóforos nos hepatócitos. Nesse estágio, os parasitos podem permanecer em estágio latente no fígado, denominados hipnozoítos (*P. vivax* e *P. ovale*), ou iniciar um desenvolvimento que resulte na produção de milhares de merozoítos. Os parasitos, então, induzem o deslocamento do hepatócito infectado, permitindo que ele migre para o espaço sinusóide no fígado, onde ocorre o surgimento de vesículas (com parasitos), denominadas merossomos. Os merossomos se rompem e liberam os merozoítos na corrente sanguínea que, rapidamente, invadem os eritrócitos. Esses se replicam, às vezes de forma síncrona, em um ciclo que pode corresponder ao ciclo sintomático na malária, caracterizado por febre e calafrios. Em resposta a uma lacuna, ainda não completamente compreendida, alguns parasitos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos, que são as formas ingeridas pelo mosquito e que podem viver quiescentes na corrente sanguínea por semanas. Uma vez que os parasitos são ingeridos pelo mosquito vetor durante o repasto sanguíneo, eles passam rapidamente pela transição a gametas masculinos e femininos ativados. O parasito diploide móvel e de vida curta, o oocineto, migra para a parede do intestino médio através da matriz peritrófica, onde o oocisto é formado. Depois de uma redução meiótica, formam-se esporozoítos dentro do oocisto, que ao se romper, libera esporozoítos na hemocele do inseto. Esses migram para as glândulas salivares do mosquito, onde são ingeridos em um posterior repasto sanguíneo. Cerca de dez dias após o mosquito se alimentar de gametócitos durante o repasto sanguíneo, ele pode ser capaz de infectar outro hospedeiro humano com *Plasmodium spp.* Adaptado de BRIGHT et al., (2013).

O progresso científico sobre *P. vivax* desde 1960 foi mínimo em comparação a *P. falciparum* porque *P. vivax* foi considerado, por muito tempo, um parasito causador de uma infecção sem gravidade (MUELLER et al., 2009). Além disso, a pesquisa envolvendo *P. falciparum* foi considerada como prioridade devido à sua alta mortalidade e, em parte, porque

foi adaptada para o cultivo em laboratório. A preferência por reticulócitos também impediu, até o momento, o desenvolvimento de cultivo contínuo *in vitro* de *P. vivax*, dificultando a pesquisa básica necessária para compreender adequadamente a sua biologia e avançar no desenvolvimento de vacinas, diagnósticos e tratamentos.

A malária causada por *P. vivax* é difícil de detectar e, conseqüentemente, de tratar, porque a parasitemia é baixa em comparação à detectada em infecções por *P. falciparum*. Soma-se a isso o fato de que os testes de diagnóstico atuais não podem detectar as formas dormentes no fígado (HULDEN; HULDEN, 2011). Portanto, uma proporção considerável de pessoas infectadas serve como reservatório para a continuidade da transmissão e só são diagnosticadas/tratadas quando apresentam episódios clínicos da infecção (ASIH, P. B.S.; SYAFRUDDIN, D.; BAIRD, J.K., 2017). Além disso, a eliminação do estágio hepático de parasitos de *P. vivax* requer o uso de PQ, que pode produzir efeitos secundários graves (hemolíticos e anemia) em doentes com formas graves de deficiência de *glicose – 6 – fosfato desidrogenase* (G6PD) (AVALOS et al., 2018; BAIRD, 2015a). Devido ao seu caráter oxidante, a PQ é capaz de causar hemólise grave em deficientes de G6PD. A sequência gradual de eventos do ataque oxidativo à hemólise não é totalmente elucidada (LUZZATTO; SENECA, 2014). No entanto, sabemos que o primeiro passo bioquímico crucial em um episódio hemolítico é a diminuição do NADPH (GAETANI et al., 1979) e a conseqüente depleção de glutathiona (GSH) através de sua conversão em dissulfeto de glutathiona (GSSG). Considerando este risco, bem como a possibilidade de repetidos episódios clínicos, o controle bem sucedido e a eliminação de *P. vivax* são desafiadores e exigem intervenções adicionais específicas: eliminação das fontes de infecção, garantia de que os serviços de microscopia sejam capazes de detectar infecções por *P. vivax* de baixa carga parasitária, uso de testes de diagnóstico rápido em áreas onde *P. falciparum* e *P. vivax* coexistem e testar, sempre que possível, a deficiência de G6PD nos pacientes antes de administrar a PQ. Dessa forma, o tratamento contra os estágios sanguíneos e os hipnozoítos de *P. vivax* (BAIRD, 2015b) pode ser realizado de forma segura e efetiva.

1.3. Recorrências por *Plasmodium vivax*

A descrição dos estágios hepáticos de *P. vivax* foi realizada em biópsias hepática de um paciente submetido à terapia experimental (SHORTT et al., 1948; SHORTT; GARNHAM, 1948) e em biópsias hepáticas de chimpanzés infectados por inoculação intravenosa com um grande número de esporozoítos de *P. vivax* (KROTOSKI, 1985). Foi este

último estudo, na década de 80, que demonstrou, a existência de formas pequenas e não replicantes de *P. vivax*, os hipnozoítos, em células parenquimais hepáticas infectadas pelo parasito. Desde que esses estudos foram realizados, o estágio hepático de *P. vivax* tem sido pouco investigado e a pesquisa, nesse sentido, tem se limitado a estudos *in vitro* em hepatócitos humanos primários (isolados diretamente de amostras de fígado humano) (MAZIER et al., 1984) ou a linhagens celulares de hepatoma (SATTABONGKOT et al., 2006). Mais de 30 anos depois, ainda não se sabe ao certo se os hipnozoítos são metabolicamente ativos durante o período de dormência. Os fatores que desencadeiam sua reativação também não são completamente compreendidos (CAMPO et al., 2015). Recentemente, um estudo caracterizou o transcriptoma de hipnozoítos de espécies recidivantes de malária, através de protocolos de microscopia a laser e *RNA-seq*, e identificou os fatores-chave que regulam a transcrição e a tradução, tais como as vias que permitem a proliferação celular, as quais poderiam atuar como potenciais marcadores de hipnozoítos. A regulação positiva de algumas vias, com baixos níveis de transcrição e repressão translacional, parece contribuir parcialmente para a manutenção do estado quiescente dos hipnozoítos desempenhando um papel fundamental na manutenção do seu estado metabólico. Além disso, alguns mRNAs de proteínas de ligação a RNA parecem ser superexpressos nos hipnozoítos de *P. cynomolgi*, indicando que a regulação gênica pós-transcricional também pode contribuir para a homeostase do hipnozoíto (CUBI et al., 2017).

Os padrões de recaída em pacientes infectados por *P. vivax* em áreas não endêmicas, a notável periodicidade das recaídas e as altas taxas de infecção por *P. vivax* que ocorrem após as infecções por *P. falciparum* (LOOAREESUWAN et al., 1987) sustentam a teoria de que os hipnozoítos podem ser ativados por estímulos externos ao parasito, como uma infecção por *Plasmodium* (WHITE et al., 2011), ou doenças febris associadas à malária aguda ou à infecções bacterianas febris (como por exemplo, febre tifoide, "Febre das Trincheiras" ou "Febre de Malta/Brucelose"), mas não infecções virais (SHANKS; WHITE, 2013; WHITE et al., 2011). Em áreas endêmicas, recrudescência, reinfecção e recaída (coletivamente conhecidos como recidivas ou recorrências da infecção) não podem ser distinguidos entre si, de forma confiável, porque as recaídas nessas áreas são comumente causadas por parasitos geneticamente distintos (heterólogos) (DE ARAUJO et al., 2012; IMWONG et al., 2007). Dessa forma, essas observações levaram à hipótese de que os residentes de áreas endêmicas de *P. vivax* acumulam uma quantidade de hipnozoítos no fígado a partir de inoculações repetidas de esporozoítos que podem ser ativados pela própria infecção, ou por outras infecções (Figura 5).

As recaídas podem, também, ser uma característica adaptativa do parasito para sequestro ou hibernação durante condições inóspitas para o vetor *Anopheles* (BAIRD; RIECKMANN, 2003; COGSWELL, 2011). Um estudo realizado em 2011 especulou que a picada do *Anopheles* e suas complexas consequências imunológicas poderiam desencadear as recaídas (HULDEN; HULDEN, 2011). Outras hipóteses sugerem que as recaídas ocorrem em intervalos previsíveis, de maneira que os esporozoítos parecem ser geneticamente programados para latência precoce ou tardia (BATTLE et al., 2014). Embora um sistema *in vitro* de cultivo de hipnozoítos em hepatócitos (MARCH et al., 2013; ROTH et al., 2018; ZEEMAN et al., 2014) e um modelo murino que expressa proteínas hepáticas humanas para estudo da infecção hepática tenham constituído avanços recentes para a compreensão das recaídas, o conhecimento da biologia dos hipnozoítos ainda é limitado, o que dificulta, também, a busca por novas drogas direcionadas a estas formas latentes.

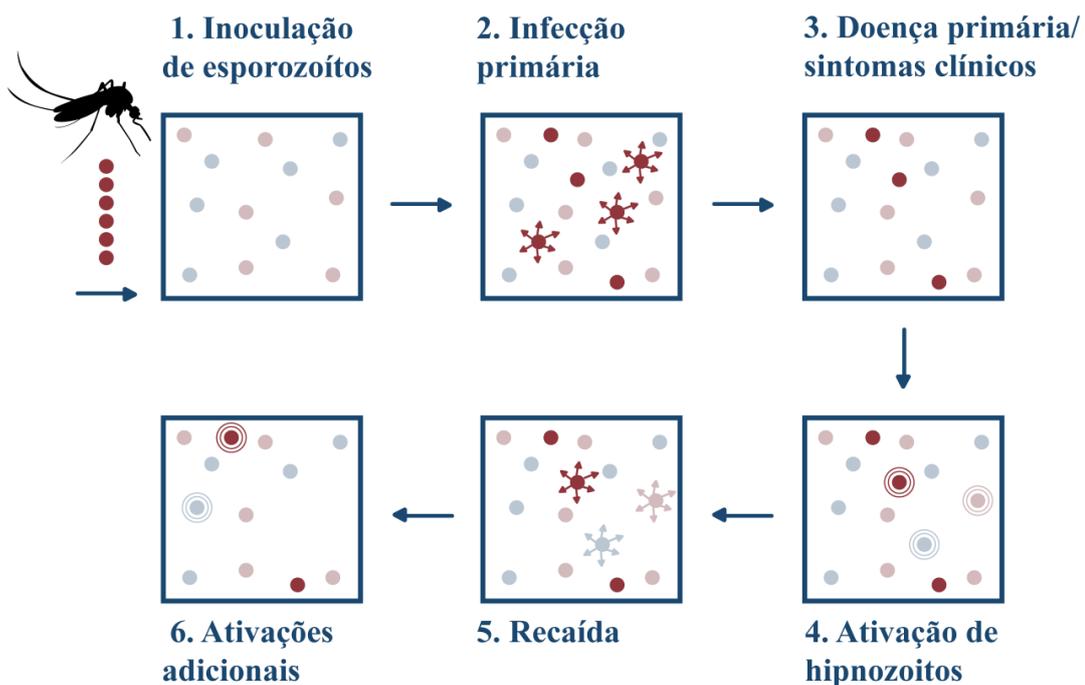


Figura 5. Mecanismo proposto e sequência de ativação de recaídas de *Plasmodium vivax* em área endêmica de malária. (1) Em um exemplo ilustrado, no momento da infecção (inoculação de esporozoítos), o indivíduo possui hipnozoítos de dois genótipos diferentes adquiridos a partir de duas inoculações anteriores que estão em latência no fígado. Os diferentes genótipos são denotados por cores diferentes (azul e vermelho – claro e escuro). A cor vermelha sugere que parasitos de infecções anteriores que estiveram em latência, também podem ser ativados na infecção primária (2). Metade dos esporozoítos da infecção recente (vermelho) se desenvolvem em esquizontes pré eritrocitários, dando início a doença primária (3), e a metade fica dormente no fígado, sob pequenas formas (os hipnozoítos). A doença associada à infecção no sangue ativa uma pequena fração dos hipnozoítos (4). Neste exemplo, há um hipnozoíto de cada genótipo e cada um é ativado pela doença e se desenvolve em um esquizonte pré eritrocitário, levando a recaídas (5). A própria doença, em processo, ativa alguns hipnozoítos remanescentes (em tempos diferentes ou não) e as recaídas continuam até que o número de hipnozoítos se esgote ou alguns não sejam ativados (6). Se houver alguns hipnozoítos que não sejam ativados, estes podem ser ativados em um momento posterior por uma infecção subsequente por *Plasmodium*. Adaptado de WHITE et al., (2011).

A probabilidade de recaída por *P. vivax* e o intervalo de tempo decorrido entre a parasitemia primária e recaída varia aparentemente em relação à latitude e à abundância sazonal de vetores anofelinos (BATTLE et al., 2014). As características adaptativas do parasito para sequestrar ou “hibernar” durante períodos em que as condições climáticas seriam inóspitas aos vetores de mosquitos anofelinos (BAIRD; RIECKMANN, 2003; WHITE et al., 2011) sustentam a hipótese de que há uma variação geográfica significativa na taxa/tempo em que uma cepa de *P. vivax* recai (GARNHAM et al., 1975). Em geral, cepas de regiões temperadas têm uma menor probabilidade de recair (30%) e tendem a apresentar uma latência maior (0 – 6 meses) (Figura 6). Por outro lado, cepas tropicais geralmente recaem (risco de 80%) dentro de algumas semanas após a infecção primária (WHITE et al., 2011). Não sabemos, ainda, o que determina a periodicidade das recaídas. Nota-se, pois, que os padrões de recaída variam regionalmente, devido às próprias características biológicas do parasito, e devem ser levados em consideração ao se avaliar as estratégias de controle e eliminação de infecções por *P. vivax*. Independentemente do mecanismo desencadeante e da etiologia da recaída, há evidências que ambientes experimentais e naturais controlados indicam considerável variação geográfica no tempo de recaída. Embora a percepção histórica tenha sido que, cepas recidivantes frequentes são originárias dos trópicos e cepas de longa latência de regiões temperadas (WHITE et al., 2011), ela não descreve suficientemente a variação observada em fenótipos recidivantes em diferentes regiões geográficas (BATTLE et al., 2014).

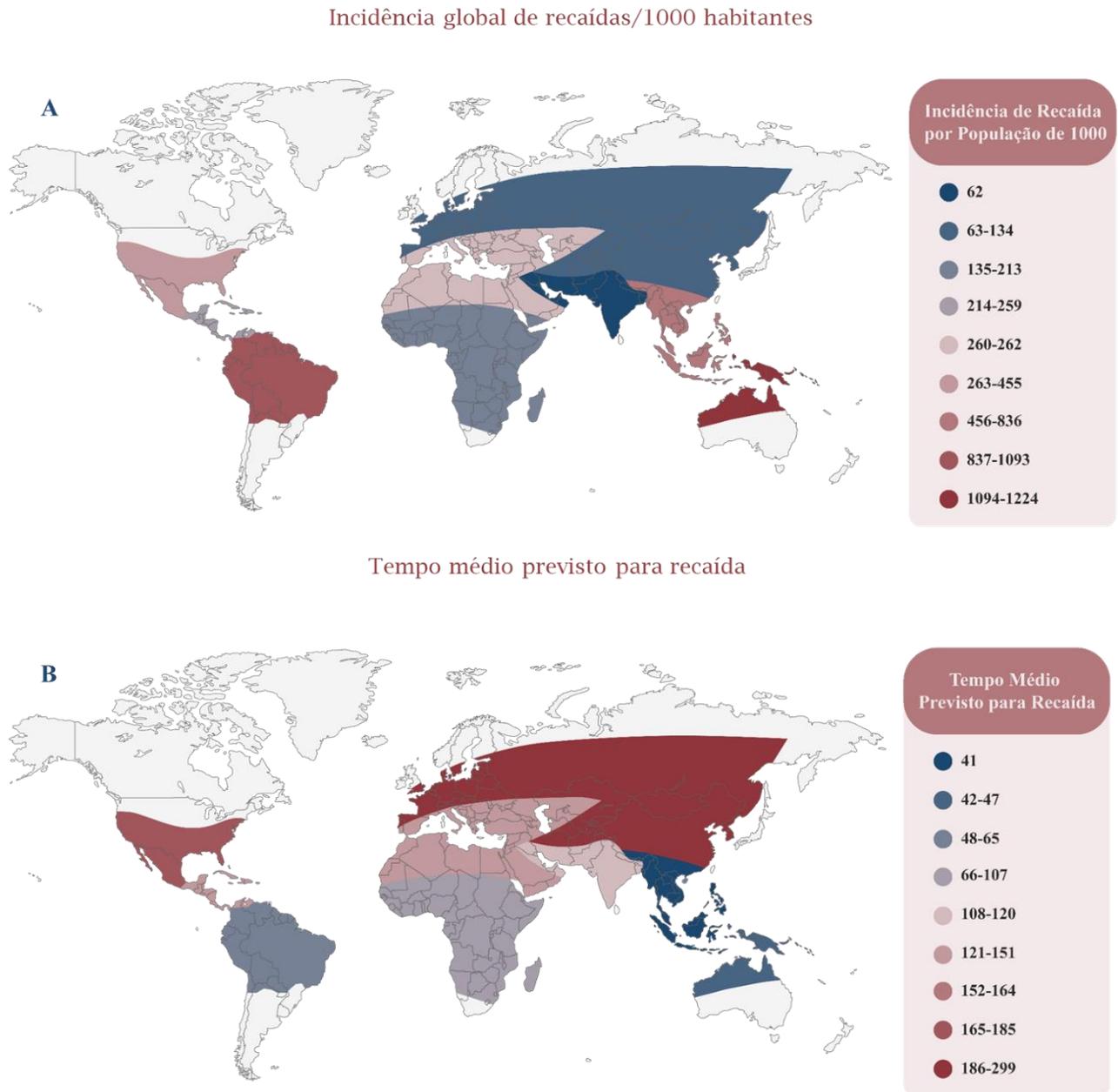
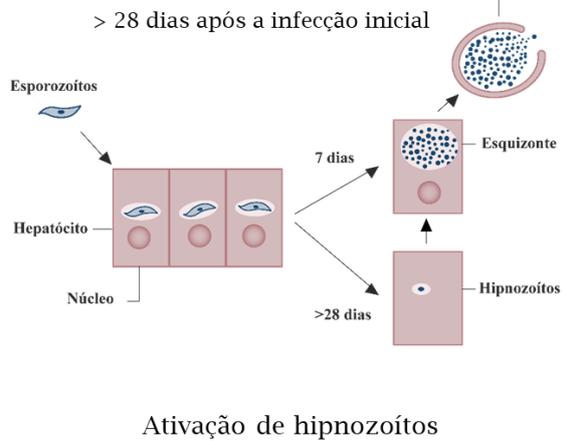


Figura 6. Incidência global de recaída, ajustada por tempo médio de recaída. (A) A incidência de recaída por 100.000 pessoas / dia variando a intensidade da cor azul a vermelho, sendo o vermelho a maior incidência de recaída. (B) O tempo médio previsto para recaída variam de azul para vermelho, com o azul representando a recaída mais tardia. Os números mostrados na figura apresentam as zonas propostas por MacDonald, sendo descritas como regiões “zoogeográficas” de malária e compartilham pontos em comum com muitas zonas biogeográficas históricas (HOLT et al., 2013; OLSON et al., 2001). Os limites aproximados das zonas são delineados por variáveis climáticas que influenciam as taxas de transmissão da malária, como temperatura e precipitação, a intensidade de transmissão observada, bem como a abundância e os comportamentos das espécies de vetores localmente dominantes. Adaptado de BATTLE et al. (2014).

A contribuição das recaídas para o ônus de *P. vivax* pode ser avaliada comparando-se as taxas de recorrência entre pacientes que são submetidos a diferentes tratamentos, com e sem uso de PQ (SIMÕES et al., 2014). A recorrência da malária é caracterizada como a recorrência de parasitemia assexuada seguinte ao tratamento da doença, em período de tempo variado (POPOVICI et al., 2018). Com base na observação clínica é muito difícil distinguir entre recrudescência, recaída e reinfeção. Entretanto, tem sido consenso entre os estudos que até 28 dias, quando ainda há droga (CQ) circulante após a administração inicial do fármaco, as recidivas (ou recorrências) podem ser consideradas recrudescências (POPOVICI et al., 2018). Já a partir de 29 dias (tempo previsto em que não há mais CQ circulando na corrente sanguínea do indivíduo após início do tratamento), as recorrências podem ser consideradas recaídas. As reinfeções, por sua vez, podem ocorrer a qualquer momento após a eliminação da droga no organismo, desde que haja o contato com o mosquito vetor, normalmente em regiões endêmicas para malária (SIMÕES et al., 2014) (Figura 7). Uma vez que a genotipagem do parasito não permite de diferenciar recaída de reinfeção e de recrudescência, a maioria dos estudos nesse sentido tem avaliado as estimativas gerais das taxas de recorrências (POPOVICI et al., 2018). Nesses estudos tem sido assumido que uma parte significativa na taxa de recorrência após tratamento pode ser atribuída à reativação dos hipnozoítos. Também tem se assumido que as contribuições do estágio assexuado são insignificantes (BRASIL et al., 2018; CHU et al., 2018; SIMÕES et al., 2014). Os primeiros estudos realizados após a segunda guerra mundial em soldados americanos demonstraram que as taxas de recaída por *P. vivax* foram de 70% nos 120 dias após o retorno de áreas endêmicas (MOST et al., 1946). Da mesma forma, na Tailândia (área de baixa transmissão), foi registrada uma taxa de recorrência de 79% dentro de 63 dias após monoterapia com CQ (LUXEMBURGER et al., 1999). Mais recentemente, uma taxa de recorrência de 78% foi relatada em soldados da Indonésia até um ano após monoterapia de artesunato (SUTANTO et al., 2013). Na Papua Nova Guiné, região de alta transmissão de *P. vivax*, crianças com idade inferior a seis anos foram tratadas de diferentes formas: (i) com artesunato e PQ, (ii) somente com artesunato, ou (iii) placebo e foram acompanhadas por dez meses. Nessa região, estima-se que as recaídas contribuíssem com, aproximadamente, 50% do número total das infecções por *P. vivax* (BETUELA et al., 2012). Estimativas mais recentes de recaída na Papua Nova Guiné são ainda maiores (80%) (SUTANTO et al., 2013).

Recaídas



Reinfecção

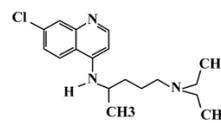


Exposição ao mosquito vetor

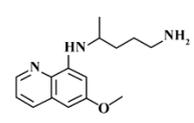
Recrudescência

< 28 dias após a infecção inicial

Cloroquina



Primaquina



Falha terapêutica

Figura 7. Recorrências da malária por *Plasmodium vivax*. A recidiva ou recorrência da malária é conceituada como a recorrência de parasitemia assexuada seguinte ao tratamento da doença, após ter sido constatada a sua negatização, em período de tempo variado (WHITE et al., 2011). Ocorre por um dos seguintes aspectos: (i) recaídas: ativação dos hipnozoítos; (ii) reinfecção: exposição à nova infecção pelo mosquito vetor; (iii) recrudescência: falha terapêutica resultante de não adesão ao tratamento (PEREIRA; ISHIKAWA; FONTES, 2011a), resistência do parasito às drogas utilizadas (DUARTE et al., 2001), má qualidade do medicamento instituído (NOGUEIRA et al., 2011) ou utilização de doses subterapêuticas das drogas. Do ponto de vista conceitual, a recorrência de malária pode ser resultado de recaída, reinfecção ou recrudescência. Recrudescência de malária ocorre quando as formas sanguíneas do parasito não são completamente erradicadas pelo tratamento e reexpandem o seu número após o declínio da concentração sérica das drogas. Ocorre com maior frequência na malária por *P. falciparum* e *P. vivax*. As recaídas são definidas como o reaparecimento da parasitemia e de manifestações clínicas do paciente por uma reinvasão das hemácias pelos merozoítos provenientes de hipnozoítos dormentes no fígado. Acredita-se que podem surgir após 21 a 140 dias do tratamento com a cepa tropical e após 180 a 420 dias com a cepa temperada do parasito (WHITE et al., 2011). Sua principal causa é a falha no tratamento. Baseado apenas na observação clínica, é muito difícil distinguir recrudescência de recaída e recaída de reinfecção. Em algumas situações, o discernimento pode ser feito pela identificação de genótipo idêntico do parasito da recaída com a infecção primária. Contudo, a genotipagem dos parasitos da infecção inicial e da recaída não tem sido eficiente para a distinção entre recaída e reinfecção (DE ARAUJO et al., 2012; ORJUELA-SÁNCHEZ et al., 2009). Por sua vez, reinfecção por *P. vivax* é uma nova infecção adquirida por pacientes que tenham tratado de malária, após intervalo de tempo incompatível com a ocorrência de recrudescência ou recaída. Em análise genotípica, pode-se considerar, como reinfecção, o achado de parasito geneticamente diferente daquele causador da infecção primária (MARKUS, 2011). Como os tempos entre os episódios se sobrepõem, mesmo com a análise genotípica, é também difícil a distinção precisa entre recaída e reinfecção. Tem sido consenso que até 28 dias, quando ainda há droga circulante após o tratamento, as recidivas podem ser consideradas recrudescências. A partir de 29 dias (ou mesmo antes em caso de parasitos resistentes) até mais de seis meses, podem ser consideradas recaídas. As reinfecções, por sua vez, podem ocorrer a qualquer momento após a eliminação da droga do organismo (WHITE et al., 2011).

1.4. Tratamento da malária causada por *Plasmodium vivax*

Ao longo dos anos, muitas pesquisas foram realizadas no sentido de desenvolver drogas contra as diferentes formas do ciclo de vida de *Plasmodium*, incluindo as formas de hipnozoítos que são particularmente desafiadoras. A ausência de informação no que diz respeito à biologia dos hipnozoítos impacta negativamente no desenvolvimento de novas drogas antimaláricas e, como resultado, a PQ (8-aminoquinolina) ainda é a única droga licenciada no Brasil que elimina os hipnozoítos e oferece profilaxia e cura radical para a infecção por *P. vivax* (FERNANDO; RODRIGO; RAJAPAKSE, 2011).

A CQ, juntamente com a PQ, tem sido recomendada pelas entidades de saúde como o regime padrão para a cura radical de *P. vivax* e *P. ovale* desde o início dos anos 1950 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). A CQ é um esquizotocida altamente eficaz, enquanto a PQ tem uma menor atividade na fase assexuada (PUKRITTAYAKAMEE et al., 1994). Acredita-se que a PQ interfere na respiração celular do parasito, gerando radicais livres de oxigênio e desregulando o transporte de elétrons. Ao ser coadministrada com a CQ, o efeito total é um reflexo da eficácia sinérgica do agente esquizotocida e da PQ.

1.4.1. Cloroquina

Por quase 60 anos, a CQ tem sido considerada a droga de primeira linha para o tratamento das infecções por *P. vivax* (NEGREIROS et al., 2016). A CQ é eliminada muito lentamente (tempo de meia vida estimado de 28 dias) e seu principal metabólito ativo é a desetilcloroquina. O metabolismo da CQ é feito, principalmente, pelas isoformas hepáticas do citocromo P450 – CYP2C8, CYP3A4 e CYP2D6 e sua ligação aos tecidos é extensa, resultando em um enorme volume de distribuição (PROJEAN et al., 2003). A CQ é distribuída extensivamente nos tecidos, tais como fígado, seguida do baço, coração, rins e cérebro (WHITE, 1988). O esquema terapêutico recomendado para *P. vivax* consiste na combinação de CQ por três dias (dose total de 25 mg/kg), e PQ, por sete ou quatorze dias (dose total de 3,5 mg/kg) (DEPARTAMENTO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2010). Assim, o tratamento, tradicionalmente dividido em três dias, pode ser considerado de alta dose. Esta dose fornece níveis terapêuticos no sangue total (>100 ng/mL correspondentes a >10 ng/mL no plasma) por, pelo menos, 28 dias em infecções por *P. vivax* (DEPARTAMENTO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2010). Embora a CQ tenha uma margem de segurança baixa (uma dose única de 20 mg/kg é considerada tóxica),

geralmente é bem tolerada na dose padrão de 25 mg/kg, dividida em três dias, para a infecção causada por *P. vivax* (MELLO et al., 2018). O mecanismo por trás da ação plasmodicida da CQ não é completamente compreendido. Como outros derivados da quinolina, acredita-se que ela inibe a atividade da polimerase heme, resultando em um acúmulo do grupo heme livre, que é tóxico para os parasitos.

1.4.2. Primaquina

A PQ foi sintetizada pela primeira vez, nos EUA, durante a Segunda Guerra Mundial (1941 – 1945), como parte de um empreendimento maciço de desenvolvimento de drogas antimaláricas (GRIETENS et al., 2010). A eficácia curativa radical das 8-aminoquinolinas é reconhecida há mais de 75 anos. Após a administração oral, as concentrações máximas de PQ ocorrem dentro de 1 – 3 horas (MIHALY et al., 1985) e sua meia vida é de 4 – 6 horas (PUKRITTAYAKAMEE et al., 2014). Ao contrário de outras drogas antimaláricas amplamente utilizadas, a PQ exerce um amplo espectro de atividade contra vários estágios do parasito (BAIRD; RIECKMANN, 2003), sendo ativa contra as formas pré-eritrocíticas em desenvolvimento (atividade profilática), contra os hipnozoítos (somente para *P. vivax* e *P. ovale*), contra gametócitos (de todas as espécies que causam malária humana) e ainda, pouco ativa, contra os estágios sanguíneos assexuados (PUKRITTAYAKAMEE et al., 1994). Já foi demonstrado que a PQ é eletiva, contra estágios sanguíneos de *P. falciparum* e *P. vivax*, mas as doses necessárias para a cura radical são tóxicas para o uso humano (KAIN, 1995). Embora o metabolismo complexo da PQ e seu mecanismo de ação não sejam totalmente compreendidos (MUCKLOW, 2001), uma ampla variedade de metabólitos, alguns deles espécies hidroxiladas altamente reativas, aparentemente agem nas membranas mitocondriais do parasito (MARCSISIN; REICHARD; PYBUS, 2016).

A maioria dos países endêmicos para *P. vivax* recomenda um regime de PQ de 0,25 mg/kg/dia (3,5 mg/kg/dia ou 210 mg dose total) por 14 dias, embora haja uma ampla gama de regimes de PQ sendo usados em diferentes países (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). No Brasil, o tratamento atual de primeira linha para a cura radical da infecção por *P. vivax* é de 3 dias de CQ (dose total de 25 mg/kg administrada por via oral durante três dias consecutivos), com o uso concomitante de um ciclo curto de PQ (7 – 9 dias; dose total de 3,5 – 4,2 mg/kg) (DEPARTAMENTO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2010). Além disso, as diretrizes do Ministério da Saúde determinam: fazer o ajuste da dose e do tempo de administração da PQ em pacientes com peso igual ou superior a 70 kg (DEPARTAMENTO

DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2010) e dar preferência, sempre, ao peso para a escolha da dose a ser administrada em indivíduos infectados (Figura 8).

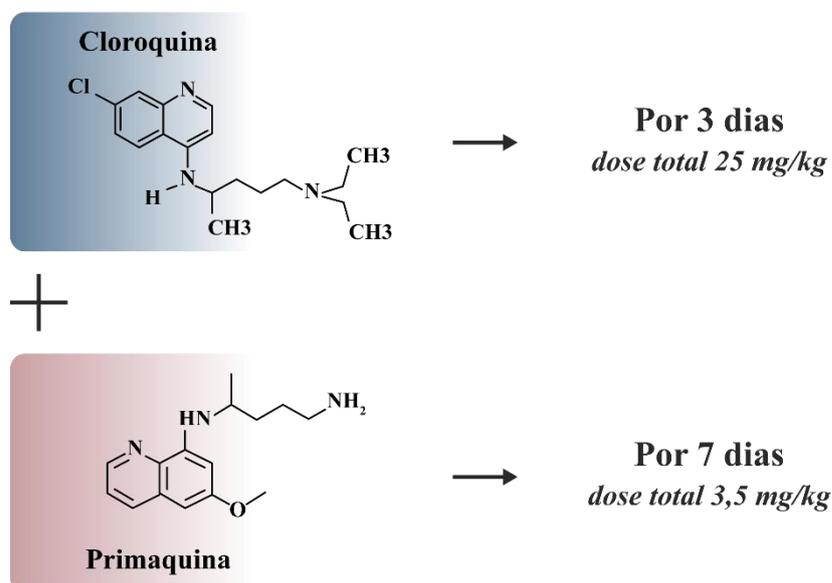


Figura 8. Tratamento atual de primeira linha para a cura radical da infecção por *Plasmodium vivax*, recomendado pelas diretrizes do Ministério da Saúde - Brasil. Cloroquina, dose total de 25 mg/kg administrada por via oral durante três dias consecutivos, concomitante ao uso de um ciclo curto de PQ, 7 – 9 dias, com dose total de 3,5 – 4,2 mg/kg.

Estudos com curta duração de acompanhamento (28 dias) evidenciaram eficácia da PQ contra os estágios assexuados, ou seja, as recorrências eram incomuns (COMMONS et al., 2018). Nos poucos estudos que acompanharam indivíduos infectados por um período de tempo mais longo, verificou-se que as taxas de recorrência após o uso da PQ (0,25 mg/kg/dia durante 14 dias) foram de 4,6% aos três meses (LOOAREESUWAN et al., 1999) e 17,5% aos seis meses, na Tailândia (BUNNAG et al., 1994). Similarmente, taxas de recorrência de 2,5% (dose de 0,5 mg/kg/dia por sete dias) (ABDON et al., 2001), 5% (0,25 mg/kg/dia por 14 dias) (ABDON et al., 2001) e 14% (dose de 0,25 mg/kg/dia por 14 dias,) aos seis meses, foram relatadas no Brasil (DUARTE et al., 2001).

A eficácia da PQ também já foi comparada em diferentes doses e duração de tratamento, inclusive na Amazônia brasileira. Em um estudo de coorte aberta nessa região, os autores mostraram que o risco de recorrência de *P. vivax* foi semelhante entre os dois regimes de tratamento: 887/6226 pacientes (14,3%) em 14 dias (dose total 3 – 4,2 mg/kg de PQ por 14 dias) *versus* 7 – 9 dias (dose total 3 – 4,2 mg/kg de PQ por 7 a 9 dias): 17,61/12,06 (14,6%), Risco Relativo = 0,97; IC 95% 0,90 – 1,04, $P = 0,960$ (DAHER et al., 2019). Em geral, na

Amazônia, a dose total de 3,5 mg/kg de PQ, por sete dias, tem sido associada a taxas de recorrência de 26 a 40% durante seguimento de 180 dias (DURAND et al., 2014; LACERDA et al., 2019; ORJUELA-SÁNCHEZ et al., 2009). Diante do exposto, nota-se, pois, que os dados disponíveis na literatura sugerem que as recaídas contribuem significativamente para a carga global das infecções por *P. vivax*. Para determinar a eficácia da PQ em áreas endêmicas é necessário avaliar as recorrências para além do período de profilaxia pós-tratamento e, também, por tempo suficiente para detectar a maioria das recorrências (idealmente seis meses), considerando-se a incidência de novas infecções (WHITE et al., 2011). Em geral, estima-se que seis semanas de acompanhamento é um período de tempo insuficiente para detectar todas as primeiras recaídas, mesmo em regiões onde o fenótipo de curta latência é prevalente (COMMONS et al., 2018). No caso de detecção de recaídas tardias, a duração de acompanhamento precisa ser maior que nove meses (KIM et al., 2012). Portanto, o acompanhamento de pacientes por períodos mais longos de tempo faz-se necessário para prever, com mais precisão, as reais taxas de recaídas/recorrências.

1.5. Desafios do uso da primaquina

1.5.1. Adesão ao tratamento

No Brasil, a PQ é geralmente recomendada por um período de 7 dias para a cura radical da malária por *P. vivax* (Tabela 1) (DEPARTAMENTO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2010). A dificuldade em prescrever a PQ, a preocupação com a sua toxicidade hemolítica e, também, a não adesão correta ao regime terapêutico, influenciam a decisão do tratamento. Em algumas regiões do mundo, uma baixa adesão tem sido documentada, principalmente no regime de 14 dias de tratamento (GRIETENS et al., 2010; KHANTIKUL et al., 2009). Em alguns estudos, a taxa de não adesão em áreas da Bacia Amazônica foi correspondente às taxas registradas no Equador, onde cerca de 34% dos pacientes não aderiram ao tratamento (ALMEIDA; VIEIRA, 2016; YÉPEZ, M. C., ZAMBRANO, D., CARRASCO, F., & YÉPEZ, 2000). A razão de chance de ressurgimento da parasitemia em pacientes que não aderiram ao tratamento foi três vezes maior quando comparada à razão de chance observada em pacientes que aderiram ao tratamento (OR = 3,95; IC 95%, 1,31 – 11,98; $P = 0,0071$) (ALMEIDA; VIEIRA, 2016). Um estudo mais amplo quantificou a adesão de pacientes ao tratamento contra *P. vivax* com CQ (três dias) e PQ (sete dias) em cinco municípios da Amazônia brasileira. Uma taxa de adesão de 86,4% foi

observada, taxa esta superior à encontrada no Peru (62,2%) e Equador (65,9%) que utilizaram regime terapêutico semelhante ao avaliado no Brasil (GRIETENS et al., 2010; PEREIRA; ISHIKAWA; FONTES, 2011b; YÉPEZ, M. C., ZAMBRANO, D., CARRASCO, F., & YÉPEZ, 2000). Estudos comparativos da adesão ao tratamento com CQ por três dias e PQ por sete ou 14 dias, também foram realizados em regiões da Amazônia. De certa forma, constatou-se que a adesão foi menor para esquemas terapêuticos mais longos, quando comparado com o regime de PQ de sete dias, reforçando a premissa de que quanto maior o tempo de tratamento, menor a sua taxa de adesão (DUARTE; GYORKOS, 2003; GOLLER et al., 2007).

Tabela 1. Tratamento das infecções por *Plasmodium vivax* com cloroquina em três dias e primaquina em sete dias (esquema curto) preconizado pelo Ministério da Saúde. Extraído do Guia Prático de Tratamento de Malária no Brasil, 2010.

Idade/Peso	Número de comprimidos por medicamento por dia						
	1º dia		2º dia		3º dia		4º ao 7º dias
	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Primaquina INFANTIL
6-11 meses 5-9 kg	1/2	1	1/4	1	1/4	1	1/2
1-3 anos 1-14 kg	1	2	1/2	1	1/2	1	1
4-8 anos 15-24 kg	1	2	1	2	1	2	2
Idade/Peso	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Primaquina ADULTO
9-11 anos 25-34 kg	2	1	2	1	2	1	1
12-14 anos 35-49 kg	3	2	2	2	2	2	1
≥15 anos ≥ 50 kg	4	2	3	2	3	2	2

- Cloroquina: comprimidos de 150mg; Primaquina infantil: comprimidos de 5mg; Primaquina adulto: comprimidos de 15mg.
- Sempre dar preferência ao peso para a escolha da dose.
- Todos os medicamentos devem ser administrados em dose única diária.
- Administrar os medicamentos preferencialmente às refeições.
- Não administrar primaquina para gestantes ou crianças menores de 6 meses.
- Se surgir icterícia, suspender a primaquina.
- Se o paciente tiver mais de 70kg, ajustar a dose de primaquina.

1.5.2. Efeitos adversos da primaquina

A dosagem individual de PQ é limitada pelo desconforto abdominal, que geralmente é grave em doses maiores que 1 mg/kg (BRAGA et al., 2015). Em geral, a PQ é bem tolerada em doses individuais $\leq 0,5$ mg/kg, se administrada junto aos alimentos. O principal efeito

adverso da PQ é a hemólise (ASHLEY; RECHT; WHITE, 2014). Alguma perda de células vermelhas pode ocorrer em pacientes normais, mas aqueles que são deficientes em G6PD são particularmente vulneráveis. A G6PD é necessária para as defesas dos eritrócitos, regeneração de glutatona e para a funcionalidade da enzima *catalase* (RECHT; ASHLEY; WHITE, 2018). Os eritrócitos de homens hemizigotos com deficiência de G6PD e de mulheres homocigotas têm menos de 30% da atividade enzimática encontrada nas células normais. Existem mais de 180 variantes genéticas de G6PD, sendo que quase todas conferem uma enzima instável que se degrada mais rapidamente do que a variante normal e torna as células vermelhas mais vulneráveis a danos oxidativos (BAIRD et al., 2001). O grau e risco de hemólise dependem de dois fatores principais: o grau de deficiência de G6PD, além da dose e duração da exposição a PQ (RECHT et al., 2015). No Brasil, a prevalência de deficiência de G6PD, em área endêmica de malária na Amazônia Brasileira, foi detectada a uma frequência de 2,4 – 5,6% em homens adultos (DOMBROWSKI et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2016).

1.5.3. Tratamentos alternativos à primaquina para infecções por *Plasmodium vivax*

A tafenoquina (TQ), uma 8-aminoquinolina estruturalmente relacionada à PQ, foi testada, pela primeira vez, em 1998, para avaliação da sua tolerabilidade em homens normais para a G6PD (RAJAPAKSE; RODRIGO; SD, 2015). A TQ é absorvida lentamente após administração oral, com concentrações plasmáticas máximas observadas em cerca de 12 horas após a dose em indivíduos em jejum (BRUECKNER et al., 1998). A meia vida de eliminação da TQ é de cerca de 2 semanas, sendo uma droga amplamente distribuída em tecidos de baixa depuração (capacidade do organismo em eliminar o fármaco) (CHARLES et al., 2007). A TQ, assim como a PQ, causa hemólise em indivíduos com deficiência de G6PD (LACERDA et al., 2019; RUEANGWEERAYUT et al., 2017). Diferentemente da TQ, a PQ é rapidamente eliminada e sua administração pode ser interrompida se houver hemólise grave. Como medicação anti-hipnozoítica de ação prolongada, a TQ foi recentemente registrada na *Food and Drug Administration* e na *Australian Therapeutic Goods Administration* para cura radical da malária por *P. vivax* (LLANOS-CUENTAS et al., 2019).

Estudos iniciais confirmaram a eficácia da TQ para prevenir recaídas da infecção por *P. vivax* (LLANOS-CUENTAS et al., 2014). Em 2014, um estudo multicêntrico de fase três realizado em diferentes localidades no Brasil, Peru, Índia e Tailândia, mostrou que uma única dose de 300 ou 600 mg de TQ em combinação com a CQ foi tão eficaz quanto a dose de 15 mg/kg/dia de PQ por 14 dias na prevenção de recaídas por *P. vivax* (LLANOS-CUENTAS et

al., 2014). Recentemente, um outro estudo confirmou estes dados em uma população de área endêmica, mostrando que 62,4% (IC 95%, 54,9 – 69,0) de pacientes em uso de TQ não tiveram recidivas por 6 meses (LACERDA et al., 2019). Confirmando esses dados, uma metanálise, realizada em 2019, mostrou que o percentual de pacientes livres de recorrência aos seis meses foi de 67% (IC 95% 61– 72,3) entre 426 pacientes em uso de TQ e 72,8% (IC 95% = 65,6 – 78,8) entre 214 pacientes em uso de PQ (LLANOS-CUENTAS et al., 2019). Entretanto, a eficácia da TQ não se mostrou inferior à da PQ (OR = 1,81; IC 95% = 0,82 – 3,96). De forma favorável, pelo fato da dose única, para a TQ não há abandono do tratamento como acontece com a administração de PQ (LACERDA et al., 2019).

1.6. Efeito do metabolismo de CYP2D6 na farmacocinética/atividade da primaquina

A caracterização dos metabólitos de PQ é complexa devido à formação de muitos metabólitos ativos instáveis. O principal conceito recentemente descoberto é que a PQ parental é uma pró-droga, biotransformada pela isoenzimas do complexo citocromo P450 CYP2D6 em um metabólito(s) oxidado(s), que é (são) responsável(is) pela atividade anti-hipnozoítica da droga (Figura 9). Avanços tecnológicos recentes em cromatografia líquida com espectrometria de massa permitiram a identificação extensiva de metabólitos e estudos de fenotipagem do CYP450 usando isoenzimas recombinantes e/ou hepatócitos. (BENNETT et al., 2013; PYBUS et al., 2012). Em um extenso teste *in vitro* com PQ, os autores demonstraram que a CYP2D6, Monoamina Oxidase A (MAO-A), CYP2C19 e CYP3A4 (em ordem de eficácia catalítica) foram capazes de metabolizar a PQ em alguma extensão (PYBUS et al., 2012). Deve-se notar que a CYP2D6 apresentou a maior razão V_{max}/K_m (eficiência catalítica) no metabolismo da PQ em comparação às isoenzimas CYPs e MAOs recombinantes testadas. Eles sugeriram que, embora a CYP2D6 tenha uma concentração relativamente baixa em relação a outras CYPs relevantes, presentes em hepatócitos, sua relevância fisiológica potencial na via metabólica da PQ é grande.

A via da MAO-A parece ser amplamente responsável pela formação de uma espécie de aldeído de PQ (o provável progenitor da carboxiprimaquina, o metabólico plasmático mais abundante em humanos). Curiosamente, metabólitos fenólicos, previamente associados com a atividade *redox* foram observados sendo primariamente produtos do metabolismo de CYP2D6 (PYBUS et al., 2012). Em 2015, um estudo mostrou que a formação de metabólitos fenólicos diminuiu em camundongos *knockout* para CYP2D (POTTER et al., 2015a). Dessa forma, a via mediada pela CYP2D6 parece ser a responsável pela formação dos metabólitos associados

à eficácia antimalárica, e, também, aos efeitos hemolíticos do fármaco (BENNETT et al., 2013; FASINU et al., 2014).

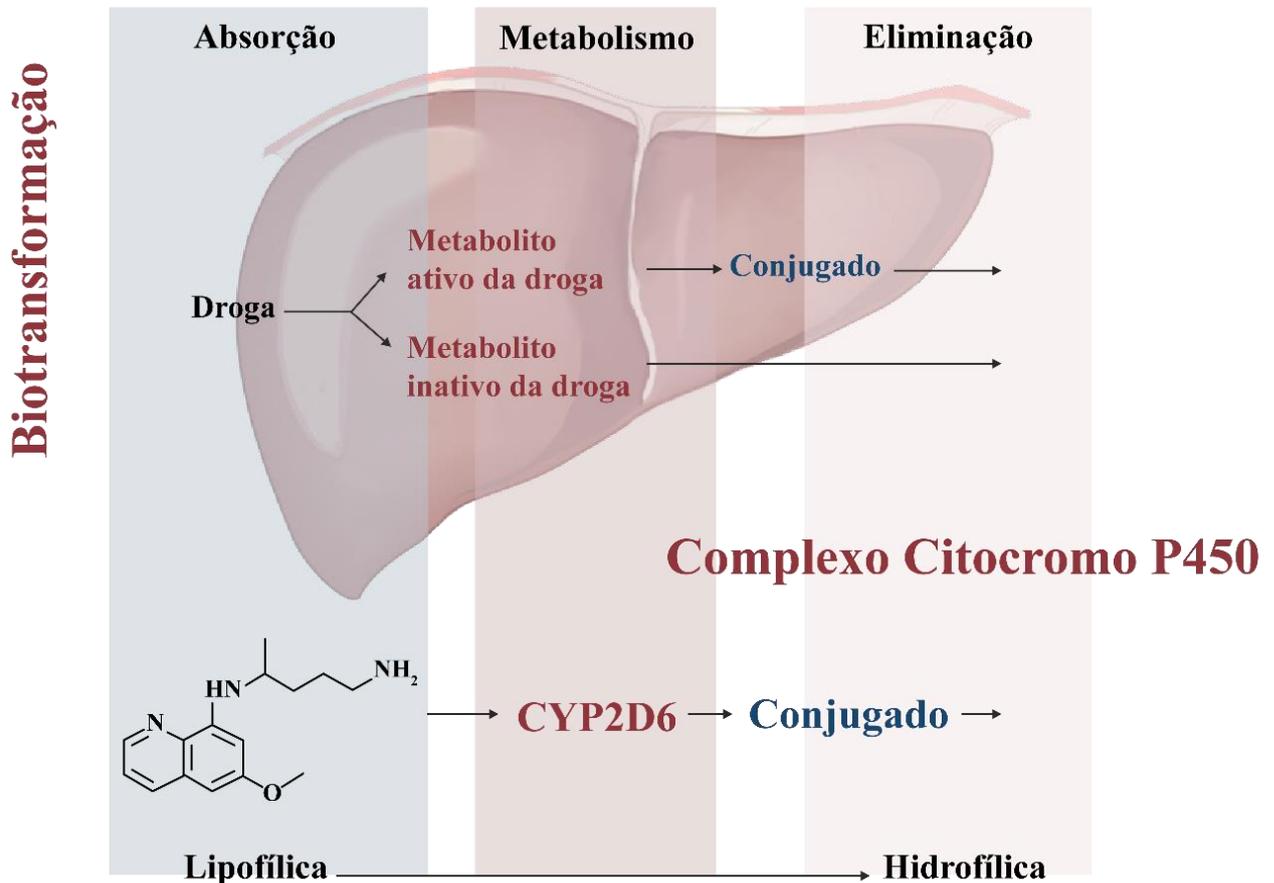


Figura 9. Processo de biotransformação da primaquina no fígado. A depuração de uma droga no organismo geralmente envolve um processo de biotransformação (ou reações metabólicas) que pode ser modulado pela modificação da estrutura química dos xenobióticos para aumentar ou diminuir a sua taxa de metabolismo. Devido à biotransformação, a estrutura molecular de uma droga é comumente alterada para ser mais hidrofílica, facilitando, assim, a sua eliminação do organismo. Além de facilitar a excreção do organismo, esse processo de modificação é essencial para promover o efeito farmacológicos de pró-fármacos (compostos administrados em forma inativa e que só são ativados somente após biotransformação) e promover sua ação farmacológica (formação de metabólitos ativos) / melhora de absorção. Embora as vias de metabolismo de PQ não sejam totalmente compreendidas, estudos sugerem que a eficácia da PQ está ligada a seu processo de biotransformação, por uma via dependente do complexo citocromo P450, levando à produção de metabólitos de ciclo *redox*. Os metabólitos fenólicos de PQ são os candidatos mais prováveis para essa atividade/eficácia (PYBUS et al., 2013a). Dada a natureza reativa desses metabólitos e sua capacidade demonstrada para o ciclo *redox*, eles devem ser considerados de importância potencial para qualquer mecanismo de ação dependente da produção de estresse oxidativo. Recentemente foi demonstrado que estes metabólitos fenólicos são predominantemente gerados através de uma via dependente da CYP2D6, importante membro da superfamília do Citocromo P450 responsável pelo metabolismo de aproximadamente 25% das drogas usadas clinicamente (ZANGER; RAIMUNDO; EICHELBAUM, 2004). O gene *CYP2D6* possui uma alta heterogeneidade alélica que resulta em grandes variações interindividuais no nível e atividade da enzima. A atividade funcional do gene *CYP2D6* é um importante determinante da depuração de fármacos para muitos substratos desta enzima. Em modelos animais e em humanos, parece que a diminuição da atividade de CYP2D6 tem um efeito significativo no metabolismo e *clearance* da PQ.

O perfil e parâmetros farmacocinéticos da carboxiprimaquina em humanos não são afetados pelo genótipo CYP2D6, corroborando a evidência de que a formação do metabólito carboxi prossegue via MAO-A, como a enzima metabólica primária e tem pouco a ver com o metabolismo da enzima CYP2D6 funcional (Figura 10). O perfil da farmacocinética da PQ em um modelo de camundongo com metabolismo heterogêneo de CYP2D6 foi conduzido por Potter et al. (2015) e as tendências correspondentes foram semelhantes às obtidas por Bennet et al. (2013) em estudo com humanos (BENNETT et al., 2013; POTTER et al., 2015b). Os perfis farmacocinéticos plasmáticos e hepáticos da PQ parental em camundongos normais C57 BL/6 e CYP2D *knockout* mostram que os níveis de PQ parental eram mais baixos em camundongos selvagem em biópsias hepáticas e plasma.

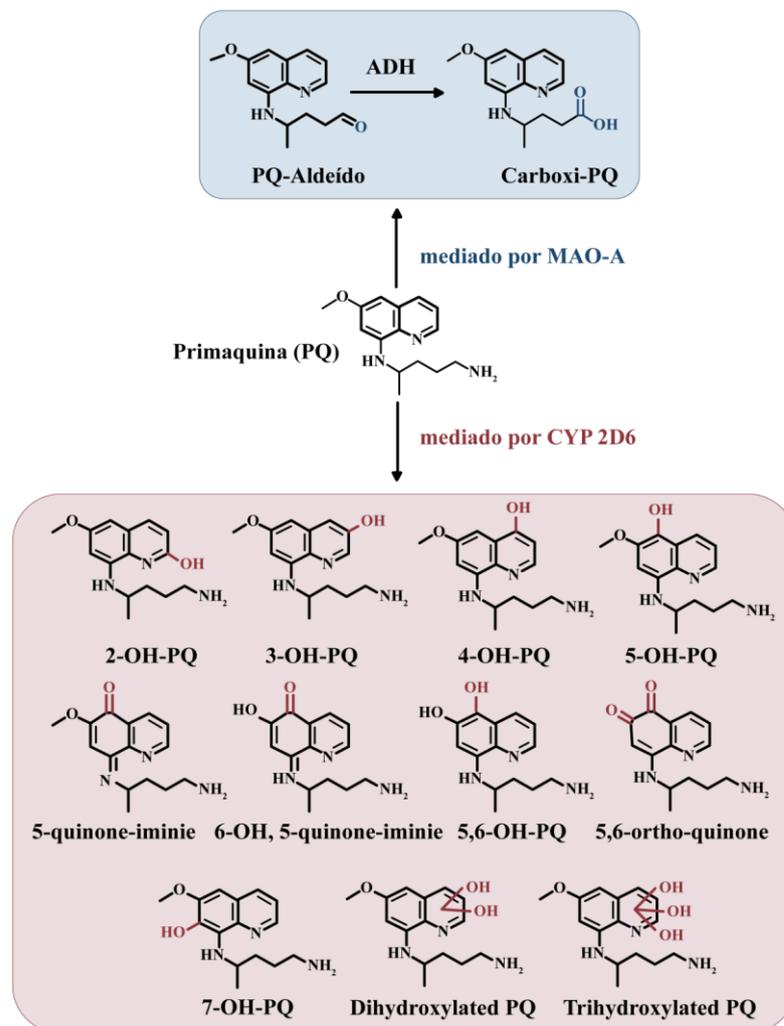


Figura 10. Vias metabólicas envolvidas na farmacocinética da primaquina, mediadas por CYP2D6 e Monoamina Oxidase-A. O aldeído da PQ e o subsequente metabólito carboxi formado pelo metabolismo da MAO-A são destacados pela caixa azul. Os metabólitos fenólicos da PQ produzidos através do metabolismo de CYP2D6 são destacados pela caixa vermelha. Adaptado de MARCSISIN; REICHARD; PYBUS (2016).

1.7. Influência da variabilidade genética de *CYP2D6* no metabolismo de drogas

O gene *CYP2D6* humano inclui 9 éxons e 8 íntrons, com uma fase de leitura aberta de 1383 pb, codificando cerca de 461 aminoácidos e está localizado no cromossomo 22q31.1, em um conjunto de genes que abrange cerca de 45 kb, incluindo os pseudogenes *CYP2D7* e *CYP2D8*. A *CYP2D6* é uma das mais importantes e estudadas enzimas do complexo P450, sendo responsável pela metabolização de 25 – 30% dos medicamentos prescritos em humanos (INGELMAN-SUNDBERG, 2005a; WANG et al., 2014; ZANGER; SCHWAB, 2013). As principais classes de fármacos metabolizados pela *CYP2D6* incluem: antimaláricos (CQ e PQ), antidepressivos, antipsicóticos, antiarrítmicos, betabloqueadores, antieméticos e opioides (PYBUS et al., 2012). Apesar de representar apenas uma pequena percentagem de todas as enzimas hepáticas do complexo citocromo P450 (2 – 5% do conteúdo total de CYP no fígado (INGELMAN-SUNDBERG, 2005b), seu papel no metabolismo de drogas é extensivamente maior do que o seu conteúdo relativo (ZANGER; RAIMUNDO; EICHELBAUM, 2004). A *CYP2D6* também está presente em pequenas quantidades no cérebro (CHINTA et al., 2002), trato gastrointestinal e pulmões (GUIDICE et al., 1997). Apesar da *CYP2D6* ser uma das isoformas do CYP450 mais amplamente estudadas em relação aos polimorfismos genéticos, pouco se sabe sobre os mecanismos de regulação e variabilidade na expressão desse gene. Acredita-se que haja a participação do fator HNF4- α no processo de regulação transcricional (PAN; NING; JEONG, 2017; ZANGER; SCHWAB, 2013).

O locus de *CYP2D6* é complexo e altamente polimórfico. Os principais polimorfismos de *CYP2D6* descritos na literatura estão apresentados na Figura 11. A presença de uma ou mais variações de nucleotídeos (SNVs), que incluem SNPs e inserções ou deleções de um, ou de um pequeno número de nucleotídeos (HODEL et al., 2013), determina diferentes variantes alélicas de *CYP2D6*. Outros alelos são caracterizados por rearranjos gênicos que deram origem a grandes deleções, duplicações gênicas e multiplicações. Alelos com variações de nucleotídeos únicos exibem uma seleção de variantes alélicas raras. Em geral, os alelos de *CYP2D6* não são divididos por função, mas pela presença de um conjunto de alterações em determinadas posições, que os classifica em *CYP2D6*1* (alelo referência) e demais alelos de *CYP2D6*.

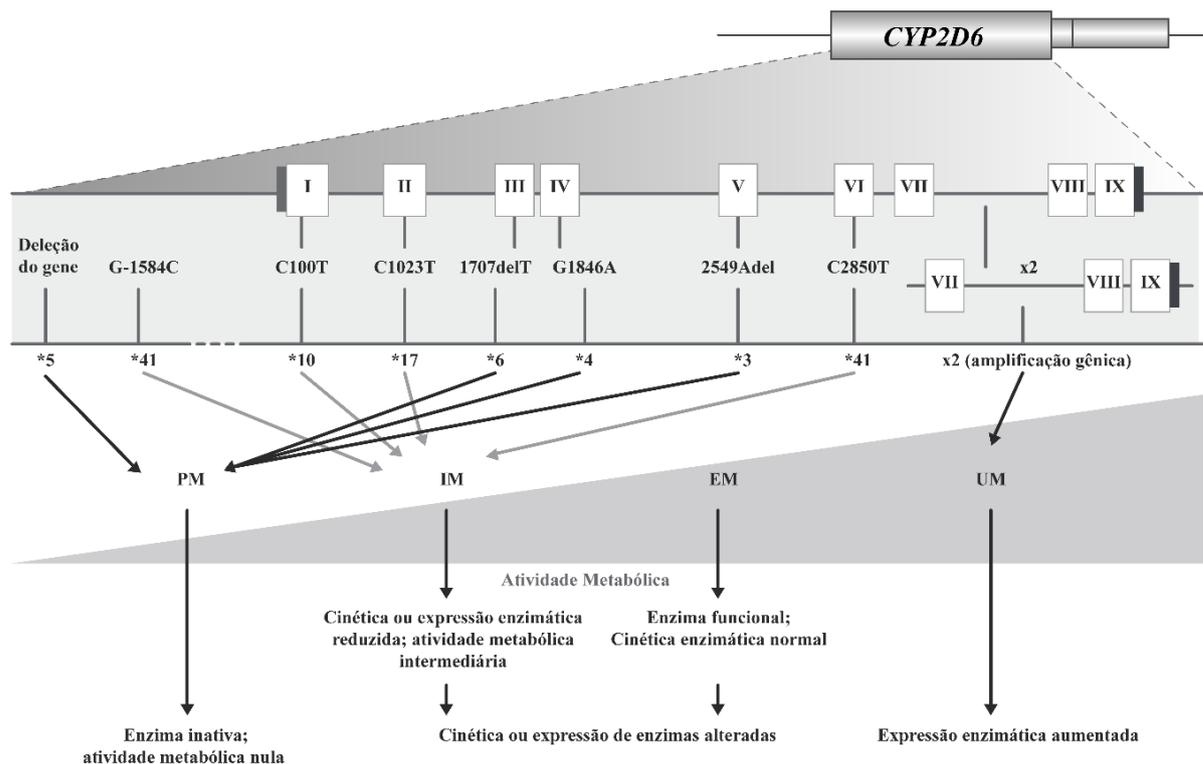


Figura 11. Polimorfismos no locus *CYP2D6*. O gene *CYP2D6* inclui 9 éxons (apresentados em caixas numeradas em algarismos romanos) e 8 íntrons e está localizado no cromossomo 22q.31.1. Mais de 150 variantes alélicas, caracterizadas por SNPs, inserções/deleções e repetições, dentro das regiões codificadora e promotora do locus *CYP2D6* são conhecidos, além de deleções e duplicações do gene inteiro. Polimorfismos comuns (incluindo o polimorfismo G1846A, determinante do alelo *CYP2D6* *4, mostrado em negrito) e seus efeitos fenotípicos são mostrados na figura. Como demonstrado, cada polimorfismo é determinante de um alelo * de *CYP2D6*. Cada diplótipo caracteriza uma classe fenotípica com atividade enzimática variável: metabolizadores nulos (PM), metabolizadores intermediários (IM), metabolizadores normais (EM) e metabolizadores ultrarrápidos (UM). O triângulo em cinza indica a extensão de atividade metabólica, sendo baixa em indivíduos com enzima inativa ou atividade metabólica nula e extremamente alta em indivíduos com expressão enzimática aumentada ou atividade metabólica ultrarrápida. Adaptado de BATTY et al., (2014).

Atualmente, existem mais de 150 variantes alélicas descritas, mas a maioria é bastante rara (ZANGER; SCHWAB, 2013). Em geral, a sequência e as variações estruturais dão origem a alelos que conferem ausência, diminuição, normalidade ou aumento da função, levando a uma ampla gama de atividade enzimática entre os indivíduos, desde a ausência de atividade até um metabolismo ultrarrápido (GAEDIGK, 2013; HE et al., 2015; VARELA et al., 2015). Em um extremo estão os chamados metabolizadores nulos, isto é, indivíduos com alelos inativos ou não funcionais que são incapazes de metabolizar ou bioativar drogas através da via *CYP2D6*. No outro extremo estão os metabolizadores ultrarrápidos que possuem pelo menos um alelo de função aumentada (isto é, duas ou mais cópias de um alelo funcional em um cromossomo) para além de um alelo de função normal. Estes dois grupos metabolizadores estão em maior risco de sofrer efeitos adversos relacionados com a dose ou falha do tratamento, dependendo do substrato particular envolvido.

A genética desempenha um importante papel na determinação da variação interindividual do metabolismo de CYP2D6 (ZHOU, 2009). Variantes importantes no metabolismo da enzima incluem alelos relacionados a atividade nula: *CYP2D6**3, *4, *5, *6, *7, *8, bem como *36 que não tem atividade funcional (metabolizador nulo); alelos relacionados a atividade reduzida: *CYP2D6**9, *10, *17, *29 e *41, que diminuem o efeito catalítico da enzima (metabolizador intermediário); e duplicações *1xN, *2xN, ou *35xN que apresentam a capacidade funcional aumentada (metabolismo ultrarrápido). Estudos demonstraram que as frequências alélicas de *CYP2D6* variam substancialmente entre as populações do mundo (GAEDIGK et al., 2017; LLERENA et al., 2014; NARANJO et al., 2018; SISTONEN et al., 2007; ZANGER; RAIMUNDO; EICHELBAUM, 2004). Algumas variantes alélicas estão presentes nas populações em frequências similares, enquanto outras são observadas em frequências muito diferentes ou foram detectadas apenas em um determinado grupo étnico. A expressão polimórfica do gene *CYP2D6* é um dos fatores mais importante que afeta a atividade da enzima dentro e entre as populações (GAEDIGK et al., 2017). Por exemplo, o alelo de função reduzida *10 é observado em cerca de 38% a 50% de asiáticos, mas apenas em cerca de 3% de caucasianos e 6% de africanos. Da mesma forma, o alelo de função reduzida *17 está presente quase exclusivamente em africanos (LLERENA et al., 2014). Em contraste, o alelo *2 de função normal (metabolizador normal) está presente em cerca de 25% dos caucasianos e 31% dos africanos, mas apenas em 10% a 12% de asiáticos. Essas diferenças provavelmente respondem por alguma variação étnica na resposta a medicamentos que são substratos de *CYP2D6* (TUTTON, 2014).

Entre os principais polimorfismos de *CYP2D6*, o SNP G1846A é característico do alelo *CYP2D6**4 não funcional, resultando em uma proteína sem atividade. Esta variante é responsável pela maioria dos indivíduos com ausência da atividade de *CYP2D6*, encontrados majoritariamente em populações caucasianas. O SNP C100T caracteriza o haplótipo *CYP2D6**4 não funcional e o haplótipo *CYP2D6**10 de função reduzida. Como o SNP C100T está presente tanto no haplótipo não funcional como o de função reduzida, esse SNP não deve ser responsável pela ausência de função observada em *CYP2D6**4. A presença da alteração C100T e a ausência do polimorfismo G1846A caracteriza a variante alélica *CYP2D6**10 (SHIRAIISHI et al., 2002). Na maioria dos casos, a presença de C1023T e C2850T é diagnóstico para a variante alélica *CYP2D6**17 (OSCARSON et al., 1997).

O SNP G3183A foi identificado pela primeira vez em uma triagem de uma grande população europeia (GAEDIGK et al., 1999). Embora raro em europeus, os SNPs C2850T e G3183A foram posteriormente identificados como parte do haplótipo *CYP2D6**29 de função

reduzida, que é encontrado com uma frequência estimada de 20% em africanos. Já o G2988A é um polimorfismo intrônico que demonstrou estar associado ao *splicing* de *CYP2D6* (ALDOSARI et al., 2013; SILVINO et al., 2016). Essa alteração pós transcricional leva à deleção do éxon 6, e conseqüente redução da atividade enzimática. O polimorfismo G2988A é característico do alelo *CYP2D6**41, que se acredita ser responsável pela fenótipo reduzido na maioria dos caucasianos (RAIMUNDO et al., 2004).

Embora os polimorfismos do gene *CYP2D6* contribuam para uma grande parte da variabilidade interindividual na atividade da enzima *CYP2D6*, as variações no número de cópias (CNV) do gene *CYP2D6* também contribuem para essa variabilidade (EICHELBAUM; INGELMAN-SUNDBERG; EVANS, 2006). O gene *CYP2D6* frequentemente sofre deleção ou amplificação gênica. As frequências destes polimorfismos variam consideravelmente entre diferentes populações étnicas (SISTONEN et al., 2007). Por exemplo, a eliminação completa do gene *CYP2D6* (*5) é relativamente mais frequente em asiáticos e caucasianos, variando entre 4 – 5% e 2 – 7%, respectivamente (BRADFORD, 2002a) (Figura 12).

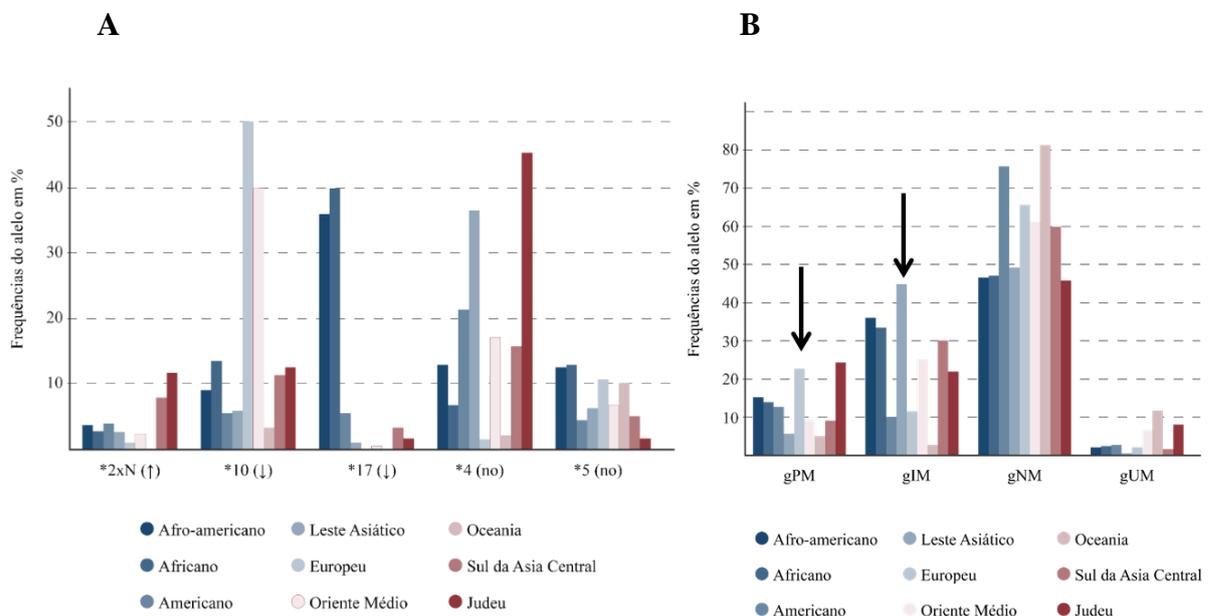


Figura 12. Frequências alélicas de *CYP2D6* em todas as populações do mundo. (A) Comparação de frequências alélicas selecionadas entre populações mundiais. As frequências alélicas diferem consideravelmente entre as populações, como demonstrado em variantes alélicas de *CYP2D6* selecionadas. O gráfico representa as frequências dos fenótipos de função nula (gPM), reduzida (gIM), normal (gNM) e aumentada (gUM), calculadas a partir das variantes alélicas reportadas em cada população. As frequências alélicas representam a média de um alelo nas respectivas populações e, portanto, não somam 100%. As setas pretas estão indicando maior frequência dos genótipos gPM e gIM (atividade nula/reduzida da enzima) em europeus.

Similarmente, a amplificação do gene inteiro *CYP2D6* varia de 0 – 13% em caucasianos e africanos (SISTONEN et al., 2007), sendo muito alta em asiáticos (54%). A genética do CNV em *CYP2D6* é mais complicada pela variedade de alelos *CYP2D6* que existem em múltiplas cópias. A consequência fenotípica do CNV depende do alelo *CYP2D6* envolvido na duplicação. Por exemplo, com base no metabolismo da droga-sonda dextrometorfano, foi demonstrado que os indivíduos com duplicações de *CYP2D6*2* têm atividade enzimática aumentada quando comparados com portadores de uma única cópia desse alelo (AKLILLU et al., 1996). No entanto, indivíduos com duplicações de *CYP2D6*10* têm atividade enzimática similar aos indivíduos que tem uma única cópia do alelo *CYP2D6*10* (ISHIGURO et al., 2004). Assim, os portadores de múltiplas cópias dos alelos *CYP2D6* funcionais (**1xN*, **2xN*) são classificados como metabolizadores ultrarrápidos, enquanto os portadores de dois alelos *CYP2D6*10x2* e *CYP2D6*4x2* são considerados metabolizadores intermediários e nulos, respectivamente.

1.8. Tradução do genótipo de CYP2D6 em classes fenotípicas de acordo com a atividade enzimática

A introdução de técnicas moleculares na década de 1990 permitiu o sequenciamento do DNA de pacientes com fenótipo de metabolismo reduzido para *CYP2D6* e reconhecimento de diversas variações na sequência de *CYP2D6* (HEIM; MEYER, 1992). Mais tarde, a identificação de pacientes com um metabolismo ultrarrápido devido a duplicações ou múltiplas cópias do gene funcional e níveis mais elevados de expressão enzimática levaram ao atual modelo de classificação tradicional do metabolismo de *CYP2D6*: metabolizadores nulos (PM), indivíduos que são homocigotos para alelos de perda de função; metabolizadores intermediários (IM), indivíduos que carregam (i) um alelo com perda de função e um com atividade reduzida ou (ii) ambos os alelos com atividade reduzida; os metabolizadores normais ou extensivos (EM ou NM) que podem ser classificados de acordo com as seguintes combinações: (i) dois alelos funcionais, (ii) um alelo com atividade funcional e outro com atividade reduzida, (iii) um alelo funcional e um com perda de função ou (iv) um alelo com perda de função e outro com amplificação gênica; e os metabolizadores ultrarrápidos (UM), indivíduos que têm um ganho da função de *CYP2D6* devido à duplicação ou múltiplas cópias do gene *CYP2D6* funcional (Figura 13) (GAEDIGK et al., 2008; HE; HOSKINS; MCLEOD, 2011; HOSONO et al., 2009). Dessa forma, para descrever a funcionalidade dos alelos e o *status* do fenótipo, alguns termos para designar a função dos alelos são designados: função

“nula”, “reduzida”, “normal” e “aumentado”, correspondente a metabolizador nulo (PM), intermediário (IM), normal (NM) e ultrarrápido (UM), respectivamente. Esses termos foram determinados pelo Consórcio de Implementação Farmacogenética Clínica (CPIC) em um esforço para padronizar os termos de notificação dos resultados dos testes farmacogenéticos clínicos (<https://cpicpgx.org/resources/term-standardization/>).

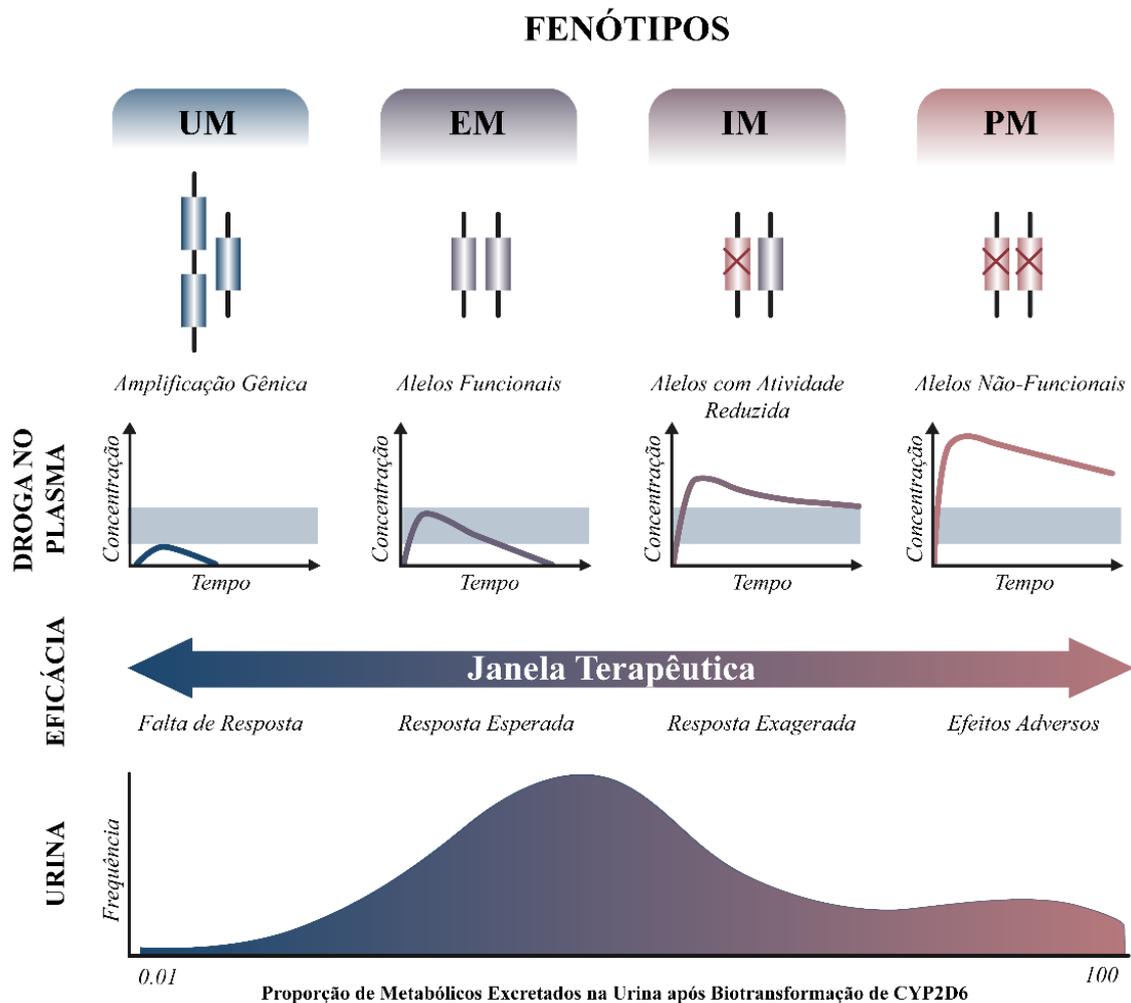


Figura 13. Esquema das relações genótipo-fenótipo de CYP2D6 e suas consequências farmacocinéticas e clínicas. No modelo tradicional de classificação dos fenótipos de CYP2D6, indivíduos são categorizados em quatro grupos com base na extensão da atividade enzimática: metabolizadores pobres ou nulos (PM), indivíduos que carregam dois alelos nulos; metabolizadores intermediários (IM), indivíduos que carregam (i) um alelo com perda de função e um com atividade reduzida ou (ii) ambos os alelos com atividade reduzida; metabolizadores extensivos ou normais (EM), pacientes com (i) dois alelos funcionais, (ii) um alelo com atividade funcional e outro com atividade reduzida, (iii) um alelo funcional e um com perda de função ou (iv) um alelo com perda de função e outro com amplificação gênica e metabolizadores ultrarrápidos (UM), indivíduos que têm um ganho da função de CYP2D6 devido à duplicação ou múltiplas cópias do gene *CYP2D6* funcional. Os alelos nulos ou com função diminuída são representados por caixas vermelhas e alelos totalmente funcionais por caixas azuis. O painel abaixo das representações dos alelos mostra as curvas de concentração plasmáticas esperadas no metabolismo de drogas, ao longo do tempo, com a janela terapêutica/resposta esperada indicada pela área (proporção de metabólitos excretados na urina após biotransformação de CYP2D6). Adaptado de ZANGER; RAIMUNDO; EICHELBAUM (2004).

Mesmo que a análise do genótipo de CYP2D6 seja limitada aos polimorfismos mais comuns e clinicamente relevantes, designando quatro classes fenotípicas (PM, IM, EM e UM), o número de alelos e diplótipos encontrados em qualquer população ou coorte estudada permanece extremamente grande. Como a maior parte da literatura sobre CYP2D6 está focada na determinação do estado metabólico de um indivíduo, o banco de dados *Pharmgkb* compila os haplótipos/diplótipos que resultam mais comumente na função alterada de CYP2D6, embora existam muito mais. Um estudo populacional recente avaliando diferentes SNPs, (determinantes de 20 variantes alélicas, bem como variantes de número de cópias) foram identificados 51 e 57 diplótipos (combinação dos alelos) diferentes entre caucasianos e afro-americanos, respectivamente. Essa variabilidade observada em diversos estudos, levou ao desenvolvimento de um “Sistema” para interpretar prontamente as informações de genótipo/diplótipo de *CYP2D6*, agrupando genótipos em grupos fenotípicos já convencionalmente determinados para a atividade enzimática: metabolizadores nulos (PM), metabolizadores reduzidos (IM), metabolizadores normais (NM) e metabolizadores ultrarrápidos (UM). A fim de facilitar a tradução do genótipo em fenótipo, no sistema de Pontuação de Atividade Alélica (*Activity Score System*), a cada alelo de *CYP2D6* é atribuído um valor de 0, 0,5 ou 1, categorizando-o como: nulo, reduzido ou com função normal, respectivamente (note que o valor de 0,5 não indica uma redução da atividade de 50%, mas sinaliza diminuição da função enzimática, ou seja, tem atividade funcional intermediária entre a ausência e função completa de CYP2D6). Para alelos com duas ou mais cópias gênicas, o valor do alelo é multiplicado pelo número de cópias do gene (por exemplo, uma duplicação do gene *CYP2D6* *1x2 recebe um valor de 2 para calcular o AS). A soma dos valores de ambos os alelos fornece o AS de um genótipo. Na maioria das populações, esse sistema de classificação normalmente leva a seis grupos AS, ou seja, AS = 0; 0,5; 1; 1,5; 2 e >2. Esse sistema de pontuação proposto é fácil de usar e mais intuitivo do que os alelos/diplótipos de *CYP2D6* (por exemplo, *CYP2D6**1, *4, *10, *1xN), que são difíceis de interpretar para muitos profissionais da saúde, clinicamente orientados, mas que não estão intimamente familiarizados com a nomenclatura de *CYP2D6* e lutam com a avaliação do impacto clínico de um genótipo específico da enzima. Embora o uso do sistema AS tenha simplificado as associações genótipo-fenótipo, a abordagem se beneficiará de refinamento, e fatores adicionais contribuem para a variabilidade da atividade da CYP2D6 dentro de um dado diplótipo, não sendo capturados pelo atual sistema de pontuação. Mais pesquisas nessas duas áreas potencialmente levará a uma aplicabilidade clínica mais difundida (GAEDIGK et al., 2018a) (Figura 14).

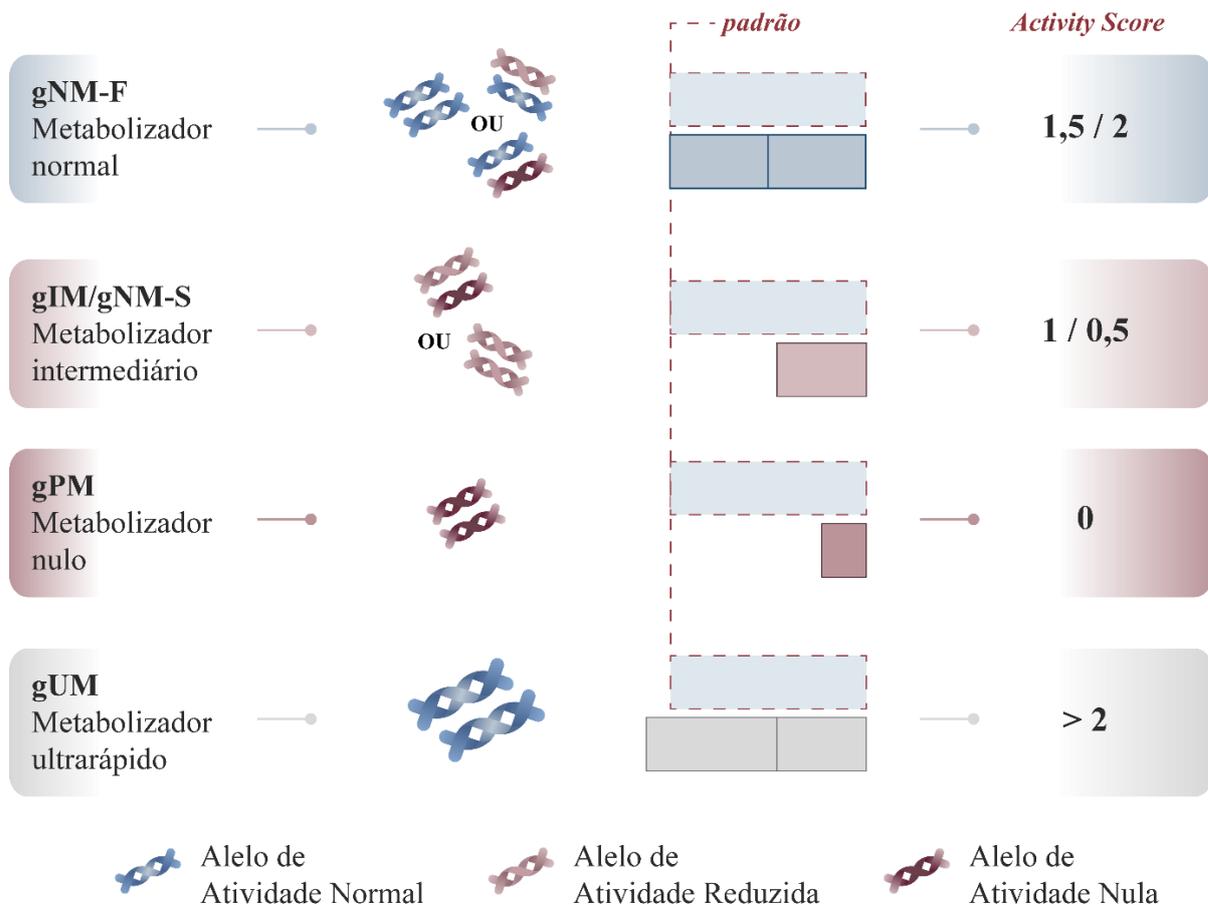


Figura 14. Classificação fenotípica baseada no Sistema de Pontuação de alelos de CYP2D6 (Activity Score System). Para descrever a funcionalidade dos alelos e o *status* fenotípico de CYP2D6, aderimos aos termos de classificação dos alelos como: “não funcional”, “reduzido”, “funcional” e “aumentado”, correspondentes aos fenótipos nulos (gPM), reduzido ou intermediário (gIM), normal (gNM) e ultrarrápido (gUM), respectivamente. Esses termos foram determinados pelo CPIC em um esforço para padronizar os termos de notificação dos resultados dos testes farmacogenéticos clínicos. No Sistema de Pontuação de Alelos (Activity Score System), os alelos são agrupados de acordo com sua funcionalidade; os valores entre parênteses indicam valores respectivos atribuídos a um alelo para calcular o AS de um haplótipo/diplótipo: não funcional (0) (*4, *4xN, *5, *6, *7, *8, *11, *12, *36, *40, *42, *56), alelos de função reduzida (0,5) (*9, *10, *17, *29, *41, *44, *49), funcionais (1) alelos (*2, *35, *43, *45) e alelos de função aumentada (2) (*1xN, *2xN, *35xN). Em seguida, as somas dos alelos não funcionais/nulos (0), função reduzida (0,5), funcionais (1) e função aumentada (2) são calculadas. As combinações de alelos, normalmente, dão origem a seis grupos AS (AS = 0, AS = 0,5, AS = 1, AS = 1,5, AS = 2, AS > 2). Indivíduos com AS = 0, AS = 0,5 e AS > 2 são designados como metabolizadores genéticos nulos, reduzidos e ultrarrápidos (gPM, gIM e gUM), respectivamente. Indivíduos com AS = 2 são designados como metabolizadores genéticos normais (gNM). Como esses grupos diplótipos cobrem uma ampla faixa de atividade, os indivíduos com AS = 1 são distinguidos aqui como gNM-*slow* (gNM-S), e indivíduos com AS = 1,5 e AS = 2 são designados como gNM-*fast* (gNM-F), de acordo com o relatório de Gaedigk et al. (GAEDIGK et al., 2008). Para especificar que o fenótipo foi previsto a partir do genótipo, utiliza-se o prefixo “g”.

Em termos de refinamento, no Sistema AS, atualmente, há mais grupos fenotípicos comparado a classificação clássica de CYP2D6, ou seja, os fenótipos: pobre/nulo (PM), intermediário/reduzido (IM), normal/extensivo (EM) e ultrarrápido (UM), que têm sido tradicionalmente utilizados em toda a literatura. Embora haja consenso entre os especialistas em definir AS = 0 como PM, AS = 0,5 como IM, AS = 1,5 e 2 como NM e aqueles com AS >

2 como UM, há controvérsias quanto à classificação dos indivíduos com AS = 1 e 2,5. O grupo fenotípico AS = 1 é o grupo mais contestado, classificado por alguns pesquisadores, como IMs por outros, como NMs. Os genótipos que dão origem a AS = 2,5 são tipicamente agrupados com AS > 2 e classificados como UM, mas alguns especialistas sugerem que o NM pode ser uma atribuição.

1.9. Efeito e implicações do metabolismo reduzido de CYP2D6

A farmacocinética da PQ foi avaliada em estudos com animais ao longo de muitos anos para posteriormente incluir os estudos clínicos em humanos (POTTER et al., 2015a; PYBUS et al., 2013a). Em 2013, um estudo avaliou a farmacocinética de PQ e carboxiprimaquina (CPQ), seu principal metabólito ativo, em indivíduos que apresentaram recaídas por *P. vivax* (MARCSISIN; REICHARD; PYBUS, 2016; PYBUS et al., 2013b). Indivíduos que recaíram apresentaram metabolismo reduzido de CYP2D6, com meia vida de PQ mais longa e valores de depuração (taxa de eliminação) mais baixos em relação aos indivíduos que não apresentaram recorrências da doença. Esses achados descritos apontam para o grupo de indivíduos inelegíveis para a PQ. Estudos na Indonésia acompanharam o relatório de Bennett et al. (2013) sugerindo que a função do citocromo P450 2D6 (CYP2D6) prejudicada por polimorfismos alélicos de ocorrência natural, resultou em falha terapêutica da PQ contra a infecção por *P. vivax*. Alelos de CYP2D6 com função nula/reduzida ocorreram em 95% das falhas terapêuticas, mesmo em uso de PQ de alta qualidade, diretamente supervisionada, e indivíduos acompanhados por um ano, em áreas em que a reinfeção era improvável (BAIRD; BATTLE; HOWES, 2018; SUTANTO et al., 2013).

2. Justificativa

A biologia dos hipnozoítos, infelizmente, permanece em grande parte desconhecida pois os estudos clínicos encontram dificuldades na identificação das verdadeiras recaídas. Vários estudos têm contornado essa questão analisando viajantes infectados por *P. vivax* que não retornaram às áreas endêmicas. No entanto, não está claro se as recorrências analisadas, nesses estudos, correspondem àquelas que ocorrem em indivíduos que vivem em áreas endêmicas de malária, que provavelmente foram infectados repetidamente por *P. vivax* e podem, portanto, ter um número muito maior de diferentes variantes genéticas de hipnozoítos. Até o momento, apenas um estudo no Brasil avaliou a presença de polimorfismos em *CYP2D6* e sua associação com recorrências de malária por *P. vivax* em região endêmica (BRASIL et al., 2018). Dessa forma, as evidências disponíveis não permitem a estimativa preliminar da proporção da população brasileira em que o metabolismo prejudicado da PQ provavelmente seria insuficiente para alcançar uma cura radical contra as recorrências da infecção por *P. vivax*.

Se a eficácia da PQ depender exclusivamente do metabolismo de *CYP2D6*, isso poderia representar um sério problema para os esforços de erradicação centrados no uso de PQ, pois muitas populações em todo o mundo, incluindo as que residem em áreas endêmicas, têm alta prevalência de alelos de atividade nula e reduzida de *CYP2D6* (BRADFORD, 2002b). Embora estudos mais recentes com PQ tenham fornecido evidências convincentes de que o metabolismo para formação de seus metabólitos ativos é dependente da atividade de *CYP2D6* (BENNETT et al., 2013; PYBUS et al., 2013a), esta evidência é baseada na falha terapêutica com PQ para metabolizadores nulos/reduzidos de *CYP2D6* e/ou ausência do efeito antimalárico de PQ em camundongos *knockout* de *CYP2D*, necessitando de estudos em humanos para comprovação desses dados.

A ampla caracterização do metabolismo da PQ é necessária para desenvolver um modelo mais complexo de riscos de falha no tratamento em termos do metabolismo do *CYP2D6*. No Brasil, a escassez de populações amostradas na base de dados torna-se insuficiente e não-representativa e, por vez, centra-se a características específicas populacionais, excepcionalmente desafiadoras para quaisquer conclusões futuras a nível regional da implicação do metabolismo de *CYP2D6* na região da Amazônia Legal Brasileira. Estimativas recentes mostraram que alelos do *CYP2D6* prejudicados, possivelmente relacionados ao alto risco de falha do tratamento com PQ, ocorrem em mais de 20% das populações mundial. Se, de fato, um terço ou mais das pessoas infectadas por *P. vivax* não

puderm receber com segurança terapia eficaz de PQ contra hipnozoítos, abordagens quimioterapêuticas ou quimioproláticas alternativas para prevenir os múltiplos ataques clínicos recorrentes de malária por *P. vivax* devem ser concebidas, otimizadas e validadas. Além disso, a obtenção de estimativas mais robustas das recorrências nesses grupos populacionais é essencial e informará diretamente a necessidade de estratégias para a terapia segura e eficaz dos reservatórios de hipnozoítos em comunidades humanas.

3. Hipótese de estudo

(i) O metabolismo nulo/reduzido do citocromo P450 2D6 (CYP2D6), causada por polimorfismos alélicos, resulta em risco aumento de recorrências da infecção por *P. vivax* devido a falha terapêutica da PQ; (ii) a resposta imune do hospedeiro aos parasitas da malária e fatores epidemiológicos modulam a suscetibilidade a recorrências de *P. vivax* em associação com o *status* de metabolismo reduzido de CYP2D6.

4. Objetivos

O objetivo geral desse estudo foi associar a atividade nula/reduzida de CYP2D6 e aumento do risco de recorrência de *P. vivax* em área endêmica de malária, com objetivos específicos de:

- (i) Identificar a prevalência de recorrências das infecções por *P. vivax* registrados no SIVEP–Malária ao longo de dez anos na comunidade de Rio Pardo;
- (ii) Estimar a frequências dos alelos, diplótipos e fenótipos de *CYP2D6* na população de Rio Pardo;
- (iii) Correlacionar a frequência das variantes genéticas de *CYP2D6* à ancestralidade genômica dos indivíduos de Rio Pardo;
- (iv) Investigar a associação de polimorfismos alélicos de *CYP2D6* no risco de recorrências da infecção por *P. vivax*.
- (v) Identificar fatores imuno/epidemiológicos envolvidos na suscetibilidade a recorrências de *P. vivax* em associação com o metabolismo nulo/reduzido de CYP2D6.

5. Métodos

5.1. Área e população de estudo

O estudo foi realizado no assentamento agrícola de Rio Pardo, localizado no município de Presidente Figueiredo, estado do Amazonas. O assentamento de Rio Pardo fica a aproximadamente 160 km de Manaus (Figura 10A) e foi oficialmente criado em 1996, pelo Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA), como parte dos projetos de colonização da Amazônia focados na agricultura e ocupação humana da região (CASTRO et al., 2006; KANO et al., 2012). A localidade rural é composta por sete áreas denominadas “Ramais”: Principal, Samuel, Novo Paraíso, Gusmão, Terra Preta, Taxista e Novo Progresso, que inclui as famílias residentes em ambos os lados de vias não pavimentadas (Figura 10B) e cercadas por floresta tropical. Além disto, há uma população ribeirinha, que vive às margens do Igarapé de Rio Pardo (KANO et al., 2012), cerca de 1,5 km das margens do córrego.

Um recenseamento da população, em 2008, registrou 701 habitantes, sendo 360 (51,4%) residentes em áreas de ramais, e 341 (48,6%) no Igarapé. A maioria dos indivíduos que residem em Rio Pardo são nativos da região da Amazônia e vivem principalmente da agricultura de subsistência e pesca na região, ao longo das margens do Rio Pardo. Em geral, as taxas de transmissão de malária na área estudada foram predominantemente moderadas a baixa durante os anos de 2003 a 2013 e apresentou variação do número de casos de malária durante os dez anos de levantamento de dados (2003 – 2013), refletindo períodos de diferentes intensidades de transmissão. A área de estudo foi classificada como hipo- a mesoendêmica com base no tamanho do baço das crianças locais e taxas de infecção parasitária (KANO et al., 2012). Ao longo dos anos, *P. vivax* foi a espécie responsável pela maioria dos casos de malária (média de 90%) durante o período de estudo na região. O número de casos de malária microscopicamente positivos para *P. falciparum* decresceu ao longo dos últimos anos, e desde 2011, *P. vivax* é a espécie responsável por todos os casos de malária registrados na comunidade (PIRES et al., 2018). O local do estudo e os padrões de transmissão da malária já foram descritos anteriormente por nosso grupo de pesquisa (KANO et al., 2012, 2018; PIRES et al., 2018). O número mais elevado de casos de malária foi em 2004 a 2006 (a incidência média anual de parasitas (IPA) foi de 289 casos por 1000 habitantes), seguida de uma diminuição contínua do número de casos; em 2009, a IPA era de 54,6 (Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, SVS / MS).

No Brasil, todos os casos de malária são registrados no Ministério da Saúde através do banco de dados do Registro Nacional do Sistema de Vigilância da Malária (SIVEP-Malária). O SIVEP-Malária é um sistema de vigilância online, projetado para identificar surtos e rastrear a eficácia do controle da malária, que notifica todos os casos de malária no Brasil, desde 2003. Estima-se que 99,6% dos casos de malária notificados no Brasil foram capturados pelo sistema em 2014. As altas taxas de notificação são impulsionadas pela notificação compulsória da malária no Brasil, sendo necessária para o acesso gratuito ao tratamento da malária, fornecido exclusivamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e testes/microscopia para confirmação da infecção e dos casos de malária (BRAZ et al., 2016; DAHER et al., 2019).

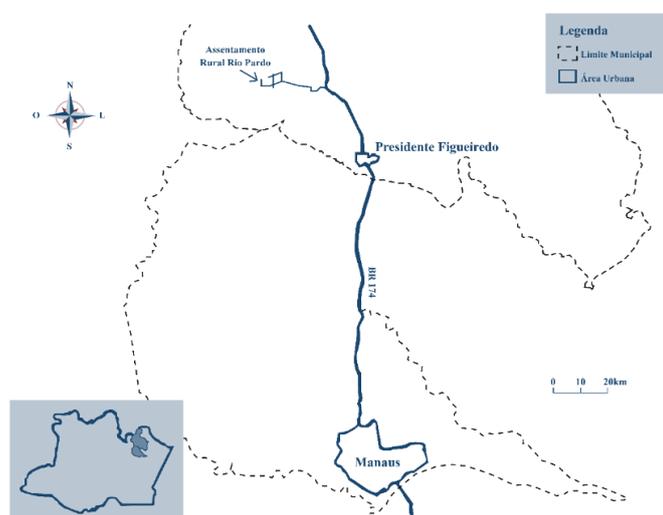
A**B**

Figura 15. Assentamento agrícola de Rio Pardo. (A) Localização geográfica de Rio Pardo – Presidente Figueiredo/Amazonas; (B) Áreas do assentamento agrícola de Rio Pardo: “Ramal” – estradas não pavimentadas que incluem domicílios localizados em ambos os lados e Igarapé – moradias ao longo do córrego Rio Pardo. Adaptado de FERREIRA; LUZ; BUSS (2016); KANO et al., (2012).

5.2. Classificação das recorrências e pacientes incluídos no estudo

Um estudo de coorte aberta de base populacional foi iniciado em novembro de 2008, seguido por duas pesquisas transversais: junho de 2009 e outubro a novembro de 2009 (KANO et al., 2012; SOUZA-SILVA et al., 2014). Dados imuno/epidemiológicos e amostras de sangue (DNA e plasma) foram coletados durante os levantamentos transversais. Inicialmente o estudo incluiu a participação da maioria dos indivíduos residentes em Rio Pardo (KANO et al., 2012), sendo possível obter informações/amostra da maioria dos indivíduos da comunidade. No geral, dos 701 moradores da Comunidade de Rio Pardo (senso de 2008), 541 (77,2%) indivíduos residentes em 176 domicílios aceitaram (mediante consentimento informado por escrito) a coleta de DNA. Destes, 261 indivíduos foram elegíveis ao nosso estudo, cuja análise genotípica/número de recorrências individual foi computada apenas uma única vez nas análises. A maioria dos indivíduos da comunidade, 527 (97,4%), eram nativos da Amazônia, mas para 14 indivíduos não havia informações sobre origem étnica. Para cada residente, o número de episódios de malária por *P. vivax* (monoinfecção e infecções mistas com *P. falciparum*) e informações sobre as espécies parasitas determinadas por microscopia foram obtidos do SIVEP-Malária para o período que o indivíduo residia na comunidade do Rio Pardo entre 2003 e 2013 (quando os dados estavam disponíveis no banco de dados).

Os 261 indivíduos totais, elegíveis ao estudo (indivíduos com amostra de DNA/plasma disponível e que apresentaram recorrências no período de levantamento dos dados: 2003 – 2013) foram pacientes com monoinfecção por *P. vivax* diagnosticada por microscopia e com episódios recorrentes, registrados no SIVEP-Malária, em intervalos que variaram de 29 a 180 dias do episódio inicial. Indivíduos com um único episódio de malária por *P. vivax* relatado em um período de 10 anos ou com episódios em intervalos maiores que 180 dias foram provavelmente reinfetados e, portanto, foram classificados como sem recorrência. Alguns indivíduos experimentaram vários episódios de múltiplas recorrências no período de 10 anos de levantamento dos dados, assim consideramos o episódio com o maior número de recorrências consecutivas. Por exemplo, se um indivíduo experimentou dois episódios de múltiplas recorrências (com dois e três episódios cada) em momentos diferentes, consideramos que esse sujeito teve três recorrências. Os indivíduos gestantes e crianças com menos de 6 meses de idade foram excluídos do estudo.

Do total de 261 pacientes com infecção por *P. vivax*, 137 foram elegíveis sem recorrência, 52 com única recorrência e 72 pacientes com múltiplos episódios de recorrência.

Todos os indivíduos incluídos no estudo receberam o tratamento recomendado para *P. vivax*: uma combinação de CQ (dose total de 25 mg/kg administrada por via oral durante três dias consecutivos) e PQ (dose total de 3,5 mg/kg administrada por sete dias), de acordo com as diretrizes do Ministério da Saúde do Brasil para tratamento da malária por *P. vivax* (DEPARTAMENTO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2010). O tratamento dos pacientes não foi supervisionado de perto. Os serviços de saúde na comunidade são realizados em um único posto avançado de diagnóstico de malária gerido pelo governo, neste diagnóstico e tratamento gratuitos para malária são fornecidos aos habitantes locais. As diretrizes do Ministério da Saúde determinam o ajuste da dose e tempo de administração da PQ em pacientes com peso igual ou superior a 70 kg (DEPARTAMENTO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2010) e preferência ao ajuste por peso para a escolha da melhor dosagem de CQ-PQ a ser administrada no indivíduo infectado. Os aspectos éticos e metodológicos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Instituto René Rachou / Fiocruz (Parecer nº 377.205; nº 2.803.756). Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento informado, incluindo parentes, cuidadores ou responsáveis, em nome dos menores/crianças inscritos no estudo.

5.3. Coleta de amostras de sangue e extração de DNA

A infecção por *P. vivax* foi confirmada pelo exame microscópico de esfregaços sanguíneos espessos corados por *Giemsa*, avaliados por microscopistas bem treinados, de acordo com as diretrizes de diagnóstico de Malária do Ministério da Saúde do Brasil. De cada paciente, 5 mL de sangue periférico foi coletado durante as cortes transversais e armazenados a 4°C em um tubo contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Para extração de DNA, o Kit de DNA *Gentra Puregene*® (Gentra Puregene, Minneapolis, MN, EUA) foi usado de acordo com as instruções do fabricante. Ao todo, 300 µL de sangue total foram utilizados para extração, obtendo-se um volume final de 100 µL de DNA/solução. É importante mencionar que as amostras utilizadas no estudo se encontram estocadas no Laboratório de Malária do Instituto René Rachou (IRR) e fazem parte do biorrepositório do Laboratório de Malária, que foi estabelecido conforme as diretrizes da Portaria Nº. 2201, do Ministério da Saúde, que regulariza as diretrizes nacionais para biorrepositórios de material biológico para fins de pesquisa.

5.4. Genotipagem de polimorfismos no gene *CYP2D6* por PCR em Tempo Real (qPCR)

Os alelos (*) de *CYP2D6* têm sua atividade enzimática determinada ou predita por experimentos *in vivo* ou *in vitro* e as informações específicas das variantes genéticas já descritas estão compiladas na plataforma de dados *online*, disponível em: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>. A escolha dos polimorfismos analisados neste estudo foi baseada na seleção dos polimorfismos de base única (SNPs), deleções e/ou duplicações determinantes de atividade nula/reduzida da enzima e, também, frequentes na população brasileira, segundo revisão da literatura (Tabela 2) (DE AMEIDA MELO et al., 2016; FRIEDRICH et al., 2014). Informações da frequência alélica e função/atividade enzimática estão disponíveis na Plataforma *PharmGKB* (<http://www.pharmgkb.org/>).

Tabela 2. Variantes de *CYP2D6* genotipadas na população de estudo.

Gene	Referência	Polimorfismos	Alelos Relacionados	Atividade Fenotípica Predita	
<i>CYP2D6</i>	rs1080985	G-1584C	*2, *35, *41	gNM-F (*2 e *35) / gIM (*41)	
	rs1065852	C100T	*4, *10	gPM (*4) / gIM (*10)	
	rs28371706	C1023T	*17	gIM	
	rs3892097	G1846A	*4	gPM	
	rs16947	SNP	G2850T	*2, *35, *4, *17, *41, *34	gNM-F (*2 e *35) / gPM (*4) / gIM (*17 e *41)
	rs28371725		G2988A	*41	gIM
	rs59421388		G3183A	*29	gIM
	rs1135840		G4180C	*2, *35, *4, *10, *17, *41	gNM-F (*2 e *35) / gPM (*4) / gIM (*10, *17 e *41)
	rs5030656	Deleção	2615_2617 delAAG	*9	gIM

Classificações fenotípicas em grupos metabolizadores nulos (gPM), intermediários/reduzidos (gIM), normal-*slow* (gNM-S), normal-*fast* (gNM-F) e ultrarrápidos (gUM). O prefixo “g” indica que o fenótipo é previsto a partir do genótipo.

Oito SNPs no gene *CYP2D6* (C-1584G [rs1080985], C100T [rs1065852], C1023T [rs28371706], G1846A [rs3892097], C2850T [rs16947], G2988A [rs28371725], G3183A [rs59421388], G4180C [rs1135840] e uma deleção 2615_2617delAAG [rs5030656] foram genotipados por qPCR, no DNA dos pacientes, utilizando sondas de hidrólise – *TaqMan*® *SNP Genotyping Assays* – específicas para cada polimorfismo (Thermo Fisher Scientific), cujas sequências são determinadas de acordo com as variantes genéticas descritas no banco de dados do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (NCBI). Todas as reações de amplificação foram realizadas em placa de 384 poços, para um volume total de 5 µL, na presença de 2,5 µL de *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix 2x* (Thermo Fisher Scientific),

0,25 µL de *TaqMan® SNP Genotyping Assays* (Thermo Fisher Scientific), 1,25 µL de água ultrapura, livre de nucleases e 1 µL de DNA alvo (≈ 10 ng/µL). Em todos os experimentos, um controle negativo preparado por ausência de DNA alvo e amostras heterozigotos e homozigotas para cada polimorfismo foram utilizadas como controle positivo. As condições de termociclagem da PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 95 °C durante 10 min, 50 ciclos de 15 segundos a 92°C e 90 segundos a 60 °C. A amplificação e a detecção de fluorescência foram realizadas utilizando-se o equipamento *ViiA7 Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific). Os resultados foram analisados no *QuantStudio Real Time PCR Software* e de forma complementar, usando o *Thermo Fisher Cloud*, uma plataforma para monitorar o desempenho geral do experimento (Thermo Fisher Scientific).

5.5. Número de cópias gênicas de *CYP2D6*

A determinação do número de cópias do gene *CYP2D6* foi realizada por PCR em Tempo Real utilizando um ensaio específico: *Hs00010001_cn* (Thermo Fisher Scientific) para a detecção de deleção e amplificação do gene. O número de cópias gênicas foi determinado por comparação da amplificação do gene alvo *CYP2D6* e um gene de referência (*RNAse P*), já descrito na literatura como não polimórfico para amplificação/deleções. A *RNAse P* é um dos controles endógenos mais utilizados na literatura, com um gene de cópia única no genoma haploide, utilizado como normalizador. Todas as reações de amplificação foram realizadas na presença de 5,0 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix 2x* (Thermo Fisher Scientific), 0,5 µL de *Copy Number Assay - Hs00010001_cn* (Thermo Fisher Scientific), 0,5 µL *Copy Number Reference Assay Human RNase P* (Thermo Fisher Scientific), 3 µL de água ultrapura livre de nucleases e 1 µL do DNA alvo (≈ 10 ng / µL). A detecção do número de cópias foi feita em triplicata, utilizando-se placas de 384 poços, para um volume total de 10 µL/poço. Controles positivos para duas e três cópias do gene *CYP2D6* foram utilizados em todas os experimentos. Os parâmetros de ciclagem utilizados foram os seguintes: 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 60 segundos. A amplificação e detecção da fluorescência foi determinada utilizando-se o equipamento *ViiA7 Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific). A predição do número de cópias foi realizada através do *Software CopyCaller® v.2.0*, capaz de calcular os intervalos de confiança e *z-score* absoluto para cada amostra. Somente resultados do número de cópias das amostras com valores de confiança superiores a 95% e *scores z absolutos* (estimativa de desvio para a métrica do intervalo de confiança) $< 1,75$ foram considerados.

5.6. Predição dos haplótipos e classificação dos fenótipos de CYP2D6 (*Activity Score System*)

Após genotipagem dos polimorfismos de CYP2D6 selecionados, os dados genotípicos foram utilizados para inferir os haplótipos de CYP2D6 foram inferidos, através do programa PHASE (versão 2.1). O algoritmo foi executado três vezes com 50.000 etapas de *burn-in*, seguidas por 400.000 iterações e um intervalo de 1.000 iterações. Os onze haplótipos gerados pelo programa PHASE foram comparados aos haplótipos de CYP2D6 derivados da base de dados *Pharmaceutical Variation Consortium (PharmVar)* (GAEDIGK et al., 2018b) (Tabela 3). Os haplótipos não correspondentes aos alelos de CYP2D6 disponíveis no *PharmVar* foram designados como indeterminados.

Tabela 3. Haplótipos de CYP2D6 preditos por comparação aos disponíveis no banco de dados *Pharmaceutical Variation Consortium (PharmVar)*.

Alelo CYP2D6	Promotor	Éxon 1	Éxon 2	.	.	Éxon 6	.	Éxon 7	Éxon 9	CNV	Atividade Enzimática
	C-1584G	C100T	C1023T	G1846A	2615_2617 delAAG	C2850T	G2988A	G3183A	G4180C		
*1	C	C	C	G	AAG	C	G	G	G	.	Normal
*2A	G	C	C	G	AAG	T	G	C	C	.	Normal
*2D	C	C	C	G	AAG	T	G	C	C	.	Normal
*4	C	T	C	A	AAG	C	G	G	C	.	Nula
*5	C	Nula
*10	C	T	C	G	AAG	C	G	C	C	.	Reduzida
*17	C	C	T	G	AAG	T	G	C	C	.	Reduzida
*29	C	C	C	G	AAG	T	A	C	C	.	Reduzida
*35	G	C	C	G	AAG	T	G	C	C	.	Normal
*41	G	C	C	G	AAG	T	G	C	C	.	Reduzida
*1xN	C	C	C	G	AAG	C	G	G	G	xN	Aumentada
*2xN	G	C	C	G	AAG	T	G	C	C	xN	Aumentada
*4xN	C	T	C	A	AAG	C	G	C	C	xN	Nula
*10xN	C	C	C	G	AAG	C	G	G	G	xN	Reduzida
*17xN	C	C	C	G	AAG	C	G	G	G	xN	Reduzida

Para a tradução dos genótipos em fenótipos, introduzimos em nossos dados o Sistema de Pontuação de Alelos - *Activity Score System (AS)*, conforme recomendado pelo *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC)*. Todos os alelos inferidos foram agrupados de acordo com sua funcionalidade percebida; os valores entre parênteses indicam valores respectivos atribuídos a cada um dos alelos para calcular o AS (GAEDIGK et al., 2008; HICKS; SWEN; GAEDIGK, 2014) a partir do haplótipo/diplótipo: não funcional (0) (*4, *4xN, *5), alelos de função reduzida (0,5) (*10, *17, *29, *41), alelos funcionais (1) (*2, *35) e alelos de função aumentada (2) (*1xN, *2xN, *35xN). Os valores relativos de AS são atribuídos de acordo com o alelo de referência CYP2D6*1, considerado totalmente funcional.

O sistema AS é uma ferramenta válida e fácil de usar para traduzir dados genotípicos para a predição do fenótipo de atividade de CYP2D6, descrita por Gaedigk et al., em 2007.

Para aplicação do AS, assume-se que ambos os alelos dos indivíduos contribuem igualmente para a atividade global de CYP2D6 (GAEDIGK et al., 2008). Portanto, em seguida, foram calculadas as somas dos alelos não funcionais (0), função reduzida (0,5), alelos funcionais (1) e função aumentada (2). O valor de “1” é atribuído ao alelo *CYP2D6*1* de referência totalmente funcional e “0” aos alelos não funcionais. Os alelos portadores de duplicações ou multiplicações gênicas receberam o dobro do valor comparado àquele atribuído a um alelo com uma única cópia gênica. Alelos de atividade reduzida receberam um valor de “0,5” para refletir os níveis de redução de atividade. A soma dos valores individuais dos alelos forma o AS, capaz de prever a atividade fenotípica de CYP2D6.

As combinações dos alelos inferidos em nosso estudo deram origem a cinco grupos AS (AS = 0, AS = 0,5, AS = 1, AS = 1,5, AS > 2). Indivíduos com AS = 0, AS = 0,5 e AS > 2 foram designados como metabolizadores genéticos nulos, intermediários/reduzidos e ultrarrápidos (gPM, gIM e gUM), respectivamente. Indivíduos com AS = 1, AS = 1,5 e AS = 2 foram designados como metabolizadores genéticos normais (gNM). Como esses grupos diplóticos cobrem uma ampla faixa de atividade, ou seja, apresentam variações na extensão do metabolismo (com atividade enzimática muitas vezes similar aos gIMs), os indivíduos com AS = 1 foram distinguidos aqui como gNM-*slow* (gNM-S), e indivíduos com AS = 1,5 e AS = 2 foram designados como gNM-*fast* (gNM-F), de acordo com o relatório de Gaedigk et al. (2007) (GAEDIGK et al., 2008, 2018a; WANG et al., 2014; WANG; PAPP; SUN, 2015). Para especificar que o fenótipo foi previsto a partir do genótipo, utilizamos o prefixo “g”, como sugerido anteriormente (HICKS; SWEN; GAEDIGK, 2014). Todos os indivíduos com AS > 2 foram classificados como metabolizadores ultrarrápidos, por meio da análise concomitante ao AS atribuído e o número de cópias gênicas de *CYP2D6* preditos (Tabela 4).

Tabela 4. Valores atribuídos aos alelos de *CYP2D6* identificados nas amostras do estudo através do Sistema de Pontuação de Atividade (*Activity Score System*).

<i>Sistema de Pontuação de Atividade (Activity Score System)</i>		
Valores atribuídos aos alelos de <i>CYP2D6</i>	Alelos	Atividade Enzimática
0	*4, *4xN, *5	Nula
0,5	*10, *17, *29, *41	Reduzida
1	*1, *2, *35	Normal
2	*1xN, *2xN, *35xN	Aumentada
ND	*34	Indeterminada

5.7. Análises estatísticas

O desfecho primário do nosso estudo foi o efeito da atividade reduzida de CYP2D6 no número de episódios de recorrência da infecção por *P. vivax*. Variáveis adicionais, local de moradia, tempo de residência na região da Amazônia Legal, tempo de Residência em Rio Pardo, idade, sexo e dados de ancestralidade, foram avaliadas como desfechos secundários. Todos os dados clínicos, demográficos e epidemiológicos dos pacientes fazem parte do nosso banco de dados laboratorial, em plataforma computadorizada, como parte dos coortes transversais realizados na comunidade de Rio Pardo. Os dados foram submetidos a um teste de normalidade para avaliar o padrão de distribuição. Variáveis que não preencherem os requisitos para análise paramétrica foram descritas como medianas e quartis e sua distribuição intergrupos foi avaliada por meio dos testes estatísticos de *Mann Whitney* ou *Kruskal-Wallis*, com *Teste post hoc de Dunn*, conforme apropriado. Para proporções expressas como porcentagens e intervalos de confiança de 95%, utilizamos o *Teste de Qui-Quadrado (χ^2) de Pearson*, ou *Teste Exato de Fisher*. A associação entre idade e tempo de residência na Amazônia foi estimada pelo *Teste de Correlação de Postos de Spearman*. Todos os testes foram bilaterais e os valores de *P* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *Software STATA* (versão 14), *GraphPad Prism* (versão 7) e o *Software R* (versão 3.5.1). O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e o Desquilíbrio de Ligação (utilizando as estatísticas r^2 e D') foram avaliados para cada SNP usando o *Software Arlequin* (versão 3.5) e *Haploview* (versão 4.1), respectivamente.

Os modelos básicos de regressão de dados de contagem podem ser representados e entendidos usando Regressão Linear Generalizada (GLM). A Regressão de *Poisson* é comumente usada para modelar o número de casos em uma população específica por um certo tempo. Porém, a superdispersão dos dados (isto é, variância superior à média), torna o ajuste da Regressão Binomial Negativo (extensão do modelo de *Poisson*) mais apropriado. A associação entre o nível de atividade de CYP2D6 e o número de recorrências foi determinada estimando-se o risco relativo e a razão de chance, ajustando os modelos de Regressão Binomial Negativo (BN) e Regressão Logística, respectivamente. As variáveis dependentes dos modelos foram a variável binária, recorrência *versus* não recorrência, na Regressão Logística e o número máximo de episódios recorrentes relatados para o sujeito considerando um período de 10 anos na Regressão BN. No modelo BN, o logaritmo do tempo de residência em Rio Pardo foi definido como *offset*, uma vez que esse tempo variou para os indivíduos do

estudo (mediana = 7 anos, IQR = 4 – 10). Os escores de atividade de CYP2D6, calculados de acordo com o modelo AS, foram inseridos nos modelos como uma variável dicotômica, ou $AS \leq 1,0$ (gPM, gIM e gNM-S) ou $AS > 1,0$ (gNM-F e gUM). A exposição a longo prazo à malária foi avaliada considerando o tempo de residência na área endêmica da Amazônia brasileira (variável contínua). A outra covariável analisada foi o local de residência na comunidade Rio Pardo (População Ribeirinha *versus* Não Ribeirinha). As covariáveis foram selecionadas para inclusão nos modelos logísticos, somente quando associadas ao desfecho ao nível de significância de 15% na análise exploratória não ajustada. O deslocamento da Regressão BN foi definido como o tempo que um indivíduo viveu na comunidade Rio Pardo durante o período do estudo. Análises de Regressão Logística e BN foram realizadas usando, a função *glm* nas estatísticas do pacote R e a função *glm.nb* no pacote MASS, respectivamente. A qualidade do ajuste foi avaliada comparando-se o desvio dos modelos candidatos e as estatísticas de critérios de informação de Akaike (AIC). O tempo até a primeira recorrência de malária por *P. vivax* para os grupos de nível de atividade do CYP2D6 foi estimado com a análise de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e comparado com o *Teste de Log-rank*.

5.8. Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs) e estimativa da ancestralidade genômica individual

Os indivíduos foram genotipados para um conjunto de 48 SNPs previamente validados como uma ferramenta útil para estimativa de ancestralidade em amostras populacionais de diferentes origens. O protocolo de genotipagem e os resultados da genotipagem fazem parte do estudo publicado anteriormente por nosso grupo de pesquisa (KANO et al., 2018). Os AIMs foram genotipados por PCR em tempo real com sondas de hidrólise específicas para cada SNP (Thermo Fisher Scientific). A ancestralidade individual foi estimada usando o método implementado no programa *Structure 2.3.4*. O programa implementa um método de agrupamento bayesiano para inferir a estrutura da população e uma mistura usando um procedimento de Markov Chain Monte Carlo (MCMC). O *burn-in* foi estabelecido em 50.000 passos seguidos por 500.000 passos MCMC, e um modelo de frequências alélicas correlatas foi especificado. Trinta réplicas foram realizadas considerando-se três agrupamentos ($K = 3$), pois a população brasileira é formada por uma mistura de três populações parentais: nativos americanos, europeus e africanos. Para todas as execuções, o λ foi definido como 1.0, o parâmetro α foi estimado a partir dos dados e as informações *a priori* para os indivíduos das populações parentais para auxiliar o agrupamento não foram utilizadas. Todas as réplicas

foram avaliadas usando o *CLUMPP*, e as soluções específicas foram plotadas usando *DISTRUCT* 1.1. Para evitar o viés causado pela estrutura familiar em nossas análises da estrutura populacional, excluimos amostras relacionadas que foram identificadas usando dados individuais de nome de família e informações sobre famílias. Os dados das populações parentais (europeias, africanas e americanas nativas) foram um conjunto de dados públicos obtidos do *HGDP-CEPH Diversity Panel* e do *Hapmap Project*.

Capítulo 1**6. Resultados****6.1. Prevalência das recorrências por *Plasmodium vivax* no assentamento agrícola de Rio Pardo**

O estudo envolveu 261 indivíduos, residentes no assentamento agrícola de Rio Pardo (região Amazônica), para os quais o número de casos confirmados de malária por *P. vivax* foi obtido para 10 anos (2003 – 2013), através do levantamento de dados da plataforma oficial eletrônica de notificação de malária (SIVEP-Malária). De acordo com os dados epidemiológicos da população de Rio Pardo, entre 2003 e 2013, foram identificados 2977 casos de malária na comunidade agrícola, dos quais 2486 foram infecções por *P. vivax*. A frequência global da malária microscopicamente positiva flutuou durante o período do estudo, com uma mediana de 198 casos/ano (IQR = 79 – 502 casos positivos). O número de casos registrados da doença foi maior nos primeiros anos, seguido de uma diminuição contínua da frequência dos casos de malária (Figura 16). Ao longo dos anos, o índice de infecção por *P. falciparum* decresceu e, desde 2011, *P. vivax* é, agora, responsável por todos os casos de malária registrados no assentamento de Rio Pardo. A estratégia selecionada para a identificação de recorrências (considerando o intervalo de 29 – 180 dias após o episódio inicial) permitiu a estimativa do número de casos de recorrência por *P. vivax*, após o tratamento com CQ-PQ no período de 10 anos considerado. A frequência média de indivíduos que apresentaram recorrências foi de 18,4% (Figura 16) de 2003 a 2013.

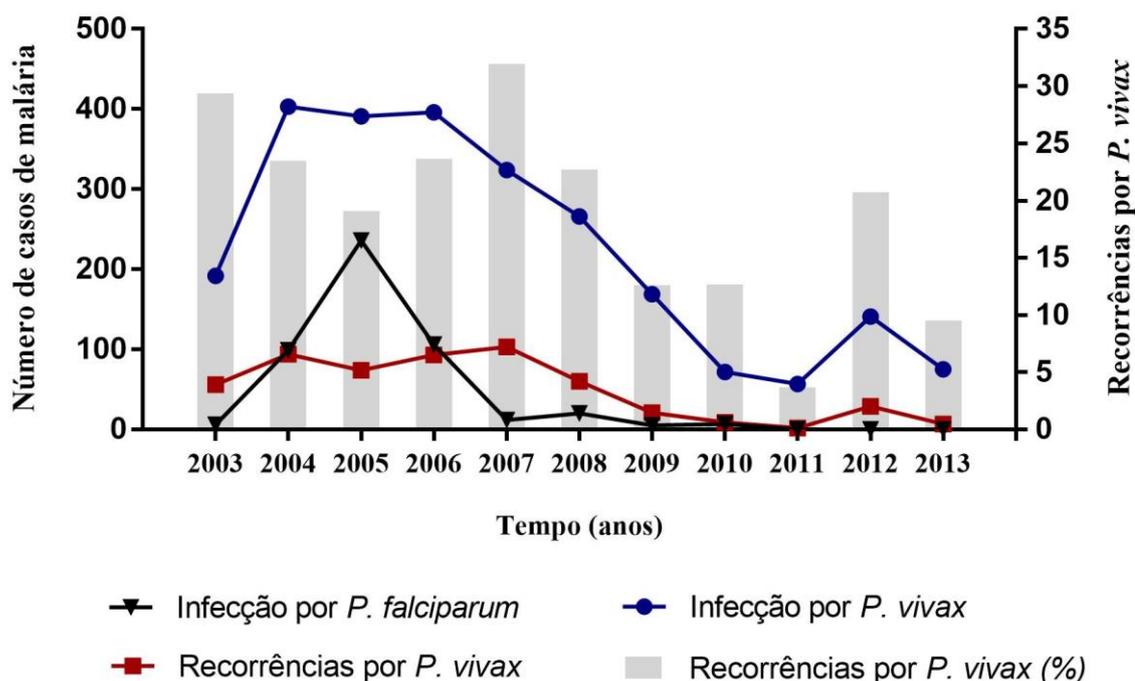


Figura 16. Estimativa da proporção de indivíduos que apresentaram episódios de recorrência da infecção por *Plasmodium vivax*, após tratamento com CQ-PQ, na comunidade de Rio Pardo. Todos os casos de malária relatados foram registrados no Ministério da Saúde no Brasil através do Registro Nacional do Sistema de Vigilância da Malária (SIVEP-Malária). O eixo y, ao lado esquerdo, representa o número total de indivíduos infectados por *P. vivax* durante o período de levantamento de dados em Rio Pardo (2003 a 2013). A linha em azul representa o número absoluto de indivíduos que apresentaram infecções por *P. vivax* e em preto estão representados os casos de infecção por *P. falciparum*. O eixo y, ao lado direito, representa as estimativas de frequência relativa (%) de casos de recorrência por *P. vivax* ao longo dos dez anos de estudo.

Os indivíduos considerados elegíveis ao estudo, foram classificados em três grupos considerando o número de recorrências: não recorrência ($n = 137$), única recorrência ($n = 52$) e múltiplas recorrências ($n = 72$; de 2 a 6 episódios de recorrência por *P. vivax*). No grupo sem recorrência, a maioria dos indivíduos (77%) experimentou apenas um único episódio de malária por *P. vivax* durante o período do estudo, enquanto 33% dos indivíduos ($n = 32$) tiveram episódios de malária em intervalos maiores que 1 ano. Entre os indivíduos que experimentaram múltiplos episódios de recorrência de malária por *P. vivax*, 65% tiveram repetidas recorrências. Para os grupos de única e múltiplas recorrências, a mediana do tempo entre a infecção inicial e a primeira recorrência de *P. vivax* foi estimada em 60 dias (IQR = 20 – 181 dias).

Os indivíduos incluídos tinham uma mediana de idade de 22 anos (IQR = 9 – 42 anos) e viveram por 19 anos (IQR = 9 – 36 anos) na Amazônia Legal, área considerada endêmica para malária (Tabela 5). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos (sem, única e múltiplas recorrências) para idade ou tempo de residência na Amazônia. O

tempo de residência na comunidade Rio Pardo foi mais curto (mediana = 7 anos; IQR = 4 – 10 anos) comparado ao tempo de residência na região amazônica, o que refletiu em parte o recente estabelecimento do assentamento (aproximadamente 20 anos). Além disso, como essa população foi estabelecida principalmente por migrantes da região amazônica, a idade foi altamente correlacionada com o tempo de residência na região amazônica ($r = 0,93$, $P = 0,000$; Correlação de *Spearman*). Idade, sexo, tempo de residência no Rio Pardo ou na região amazônica não diferiram entre os grupos de indivíduos definidos pelo número de recorrências (Tabela 5). Já a área de residência apresentou diferenças estatisticamente significativas entre indivíduos sem e com únicas ou múltiplas recorrências: uma maior frequência de pessoas que vivem ao longo da corrente do Rio Pardo, designada população ribeirinha, foi observada no grupo com múltiplas recorrências (72,2 %; $P < 0,0001$) (Tabela 5).

Tabela 5. Dados demográficos e epidemiológicos de 261 indivíduos da comunidade de Rio Pardo.

Características	Sem recorrências (n = 137)	Única recorrência (n = 52)	Múltiplas recorrências (n = 72)	P - value	População total (n = 261)
Idade, anos (mediana, IQR)	25 (9 – 47)	18 (9 – 45)	21 (8 – 32)	0,142 ^a	21,5 (9 – 42)
Sexo, n (%)					
Masculino	86 (62,8)	29 (55,8)	38 (53,5)	0,385 ^b	154 (59,0)
Feminino	51 (37,2)	23 (44,2)	33 (46,5)		107 (41,0)
Tempo de Residência em Rio Pardo, anos (mediana, IQR)	7 (4 – 10)	8 (5 – 11)	7 (5 – 9)	0,391 ^a	7 (4 – 10)
Tempo de Residência na Amazônia, anos (mediana, IQR)	20 (9 – 42)	20 (10 – 42)	16 (8 – 28)	0,107 ^a	19 (9 – 36)
Local de Moradia em Rio Pardo, n (%)					
Ribeirinho	43 (31,4)	28 (53,8)	52 (72,2)	< 0.0001 ^b	123 (47,1)
Não Ribeirinho	94 (68,6)	24 (46,2)	20 (27,8)		138 (52,9)

^a Teste de *Kruskal Wallis*

^b Teste de *Qui-Quadrado*

6.2. Frequência dos alelos e fenótipos de CYP2D6 na comunidade de Rio Pardo

Todos os 261 indivíduos incluídos no estudo foram genotipados com sucesso e tiveram o número de cópias inferido. Porém, oito indivíduos apresentaram alelos de *CYP2D6* indeterminados após análise de inferência dos haplótipos, ou seja, a combinação de nucleotídeos, determinante dos haplótipos, não foi correspondente a nenhum alelo de

CYP2D6 descritos no banco de dados *PharmVar*. As frequências dos polimorfismos de *CYP2D6* incluídos na análise estão apresentadas na Tabela 6. Os SNPs C2850T (68,2%) e G4180C (78,2%) (presentes em alelos com atividade nula, reduzida ou normal) apresentaram maior frequência de heterozigotos e homozigotos para a alteração, seguidos pelos SNPs C-1584G (11,8%) e C100T (19,9%), determinantes de alelos com função nula/reduzida de *CYP2D6* (Tabela 6). O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e o desequilíbrio de ligação (LD) foram estimados a partir das variantes estudadas (Tabela 6). Apenas um locus (C100T) apresentou desvio do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($P < 0,05$) na população estudada. O padrão de LD foi medido usando dados de SNP com frequência maior que 10%. Após análise, dois pares de SNPs fortemente correlacionados, C100T e G1846A ($r^2 = 0,92$); C2850T e G4180C ($r^2 = 0,64$), foram encontrados em alto LD (Figura 17).

Tabela 6. Frequência de polimorfismos (SNPs e deleção) avaliados no gene *CYP2D6* nos grupos sem, com única e múltiplas recorrências na comunidade de Rio Pardo.

<i>Frequência Genotípica de CYP2D6 , % (n)</i>						
C -1584G	CC	CG	GG	CG + GG	P - value ^a	G
Sem recorrência	0,511 (70)	0,394 (54)	0,095 (13)	0,489 (67)	0,397	0,292
Única recorrência	0,615 (32)	0,269 (14)	0,115 (6)	0,385 (20)		0,25
Múltiplas recorrências	0,569 (41)	0,333 (24)	0,097 (7)	0,431 (31)		0,264
Total	0,548 (143)	0,352 (92)	0,100 (26)	0,452 (118)		0,276
C100T	CC	TC	TT	TC + TT		T
Sem recorrência	0,832 (114)	0,153 (21)	0,015 (2)	0,168 (23)	0,382	0,091
Única recorrência	0,750 (39)	0,212 (11)	0,038 (2)	0,250 (13)		0,144
Múltiplas recorrências	0,778 (56)	0,222 (16)	.	0,222 (16)		0,111
Total	0,801 (209)	0,184 (48)	0,015 (4)	0,199 (52)		0,107
C1023T	CC	CT	TT	CT + TT		T
Sem recorrência	0,839 (115)	0,109 (15)	0,051 (7)	0,161 (22)	0,164	0,106
Única recorrência	0,885 (46)	0,115 (6)	.	0,115 (6)		0,058
Múltiplas recorrências	0,931 (67)	0,056 (4)	0,014 (1)	0,069 (5)		0,042
Total	0,874 (228)	0,096 (25)	0,031 (8)	0,126 (33)		0,079
G1846A	GG	GA	AA	GA + AA		A
Sem recorrência	0,847 (116)	0,139 (19)	0,015 (2)	0,153 (21)	0,274	0,084
Única recorrência	0,750 (39)	0,231 (12)	0,019 (1)	0,250 (13)		0,135
Múltiplas recorrências	0,792 (57)	0,208 (15)	.	0,208 (15)		0,104
Total	0,812 (212)	0,176 (46)	0,011 (3)	0,188 (49)		0,1

2615_2617delAAG	AA	CA	CC	CA + CC		C
Sem recorrência	0,985 (135)	0,015 (2)	.	0,015 (2)		0,007
Única recorrência	1,000 (52)
Múltiplas recorrências	1,000 (72)	.	.	.	ND	.
Total	0,992 (259)	0,008 (2)	.	0,008 (2)		0,004
C2850T	CC	TC	TT	TC + TT		T
Sem recorrência	0,292 (40)	0,547 (75)	0,161 (22)	0,708 (97)		0,434
Única recorrência	0,404 (21)	0,423 (22)	0,173 (9)	0,596 (31)		0,385
Múltiplas recorrências	0,306 (22)	0,514 (37)	0,181 (13)	0,694 (50)	0,325	0,438
Total	0,318 (83)	0,513 (134)	0,169 (44)	0,682 (178)		0,425
G2988A	GG	GA	AA	GA + AA		A
Sem recorrência	0,964 (132)	0,036 (5)	.	0,036 (5)		0,018
Única recorrência	0,981 (51)	0,019 (1)	.	0,019 (1)		0,01
Múltiplas recorrências	0,875 (63)	0,125 (9)	.	0,125 (9)	0,014	0,063
Total	0,943 (246)	0,057 (15)	.	0,057 (15)		0,029
G3183A	GG	GA	AA	GA + AA		A
Sem recorrência	0,993 (136)	0,007 (1)	.	0,007 (1)		0,004
Única recorrência	0,962 (50)	0,038 (2)	.	0,038 (2)		0,019
Múltiplas recorrências	0,903 (65)	0,097 (7)	.	0,097 (7)	0,006	0,049
Total	0,962 (251)	0,038 (10)	.	0,038 (10)		0,019
G4180C	GG	GC	CC	GC + CC		C
Sem recorrência	0,226 (31)	0,504 (69)	0,270 (37)	0,774 (106)		0,522
Única recorrência	0,212 (11)	0,519 (27)	0,269 (14)	0,788(41)		0,529
Múltiplas recorrências	0,208 (15)	0,486 (35)	0,306 (22)	0,792 (57)	0,948	0,549
Total	0,218 (57)	0,502 (131)	0,280 (73)	0,782 (204)		0,531

NT, não testado

^a Comparação da frequência genotípica (heterozigoto e homozigoto mutado *versus* não mutado) entre indivíduos sem, com única e múltiplas recorrências; *Teste Qui-Quadrado* (n = 261)
Frequências iguais a 0 estão representadas por “.”

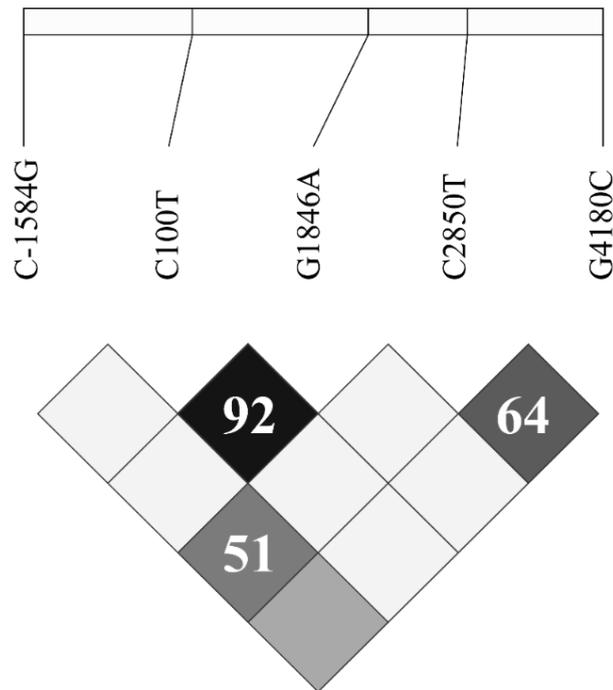


Figura 17. Mapa de Desequilíbrio de Ligação no gene *CYP2D6* gerados pelo *Haploview*. Valores de LD emparelhados (r^2) para SNPs em *CYP2D6* são apresentados na figura. Os valores de r^2 são dados em blocos para cada combinação de polimorfismos e indicam a correlação entre estes. Branco: $r^2 = 0$; preto: $r^2 = 1$; tons de cinza: $0 < r^2 < 1$. O LD foi calculado apenas para SNPs para os quais a frequência do alelo menor era pelo menos 0,1.

Para identificar e explorar potenciais alelos associados à função reduzida de *CYP2D6* no assentamento de Rio Pardo, os haplótipos dos indivíduos incluídos no estudo foram construídos a partir das variantes polimórficas selecionadas na literatura (maior frequência na população brasileira e determinantes dos principais alelos de *CYP2D6*) e analisado, concomitante, ao número de cópias gênicas. Entre todos os pacientes incluídos no estudo, 1,5% ($n = 8$) foram positivos para amplificação do gene. Nenhuma amostra foi identificada como homocigota para a deleção do gene *CYP2D6*. Ao todo, foram determinados onze haplótipos que permitiram a caracterização das variantes alélicas de *CYP2D6*: *1; *2/*35; *2D *4; *5; *10; *17; *29, *34 e *41, incluindo amplificação do número de cópias: *1x2, *2x2/*35x2, *4x2 e *17x2. Dois haplótipos foram indeterminados, ou seja, a combinação de nucleotídeos não permitiu a definição de alelos de *CYP2D6* descritos no banco de dados *PharmVar* (Figura 18).

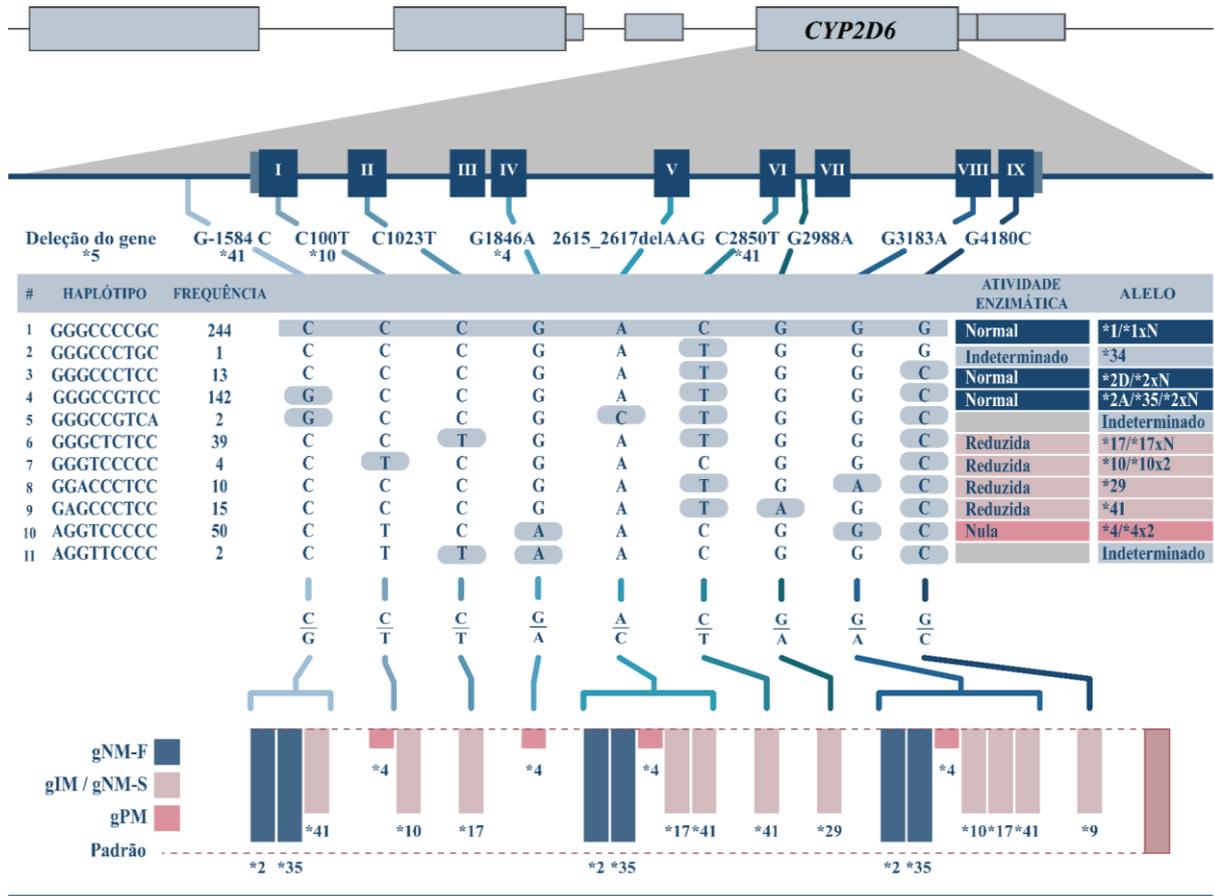


Figura 18. Haplótipos preditos para os indivíduos elegíveis ao estudo com as suas respectivas classificações alélicas e atividade fenotípica de CYP2D6. Dez polimorfismos no gene *CYP2D6*, incluindo análise do número de cópias, foram analisados em 261 indivíduos da comunidade de Rio Pardo. Os polimorfismos analisados estão representados em sua respectiva localização nos éxons ou íntrons de *CYP2D6*, apresentados nas caixas azul escuro. A genotipagem das alterações genéticas no gene *CYP2D6* levaram à inferência de onze haplótipos (#), com suas respectivas frequências. O conjunto de alterações nucleotídicas determina um alelo específico de *CYP2D6*, com atividade enzimática relatada na literatura. Abaixo dos haplótipos estão representadas as alterações nucleotídicas. O tamanho da barra representa a atividade de cada alelo, comparado ao padrão (barra azul representa atividade normal de *CYP2D6*). Nos indivíduos analisados, o alelo *9 não foi encontrado; sendo ilustrado na figura apenas para representar um alelo decorrente do polimorfismo G4180C.

Um total de 12 alelos foram identificados e a frequência geral de variantes disfuncionais (função nula ou reduzida) foi de 24% (Tabela 7). Entre eles, os alelos mais frequentes foram *CYP2D6* *4 (9%) e *17 (7%). Alelos para aumento da função foram observados em 2% dos cromossomos investigados. Não houve diferença na prevalência de alelos agrupados por função (normal versus disfuncional) entre os grupos definidos pelo número de recorrências ($P = 0,239$, *Teste de Qui-Quadrado*) (Figura 19).

Tabela 7. Frequência dos alelos de *CYP2D6* observados na população de Rio Pardo nos grupos sem, única e múltiplas recorrências.

Alelos de <i>CYP2D6</i>	Atividade de <i>CYP2D6</i> ^a	Sem recorrência, (n)	Única recorrência, (n)	Múltiplas recorrências, (n)	Total, (n)
*1	Normal	43,4 (119)	42,3 (44)	41,0 (59)	42,5 (222)
*2/*35	Normal	29,2 (80)	26,0 (27)	27,1 (39)	28,0 (146)
*34	Normal	4,0 (1)	.	.	2,0 (1)
*4	Nula	6,6 (18)	12,5 (13)	10,4 (15)	8,8 (46)
*5	Nula	2,9 (8)	1,9 (2)	4,2 (6)	3,1 (16)
*10	Reduzida	0,7 (2)	1,0 (1)	0,7 (1)	0,8 (4)
*17	Reduzida	9,1 (25)	5,8 (6)	3,5 (5)	6,9 (36)
*29	Reduzida	0,4 (1)	1,9 (2)	4,9 (7)	1,9 (10)
*41	Reduzida	1,8 (5)	1,0 (1)	6,2 (9)	2,9 (15)
*1x2	Aumentada	1,1 (3)	1,0 (1)	.	0,8 (4)
*2x2/*35x2	Aumentada	.	2,9 (3)	.	0,6 (3)
*17x2	Aumentada	.	.	0,7 (1)	0,2 (1)
Outros ^b	ND	4,4 (12)	3,8 (4)	1,4 (2)	3,4 (18)

n = número de cromossomos, n=522; sem recorrência, n=274; única recorrência, n=104; múltiplas recorrências, n=144. Os fenótipos de *CYP2D6* estão representados como atividade normal (gNM-F), atividade reduzida (gIM/gNM-S), atividade nula (gPM) e atividade aumentada (gUM). Os indivíduos cujo fenótipo não foi determinado por ausência de dados de número de cópias ou predição alélica de *CYP2D6* estão apresentados como ND. Os alelos com atividade aumentada correspondem às variantes: *1x2, *2x2/*35x2, *4x2 ou *17x2. Frequências iguais a 0 estão representadas por “.”

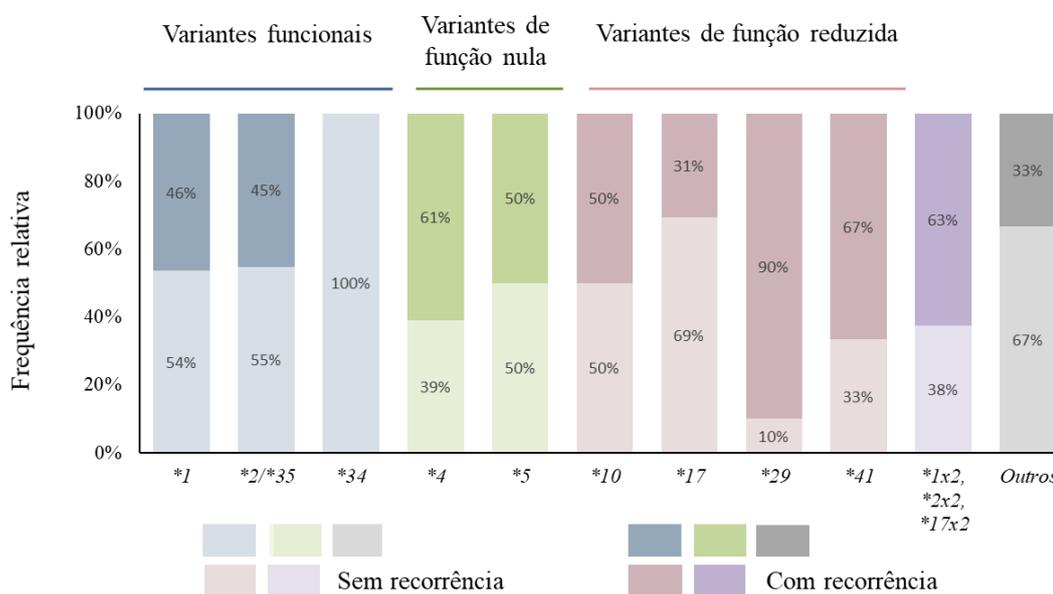


Figura 19. Frequência das variantes alélicas de *CYP2D6* encontradas na comunidade de Rio Pardo nos grupos sem recorrência e com recorrência da infecção por *Plasmodium vivax*. (n, número de cromossomos; n = 522).

As frequências diplóticas e os fenótipos previstos estão resumidos na Tabela 8. A prevalência geral de indivíduos com atividade reduzida de *CYP2D6* (gPM, 1,2%; gIM, 2,4% e gNM-S, 21,8%) foi de 25,4% (Tabela 8). Os diplótipos mais comuns (frequência > 1%) que

predisseram metabolismo reduzido foram: *2/*4 (gNM-S, 7,3%), *1 /*4 (gNM-S, 6,9%), *1/*5 (gNM-S, 4,2%) e *17/*17 (gNM-S, 1,5%). Nenhuma diferença foi observada entre os fenótipos CYP2D6 previstos com atividade reduzida ($AS \leq 1,0$) e indivíduos com enzima funcional ($AS > 1,0$) para os grupos sem, única e múltiplas recorrências ($P = 0,181$, *Teste de Qui-Quadrado*) (Tabela 8).

Tabela 8. Frequência dos diplótipos de CYP2D6 na população de Rio Pardo.

Frequência dos diplótipos de CYP2D6 %, (n)						
Diplótipos	AS Score	Fenótipo de CYP2D6	Sem recorrências	Única recorrência	Múltiplas recorrências	Total
*1/*1	2	gNM-F	16,8 (23)	15,4 (8)	13,9 (10)	15,7 (41)
*1/*2	2	gNM-F	28,5 (39)	23,1 (12)	22,2 (16)	25,7 (67)
*1/*34	2	gNM-F	7,0 (1)	.	.	0,4 (1)
*2/*2	2	gNM-F	9,5 (13)	7,7 (4)	8,3 (6)	8,8 (23)
*2/*10	1,5	gNM-F	7,0 (1)	.	.	0,4 (1)
*1/*10	1,5	gNM-F	7,0 (1)	.	1,4 (1)	0,8 (2)
*1/*17	1,5	gNM-F	10,2 (14)	9,6 (5)	2,8 (2)	8,0 (21)
*1/*29	1,5	gNM-F	.	1,9 (1)	5,6 (4)	01,9 (5)
*1/*41	1,5	gNM-F	2,9 (4)	.	6,9 (5)	3,4 (9)
*2/*17	1,5	gNM-F	7,0 (1)	1,9 (1)	.	0,8 (2)
*2/*29	1,5	gNM-F	7,0 (1)	.	1,4 (1)	0,8 (2)
*2/*41	1,5	gNM-F	7,0 (1)	1,9 (1)	2,8 (2)	1,5 (4)
*17x2/*29	1,5	gNM-F	.	.	1,4 (1)	0,4 (1)
*1/*4	1	gNM-S	3,6 (5)	13,5 (7)	8,3 (6)	6,9 (18)
*1/*5	1	gNM-S	2,9 (4)	3,8 (2)	6,9 (5)	4,2 (11)
*17/*17	1	gNM-S	2,2 (3)	.	1,4 (1)	1,5 (4)
*17/*29	1	gNM-S	.	.	1,4 (1)	0,4 (1)
*2/*4	1	gNM-S	7,3 (10)	3,8 (2)	9,7 (7)	7,3 (19)
*2/*5	1	gNM-S	0,7 (1)	.	1,4 (1)	0,8 (2)
*4/*10	0,5	gIM	.	1,9 (1)	.	0,4 (1)
*5/*17	0,5	gIM	1,5 (2)	.	.	0,8 (2)
*4/*29	0,5	gIM	.	1,9 (1)	.	0,4 (1)
*4/*41	0,5	gIM	.	.	2,8 (2)	0,8 (2)
*4/*4	0	gPM	0,7 (1)	1,9 (1)	.	0,8 (2)
*4/*5	0	gPM	0,7 (1)	.	.	0,4 (1)
*1/*1x2	3	gUM	2,2 (3)	1,9 (1)	.	1,5 (4)
*2/*2x2	3	gUM	.	5,8 (3)	.	1,1 (3)
Outros ^a	ND	ND	5,8 (8)	3,8 (2)	1,4 (1)	4,2 (11)

Os fenótipos de CYP2D6 estão representados como atividade normal (gNM-F), reduzida (gIM/gNM-S); nula (gPM), aumentada (gUM) e ND para indivíduos cujo fenótipo não foi determinado por ausência de dados de número de cópias ou predição alélica de CYP2D6. Os alelos com atividade aumentada correspondem às variantes: *1x2, *2x2 e *17x2. O símbolo *2 dos diplótipos representam as variantes *2A, *2D ou *35, cuja diferenciação não foi possível em nosso estudo. Frequências igual a 0 estão representadas por “.”. a O haplótipo inferido não combinou com os alelos de CYP2D6 conhecidos.

Para entender a relevância clínica das frequências alélicas de *CYP2D6*, avaliamos as frequências dos fenótipos preditos. Entre os 261 pacientes elegíveis, 11 indivíduos (4,2%) foram preditos como sendo metabolizadores ultrarrápidos (UMs), 177 (67,8%) como metabolizadores normais (gNM-F) e 64 (24,5%) indivíduos com comprometimento da atividade de *CYP2D6*: metabolizadores nulos (gPM; 3 indivíduos, 1,1%), reduzidos (gIM; 6 indivíduos, 2,3%) e atividade normal-reduzida (gNM-S; 55 indivíduos, 21,1%). O caso da atividade nula/reduzida de *CYP2D6* associar-se ao risco de falha terapêutica, nos levou a diferenciar o metabolismo nulo/reduzido do metabolismo normal da PQ. A frequência da baixa atividade de *CYP2D6* foi aproximadamente 25% (dados não reportados) na comunidade de Rio Pardo. Quando as variantes alélicas foram analisadas separadamente, 100% dos UMs tinham os dois alelos funcionais, carregando uma duplicação em um dos alelos com função normal, como esperado por definição. De forma importante, uma maior proporção de fenótipos característicos de atividade reduzida foi encontrada em indivíduos com recorrência (66,7 e 58,2% para indivíduos gIM e gNM-S, respectivamente), em comparação com gNM-F (44,6%) (Figura 20).

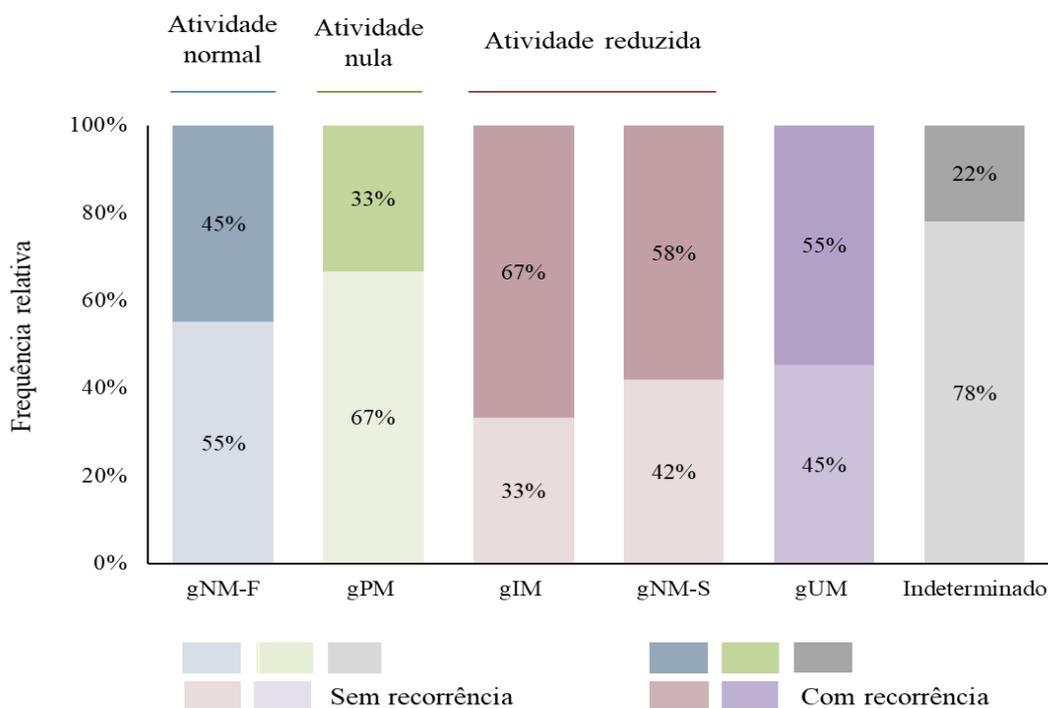


Figura 20. Comparação das frequências fenotípicas preditas para *CYP2D6* em indivíduos de Rio Pardo (n = 261). Os fenótipos de *CYP2D6* estão representados como normal para fenótipos de metabolismo extensivo/normal (gNM-F), reduzido para metabolismo intermediário (gIM e gNM-S), ausente, para metabolismo nulo (gPM), aumentado para metabolismo ultrarrápido (gUM) e ND para indivíduos cujo fenótipo não foi determinado por ausência de dados de número de cópias ou predição alélica de *CYP2D6*. No sistema de pontuação de atividade de *CYP2D6*, os alelos *4 e *5 recebem um valor de 0, alelos *10, *17, *29 e *41, o valor de 0,5 e alelos *1, *2A/*2D e *35 recebem um escore de 1. A soma do escore dos alelos de *CYP2D6* determina a atividade metabólica da enzima (fenótipo).

6.3. Distribuição de frequência das variantes de CYP2D6 em relação à ancestralidade genômica de indivíduos da Amazônia brasileira

Dados disponíveis da ancestralidade genômica de 123 indivíduos (47,2% dos 261 indivíduos elegíveis), obtidos em estudo prévio desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, foram correlacionados à variabilidade genética de CYP2D6. Os pacientes tinham mediana de idade de 36 anos (IQR 24 – 52 anos), similar a mediana de tempo de residência na região da Amazônia (33 anos; IQR 20 – 49 anos). A mediana de tempo de residência em Rio Pardo foi de 8 anos (IQR 6 – 12 anos), refletindo as características de formação recente da comunidade. As estimativas médias de ancestralidade genômica dos 123 indivíduos incluídos na análise apontam para uma população altamente miscigenada com contribuição significativamente menor de descendentes africanos e predominância significativa de ancestralidade europeia (mediana de 0,450, IQR = 0,266 – 0,617) e descendentes indígenas americanos (nativos americanos) (mediana de 0,336, IQR: 0,223 – 0,544) (Teste de *Kruskal-Wallis*; $P < 0,0001$). Uma baixa contribuição da ascendência africana foi observada entre os indivíduos, com mediana de ancestralidade genômica de 0,154 (IQR: 0,0892 – 0,244) (Figura 21). Entre os 123 indivíduos com informações de ancestralidade, 69 foram classificados sem recorrências, 19 com única recorrência e 35 apresentaram múltiplos episódios de recorrências (2003 a 2013). A proporção de ascendência africana, nativo americana e europeia para os grupos sem recorrência *versus* única *versus* múltiplas recorrências foi similar ($P > 0,05$; Teste de *Kruskal Wallis*) (Figura 22) entre os grupos sem, única e múltiplas recorrências.

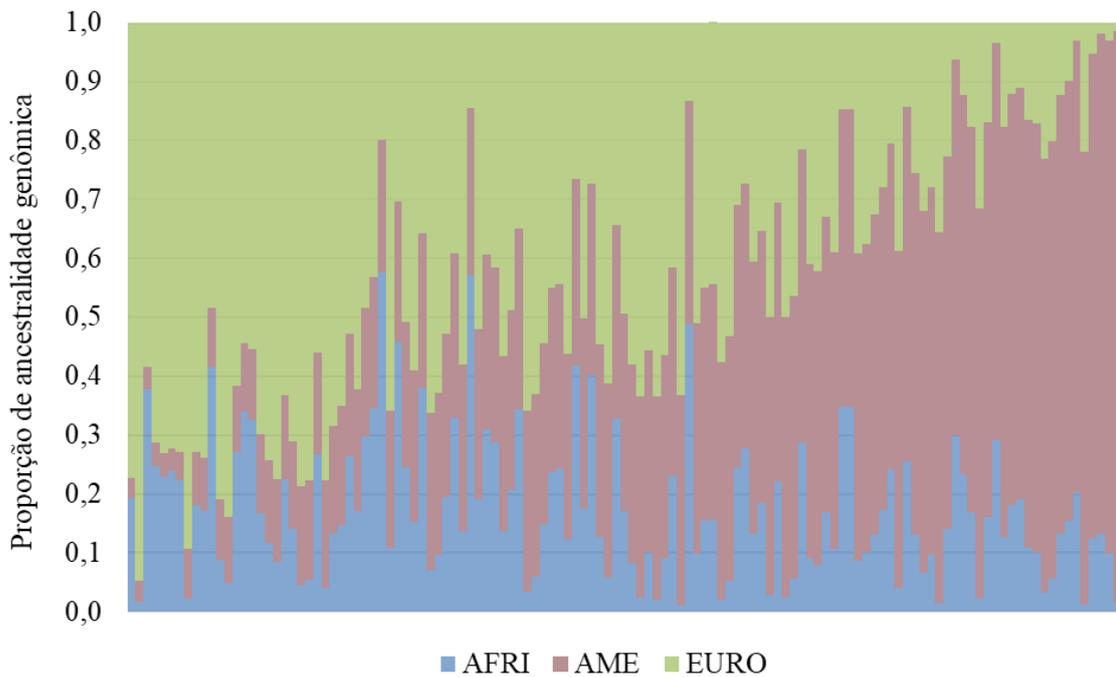


Figura 21. *Barplot* da ancestralidade individual estimada para os indivíduos de Rio Pardo com o *Software Structure* para a ancestralidade Africana (azul), Nativo Americana (vermelho) e Europeia (verde). Os valores estimados da ancestralidade individual foram obtidos usando o método implementado no programa *Structure*, por meio de agrupamento *Bayesiano*. No eixo y está representada a proporção de ancestralidade genômica para os 123 indivíduos do estudo, dispostos no eixo x.

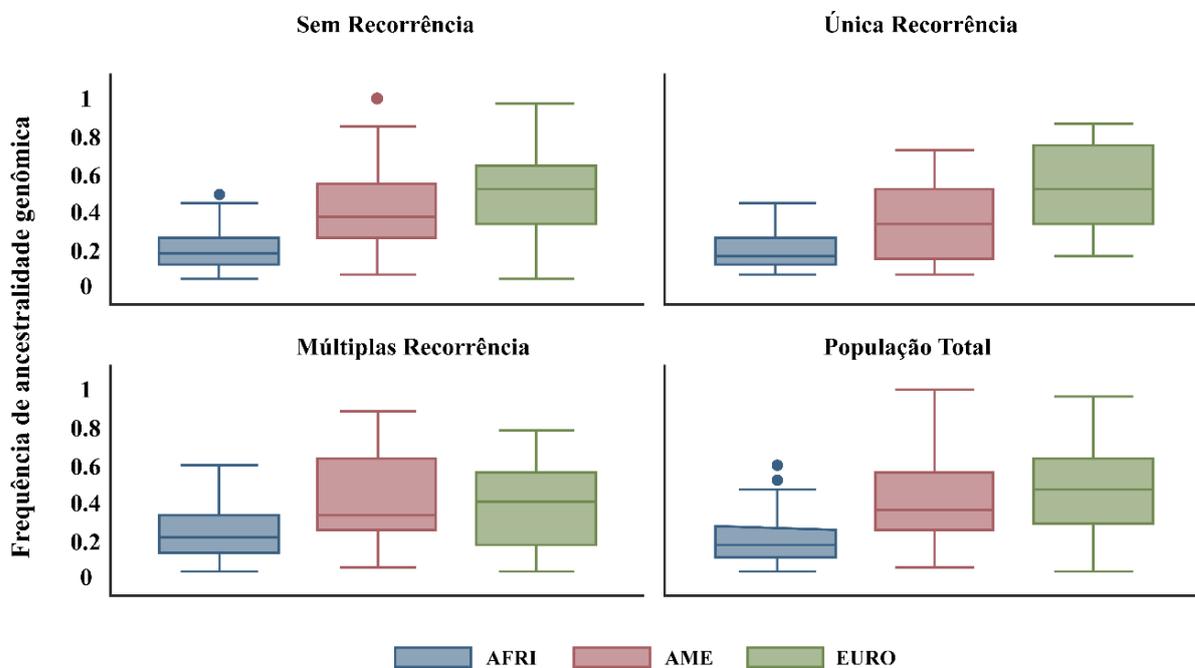


Figura 22. Proporção de ancestralidade africana, nativo americana e europeia entre os grupos sem recorrência ($n = 69$), com única ($n = 19$) e múltiplas recorrências ($n = 35$) na comunidade de Rio Pardo. Os resultados estão apresentados como valores de mediana e intervalo interquartil da ancestralidade genômica europeia individual para cada grupo. Os pontos apresentados na figura representam os *outliers*. $P > 0,05$; Teste de *Kruskal Wallis*.

De modo a avaliar a variabilidade de *CYP2D6* decorrente de componentes genéticos ancestrais da população brasileira, nós caracterizamos a frequência dos alelos/fenótipos de *CYP2D6* por predominância da ancestralidade genômica ancestral individual. Para cada indivíduo do estudo, nós determinamos como critério: considerar como ancestralidade predominante, aquela em que a razão entre as duas maiores proporções ancestrais (africano, nativo americano e/ou europeu) inferida para o indivíduo era maior ou igual a 2. Indivíduos cuja razão entre as duas maiores proporções ancestrais era menor que 2 foram considerados miscigenados. Em cada grupo definido de acordo com a ancestralidade predominante, a mediana da ancestralidade nativo americana e europeia foi de, aproximadamente, 70% (mediana de 0,722; IQR 0,650 – 0,775 para o grupo nativo americano e mediana de 0,698; IQR 0,645 – 0,746 para o grupo europeu). Indivíduos considerados como miscigenados apresentaram mediana de ancestralidade nativo americana e europeia de 0,346 (IQR 0,308 – 0,474) e 0,444 (IQR 0,350 – 0,531), respectivamente. A deleção do gene (*CYP2D6**5) foi predominante em nativos americanos (6%). Uma frequência mais elevada de algumas variantes alélicas de atividade nula/reduzida de *CYP2D6* foi observada em indivíduos com ancestralidade genômica europeia predominante, como por exemplo, *4 e *41 (14,0% e 5,3%, respectivamente) (Figura 23 e Tabela 9). Enquanto, uma maior frequência da variante *CYP2D6**29 foi observada em indivíduos com *background* africano (dados não reportados).

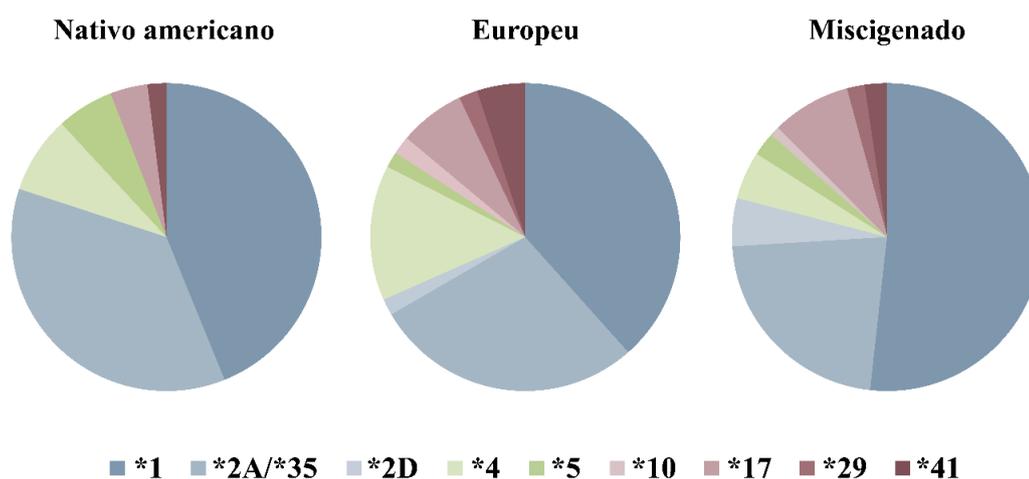


Figura 23. Frequência dos alelos de *CYP2D6* entre indivíduos com ancestralidade nativo americana (n cromossomos = 50), europeia (n cromossomos = 57) e miscigenado (n cromossomos = 120). As diferentes variantes alélicas de *CYP2D6* estão representadas de acordo com a predominância da ancestralidade genômica. Na classificação dos indivíduos, consideramos como ancestralidade predominante quando a razão entre as duas maiores proporções ancestrais (africano, nativo americano e/ou europeu) foi maior ou igual a 2. Indivíduos com razão menor que 2 foram considerados miscigenados. A ancestralidade africana foi desconsiderada da análise, pois apenas dois indivíduos apresentavam ancestralidade predominantemente africana. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os alelos de *CYP2D6* nos diferentes grupos ($P > 0.05$; Teste *Exato de Fisher*).

Tabela 9. Frequência dos alelos CYP2D6 entre indivíduos com ancestralidade africana, nativo americana e europeia predominantes ($P > 0.05$; Teste *Exato de Fisher*).

Alelos de CYP2D6	Africano, % (n)	Nativo Americano, % (n)	Europeia, % (n)	Miscigenado, % (n)
*1	0,500 (2)	0,440 (22)	0,386 (22)	0,517 (62)
*2A/*35	.	0,360 (18)	0,2811 (16)	0,225 (27)
*2D	.	.	0,018 (1)	0,050 (6)
*4	.	0,080 (4)	0,140 (8)	0,050 (6)
*5	.	0,060 (3)	0,018 (1)	0,025 (3)
*10	.	.	0,018 (1)	0,008 (1)
*17	.	0,040 (2)	0,070 (4)	0,083 (10)
*29	0,500 (2)	.	0,018 (1)	0,017 (2)
*41	.	0,020 (1)	0,053 (3)	0,025 (3)

Ao considerar, as distribuições previstas de frequência fenotípica de CYP2D6, a ancestralidade genômica média para cada população parental (europeus, nativos americanos e africanos) que formaram a população brasileira não diferiu entre indivíduos com atividade reduzida de CYP2D6 e enzima funcional ($P = 0,180$; Teste de *Mann-Whitney*) (Tabela 10).

Tabela 10. Ancestralidade individual estimada pelos grupos fenotípicos de CYP2D6.

Ancestralidade	CYP2D6, mediana (IQR)		
	Enzima funcional (AS > 1)	Atividade nula/reduzida (AS ≤ 1)	P - value ^a
Europeu	0,411 (0,244 – 0,572)	0,528 (0,271 – 0,675)	0,18
Nativo americano	0,357 (0,252 – 0,551)	0,309 (0,165 – 0,568)	0,314
Africano	0,154 (0,086 – 0,251)	0,138 (0,084 – 0,212)	0,726

^a Teste de *Mann-Whitney*

6.4. Atividade reduzida de CYP2D6 aumenta o número de recorrência de *Plasmodium vivax*

Para avaliar se o metabolismo reduzido de CYP2D6 após o tratamento PQ/CQ influencia os episódios clínicos recorrentes de malária, correlacionamos os fenótipos CYP2D6 preditos com o número de recorrências de *P. vivax*. O fenótipo relacionado a uma atividade normal de CYP2D6 (gNM-F), predominante em todos os grupos, foi observado em maior frequência (71,5%) no grupo sem recorrência (Tabela 11). Ao todo, vinte e sete indivíduos (de 130; 20,8%) tiveram atividade reduzida de CYP2D6 (AS ≤ 1) no grupo sem recorrência em comparação com 27,5% (14 de 51) no grupo com única recorrência e 32,4% (23 de 71) no

grupo de múltiplas recorrências. A análise univariada mostrou que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos sem, única e múltiplas recorrências em relação à distribuição de frequência da atividade predita de CYP2D6 ($P = 0,065$, Teste Qui-Quadrado de tendência) (Figura 24).

Tabela 11. Escore de atividade (AS) atribuído às variantes alélicas de CYP2D6.

Fenótipos de CYP2D6	Atividade Enzimática	Activity Score	Sem recorrência, % (n)	Única recorrência, % (n)	Múltiplas recorrências, % (n)	Total, % (n)
gPM	Nula	0	1,5 (2)	1,9 (1)	.	1,1 (3)
gIM	Reduzida	0,5	1,5 (2)	3,8 (2)	1,8 (2)	2,3 (6)
gNM-S	Reduzida	1	16,8 (23)	21,2 (11)	29,2 (21)	21,1 (55)
gNM-F	Normal	1,5 ou 2	71,5 (98)	61,5 (32)	65,3 (47)	67,8 (177)
gUM	Aumentada	> 2	3,6 (5)	9,6 (5)	1,4 (1)	4,2 (11)
ND	Indeterminada	ND	5,1 (7)	1,9 (1)	1,4 (1)	3,4 (9)

Os fenótipos de CYP2D6 estão representados como normal para fenótipos de metabolismo extensivo/normal (gNM-F), reduzido para metabolismo intermediário (gIM e gNM-S), ausente, para metabolismo nulo (gPM), aumentado para metabolismo ultrarrápido (gUM) e ND para indivíduos cujo fenótipo não foi determinado por ausência de dados de número de cópias ou predição alélica de CYP2D6. No sistema de pontuação de atividade de CYP2D6, os alelos *4 e *5 recebem um valor de 0, alelos *10, *17, *29 e *41, o valor de 0,5 e alelos *1, *2A/*2D e *35 recebem um escore de 1. A soma do escore dos alelos de CYP2D6 determina a atividade metabólica da enzima (fenótipo).

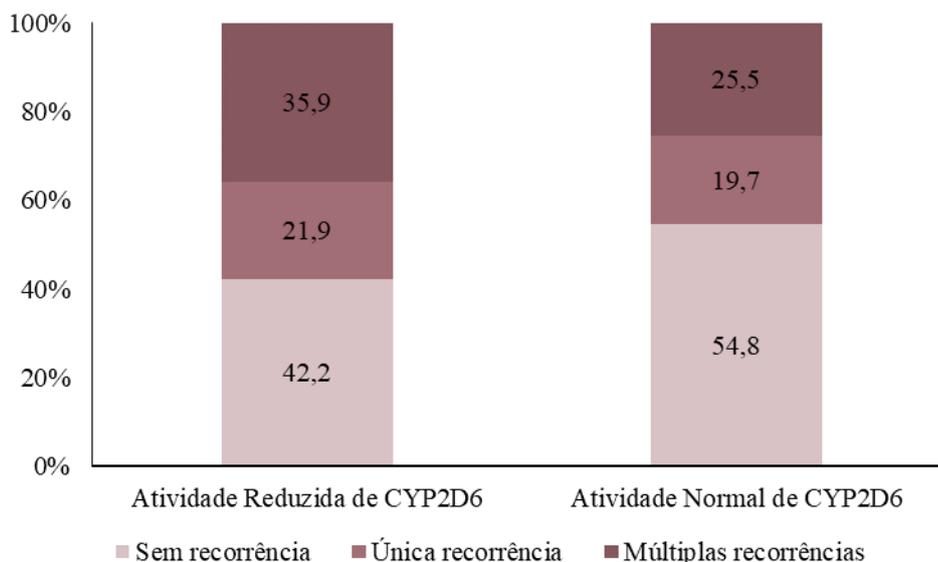


Figura 24. Frequência da atividade enzimática de CYP2D6 predita entre os grupos de indivíduos sem recorrência (n = 130) única recorrência (n = 51) e múltiplas recorrências (n = 71). Indivíduos com atividade aumentada (gUM) e metabolismo normal (gNM-F) foram agrupados. Indivíduos com fenótipos de CYP2D6 indeterminados foram desconsiderados na análise (n = 9). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os alelos de CYP2D6 nos diferentes grupos ($P = 0,065$; Teste de Qui-Quadrado).

Para confirmar a associação entre a atividade predita de CYP2D6 e recorrência clínica na malária por *P. vivax*, um modelo de Regressão Binomial Negativo foi ajustado para variáveis epidemiológicas. No modelo de melhor ajuste, indivíduos com níveis reduzidos de atividade de CYP2D6 ($AS \leq 1$) tiveram quase o dobro do risco de recorrência em comparação a indivíduos com enzima normal ($AS > 1$) (razão de risco 1,75, 95% CI 1,2 – 2,6, $P = 0,003$). No entanto, indivíduos vivendo por mais tempo na região amazônica apresentaram risco reduzido de recorrência na malária por *P. vivax* (razão de risco 0,97, IC 95% 0,96 – 0,98, $P < 0,0001$). O risco de recorrência também foi maior para os indivíduos que viviam ao longo do córrego Rio Pardo (área ribeirinha) (razão de risco 2,68; IC95% 1,9 – 3,8; $P < 0,0001$) (Figura 25 e Tabela 12).

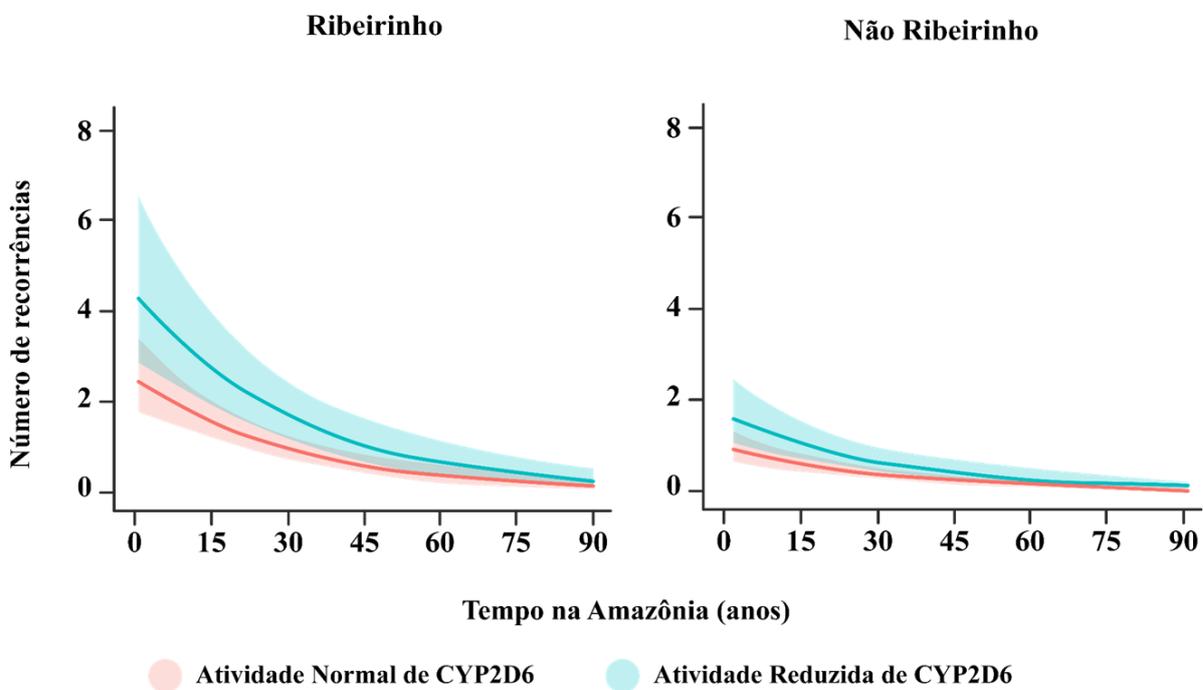


Figura 25. Número predito de recorrências em indivíduos com atividade reduzida e normal de CYP2D6 na população ribeirinha e não ribeirinha de Rio Pardo. O número predito de recorrências em 10 anos, representado no eixo x, foi estimado de acordo com a atividade fenotípica de CYP2D6, a área de residência no assentamento de Rio Pardo (ribeirinho *versus* não ribeirinho) e o tempo de residência na região da Amazônia, expresso no eixo y. Todas as variáveis foram derivadas do modelo de Regressão Binomial Negativo.

Tabela 12. Estimativa do risco relativo de episódios de recorrências em indivíduos com atividade reduzida de CYP2D6, a considerar exposição e susceptibilidade a infecções por *Plasmodium vivax*.

Parâmetro	Risco Relativo (IC 95%) ^a	P - value
Atividade predita de CYP2D6		
Normal	Referência	
Reduzida	1,75 (1,18 – 2,58)	0,003
Tempo de residência na região Amazônica	0,97 (0,96 – 0,98)	< 0,0001
Local de residência em Rio Pardo		
Não Ribeirinho	Referência	
Ribeirinho	2,68 (1,89 – 3,83)	< 0,0001

^a Risco Relativo

Nesse sentido, um modelo de Regressão Logística ajustado para local de residência e tempo de residência em área endêmica de malária apresentou maior risco de recidiva para indivíduos com níveis reduzidos de atividade do CYP2D6 (risco relativo 1,94; IC95% 1,02 – 3,75; $P = 0,044$). Além disso, o risco de recorrência foi menor (risco relativo 0,98, IC 95% 0,96 – 0,99, $P = 0,011$) para indivíduos que viveram mais tempo na região amazônica, enquanto os ribeirinhos tiveram risco aumentado (risco relativo 4,96, IC 95% 2,85, $P < 0,0001$) para recorrências da malária por *P. vivax* (Figura 26 e Tabela 13). Após explorar os dados de variação alélica de *CYP2D6*, investigamos se o fenótipo de *CYP2D6* influenciava o tempo de recorrência da infecção por *P. vivax*. O tempo entre a infecção inicial e a primeira recorrência não diferiu entre os grupos de indivíduos com atividade nula/reduzida (mediana = 70 dias, IC 95%, 45,5 – 100) para atividade reduzida e normal (mediana = 53 dias, IC 95%, 38 – 87) de *CYP2D6* ($P = 0,357$, *Teste de Log-rank*) (Figura 27).

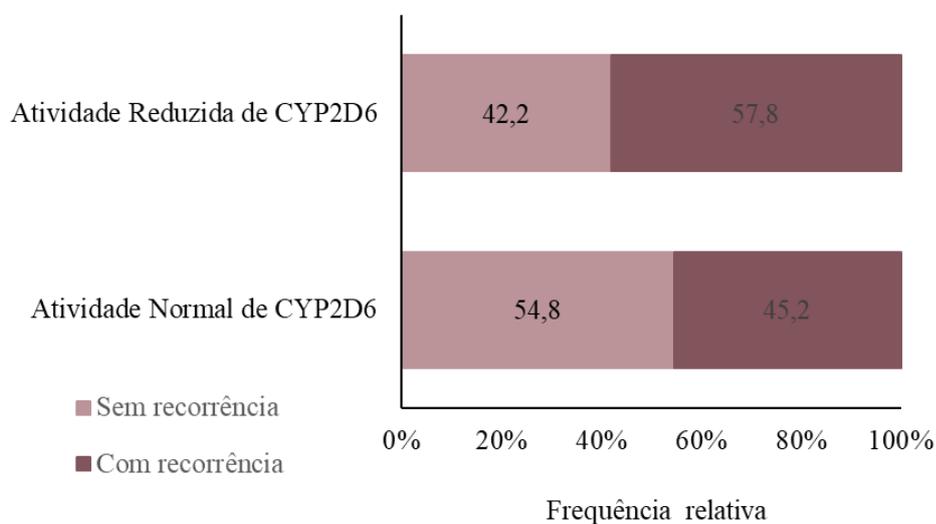


Figura 26. Frequência de recorrência em indivíduos com atividade normal e reduzida de CYP2D6 nos grupos sem recorrência (n=130) e com recorrência (n=122). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a frequência dos fenótipos de atividade reduzida e normal CYP2D6 nos grupos sem recorrência e com recorrência ($P = 0,085$; Teste Exato de Fisher).

Tabela 13. Estimativa da razão de chance de episódios de recorrências em indivíduos com atividade reduzida de CYP2D6, a considerar exposição e susceptibilidade a infecções por *Plasmodium vivax*.

Parâmetro	Razão de Chance (IC 95%) ^a	P - value
Atividade predita de CYP2D6		
Normal	Referência	
Reduzida	1,940 (1,021 – 3,747)	0,044
Tempo de residência na região Amazônica		
	0,980 (0,964 – 0,995)	0,011
Local de residência em Rio Pardo		
Não Ribeirinho	Referência	
Ribeirinho	4,963 (2,850 – 8,852)	<0,0001

^a Razão de Chance

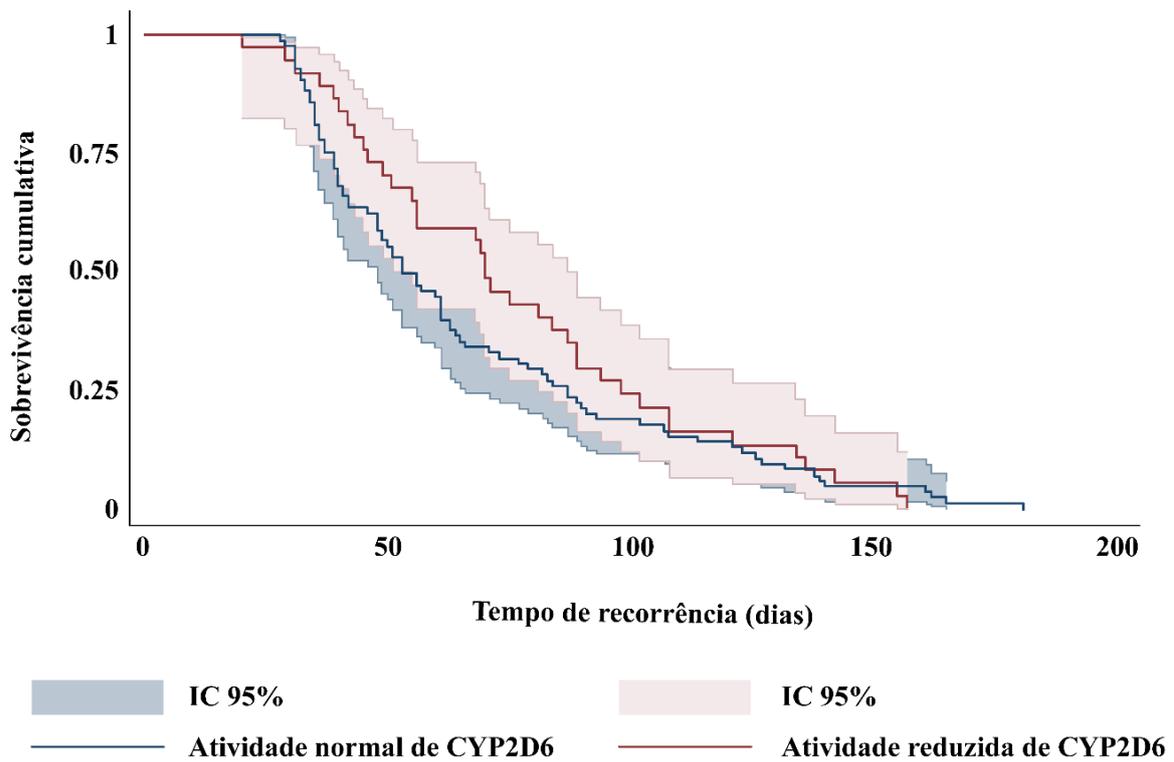


Figura 27. Curva *Kaplan-Meier* para o efeito da atividade de CYP2D6 no tempo da primeira recorrência da infecção por *Plasmodium vivax*. O tempo mediano para o primeiro episódio recorrente de malária por *P. vivax* foi de 70 dias (95% IC, 45 – 100 dias) para indivíduos com atividade reduzida de CYP2D6 e 53 (95% IC, 38 – 87 dias) para indivíduos com enzima normal ($P = 0,357$, Teste de *Log-rank*).

7. Discussão

7.1. Classificação das recorrências e contribuição dos hipnozoítos para a transmissão da malária por *Plasmodium vivax* em Rio Pardo

O aumento das falhas terapêuticas por PQ-CQ merece destaque nas investigações acerca da farmacocinética da droga e proposições de esforços para a eliminação da malária. Um dos principais desafios na terapêutica da malária por *P. vivax* é alcançar a cura radical de forma efetiva e segura para o paciente pois os frequentes episódios de recorrência, por ativação de hipnozoítos, são a fonte dominante de malária incidente e são extremamente difíceis de controlar devido à ausência de biomarcadores para diagnóstico e detecção das formas latentes. Além disso, refratários à maioria das drogas antimaláricas, os hipnozoítos são formas difíceis de serem atingidas, pois podem ser eliminados apenas pelo tratamento com PQ, que pode ter sua eficácia reduzida devido ao metabolismo alterado da enzima CYP2D6 (BENNETT et al., 2013; PYBUS et al., 2013a). Neste ponto, a compreensão farmacocinética da PQ é muito importante para otimizar o regime de dosagem terapêutica e reduzir a infectividade aos mosquitos, pela reativação de hipnozoítos. Como discutiremos mais, a dependência de CYP2D6 para o metabolismo eficaz da PQ levanta preocupações óbvias sobre o comprometimento do efeito terapêutico em populações polimórficas. Sabe-se, hoje, que para a CYP2D6 existe com mais de 150 variantes alélicas principais (INGELMAN-SUNDBERG, 2005a) e acredita-se que grandes populações de indivíduos em áreas endêmicas de malária sejam afetadas por fenótipo nulos ou intermediários (BAINS, 2013). Com esses fatos em mãos, fica claro que o uso da PQ (um agente para cura radical das infecções por *P. vivax*) precisa ser analisado cuidadosamente, levando em consideração o efeito das questões farmacogenéticas da droga, assim como problemas relacionados à sua toxicidade. Além disso, contornar as limitações no conhecimento da biologia e epidemiologia dos hipnozoítos também pode ser a grande oportunidade para acelerar as tentativas de eliminação da malária por *P. vivax*. Se no mundo, parte dos casos incidentes de malária por *P. vivax* derivam de hipnozoítos, limitar esse reservatório produziria reduções na transmissão e mortalidade da doença.

Em áreas onde a transmissão ocorre, é difícil distinguir um episódio de recaída verdadeira de um recrudescimento ou um episódio primário de uma nova infecção. A ambiguidade da frequência e do tempo de recaída geograficamente variáveis, juntamente com casos de reinfeção e recrudescência na malária recorrente por *P. vivax* (após terapia com PQ)

torna a estimativa da falha terapêutica por PQ em ambientes endêmicos muito difícil. No entanto, se os pacientes forem tratados, também, com um esquizotocida eficaz e alguns fatores de confusão forem controlados, pode-se considerar, com maior confiança, que quaisquer novos episódios parasitológicos são prováveis recaídas. Aqui, usamos uma combinação de critérios para caracterizar com rigor os episódios de recorrências da infecção por *P. vivax*. Uma parte importante desta análise incluiu a correspondência de um sistema de vigilância epidemiológico do Brasil, SIVEP-Malária, para explorar a frequência de recorrências registradas na comunidade de estudo. Primeiramente, analisamos o perfil geral de transmissão na região durante o período de estudo (levantamento do número de casos de 2003 a 2013). O número de casos por *P. falciparum* decresceu ao longo dos anos e, atualmente, *P. vivax* é responsável por todos os casos clínicos registrados na região. Dos casos registrados por *P. vivax* ao longo de dez anos, cerca de 20% das infecções anuais, registradas em Rio Pardo, podem ser atribuídas às recorrências. Em geral, as populações amazônicas brasileiras apresentam estimativa média de 26 – 30% de recorrências anuais por *P. vivax* (SIMÕES et al., 2014). Em 2009, o estudo de Orjuela-Sánchez *et al.* avaliou a incidência e o tempo de recorrência por *P. vivax* em pacientes residentes na fronteira entre Brasil, Peru e Bolívia, tratados com CQ-PQ. Os autores registraram incidência acumulada de 26 a 40% de recidivas por *P. vivax*, as quais ocorreram em um intervalo de até 180 dias após a infecção inicial. Outros estudos também registraram taxas de recorrência de malária na Amazônia brasileira de 23 a 29% em indivíduos acompanhados por até um ano (SIMÕES et al., 2014; VITOR-SILVA et al., 2016). Conhecer a frequência de recorrências é extremamente relevante para o controle da malária por *P. vivax*, pois fornece uma indicação da carga circulante de hipnozoítos em diferentes áreas da Amazônia brasileira e os desafios impostos por estas formas dormentes, como principal determinante da persistência da malária.

Um dos pontos fortes deste estudo é que os critérios utilizados para caracterizar as recorrências por *P. vivax* permitiram caracterizar melhor o perfil de recorrência para cada indivíduo. Nossa abordagem para classificar a recorrência foi baseada na ocorrência de recidivas da malária por *P. vivax* até 180 dias após a infecção inicial, com o objetivo de reduzir a possibilidade de reinfecção. No Brasil estima-se que o intervalo médio entre a infecção inicial e as recaídas é de aproximadamente quatro meses (SIMÕES et al., 2014). Portanto, intervalos tão extensos quanto um ano aumentam a probabilidade da recidiva ter sido ocasionada por uma reinfecção em áreas de transmissão de malária. Além disso, a possibilidade de recrudescência foi reduzida considerando as recorrências que ocorreram após um período de 28 dias a partir do início do tratamento. Nesse período, a CQ ainda está

presente na circulação sanguínea e a recorrência da malária por *P. vivax* pode ser causada por parasitos resistentes a droga (BAIRD et al., 1997; CHU et al., 2018). Na Amazônia brasileira, há evidências de uma baixa resistência do *P. vivax* a CQ (FILHO et al., 2007; MARQUES et al., 2014). No entanto, os recrudescimentos ocorreriam nos primeiros dias devido à falta de adesão ao tratamento ou à dosagem inadequada, particularmente em crianças e adultos com excesso de peso (DUARTE et al., 2001). Na comunidade de Rio Pardo, estimamos uma proporção muito baixa (1,7%; 42 de 2486 casos totais de infecção por *P. vivax*) de possíveis recrudescências em 10 anos do período do estudo. Finalmente, a maioria dos indivíduos classificados como não recorrentes (77%) teve um episódio único de malária registrado de 2003 a 2013 ou episódios em intervalos maiores que 1 ano, o que provavelmente deve representar uma nova infecção.

Um estudo recente mostrou que esquemas curtos de 7 – 9 dias de PQ com uso concomitante de CQ foi mais efetivo que a CQ sozinha e igualmente eficaz ao regime de 14 dias na prevenção das recorrências de *P. vivax* (DAHER et al., 2019). Combinações de ACT-PQ também foram mais eficazes que a CQ sozinha ou combinações CQ-PQ, corroborando dados da literatura (COMMONS et al., 2018; GOMES et al., 2015). Em geral, o Brasil recomenda cursos curtos de 7 – 9 dias (dose total 3 – 4.2 mg/kg) de tratamento. Quatorze dias de PQ são recomendados no Brasil apenas quando os pacientes são submetidos a tratamento supervisionado. A mesma eficácia entre o regime de sete 14 dias é encorajadora e reforça a ideia de que a taxa de cura é em função da dose total de PQ, em vez do período de tratamento (BAIRD, 2005). O regime de curta duração tem importantes implicações práticas, porque aumenta significativamente a adesão ao tratamento em relação ao regime mais longo (14 dias) (BRAZ et al., 2016). Em geral, os pacientes que necessitam de terapia anti-hipnozoítos e que apresentam atividade de CYP2D6 significativamente alterada (atividade nula/reduzida) podem recair mesmo com a adesão total ao medicamento de boa qualidade. O tratamento dos indivíduos do presente estudo não foi supervisionado, contudo espera-se uma taxa elevada de adesão dos pacientes ao tratamento com o esquema curto de sete dias. De fato, os dados da literatura descrevem uma alta taxa (67 – 86%) de adesão ao tratamento da malária na Amazônia brasileira (ALMEIDA; RODRIGUES; VIEIRA, 2014; PEREIRA; ISHIKAWA; FONTES, 2011a).

7.2. Variabilidade da frequência alélica de *CYP2D6* nos indivíduos infectados por *Plasmodium vivax* no Brasil

Uma maior compreensão da variabilidade de *CYP2D6* na população brasileira permitirá o entendimento das diferenças no metabolismo dos fármacos mediado pela *CYP2D6* e ajudará na orientação da escolha do fármaco mais adequado, bem como de sua dosagem, para evitar as recorrências por *P. vivax* e possíveis efeitos adversos decorrentes da metabolização alterada da droga (KERB et al., 2009). Em um país de dimensões continentais, como o Brasil, com padrões de imigração distintos e diferentes processos de miscigenação, uma distribuição homogênea de alelos de *CYP2D6* em regiões geográficas do norte foi observado em nossa comunidade e estudos prévios da população norte brasileira (FRIEDRICH et al., 2014; BRASIL et al., 2018; LADEIA-ANDRADE et al., 2019). Essa homogeneidade observada contrasta com os resultados de estudos farmacogenéticos anteriores que demonstraram uma distribuição altamente heterogênea de alguns polimorfismos em diferentes as regiões geográficas, bem como nas categorias de cor/raça adotadas pelo censo brasileiro (SORTICA et al., 2012 ; SUAREZ-KURTZ et al., 2014). De fato, existem diferenças marcantes nas frequências de alelos de *CYP2D6* em populações de diferentes origens continentais. Certos alelos foram observados em altas frequências em diferentes populações, tais como *CYP2D6* *4 em europeus, *CYP2D6* *10 em asiáticos e *CYP2D6* *17 em africanos (ZHOU et al., 2009 ; CREWS et al., 2014). Em nossa comunidade, a prevalência do alelo *4 (8,8%) e *17 (6,9%) é intermediária entre as descritas para europeus e africanos (SISTONEN et al., 2009), como esperado para uma população miscigenada. No Brasil, estudos maiores foram realizados em populações do sul do país (ANTUNES et al., 2012). Em geral, as frequências alélicas foram semelhantes às observadas em outras regiões do Brasil, exceto para o alelo *CYP2D6**4, que foi observado em 18% em pacientes com câncer de mama (ANTUNES et al., 2012). Essas diferenças nos resultados refletem, possivelmente, questões metodológicas, como tamanho das amostras, características dos indivíduos, diferentes proporções de mistura, indivíduos saudáveis ou pacientes com doenças ou diferentes desenhos de estudo (FRIEDRICH et al., 2014).

Em Rio Pardo, a frequência encontrada para o alelo *CYP2D6**4 (8,8%) foi inferior à descrita por Kohlrausch *et al.* (2008) (13,2%) no Rio Grande do Sul, Argentina e Paraguai (17,8%). Enquanto, na França e Alemanha e em regiões do norte do Brasil foi encontrado em 18,9% e 10,8% da população, respectivamente. (FRIEDRICH et al., 2014 ; SISTONEN et al., 2009). O alelo *CYP2D6**41, por sua vez, ocorre em uma frequência de 4,1% no norte do país

(FRIEDRICH et al., 2014), valor este muito próximo ao encontrado em Rio Pardo e no sul da Europa (4,5%) (SISTONEN et al., 2009). Para o alelo *CYP2D6*17*, encontramos uma frequência de 6,9% em Rio Pardo, semelhantemente aos resultados alélicos de Friedrich *et al.* (2014) (5,3%) para o norte do Brasil. No Rio Grande do Sul, os autores identificaram uma frequência de apenas 1,3% para essa variante (KOHLRAUSCH et al., 2008). A deleção do gene *CYP2D6* (*5) foi observada em 3,1% das nossas amostras, semelhantemente às frequências de 2,2 e 2,7% encontradas no Rio Grande do Sul e norte do país, respectivamente (FRIEDRICH et al., 2014; KOHLRAUSCH et al., 2008). Esse alelo, geralmente, está presente em uma frequência de 3,2% na Europa e de 3,8% na Ásia Central (SISTONEN et al., 2009). O alelo *CYP2D6*10* apresentou-se em baixa frequência (0,8%), similarmente à encontrada por Kohlausch *et al.* (2008) (2,1%) e Friedrich *et al.* (2014) (1,4%). O alelo *CYP2D6*29* não foi encontrado no Rio Grande do Sul, já em nossa comunidade, observamos uma frequência de 1,9%, frequência esta comparável aos resultados de Friedrich *et al.* (2014) (1,4%), sugerindo que esta frequência pode ser representativa da população norte brasileira. Quando analisado a frequência de indivíduos com fenótipos nulos (gPM), a frequência predisposta em Rio Pardo foi de 1,1%, o que é similar à prevalência de gPMs relatados em populações latino-americanas da América do Norte (2,2% – 6,6%) (BERNARD et al., 2006). Já em relação ao fenótipo gIM, a frequência predita em nosso estudo foi de 2,3%. Esse achado deve-se, pelo menos em parte, aos alelos *17 (6,9%), *29 (1,9%) e *41 (2,9%), relatados em maior frequência na Ásia, África e Oriente Médio, respectivamente.

As categorias fenotípicas descritas para *CYP2D6* fornecem indicadores úteis sobre a atividade da enzima (GAEDIGK et al., 2008, 2017; ZANGER; RAIMUNDO; EICHELBAUM, 2004). A população brasileira passou por um intenso processo de miscigenação nos séculos anteriores, sendo composta por uma formação genética resultante das três raízes ancestrais principais: africana, nativo americana e europeia (PENA et al., 2009). Inicialmente, o principal componente populacional consistia de nativos americanos, que contribuíram fortemente para a formação inicial da nossa população. No entanto, ao término da imigração africana, a entrada proeminente de europeus provocou um importante efeito populacional no Brasil. O intenso fluxo, cerca de seis milhões de europeus, levou a mudanças no cenário de composição genética da população brasileira (PENA et al., 2009). Dessa forma, a população brasileira, hoje, é altamente heterogênea, formada pela mistura entre índios nativos, colonizadores europeus ou imigrantes e escravos africanos, com predominância de contribuição da população parental europeia (70%), com tendência crescente de norte a sul do Brasil (CALLEGARI-JACQUES et al., 2003; LINS et al., 2010;

PENA et al., 2011; SANTOS et al., 2009). Em geral, as populações da Amazônia são caracterizadas por maior contribuição de ancestralidade nativo americano em comparação com outras regiões do Brasil. Na população de Rio Pardo, as estimativas médias de ancestralidade apontaram para uma população altamente misturada com contribuição significativa de ancestrais europeus (44%) e nativos americanos (38%), mas com baixa ascendência africana (18%) (KANO et al., 2018). Este padrão de mistura com uma elevada contribuição de ancestralidade nativa americana refletiu na distribuição de frequências das variantes de *CYP2D6* na população estudada, com baixa frequência dos alelos *CYP2D6* *4 (atividade nula), *CYP2D6* *41 (atividade reduzida) e fenótipo gPM, como descrito recentemente para nativos americanos do sul (NARANJO et al., 2018). Nenhum alelo específico apresentou diferença significativa entre os europeus e nativos americanos, possivelmente devido ao número reduzido de indivíduos considerados nessa análise.

A baixa representatividade da ancestralidade predominantemente africana impossibilitou conclusões acerca da variabilidade de *CYP2D6* para alelos específicos em nossa população de estudo. Apenas as variantes alélicas *1 e *29 foram identificadas entre os indivíduos com ancestralidade africana predominante. Já a considerável proporção de ancestralidade nativo americana é consistente com a história demográfica de ocupação do norte do país, onde o processo de colonização brasileira e de miscigenação foi marcado por acasalamentos entre homens europeus e mulheres indígenas nativas como estratégia de permanência e ocupação da região (PENA et al., 2009). Embora não seja o escopo do trabalho analisar os fatores evolutivos e demográficos que contribuíram para as diferenças observadas nas frequências das variantes de *CYP2D6*, a distribuição homogênea de alguns alelos dessa enzima pode ser considerado resultado de uma pressão seletiva nesse gene que resultou na manutenção desses alelos específicos que codificam uma enzima funcional em altas frequências (LLERENA et al., 2014; NARANJO et al., 2018). O processo de seleção natural das variantes de *CYP2D6*, assim como a deriva genética e recombinação são alguns dos fatores responsáveis pelas diferenças nas frequências dessas variantes entre as populações (LLERENA et al., 2014; NARANJO et al., 2018). Vale a pena destacar que o processo de colonização foi marcado por um maior quantitativo de numerosas populações indígenas locais da região norte e foi acentuadamente diferente das outras regiões geográficas do país (BATISTA DOS SANTOS et al., 1999). Dessa forma, o processo de miscigenação da população brasileira, também, foi importante para a construção do *background* genético atual da população e deve ser levado em consideração na aplicação dos resultados obtidos em nosso estudo.

Embora as categorias fenotípicas descritas em nossa comunidade forneçam indicadores úteis do metabolismo da enzima, heterogeneidade na correspondência genótipo-fenótipo tem sido relatada dentro e entre grupos populacionais, ou seja, o mesmo genótipo pode diferir no fenótipo entre regiões e grupos étnicos (GAEDIGK et al., 2017; LLERENA et al., 2014; NARANJO et al., 2018). No presente estudo, utilizamos a classificação genótipo-fenótipo proposta como padrão pelo Consórcio de Implementação Farmacogenética Clínica (CPIC) (Sistema de Pontuação de CYP2D6) (WANG et al., 2014; WANG; PAPP; SUN, 2015) e que tem sido utilizada em estudos de malária e variabilidade de *CYP2D6* em resposta à PQ (BENNETT et al., 2013; BRASIL et al., 2018; JOAN INGRAM et al., 2014). Dados da literatura demonstram que o genótipo gNM-S (AS = 1) tem atividade próxima ao gIM (WANG et al., 2014; WANG; PAPP; SUN, 2015), permitindo, assim, que agrupássemos nossos indivíduos do estudo com escore de atividade igual a 0 (gPM), 0,5 (gIM) e 1 (gNM-S) como metabolizadores nulos/reduzidos de *CYP2D6*. Esse mesmo agrupamento tem sido utilizado por outros autores (BRASIL et al., 2018) e ressalta a necessidade de considerar a consequência dos gNM-S na metabolização reduzida e falha terapêutica da PQ. Além da variação genótipo-fenótipo, em muitos estudos observa-se que o LD no genoma humano varia entre as populações e também entre e dentro dos *loci* em uma mesma população (GABRIEL SB et al., 2002). Os altos níveis de LD em *CYP2D6* encontrados na nossa população reforça os achados da literatura (SABBAGH; DARLU, 2006). Dois fatores principais poderiam explicar os altos níveis de LD no gene *CYP2D6* na comunidade de Rio Pardo: seleção natural e a intensa miscigenação da população brasileira, como consequência do processo de colonização.

7.3. Implicações do metabolismo reduzido de *CYP2D6* nas recorrências da infecção por *Plasmodium vivax*

As diferenças interindividuais relacionadas ao metabolismo comprometido de *CYP2D6* (atividade nula/reduzida) são particularmente relevantes em situações de bloqueio da transmissão da malária, onde os hipnozoítos (refratários à maioria das drogas antimaláricas) são difíceis de serem atingidos e eliminados, ou seja, metabolizadores nulos/reduzidos de *CYP2D6* podem permanecer infectados por períodos mais longos após a administração de PQ, em comparação aos indivíduos com outros fenótipos normal de *CYP2D6*, e podem representar uma fonte residual de transmissão da doença nessas áreas, dependendo de alelos ligados a este fenótipo na população. A resposta ao tratamento é

variável entre os indivíduos, resultando em 40 – 70% dos pacientes exibindo uma falta de eficácia do tratamento farmacológico ou reações adversas a medicamentos (EICHELBAUM et al., 2006). Evidências recentes mostram que a conversão da PQ em metabólitos bioativos depende da isoforma do citocromo CYP2D6 no fígado (GANESAN et al., 2009; PYBUS et al., 2013b). Em geral, estima-se que 15 – 30% da variabilidade da resposta ao medicamento seja causada por polimorfismo genético (GETHING et al., 2012). Embora vários fatores contribuam para a resiliência de *P. vivax* às medidas de controle da malária, um alto número de recorrências atribuído à falha de PQ, em muitas áreas ao redor do mundo, vem desafiando os esforços para o controle de *P. vivax*.

Com doses fixas de PQ, pacientes com metabolismo nulo/reduzido de CYP2D6 podem ter uma subdosagem dos metabólitos ativos, conseqüente falha terapêutica e maior risco de recaída da infecção por *P. vivax* (BENNETT et al., 2013; BRASIL et al., 2018; SILVINO et al., 2016). Nosso estudo anterior apontou uma associação significativa entre múltiplas recorrências e polimorfismos relacionados à redução da atividade da CYP2D6 em viajantes que retornam de áreas endêmicas de malária no Brasil (SILVINO et al., 2016). Aqui, realizamos um estudo retrospectivo de 10 anos em um cenário de transmissão moderada/baixo e instável na Amazônia brasileira, onde as recorrências de malária por *P. vivax* após tratamento CQ / PQ foram responsáveis por aproximadamente 18% dos casos relatados para esta espécie. Na comunidade de Rio Pardo, cerca de 25% dos indivíduos apresentaram atividade nula/reduzida do CYP2D6, semelhante ao descrito para as demais áreas amazônicas brasileiras, entre 20 e 36% (BRASIL et al., 2018; LADEIA-ANDRADE et al., 2019). Aproximadamente 60% dos indivíduos com metabolismo nulo/reduzido apresentaram episódios de recorrência, com risco, quase duas vezes maior (RR 1,75; $P = 0.003$), de apresentar episódios recorrentes como conseqüência possível da falha terapêutica da PQ. Esses achados reforçam que indivíduos com maiores taxas de recorrência, presumivelmente devido à incapacidade de eliminar os hipnozoítos por *P. vivax*, apresentaram maior risco de recorrências em fenótipos de atividade nula/reduzida de CYP2D6, sugerindo que a atividade da CYP2D6 é um passo limitador na formação de metabólitos ativos de PQ contra os hipnozoítos (BENNETT et al., 2013; PYBUS et al., 2013b).

Em relação aos indivíduos com metabolismo normal de CYP2D6, 45% dos indivíduos elegíveis tiveram pelo menos um episódio de recorrência de *P. vivax*. Esse resultado reforça o caráter multifatorial do desfecho do tratamento da malária por *P. vivax*, que depende de fatores genéticos individuais, como o genótipo CYP2D6, mas também do estado imunológico dos indivíduos, da suscetibilidade do parasito às drogas e da adesão ao tratamento (CHU;

BRANCO, 2016; COMMONS et al., 2018). Parte desses casos, também, podem ser explicados pela proporção de infecções por *P. vivax* que normalmente evoluem para recaídas. Isso já foi bem estudado e sabe-se, hoje, que essa proporção é uma propriedade intrínseca do parasito da malária e varia consideravelmente entre as regiões geográficas; é também em função do tamanho do inóculo de esporozoítos e da imunidade do paciente, quando essa existe. Também é sabido que a probabilidade de recorrência com uma cepa de um único genótipo é dependente do tempo que o paciente está doente, o que também sugere efeito da imunidade sobre a ocorrência desse fenômeno.

O metabolismo prejudicado da PQ, definido aqui, como escores de atividade fenotípica abaixo de 1 ($AS \leq 1$), foi representativo de parte significativa da nossa população e foi associado com maior risco de recorrência de malária por *P. vivax* e, conseqüentemente, falha terapêutica da PQ. Em geral, a tradução de genótipos em capacidade de metabolismo da PQ (fenótipos de CYP2D6) é baseada em um único limiar de um escore de atividade, ou seja, um $AS > 1,0$ é determinante de atividade enzimática normal, sendo considerado suficiente para assegurar a cura radical do *P. vivax*. O que percebemos em nossa comunidade, também relatado em estudos anteriores (SILVINO et al., 2016; BRASIL et al., 2018), é que dentro de uma mesma amostra populacional há uma variação, perceptível, na incidência de recorrências entre indivíduos de escores de atividades semelhantes. O limiar fixo de escores de atividade ≤ 1 (atividade reduzida de CYP2D6), representando metabolismo insuficiente para tratar *P. vivax* é, portanto, variável e pode ser mais permeável do que o aqui considerado, sugerindo que uma proporção indefinida de fenótipos nulo/reduzido de CYP2D6 pode metabolizar PQ suficiente para o sucesso terapêutico ou, indivíduos com metabolismo normal podem ter metabolismo insuficiente para promover o efeito terapêutico da droga.

No presente estudo, descobrimos que a mediana do tempo de residência para indivíduos com atividade normal do CYP2D6, mas que tiveram recorrências por *P. vivax*, foi menor em comparação com indivíduos com atividade enzimática normal que tiveram recorrências da malária. Assim, existe a possibilidade dos outros fatores, como local de moradia e tempo de residência em áreas da Amazônia brasileira, terem efeito na terapia antimalárica e, conseqüente, levarem à falha terapêutica da PQ (WHITE, 2017). Para avaliar o real impacto dos fenótipos não-funcionais de CYP2D6 nas recorrências na malária por *P. vivax*, realizamos uma análise robusta, controlando o efeito de alguns potenciais fatores de confusão. Considerando que um aumento do risco de recorrência foi mostrado para os indivíduos que residem na área ribeirinha em estudos prévios conduzidos por nosso grupo (KANO et al., 2012; PIRES et al., 2018), um risco menor foi visto por eles que têm vivido por

um longo tempo na região endêmica da malária. Nossa hipótese é que os ribeirinhos acumularam um número maior de hipnozoítos porque estão mais expostos à transmissão da malária e essas formas de parasitas podem ser mais ativadas. Existem algumas possibilidades para explicar a frequente ativação do hipnozoíto nos ribeirinhos que ainda precisa ser investigada: uma doença febril sistêmica associada à malária aguda ou uma infecção bacteriana febril e o inóculo do esporozoíto que parece ser um determinante importante do tempo e do número de recaídas (SHANKS; WHITE, 2013; WHITE et al., 2011).

Em nossos resultados, observamos uma redução de 3% no risco de recorrência por ano de residência na região amazônica (razão de risco 0,97, IC 95% 0,96 – 0,98, $P < 0,0001$). Esses dados fornecem evidências de um papel adicional da imunidade do hospedeiro na modulação da suscetibilidade a recorrências de *P. vivax* de forma que indivíduos que adquiriram algum nível de imunidade à malária apresentem menos episódios de recorrência ao longo dos anos independentemente do *status* de metabolismo do CYP2D6. Juntos, nossos achados reforçam que é importante considerar a susceptibilidade e o risco do indivíduo recorrer, levando em consideração a influência do metabolismo nulo/reduzido de CYP2D6, a influência da imunidade do hospedeiro ao avaliar a associação entre recorrências por falha terapêutica de PQ e tempo de residência na região da Amazônia brasileira, e também, o risco de susceptibilidade à recorrências, ao considerar um número maior de hipnozoítos e indivíduos que são mais expostos à transmissão da malária. É provável que as variações na proporção de recorrências se alterem com os níveis e a duração da exposição à transmissão, pois isso influenciará o número de hipnozoítos que se acumulam no fígado, mas, claro, não podemos desconsiderar as limitações na determinação das recaídas, nessas áreas de transmissão instável de malária.

Em conclusão, nossas análises geraram *insights* sobre o metabolismo comprometido de PQ em pacientes com recorrências, sendo reforçado pela associação entre metabolismo nulo/reduzido de CYP2D6 e aumento do risco de episódios de recorrência por *P. vivax*. É importante ressaltar que este estudo de base comunitária destaca um papel adicional da imunidade do hospedeiro na modulação do risco de recorrência. A proporção de infecções recorrentes chegou a 25% após 28 dias de tratamento com CQ-PQ, impondo uma carga substancial aos esforços de controle da malária na Amazônia. Como indicado, para indivíduos com metabolismo comprometido que recaem durante a terapia com PQ, os médicos precisam considerar o ajuste da dosagem de drogas ou o tratamento de manifestações clínicas da infecção com antimaláricos alternativos. Para os metabolizadores nulos e intermediários, tanto o ajuste de drogas como terapia alternativa, quanto a orientação ao do paciente para procurar

tratamento médico, se os sintomas da malária surgirem, parecem ser os melhores cursos de ação para controle e eliminação dos reservatórios da infecção por *P. vivax*.

8. Considerações finais

Os prováveis efeitos das frequências significativas de alelos determinantes do metabolismo nulo/reduzido de CYP2D6 merecem avaliações no que diz respeito a estratégias técnicas para controle e eliminação da malária por *P. vivax* em regiões endêmicas de malária na Amazônia brasileira. Como em outras partes do mundo, o pouco sucesso na redução da prevalência de malária por *P. vivax* é resultante, principalmente, dos desafios impostos na eliminação dos hipnozoítos. Dessa forma, contornar as limitações no conhecimento da biologia e epidemiologia dos hipnozoítos – grandes reservatórios da infecção – pode ser a grande oportunidade para acelerar as tentativas de eliminação da malária por *P. vivax* e certamente atacar e limitar esse reservatório produziria reduções na carga de morbidade e mortalidade.

Polimorfismos no gene que expressa CYP2D6 levam a uma série de atividades metabólicas variando entre metabolizadores nulos e ultrarrápidos, aqueles com atividade enzimática acima do normal. Se a CYP2D6 é necessária para a ativação metabólica da PQ, então a eficácia (% cura) está dependente de polimorfismos genéticos. Os pacientes que necessitam de terapia anti-hipnozoítos, com PQ, e que apresentam atividade CYP2D6 significativamente reduzida ou nula podem apresentar maior risco de recair mesmo com a adesão total ao medicamento de boa qualidade. Da mesma forma, os indivíduos que são metabolizadores normal-*slow* podem necessitar de uma dose elevada de PQ para suprir a conversão metabólica diminuída da PQ parental para o seu(s) metabolito(s) ativo(s) e requerem atenção especial durante o tratamento da doença. As consequências do estado ultrarrápido ainda são desconhecidas, mas devem ser consideradas em avaliações de eficácia e segurança. Uma vez que o *status* de metabolismo de CYP2D6 varia significativamente de acordo com o grupo étnico, é provável que as diferenças regionais nos polimorfismos de CYP2D6 possam explicar, em parte, diferenças regionais na dose-resposta, embora sejam necessárias análises genóticas e fenóticas completas para entender completamente a situação, bem como compreender a contribuição de outras enzimas para a formação dos metabólitos ativos de PQ.

Nós ainda não sabemos, claramente, a extensão deste problema em relação às frequências dos alelos CYP2D6 associadas à falha terapêutica de PQ na Amazônia brasileira. Para investigar melhor essa associação, nosso estudo de base comunitária mostrou que, aproximadamente, 18% dos casos clínicos relatados na comunidade de Rio Pardo são recorrências, provavelmente pela ativação de hipnozoítos. Além disso, a prevalência de

indivíduos com atividade reduzida de CYP2D6 foi de 25%. Indivíduos com atividade reduzida de CYP2D6 tiveram quase o dobro do risco de recorrência em comparação com indivíduos com função enzimática normal. O risco de recorrência também foi maior para os indivíduos que vivem ao longo dos córregos locais (população ribeirinha). No entanto, os indivíduos que viveram por mais tempo na região amazônica apresentaram risco reduzido de recorrência de malária por *P. vivax* (Figura 28).

O conhecimento da estrutura genética da população associada à epidemiologia da malária é um passo importante para a compreensão da eficácia da resposta terapêutica em populações naturalmente infectadas por *P. vivax* e a influência desta variabilidade genética na dinâmica das infecções recorrentes. Assim, fornecemos fortes evidências ao levantar fatores que modulam o risco de recorrência em uma área de transmissão instável da malária, a considerar o metabolismo prejudicado de CYP2D6. Nossos achados têm implicações diretas no controle da malária, já que foi demonstrado que a presença de indivíduos que não respondem adequadamente ao tratamento devido à redução da atividade do CYP2D6, além disso, a imunidade e áreas de residência são sugestivos em influenciar a susceptibilidade e transmissão à doença desafiando o progresso sustentável para a eliminação do *P. vivax*.

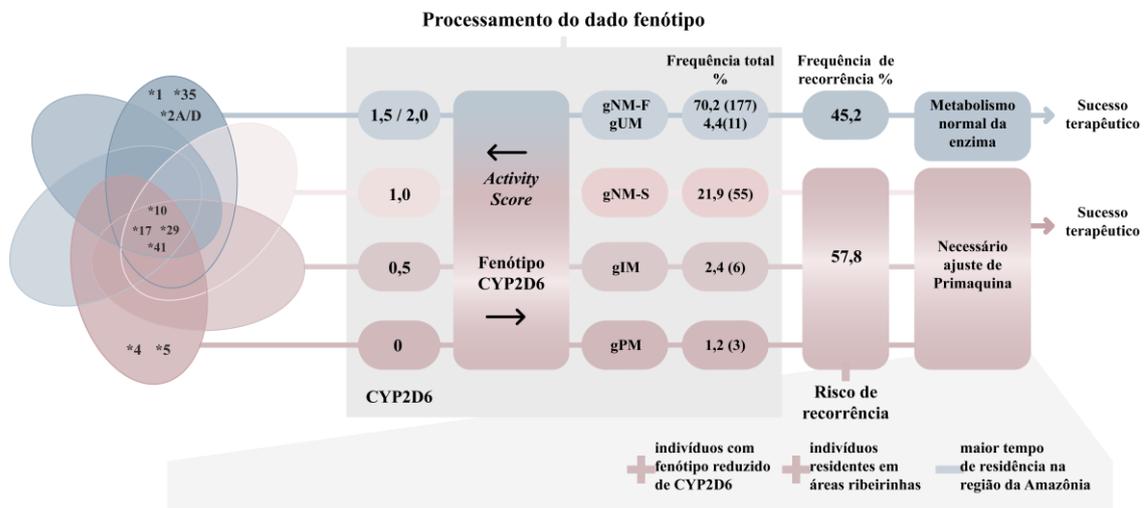


Figura 28. Fluxograma representando os principais resultados do estudo. À esquerda estão representadas as variantes alélicas de *CYP2D6*. O Consórcio de Implementação Farmacogenética Clínica (CPIC), que publica recomendações de tratamento guiadas por genética endossou um sistema que atribui a cada alelo uma pontuação de atividade. Nesse sistema, os alelos *4 e *5 recebem um valor de 0, alelos *10, *17, *29 e *41, o valor de 0,5 e alelos *1, *2A/*2D e *35 recebem um escore de 1. A soma do escore dos alelos de *CYP2D6* determina a atividade metabólica da enzima (fenótipo). No fluxograma, apresentamos a frequência total de indivíduos % (n) com os respectivos fenótipos: gNM-F, gNM-S, gIM e gPM e sem seguida, a frequência de indivíduos com os fenótipos específicos que apresentaram recorrência da infecção por *P. vivax*. Não estão representados o fenótipo gUM (0,042%) e os indivíduos cujo fenótipo é indeterminado (0,034%). Cerca de 57,8% dos indivíduos com fenótipo nulo/reduzido da enzima apresentaram recorrências (episódios únicos ou múltiplos). Sugerimos que o tratamento personalizado com ajuste da dosagem da PQ seja uma abordagem útil para o sucesso terapêutico

desses pacientes, diminuindo as taxas de recorrência da infecção por falha terapêutica devido ao metabolismo alterado da enzima CYP2D6. Dados do modelo Binomial Negativo mostraram que indivíduos com função nula/reduzida de CYP2D6 e residentes em áreas ribeirinhas apresentaram risco aumentado de episódios de recorrência de malária por *P. vivax*. Por outro lado, indivíduos que residem a mais tempo na região da Amazônia brasileira apresentaram menor risco de recorrências de infecções por *P. vivax*, sugerindo um papel da imunidade individual na susceptibilidade à infecção.

Capítulo 2

9. Resultados**Avaliação da variabilidade genética do citocromo P450 - CYP2D6 em indivíduos com recaídas da infecção por *Plasmodium vivax* no Rio de Janeiro, Brasil**

Foram avaliados três casos clínicos de pacientes infectados por *P. vivax* e que sofreram recaídas múltiplas (2–4 episódios) de *P. vivax*. Os pacientes foram infectados na região amazônica e acompanhados, posteriormente, no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, que é um dos centros de referência em malária fora da área endêmica. Nenhum paciente retornou à área endêmica após o primeiro episódio clínico, e por essa razão foram descartadas possíveis reinfecções.

9.1. Caso Clínico #1.

Paciente de 32 anos, sexo masculino, 78,5 kg de peso corporal. Residiu em São Gabriel da Cachoeira (Amazonas), por dois anos (até 18 de dezembro de 2015), onde foi diagnosticado com infecção por *P. vivax* após sintomas clínicos, e tratado com esquema padrão de CQ-PQ durante sete dias (Figura 29). No dia 25 de janeiro de 2016, 38 dias após sua mudança para o Rio de Janeiro, e 85 dias após o diagnóstico inicial de malária, ele procurou atendimento no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI, novamente com sintomatologia. Diagnosticado com *P. vivax*, o paciente apresentou parasitemia de 18.320 parasitos/mm³. Dentro do protocolo de tratamento, o indivíduo foi testado para deficiência de G6PD, obtendo resultado negativo. Dessa forma, foi administrado tratamento supervisionado de associação entre CQ-PQ, com dose total de PQ de 3,5 mg/kg, durante um período de nove dias, com acompanhamento de cura. No dia 16 de abril de 2016, intervalo de 82 dias após primeiro episódio recorrente, o paciente foi readmitido com manifestações clínicas e resultado positivo para diagnóstico de infecção por *P. vivax*, com parasitemia de 6.000 parasitos/mm³. Este foi o seu segundo episódio recorrente ao longo de aproximadamente 160 dias. O regime de medicação foi então reavaliado e ajustado. O paciente foi tratado com CQ e maior dosagem de PQ, dose total de 7 mg/kg, administrada durante 22 dias. Devido a manifestações de múltiplas recorrências durante o período de acompanhamento do paciente em área não endêmica de malária, o *status* de metabolismo de

CYP2D6 foi avaliado. Diagnosticado com as variantes alélicas *9 e *4 de *CYP2D6*, o fenótipo predito do paciente foi de metabolismo reduzido (gIM) de *CYP2D6* (Tabela 14). Desde a conclusão do último tratamento acima mencionado, o paciente foi acompanhado por mais de um ano e não apresentou novos episódios clínicos da infecção, atualizado em 20 de junho de 2017.

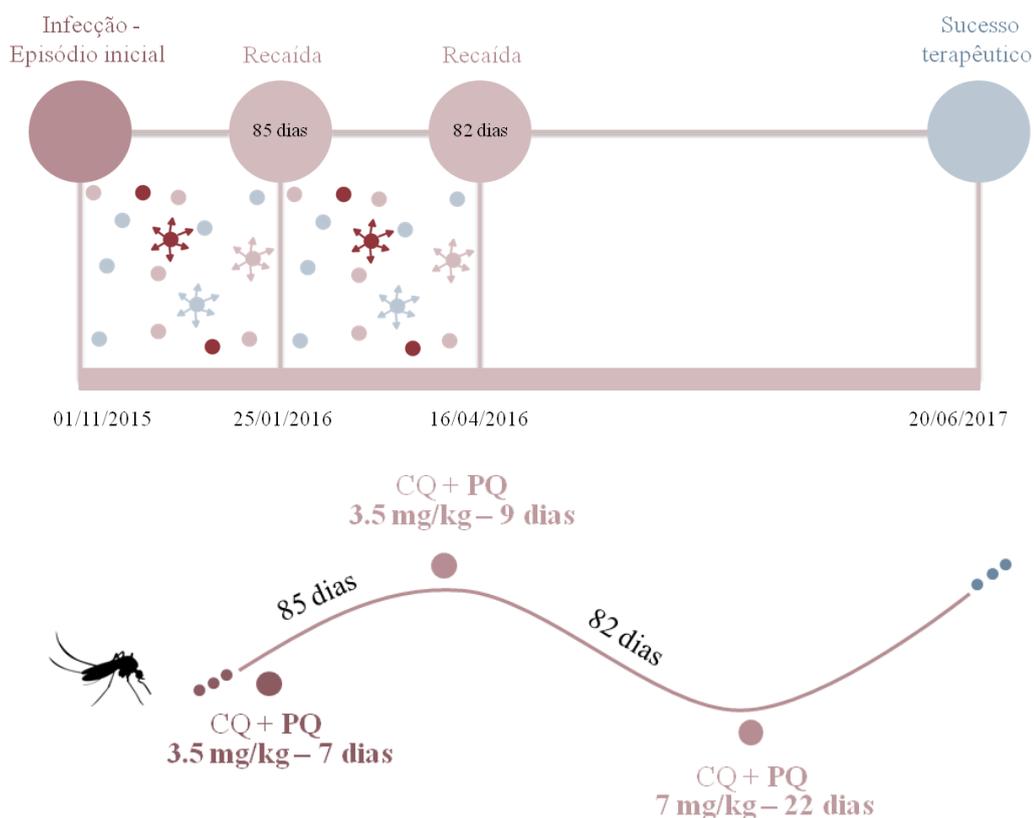


Figura 29. Periodicidade das recaídas reportadas no caso clínico #1 do Rio de Janeiro e respectivos tratamentos terapêuticos, com ajuste de drogas nos episódios de recaída por *Plasmodium vivax*.

9.2. Caso clínico #2.

Paciente de 33 anos, sexo feminino, 62,3 kg de peso corporal. Residiu em São Gabriel da Cachoeira (Amazonas) até o dia 14 de novembro de 2015, local onde foi diagnosticada e tratada para infecção por *P. vivax* em 1º de outubro de 2015 (Figura 30). No Rio de Janeiro, apresentou os sintomas clínicos com diagnóstico de *P. vivax* em 18 de fevereiro de 2016 e parasitemia de 12.480 parasitos/mm³. Após o diagnóstico, iniciou-se o tratamento supervisionado de associação entre CQ-PQ, com dose total de PQ de 3,5 mg/kg, administrada durante sete dias. Seguindo o protocolo de tratamento, a paciente foi testada para deficiência de G6PD, apresentando resultado negativo. No dia 05 de abril de 2016, foi readmitida no

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Rio de Janeiro, apresentou segunda recaída com intervalo de 47 dias da primeira recorrência. O regime de tratamento foi então ajustado, com administração de CQ e aumento da dose de PQ para dosagem total de sete mg/kg de peso corporal durante 7 dias de tratamento. A análise molecular de *CYP2D6* indicou que a paciente apresentava dois alelos *CYP2D6**4, determinante de um fenótipo gPM (atividade nula) para *CYP2D6* (Tabela 14). Após o término do tratamento, a paciente permaneceu sem sintomatologia clínica e episódios adicionais, atualizado em 20 de junho de 2017.

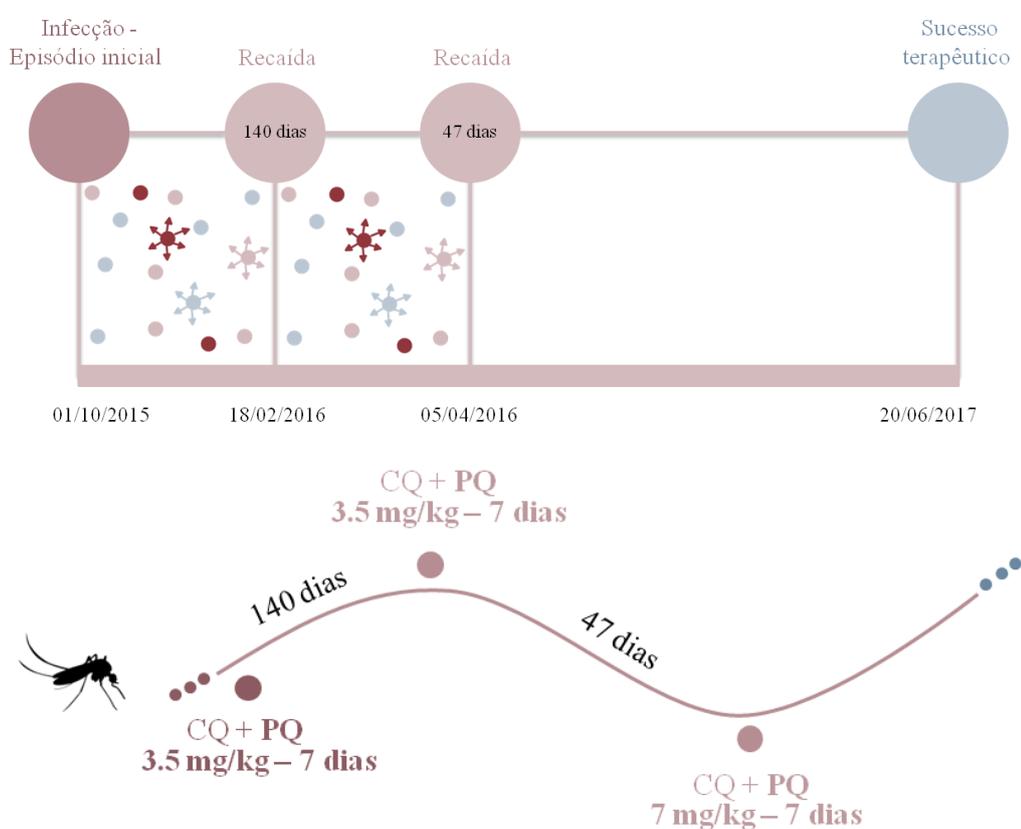


Figura 30. Periodicidade das recaídas reportadas no caso clínico #2 do Rio de Janeiro e respectivos tratamentos terapêuticos, com ajuste de drogas nos episódios de recaída por *Plasmodium vivax*.

9.3. Caso Clínico #3.

Paciente de 56 anos, sexo masculino, 82 kg de peso corporal. Residiu em Machadinho do Oeste, Rondônia (Amazonas), por dois meses, até o dia 04 de agosto de 2016. Com sintomas clínicos e diagnosticado com infecção por *P. vivax*, recebeu tratamento padrão supervisionado (CQ-PQ) em 1º de julho de 2016 (Figura 31). Após retorno ao Rio de Janeiro,

o paciente apresentou quatro episódios clínicos de malária, com recorrências em: 22 de agosto de 2016; 24 de novembro de 2016; 28 de janeiro de 2017 e 20 de março de 2017. Para esses episódios, os respectivos regimes de tratamento foram administrados: (i) CQ + PQ, com dose total de PQ de 3,5 mg/kg; (ii) CQ + PQ, com dose total de PQ de 3,5 mg/kg/ (iii) CQ + PQ, com dose total de PQ de 7 mg/kg. Devido a manifestações alérgicas induzidas por CQ (prurido), optou-se pela associação de Artemeter e Lumefantrina: AL + PQ, com dose total de PQ de 7 mg/kg (administrado no 4º episódio de recaída). Caracterizada a variabilidade genética de *CYP2D6*, o paciente apresentou dois alelos *CYP2D6*41*, determinante de um metabolismo reduzido da enzima (gNM-S) (Tabela 14). Mesmo após o ajuste da dosagem de PQ, o paciente manifestou recorrência da infecção. Em 8 de maio de 2017, após consentimento do paciente, iniciou-se a profilaxia semanal com CQ, com administração de 300 mg/semana durante um período de oito semanas. O paciente ainda está em acompanhamento e não manifestou novos episódios clínicos, atualizado em 20 de junho de 2018.

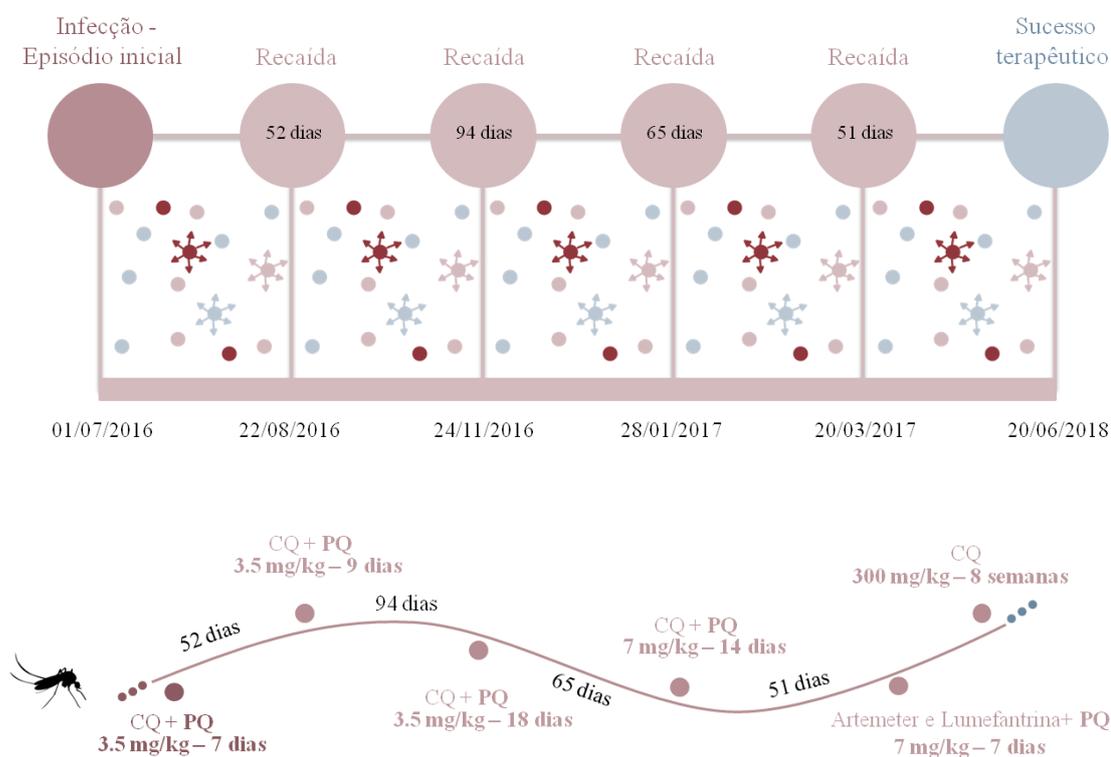


Figura 31. Periodicidade das recaídas reportadas no caso clínico #3 do Rio de Janeiro e respectivos tratamentos terapêuticos, com ajuste de drogas nos episódios de recaída por *Plasmodium vivax*.

Tabela 14. Alelos e fenótipos de CYP2D6 preditos.

Paciente	Alelo 1	Alelo 2	Score de Atividade	Fenótipo de CYP2D6	Atividade Enzimática
Caso Clínico #1	*9	*4	0.5	gIM	Reduzida
Caso Clínico #2	*4	*4	0	gPM	Nula
Caso Clínico #3	*41	*41	1.0	gNM-S	Reduzida

10. Discussão

Plasmodium vivax é a espécie mais amplamente distribuída, com destaque para sua resiliência aos esforços de controle e eliminação, devido à sua biologia complexa de formação dos hipnozoítos, capaz de promover recaídas (BETUELA et al., 2012). Para avaliar a resposta a diferentes esquemas de tratamento de pacientes com recaídas, foi realizada a predição dos fenótipos de CYP2D6 em três pacientes infectados por *P. vivax* que apresentaram múltiplas recorrências da infecção após tratamento supervisionado com CQ-PQ, no Instituto Evandro Chagas – Rio de Janeiro, Brasil. As contraindicações da terapia com PQ são particularmente importantes. A PQ provoca anemia hemolítica aguda em pacientes deficientes da enzima G6PD. O acesso seguro à PQ foi testado, com negatização dos pacientes para deficiência em G6PD. Além disso, uma das pacientes acompanhada nesse estudo não estava grávida, nem em período de lactação. Dessa forma, os três indivíduos eram elegíveis para receber PQ, descartando possíveis complicações de uso clínico desta droga.

A dose total de PQ parece ser a principal determinante da sua eficácia terapêutica. Por via de regra, não há uma correlação clara entre a dose administrada de PQ e sua consequente resposta terapêutica. A PQ apresenta características farmacocinéticas peculiares, como meia vida reduzida e alteração no metabolismo em pacientes com polimorfismos em *CYP2D6* (PYBUS et al., 2012). Estudos clínicos sugerem que a dose total é o principal determinante da eficácia terapêutica pois o risco de recaída diminui proporcionalmente ao aumento da dose administrada da PQ (JOHN et al., 2012, SCHWARTZ, REGEV-YOCHAY & KURNIK, 2000). Neste sentido o Ministério da Saúde recomenda o ajuste da droga para pacientes com mais de 70kg, objetivando alcançar a dose de 3,5mg/kg. Porém o aumento da dose é limitado pela hemotoxicidade da PQ (MYINT et al., 2011).

A genotipagem de 10 polimorfismos em *CYP2D6*, incluindo número de cópias, resultou a inferência de três variantes alélicas nestes indivíduos, que, por sua vez, apresentaram predição de atividade nula: gPM (caso 2) e reduzida: gIM (caso 1) e gNM-S (caso 3). Na tentativa de promover a cura radical, os indivíduos receberam doses aumentadas de PQ após um número variável de recorrências da infecção. A dosagem da PQ, ajustada ao peso durante o tratamento, por tanto, apresentou eficácia e boa tolerabilidade para a prevenção dos episódios de recorrências. O paciente #3 foi o único que apresentou recorrência mesmo após receber dois ciclos de 7 mg/kg da droga. Como este paciente não apresentou cura radical da infecção, foi instituído um tratamento personalizado com profilaxia semanal com uso de CQ para eliminação das formas sanguíneas recidivantes. Vale ressaltar que este paciente foi

diagnosticado como gNM-S para CYP2D6 (AS = 1). Nossos resultados são reforçados pela associação encontrada entre metabolismo reduzido de CYP2D6 (escore AS <1) e risco elevado de falha terapêutica. Todos os pacientes, embora com *status* fenotípico não funcional ou reduzida para CYP2D6, obtiveram padrão satisfatório de resposta ao ajustar as concentrações com aumento da dosagem de PQ nos tratamentos subsequentes ou até se alcançar o sucesso terapêutico.

Ainda não há métodos moleculares para diferenciar, com segurança, as recaídas das recrudescências e reinfecções. Nos casos clínicos aqui apresentados, a reinfecção é improvável, uma vez que os participantes foram infectados em áreas endêmicas de malária e se mudaram para uma área com baixa taxa de infecção, sem histórico de viagem para regiões endêmicas após o episódio inicial de *P. vivax*. Além disso, os indivíduos não podem ser caracterizados como recrudescentes devido ao aparecimento do estágio eritrocítico em período acima de 28 dias após tratamento com CQ (tempo em que a CQ ainda circula no organismo). Além disso, todos apresentaram um intervalo mínimo de 52 dias, sugestivo de recaídas por ativação de hipnozoítos, por falha terapêutica da PQ. Os resultados apresentados no estudo dos casos clínicos corroboram parcialmente resultados anteriores, indicando o uso de maiores doses totais de PQ para prevenir episódios de recaída (FERNANDO; RODRIGO; RAJAPAKSE, 2011). É importante mencionar que a presença de comorbidades e uso de medicações concomitantes não foram registradas para nenhum dos pacientes em questão, descartando possíveis interações medicamentosas ou inibição enzimática que pudessem alterar a farmacocinética da PQ por CYP2D6. Em um contexto de gerenciamento de recaídas por *P. vivax*, nessa investigação ressaltamos, também, os desafios de interpretação dos fenótipos de CYP2D6. Até o momento, não há diretrizes ou recomendações para o tratamento individualizado para indivíduos com alteração em *CYP2D6*. As implicações para a saúde pública da prevalência do *status* de fenótipo reduzido de CYP2D6 ainda precisam ser mais exploradas em estudos prospectivos, enquanto a possibilidade de terapia individualizada ainda é, infelizmente, uma possibilidade distante a ser explorada em estudos clínicos e centros de referência não endêmicos.

11. Conclusão

Os principais achados desta pesquisa reforçam a hipótese de que a variabilidade genética, determinante de um metabolismo nulo/reduzido da PQ pela isoenzima CYP2D6, aumenta o risco de recorrência da infecção por *P. vivax*, sendo as principais contribuições:

- Avaliação da contribuição das recorrências (média de 20%) por *P. vivax* para os casos totais de malária registrados na comunidade de Rio Pardo ao longo de dez anos (2003–2013);
- Descrição de uma frequência significativa de fenótipos nulo/reduzido ($AS \leq 1,0$) em indivíduos da Amazônia brasileira (25 – 30%);
- Componente europeu preponderante na população de Rio Pardo e maior frequência de fenótipos nulo/reduzido ($AS \leq 1,0$) em indivíduos com ancestralidade predominantemente europeia;
- Alta contribuição da herança de europeus e nativos americanos na região norte, que compreende maior frequência dos alelos *4 e *41 de CYP2D6;
- Maior risco de recorrências das infecções por *P. vivax* para indivíduos com função nula/reduzida de CYP2D6, sugestivo de falha terapêutica da PQ;
- Maior risco de recorrência das infecções por *P. vivax* para indivíduos residentes em áreas ribeirinhas, possivelmente, por carregarem um número maior de hipnozoítos por estarem mais expostos à transmissão da malária;
- Menor risco de recorrências das infecções por *P. vivax* em indivíduos que residem por maior tempo na região da Amazônia brasileira, sugerindo um papel da imunidade individual na modulação e susceptibilidade à infecção;
- Efetividade no controle de recorrências das infecções por *P. vivax* (cura radical), através do aumento da dose total de PQ, em indivíduos com fenótipo nulo/reduzido de CYP2D6.

12. Referências

- ABDON, N. P.; YECÊ, A.; UCHÔA, S.; SOUZA, M. De. Avaliação da resposta aos esquemas de tratamento reduzidos para malária vivax. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 4, p. 343–348, 2001.
- AKLILLU, E.; PERSSON, I.; BERTILSSON, L.; JOHANSSON, I.; RODRIGUES, F.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, n. 1, p. 441–446, 1996.
- AL-DOSARI, M. S.; AL-JENOABI, F. I.; ALKHARFY, K. M.; ALGHAMDI, A. M.; BAGULB, K. M.; PARVEZ, M. K.; AL-MOHIZEA, A. M.; AL-MUHSEN, S.; HALWANI, R. High prevalence of CYP2D6*41 (G2988A) allele in Saudi Arabians. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 1063–1067, 2013.
- ALMEIDA, E. D.; RODRIGUES, L. C. S.; VIEIRA, J. L. F. Estimates of adherence to treatment of vivax malaria. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–6, 2014.
- ALMEIDA, E. D.; VIEIRA, J. L. F. Factors associated with non-adherence to the treatment of vivax malaria in a rural community from the Brazilian Amazon Basin. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 2, p. 248–251, 2016.
- ANTUNES, M.V.; LINDEN, R.; SANTOS, T.V.; WALLEMACQ, P.; HAUFROID, V., et al. Endozifen Levels and Its Association With CYP2D6 Genotype and Phenotype: Evaluation of a Southern Brazilian Population Under Tamoxifen Pharmacotherapy. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 34, p. 422–431, 2012.
- ASHLEY, E. A.; RECHT, J.; WHITE, N. J. Primaquine: The risks and the benefits. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2014.
- ASIH, B.S.; SYAFRUDDIN, D.; BAIRD, J.K. Challenges in the Control and Elimination of Plasmodium vivax Malaria. **Scientific Reports**, v. 7, p. 43936, 2017.
- AVALOS, S.; MEJIA, R. E.; BANEGAS, E.; SALINAS, C.; GUTIERREZ, L.; FAJARDO, M.; GALO, S.; PINTO, A.; MEJIA, A.; FONTECHA, G. G6PD deficiency, primaquine treatment, and risk of haemolysis in malaria-infected patients. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2018.
- BAINS, R.K. African variation at Cytochrome P450 genes. **Evolution, Medicine and Public Health**, v. 2013, n. 1, p. 118–134, 2013.
- BAIRD, J. K.; LACY, M. D.; BASRI, H.; BARCUS, M. J.; MAGUIRE, J. D.; BANGS, M. J.; GRAMZINSKI, R.; SISMAI, P.; KRISIN; LING, J.; WIADY, I.; KUSUMANINGSIH, M.; JONES, T. R.; FRYAUFF, D. J.; HOFFMAN, S. L. Randomized, Parallel Placebo-Controlled Trial of Primaquine for Malaria Prophylaxis in Papua, Indonesia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 12, p. 1990–1997, 2001.
- BAIRD, J. K.; RIECKMANN, K. H. Can primaquine therapy for vivax malaria be improved?

Trends in Parasitology, v. 19, n. 3, p. 115–120, 2003.

BAIRD, J. K. Effectiveness of Antimalarial Drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 15, p. 1565–1577, 2005.

BAIRD, K. Origins and implications of neglect of G6PD deficiency and primaquine toxicity in *Plasmodium vivax* malaria. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 3, p. 93–106, 2015. a.

BAIRD, K. Origins and implications of neglect of G6PD deficiency and primaquine toxicity in *Plasmodium vivax* malaria. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 3, p. 93–106, 2015. b.

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. 42, p. 1–6, 2018.

BARBER, B. E.; WILLIAM, T.; GRIGG, M. J.; PARAMESWARAN, U.; PIERA, K. A.; PRICE, R. N.; YEO, T. W.; ANSTEY, N. M. Parasite Biomass-Related Inflammation, Endothelial Activation, Microvascular Dysfunction and Disease Severity in Vivax Malaria. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2015.

BARO, B.; DEROOST, K.; RAIOL, T.; BRITO, M.; ALMEIDA, A.C.; de MENEZES-NETO, A.; FIGUEIREDO, E.F.; ALENCAR, A.; LEITÃO, R.; VAL, F.; MONTEIRO, W.; OLIVEIRA, A.; ARMENGOL, M.D.; FERNÁNDEZ-BECERRA, C.; LACERDA, M.V.; DEL PORTILLO, H.A. *Plasmodium vivax* gametocytes in the bone marrow of an acute malaria patient and changes in the erythroid miRNA profile. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005365, 2017.

BATISTA DOS SANTOS, S. E.; RODRIGUES, J. D.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. K. C.; ZAGO, M. A. Differential contribution of indigenous men and women to the formation of an urban population in the amazon region as revealed by mtDNA and Y-DNA. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 109, n. 2, p. 175–180, 1999.

BATTLE, K. E.; KARHUNEN, M. S.; BHATT, S.; GETHING, P. W.; HOWES, R. E.; GOLDING, N.; VAN BOECKEL, T. P.; MESSINA, J. P.; SHANKS, G. D.; SMITH, D. L.; BAIRD, J. K.; HAY, S. I. Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. **Malaria Journal**, v. 13, n. 144, p. 1–16, 2014.

BATTY, J.A.; HALL, A.S.; WHITE, H.L.; WIKSTRAND, J.; DE BOER, R.A.; VAN VELDHUISEN, D. J.; VAN DER HARST, P.; WAAGSTEIN, F.; HJALMARSON, A.; KJEKSHUS, J.; BALMFORTH, A.J.; MERIT-HF STUDY GROUP. An investigation of CYP2D6 genotype and response to metoprolol CR/XL during dose titration in patients with heart failure: a MERIT-HF substudy. **Clinical Pharmacology Therapeutics**, v. 95, n. 3, p. 321–30, 2014.

BAIRD, J. K. *et al.* Diagnosis of Resistance to Chloroquine by *Plasmodium vivax*: Timing of Recurrence and Whole Blood Chloroquine Levels. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, p. 621–626, 1997.

BENNETT, J. W.; PYBUS, B. S.; YADAVA, A.; TOSH, D.; SOUSA, J. C.; MCCARTHY, W. F.; DEYE, G.; MELENDEZ, V.; OCKENHOUSE, C. F. Primaquine Failure and Cytochrome P-450 2D6 in Plasmodium vivax Malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 14, p. 1381–1382, 2013.

BERNARD, S., NEVILLE, K.A., NGUYEN, A.T., FLOCKHART, D.A. Interethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6 in the U.S. population: clinical implications. **Oncologist**, v. 11, p. 126–135, 2006.

BETUELA, I.; ROSANAS-URGELL, A.; KINIBORO, B.; STANISIC, D. I.; SAMOL, L.; DE LAZZARI, E.; DEL PORTILLO, H. A.; SIBA, P.; ALONSO, P. L.; BASSAT, Q.; MUELLER, I. Relapses contribute significantly to the risk of plasmodium vivax infection and disease in papua new guinean children 1-5 years of age. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 11, p. 1771–1780, 2012.

BRADFORD, L. D. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. **Pharmacogenomics**, v. 3, n. 2, p. 229–243, 2002. a.

BRADFORD, L. D. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. **Pharmacogenomics**, v. 3, n. 2, p. 229–243, 2002. b.

BRAGA, C. B. E.; MARTINS, A. C.; CAYOTOPA, A. D. E.; KLEIN, W. W.; SCHLOSSER, A. R.; SILVA, A. F. Da; SOUZA, M. N. De; ANDRADE, B. W. B.; FILGUEIRA-JÚNIOR, J. A.; PINTO, W. de J.; DA SILVA-NUNES, M. Side Effects of Chloroquine and Primaquine and Symptom Reduction in Malaria Endemic Area (Mâncio Lima, Acre, Brazil). **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, p. 1–7, 2015.

BRASIL, L. W.; RODRIGUES-SOARES, F.; SANTORO, A. B.; ALMEIDA, A. C. G.; KÜHN, A.; RAMASAWMY, R.; LACERDA, M. V. G.; MONTEIRO, W. M.; SUAREZ-KURTZ, G. 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. 57, 2018.

BRAZ, R. M.; TAUIL, P. L.; SANTELLI, A. C. F. e S.; FONTES, C. J. F. Evaluation of the completeness and timeliness of malaria reporting in the Brazilian Amazon, 2003-2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 1, p. 10–1, 2016.

BRAZ, R. M.; BARCELLOS, C. Análise do processo de eliminação da transmissão da malária na Amazônia brasileira com abordagem espacial da variação da incidência da doença em 2016*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, n. 3, p. 1–12, 2018.

BRUECKNER, R.; LASSETER, K.; LIN, E.; SCHUSTER, B. First-time-in-humans safety and pharmacokinetics of WR 238605, a new antimalarial. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 5, p. 645–649, 1998.

BUNNAG, D.; KARBWANG, J.; THANAVIBUL, A.; CHITTAMAS, Y.; RATANAPONGSE, Y.; CHALERMRUT, K.; N, B.; HARINASUTA, T. High dose of primaquine in primaquine resistant vivax malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1, n. 88, p. 218–219, 1994.

CALLEGARI-JACQUES, S. M.; GRATTAPAGLIA, D.; SALZANO, F. M.; SALAMONI,

- S. P.; CROSSETTI, S. G.; FERREIRA, M. E.; HUTZ, M. H. Historical genetics: Spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. **American Journal of Human Biology**, v. 15, n. 6, p. 824–834, 2003.
- CAMPO, B.; VANDAL, O.; WESCHE, D. L.; BURROWS, J. N. Killing the hypnozoite – drug discovery approaches to prevent relapse in *Plasmodium vivax*. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 3, p. 107–122, 2015.
- CASTRO, M. C. De; MONTE-MO, R. L.; SAWYER, D. O.; SINGER, B. H. Malaria risk on the Amazon frontier. **PNAS**, v. 103, n. 7, p. 2452–2457, 2006.
- CHARLES, B. G.; MILLER, A. K.; NASVELD, P. E.; REID, M. G.; HARRIS, I. E.; EDSTEIN, M. D. Population pharmacokinetics of tafenoquine during malaria prophylaxis in healthy subjects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 8, p. 2709–2715, 2007.
- CHINTA, S. J.; PAI, H. V.; UPADHYA, S. C.; BOYD, M. R.; RAVINDRANATH, V. Constitutive expression and localization of the major drug metabolizing enzyme, cytochrome P4502D in human brain. **Molecular Brain Research**, v. 103, n. 1–2, p. 49–61, 2002.
- CHU, C. S.; PHYO, A. P.; LWIN, K. M.; WIN, H. H.; SAN, T.; AUNG, A. A.; RAKSAPRAIDEE, R.; CARRARA, V. I.; BANCONE, G.; WATSON, J.; MOORE, K. A.; WILADPHAINGERN, J.; PROUX, S.; SRIPRAWAT, K.; WINTERBERG, M.; CHEAH, P. Y.; CHUE, A. L.; TARNING, J.; IMWONG, M.; NOSTEN, F.; WHITE, N. J. Comparison of the Cumulative Efficacy and Safety of Chloroquine, Artesunate, and Chloroquine-Primaquine in *Plasmodium vivax* Malaria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 67, n. 10, p. 1543–1549, 2018.
- COGSWELL, F. B. The hypnozoite and relapse in primate malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, n. 1, p. 26–35, 2011.
- COMMONS, R. J. et al. The effect of chloroquine dose and primaquine on *Plasmodium vivax* recurrence: a WorldWide Antimalarial Resistance Network systematic review and individual patient pooled meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 9, p. 1025–1034, 2018.
- CONFALONIERI, U. E. C.; MARGONARI, C.; QUINTÃO, A. F. Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. **Acta Tropica**, v. 129, p. 33–41, 2014.
- CONN, J. G. M. C. M. S. M. Malaria Transmission in South America—Present Status and Prospects for Elimination. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 43936, 2017.
- COURA, J. R.; SUÁREZ-MUTIS, M.; LADEIA-ANDRADE, S. A new challenge for malaria control in Brazil: Asymptomatic *Plasmodium* infection - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 229–237, 2006.
- COX-SINGH, J.; DAVIS, T. M. E.; LEE, K.-S.; SHAMSUL, S. S. G.; MATUSOP, A.; RATNAM, S.; RAHMAN, H. A.; CONWAY, D. J.; SINGH, B. Europe PMC Funders Group *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life-threatening. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 165–171, 2008.

CREWS, K.R.; GAEDIGK, A.; DUNNENBERGER, H.M.; LEEDER, J.S.; KLEIN, T.E., et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for cytochrome P450 2D6 genotype and codeine therapy: 2014 update. **Clinical Pharmacology Therapeutics**, v. 95, p. 376–382, 2014.

CUBI, R.; VEMBAR, S. S.; BITON, A.; FRANETICH, J. F.; BORDESSOULLES, M.; SOSSAU, D.; ZANGHI, G.; BOSSON-VANGA, H.; BENARD, M.; MORENO, A.; DEREUDDRE-BOSQUET, N.; LE GRAND, R.; SCHERF, A.; MAZIER, D. Laser capture microdissection enables transcriptomic analysis of dividing and quiescent liver stages of *Plasmodium relapsing* species. **Cellular Microbiology**, v. 19, n. 8, p. 1–9, 2017.

DAHER, A.; SILVA, J. C. A. L.; STEVENS, A.; MARCHESINI, P.; FONTES, C. J.; TER KUILE, F. O.; LALLOO, D. G. Evaluation of *Plasmodium vivax* malaria recurrence in Brazil. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 18, 2019.

DAYGENA, T. Y.; MASSEBO, F.; LINDTJØRN, B. Variation in species composition and infection rates of *Anopheles* mosquitoes at different altitudinal transects, and the risk of malaria in the highland of Dirashe Woreda, south Ethiopia. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2017.

DE AMEIDA MELO, M.; DE VASCONCELOS-VALENÇA, R. J.; NETO, F. M.; BORGES, R. S.; COSTA-SILVA, D. R.; DA CONCEIÇÃO BARROS-OLIVEIRA, M.; BORGES, U. S.; ALENCAR, A. P.; SILVA, V. C.; DA SILVA, B. B. CYP2D6 gene polymorphisms in Brazilian patients with breast cancer treated with adjuvant tamoxifen and its association with disease recurrence. **Biomedical Reports**, v. 5, n. 5, p. 574–578, 2016.

DE ARAUJO, F. C. F.; DE REZENDE, A. M.; FONTES, C. J. F.; CARVALHO, L. H.; ALVES DE BRITO, C. F. Multiple-Clone Activation of Hypnozoites Is the Leading Cause of Relapse in *Plasmodium vivax* Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 49871, 2012.

DE PINA-COSTA, A.; BRASIL, P.; DI SANTI, S. M.; DE ARAUJO, M. P.; SUÁREZ-MUTIS, M. C.; SANTELLI, A. C. F. e. S.; OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: What happens outside the Amazonian endemic region. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 618–633, 2014.

DEPARTAMENTO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA. Guia prático de tratamento da malária no Brasil / Ministério da Saúde. 2010.

DOMBROWSKI, J. G.; SOUZA, R. M.; CURRY, J.; HINTON, L.; SILVA, N. R. M.; GRIGNARD, L.; GONÇALVES, L. A.; GOMES, A. R.; EPIPHANIO, S.; DRAKELEY, C.; HUGGETT, J.; CLARK, T. G.; CAMPINO, S.; MARINHO, C. R. F. G6PD deficiency alleles in a malaria-endemic region in the Western Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 253, 2017.

DUARTE, E. C.; PANG, L. W.; RIBEIRO, L. C.; FONTES, C. J. F. Association of Subtherapeutic Dosages of a Standard Drug Regimen With Failures in Preventing Relapses of Vivax Malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 471–476, 2001.

DUARTE, E. C.; GYORKOS, T. W. Self-reported compliance with last malaria treatment and occurrence of malaria during follow-up in a Brazilian Amazon population. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, n. 6, p. 518–524, 2003.

DURAND, S.; CABEZAS, C.; LESCANO, A. G.; GALVEZ, M.; GUTIERREZ, S.; ARROSPIDE, N.; ALVAREZ, C.; SANTOLALLA, M. L.; BACON, D. J.; GRAF, P. C. F. Efficacy of three different regimens of primaquine for the prevention of relapses of *Plasmodium vivax* malaria in the Amazon Basin of Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 1, p. 18–26, 2014.

EICHELBAUM, M.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; EVANS, W. E. Pharmacogenomics and Individualized Drug Therapy. **Annual Review of Medicine**, v. 57, n. 1, p. 119–137, 2006.

FASINU, P. S.; TEKWANI, B. L.; NANAYAKKARA, N. P. D.; AVULA, B.; HERATH, H. M. T. B.; WANG, Y. H.; ADELLI, V. R.; ELSOHLI, M. A.; KHAN, S. I.; KHAN, I. A.; PYBUS, B. S.; MARCSISIN, S. R.; REICHARD, G. A.; MCCHESENEY, J. D.; WALKER, L. A. Enantioselective metabolism of primaquine by human CYP2D6. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2014.

FILHO, F. S. S. *et al.* Chloroquine-Resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, p. 1125–1126, 2007.

FERNANDO, D.; RODRIGO, C.; RAJAPAKSE, S. Primaquine in vivax malaria: An update and review on management issues. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 351, 2011.

FRIEDRICH, D. C.; GENRO, J. P.; SORTICA, V. A.; SUAREZ-KURTZ, G.; DE MORAES, M. E.; PENA, S. D. J.; DOS SANTOS, Â. K. R.; ROMANO-SILVA, M. A.; HUTZ, M. H. Distribution of CYP2D6 alleles and phenotypes in the Brazilian population. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e110691, 2014.

GABRIEL SB; SCHAFFNER SF; NGUYEN H; MOORE JM; ROY J; BLUMENSTIEL B. The structure of haplotype blocks in the human genome. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2225–2229, 2002.

GAEDIGK, A.; GOTTSCHALL, R. R.; FORBES, N. S.; SIMON, S. D.; KEARNS, G. L.; LEEDER, S. Optimization of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data. **Pharmacogenetics**, v. 9, n. 6, p. 669–82, 1999.

GAEDIGK, A.; SIMON, S. D.; PEARCE, R. E.; BRADFORD, L. D.; KENNEDY, M. J.; LEEDER, J. S. The CYP2D6 Activity Score: Translating Genotype Information into a Qualitative Measure of Phenotype. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 83, n. 2, p. 234–242, 2008.

GAEDIGK, A. Complexities of CYP2D6 gene analysis and interpretation. **International Review of Psychiatry**, v. 25, n. 5, p. 534–553, 2013.

GAEDIGK, A.; SANGKUH, K.; WHIRL-CARRILLO, M.; KLEIN, T.; STEVEN LEEDER, J. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations.

Genetics in Medicine, v. 19, n. 1, p. 69–76, 2017.

GAEDIGK, A.; DINH, J. C.; JEONG, H.; PRASAD, B.; LEEDER, J. S. 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. a.

GAEDIGK, A.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; MILLER, N. A.; LEEDER, J. S.; WHIRL-CARRILLO, M.; KLEIN, T. E. The Pharmacogene Variation (PharmVar) Consortium: Incorporation of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 103, n. 3, p. 399–401, 2018. b.

GAETANI, G. F.; MARENI, C.; SALVIDIO, E.; GALIANO, S.; MELONI, T.; ARESE, P. Favism: Erythrocyte Metabolism during Haemolysis and Reticulocytosis. **British Journal of Haematology**, v. 43, n. 1, p. 39–48, 1979.

GANESAN, S.; TEKWANI, B. L.; SAHU, R.; TRIPATHI, L. M.; WALKER, L. A. Cytochrome P450-dependent toxic effects of primaquine on human erythrocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 241, n. 1, p. 14–22, 2009.

GARNHAM, P. C. C.; BRAY, R. S.; BRUCE CHWATT, L. J.; DRAPER, C. C.; KILLICK-KENDRICK, R.; SERGIEV, P. G.; TIBURSKAJA, N. A.; SHUTE, P. G.; MARYON, M. A strain of Plasmodium vivax characterized by prolonged incubation: morphological and biological characteristics. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 52, n. 1, p. 21–32, 1975.

GETHING, P. W. *et al.* A Long Neglected World Malaria Map: Plasmodium vivax Endemicity in 2010. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. e1814, 2012.

GOLLER, J. L.; JOLLEY, D.; RINGWALD, P.; BIGGS, B. A. Regional differences in the response of Plasmodium vivax malaria to primaquine as anti-relapse therapy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 2, p. 203–207, 2007.

GOMES, M. D. S. M.; VIEIRA, J. L. F.; MACHADO, R. L. D.; NACHER, M.; STEFANI, A.; MUSSET, L.; LEGRAND, E.; MENEZES, R. A. O.; JÚNIOR, A. A. P.; SOUSA, A. P. M.; COUTO, V. S. C. D. A.; COUTO, Á. A. R. D. A. Efficacy in the treatment of malaria by Plasmodium vivax in Oiapoque, Brazil, on the border with French Guiana: the importance of control over external factors. **Malaria Journal**, v. 14, p. 402, 2015.

GRIETENS, K. P.; SOTO, V.; ERHART, A.; RIBERA, J. M.; TOOMER, E.; TENORIO, A.; MONTALVO, T. G.; RODRIGUEZ, H.; CUENTAS, A. L.; D'ALESSANDRO, U.; GAMBOA, D. Adherence to 7-day primaquine treatment for the radical cure of P. vivax in the Peruvian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 6, p. 1017–1023, 2010.

GUIDICE, J. M. Lo; MAREZ, D.; SABBAGH, N.; LEGRAND-ANDREOLETTI, M.; SPIRE, C.; ALCAÏDE, E.; LAFITTE, J. J.; BROLY, F. Evidence for CYP2D6 expression in human lung. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 241, n. 1, p. 79–85, 1997.

HE, Y.; HOSKINS, J. M.; MCLEOD, H. L. Copy number variants in pharmacogenetic genes. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 5, p. 244–51, 2011.

HE, Z.-X.; CHEN, X.-W.; ZHOU, Z.-W.; ZHOU, S.-F. Impact of physiological , pathological and environmental factors on the expression and activity of human cytochrome P450 2D6 and implications in precision medicine. **Drug Metabolism Review**, v. 47, n. 4, p. 1–50, 2015.

HEIM, M. H.; MEYER, U. A. Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: CYP2D6. **Genomics**, v. 14, n. 1, p. 49–58, 1992.

HICKS, J.; SWEN, J.; GAEDIGK, A. Challenges in CYP2D6 Phenotype Assignment from Genotype Data: A Critical Assessment and Call for Standardization. **Current Drug Metabolism**, v. 15, n. 2, p. 218–232, 2014.

HODEL, E. M. S.; CSAJKA, C.; ARIEY, F.; GUIDI, M.; KABANYWANYI, A. M.; DUONG, S.; DECOSTERD, L. A.; OLLIARO, P.; BECK, H. P.; GENTONA, B. Effect of single nucleotide polymorphisms in cytochrome P450 isoenzyme and N-acetyltransferase 2 genes on the metabolism of artemisinin-based combination therapies in malaria patients from Cambodia and Tanzania. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 2, p. 950–8, 2013.

HOLT, B. G.; LESSARD, J.-P.; BORREGAARF, M. K.; FRITZ, S. A.; ARAÚJO, M. B.; DIMITROV, D.; FABRE, P.-H.; GRAHAM, C. H.; GRAVES, G. R.; JONSSON, K. A.; NOGUÉS-BRAVO, D.; WANG, Z.; WHITTAKER, R. J.; FJELDSA, J.; RAHBEK, C. An Update of Wallace’s Zoogeographic Regions of the World. **Science**, v. 339, n. 6115, p. 74–79, 2013.

HOSONO, N.; KATO, M.; KIYOTANI, K.; MUSHIRODA, T.; TAKATA, S.; SATO, H.; AMITANI, H.; TSUCHIYA, Y.; YAMAZAKI, K.; TSUNODA, T.; ZEMBUTSU, H.; NAKAMURA, Y.; KUBO, M. CYP2D6 genotyping for functional-gene dosage analysis by allele copy number detection. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 1546–1554, 2009.

HULDEN, L.; HULDEN, L. Activation of the hypnozoite: A part of Plasmodium vivax life cycle and survival. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 90, 2011.

IMWONG, M.; SNOUNOU, G.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; TANOMSING, N.; KIM, J. R.; NANDY, A.; GUTHMANN, J.; NOSTEN, F.; CARLTON, J.; LOOAREESUWAN, S.; NAIR, S.; SUDIMACK, D.; DAY, N. P. J.; ANDERSON, T. J. C.; WHITE, N. J. Relapses of *Plasmodium vivax* Infection Usually Result from Activation of Heterologous Hypnozoites. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 7, p. 927–933, 2007.

INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): Clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. **Pharmacogenomics**. v. 5, n. 1, p. 6–13, 2005. a.

INGELMAN-SUNDBERG, M. The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, n. 2 Suppl., p. 52–56, 2005. b.

ISHIGURO, A.; KUBOTA, T.; ISHIKAWA, H.; IGA, T. Metabolic activity of

dextromethorphan O-demethylation in healthy Japanese volunteers carrying duplicated CYP2D6 genes: Duplicated allele of CYP2D6*10 does not increase CYP2D6 metabolic activity. **Clinica Chimica Acta**, v. 344, n. 1–2, p. 201–204, 2004.

JOAN INGRAM, R. H.; CRENNAN-DARUSALLAM, C.; SOEBIANTO, S.; NOVIYANTI, R.; KEVIN BAIRD, J. 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.

JOHN, G. K.; DOUGLAS, N. M.; SEIDLEIN, L.; NOSTEN, F.; BAIRD, J. K.; WHITE, N. J. e PRICE, R. N. Primaquine radical cure of Plasmodium vivax: a critical review of the literature. **Malaria Journal Reviews**, v. 11, n. 280, p. 1–11, 2012.

KAIN, K.C. Chemotherapy of the drug-resistant malaria. **Annual Review Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 307–324, 1995.

KANO, F. S.; SANCHEZ, B. A. M.; SOUSA, T. N.; TANG, M. L.; SALIBA, J.; OLIVEIRA, F. M.; NOGUEIRA, P. A.; GONÇALVES, A. Q.; FONTES, C. J. F.; SOARES, I. S.; BRITO, C. F. A.; ROCHA, R. S.; CARVALHO, L. H. Plasmodium vivax Duffy binding protein: Baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. **Tropical Medicine and International Health**, v. 17, n. 8, p. 989–1000, 2012.

KANO, F. S.; DE SOUZA, A. M.; DE MENEZES TORRES, L.; COSTA, M. A.; SOUZA-SILVA, F. A.; SANCHEZ, B. A. M.; FONTES, C. J. F.; SOARES, I. S.; DE BRITO, C. F. A.; CARVALHO, L. H.; SOUSA, T. N. Susceptibility to Plasmodium vivax malaria associated with DARC (Duffy antigen) polymorphisms is influenced by the time of exposure to malaria. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.

KERB, R.; FUX, R.; MÖRIKE, K.; KREMSNER, P. G.; GIL, J. P.; GLEITER, C. H.; SCHWAB, M. Pharmacogenetics of antimalarial drugs: effect on metabolism and transport. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 12, p. 760–74, 2009.

KEVIN BAIRD, J. Evidence and implications of mortality associated with acute plasmodium vivax malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 36–57, 2013.

KHANTIKUL, N.; BUTRAPORN, P.; KIM, H. S.; LEEMINGSAWAT, S.; TEMPONGKO, M. S. B.; SUWONKERD, W. Adherence to Antimalarial Drug Therapy among Vivax Malaria Patients in Northern Thailand. **Journal of Health, Population and Nutrition**, v. 27, n. 1, p. 4–13, 2009.

KIM, J.-R.; NANDY, A.; MAJI, A. K.; ADDY, M.; DONDORP, A. M.; DAY, N. P. J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; WHITE, N. J.; IMWONG, M. Genotyping of Plasmodium vivax Reveals Both Short and Long Latency Relapse Patterns in Kolkata. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e39645, 2012.

KOHLRAUSCH, F. B.; GAMA, C. S.; LOBATO, M. I.; BELMONTE-DE-ABREU, P.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; GESTEIRA, A.; BARROS, F.; CARRACEDO, Á.; HUTZ, M. H. Naturalistic pharmacogenetic study of treatment resistance to typical neuroleptics in European–Brazilian schizophrenics. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 18, n. 7, p. 599–

609, 2008.

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, n. 1, p. 1–11, 1985.

LACERDA, M. V. G.; LLANOS-CUENTAS, A.; KRUDSOOD, S.; LON, C.; SAUNDERS, D. L.; MOHAMMED, R.; YILMA, D.; BATISTA PEREIRA, D.; ESPINO, F. E. J.; MIA, R. Z.; CHUQUIYAURI, R.; VAL, F.; CASAPÍA, M.; MONTEIRO, W. M.; BRITO, M. A. M.; COSTA, M. R. F.; BUATHONG, N.; NOEDL, H.; DIRO, E.; GETIE, S.; WUBIE, K. M.; ABDISSA, A.; ZEYNUDIN, A.; ABEBE, C.; TADA, M. S.; BRAND, F.; BECK, H.-P.; ANGUS, B.; DUPARC, S.; KLEIM, J.-P.; KELLAM, L. M.; ROUSELL, V. M.; JONES, S. W.; HARDAKER, E.; MOHAMED, K.; CLOVER, D. D.; FLETCHER, K.; BRETON, J. J.; UGWUEGBULAM, C. O.; GREEN, J. A.; KOH, G. C. K. W. Single-Dose Tafenoquine to Prevent Relapse of Plasmodium vivax Malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 3, p. 215–228, 2019.

LADEIA-ANDRADE, S.; MENEZES, M. J.; SOUSA, T. N.; SILVINO, A. C. R.; JUNIOR, J. F. de C.; SALLA, L. C.; NERY, O. A.; MELO, G. N. P. De; CORDER, R. M.; RODRIGUES, P. T.; FERREIRA, M. U. Monitoring the Efficacy of Chloroquine-Primaquine Therapy for Uncomplicated Plasmodium vivax Malaria in the Main Transmission Hotspot of Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 5, p. e01965-18, 2019.

LAPORTA, G. Z.; LINTON, Y.; WILKERSON, R. C.; BERGO, E. S.; NAGAKI, S. S.; CRISTINA, D. S.; SALLUM, M. A. M. Malaria vectors in South America : current and future scenarios. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 426, p. 1–13, 2015.

LAPOUBLE, O. M. M.; SANTELLI, A. C. F. S.; MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I. Situação epidemiológica da malária na região amazônica brasileira , 2003 a 2012. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 38, n. 4, p. 300–306, 2015.

LIMA, I. D. S. F.; LAPOUBLE, O. M. M.; DUARTE, E. C. Time trends and changes in the distribution of malaria cases in the Brazilian amazon region, 2004-2013. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 1, p. 8–18, 2017.

LINS, T. C.; VIEIRA, R. G.; ABREU, B. S.; GRATTAPAGLIA, D.; PEREIRA, R. W. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty eight ancestry informative SNPs. **American Journal of Human Biology**, v. 22, n. 2, p. 187–192, 2010.

LLANOS-CUENTAS, A.; LACERDA, M. V. G.; HIEN, T. T.; VÉLEZ, I. D.; NAMAIK-LARP, C.; CHU, C. S.; VILLEGAS, M. F.; VAL, F.; MONTEIRO, W. M.; BRITO, M. A. M.; COSTA, M. R. F.; CHUQUIYAURI, R.; CASAPÍA, M.; NGUYEN, C. H.; ARUACHAN, S.; PAPWIJITSIL, R.; NOSTEN, F. H.; BANCONE, G.; ANGUS, B.; DUPARC, S.; CRAIG, G.; ROUSELL, V. M.; JONES, S. W.; HARDAKER, E.; CLOVER, D. D.; KENDALL, L.; MOHAMED, K.; KOH, G. C. K. W.; WILCHES, V. M.; BRETON, J. J.; GREEN, J. A. Tafenoquine versus Primaquine to Prevent Relapse of Plasmodium vivax Malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 3, p. 229–241, 2019.

LLANOS-CUENTAS, A.; LACERDA, M. V.; RUEANGWEERAYUT, R.; KRUDSOOD, S.; GUPTA, S. K.; KOCHAR, S. K.; ARTHUR, P.; CHUENCHOM, N.; MÖHRLE, J. J.;

DUPARC, S.; UGWUEGBULAM, C.; KLEIM, J. P.; CARTER, N.; GREEN, J. A.; KELLAM, L. Tafenoquine plus chloroquine for the treatment and relapse prevention of *Plasmodium vivax* malaria (DETECTIVE): A multicentre, double-blind, randomised, phase 2b dose-selection study. **The Lancet**, v. 383, n. 9922, p. 1049–1058, 2014.

LLERENA, A.; NARANJO, M. E. G.; RODRIGUES-SOARES, F.; PENAS-LLEDÓ, E. M.; FARIÑAS, H.; TARAZONA-SANTOS, E. Interethnic variability of *CYP2D6* alleles and of predicted and measured metabolic phenotypes across world populations. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 10, n. 11, p. 1569–1583, 2014.

LO, E.; HEMMING-SCHROEDER, E.; YEWHALAW, D.; NGUYEN, J.; KEBEDE, E.; ZEMENE, E.; GETACHEW, S.; TUSHUNE, K.; ZHONG, D.; ZHOU, G.; PETROS, B.; YAN, G. Transmission dynamics of co-endemic *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* in Ethiopia and prevalence of antimalarial resistant genotypes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–25, 2017.

LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N. J.; BUNNAG, D.; CHITTAMAS, S.; HARINASUTA, T. High Rate of *Plasmodium Vivax* Relapse Following Treatment of *Falciparum* Malaria in Thailand. **The Lancet**, v. 330, n. 8567, p. 1052–1055, 1987.

LOOAREESUWAN, S.; WILAIRATANA, P.; GLANARONGRAN, R.; A, K.; SUPEERANONTHA, L.; CHINNAPHA, S. Atovaquone and proguanil hydrochloride followed by primaquine for treatment of *Plasmodium vivax* malaria in Thailand. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p. 637–640, 1999.

LUXEMBURGER, C.; VAN VUGT, M.; JONATHAN, S.; MCGREADY, R.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N. J.; NOSTEN, F. Treatment of *vivax* malaria on the western border of Thailand. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 4, p. 433–438, 1999.

LUZZATTO, L.; SENECA, E. G6PD deficiency: a classic example of pharmacogenetics with on-going clinical implications. **British Journal of Haematology**, v. 164, n. 4, p. 469–480, 2014.

MARCH, S.; NG, S.; VELMURUGAN, S.; GALSTIAN, A.; LOGAN, D.; CARPENTER, A.; THOMAS, D.; SIM, B. K. L.; MOTA, M. M.; HOFFMAN, S. L.; BHATIA, S. N. A microscale human liver platform that supports the hepatic stages of *Plasmodium falciparum* and *vivax*. **Cell Host Microbe**, v. 14, n. 1, p. 104–115, 2013.

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, n. 1, p. 1–10, 2016.

MARKUS, M. B. The hypnozoite concept, with particular reference to malaria. **Parasitology Research**, v. 108, n. 1, p. 247–252, 2011.

MARQUES, M. M. *et al.* *Plasmodium vivax* Chloroquine Resistance and Anemia in the Western Brazilian Amazon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 342–347, 2014.

- MAYOR, A.; ALANO, P. Bone marrow reticulocytes: a Plasmodium vivax affair?. **Blood**, v. 125, n. 8, p. 1203–1206, 2019.
- MAZIER, D.; LANDAU, I.; DRUILHE, P.; MILTGEN, F.; GUGUEN-GUILLOUZO, C.; BACCAM, D.; BAXTER, J.; CHIGOT, J. P.; GENTILINI, M. Cultivation of the liver forms of plasmodium vivax in human hepatocytes. **Nature**, v. 307, p. 367–379, 1984.
- MIHALY, G.; WARD, S.; EDWARDS, G.; NICHOLL, D.; ORME, M.; BRECKENRIDGE, A. 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.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano de intensificação das ações de controle da malária na Amazônia Legal. p. 250, 2003.
- MORENO, M.; TONG-RIOS, C.; ORJUELA-SANCHEZ, P.; CARRASCO-ESCOBAR, G.; CAMPO, B.; GAMBOA, D.; WINZELER, E. A.; VINETZ, J. M. Continuous Supply of Plasmodium vivax Sporozoites from Colonized Anopheles darlingi in the Peruvian Amazon. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 541–548, 2018.
- MOST, H.; LONDON, I.; KANE, C.; LAVIETES, P.; EF, S.; JUNIOR HAYMAN, J. Chloroquine for treatment of acute attacks of vivax malaria. **Journal of the American Medical Association**, v. 131, p. 963–7, 1946.
- MUCKLOW, J. C. Adverse drug reactions. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 52, n. 4, p. 461–464, 2001.
- MUELLER, I.; GALINSKI, M. R.; BAIRD, J. K.; CARLTON, J. M.; KOCHAR, D. K.; ALONSO, P. L.; DEL PORTILLO, H. A. 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.
- MYINT, H. Y.; BERMAN, J.; WALKER, L.; PYBUS, B.; MELENDEZ, V.; BAIRD, J. K. e OHRT, C. Improving the Therapeutic Index of 8-Aminoquinolines by the Use of Drug Combinations: Review of the Literature and Proposal for Future Investigations. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n.6, p.1010–1014, 2011.
- NARANJO, M.-E. G.; RODRIGUES-SOARES, F.; PEÑAS-LLEDÓ, E. M.; TARAZONA-SANTOS, E.; FARIÑAS, H.; RODEIRO, I.; TERÁN, E.; GRAZINA, M.; MOYA, G. E.; LÓPEZ-LÓPEZ, M.; SARMIENTO, A. P.; CALZADILLA, L. R.; RAMÍREZ-ROA, R.; ÓRTIZ-LOPEZ, R.; ESTÉVEZ-CARRIZO, F.E.; SOSA-MACÍAS, M.; BARRANTES, R.; LLERENA, A. CEIBA-CONSORTIUM OF THE IBERO-AMERICAN NETWORK OF PHARMACOGENETICS AND PHARMACOGENOMICS RIBEF. Interethnic Variability in CYP2D6, CYP2C9, and CYP2C19 Genes and Predicted Drug Metabolism Phenotypes Among 6060 Ibero- and Native Americans: RIBEF-CEIBA Consortium Report on Population Pharmacogenomics. **OMICS**, v. 22, n. 9, p. 575–588. 2018.
- NEGREIROS, S.; FARIAS, S.; VIANA, G. M. R.; OKOTH, S. A.; CHENET, S. M.; DE SOUZA, T. M. H.; MARCHESINI, P.; UDHAYAKUMAR, V.; POVOA, M. M.; SANTELLI, A. C. F. S.; DE OLIVEIRA, A. M. E. Efficacy of chloroquine and primaquine

for the treatment of uncomplicated plasmodium vivax malaria in Cruzeiro do Sul, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 5, p. 1061–1068, 2016.

NOGUEIRA, F. H. A.; MOREIRA-CAMPOS, L. M. M.; DOS SANTOS, R. L. C.; PIANETTI, G. A. Quality of essential drugs in tropical countries: evaluation of antimalarial drugs in the Brazilian Health System. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 582–586, 2011.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. B.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, n. 115, p. 1–15, 2010.

OLSON, D. M.; DINERSTEIN, E.; WIKRAMANAYAKE, E. D.; BURGESS, N. D.; POWELL, G. V. N.; UNDERWOOD, E. C.; AMICO, J. A. D.; ITOUA, I.; STRAND, H. E.; MORRISON, J. C.; LOUCKS, J.; ALLNUTT, T. F.; RICKETTS, T. H.; KURA, Y.; LAMOREUX, J. F.; WESLEY, W.; HEDAO, P.; KASSEM, K. R. Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth. **BioScience**, v. 51, n. 11, p. 933–938, 2001.

ORJUELA-SÁNCHEZ, P.; DA SILVA, N. S.; DA SILVA-NUNES, M.; FERREIRA, M. U. Recurrent parasitemias and population dynamics of Plasmodium vivax polymorphisms in rural Amazonia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 6, p. 961–968, 2009.

ORTIZ-LÓPEZ, R.; ESTÉVEZ-CARRIZO, F. E.; SOSA-MACÍAS, M.; BARRANTES, R.; LLERENA, A. Interethnic Variability in *CYP2D6*, *CYP2C9*, and *CYP2C19* Genes and Predicted Drug Metabolism Phenotypes Among 6060 Ibero- and Native Americans: RIBEF-CEIBA Consortium Report on Population Pharmacogenomics. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 22, n. 9, p. omi.2018.0114, 2018.

OSCARSON, M.; HIDESTRAND, M.; JOHANSSON, I.; INGELMAN-SUNDBERG, M. A combination of mutations in the CYP2D6*17 (CYP2D6Z) allele causes alterations in enzyme function. **Molecular pharmacology**, v. 52, n. 6, p. 1034–1040, 1997.

PAN, X.; NING, M.; JEONG, H. Transcriptional regulation of CYP2D6 expression. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 45, n. 1, p. 42–48, 2017.

PENA, S. D. J.; BASTOS-RODRIGUES, L.; PIMENTA, J. R.; BYDLOWSKI, S. P. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 10, p. 870–876, 2009.

PENA, S. D. J.; DI PIETRO, G.; FUCHSHUBER-MORAES, M.; GENRO, J. P.; HUTZ, M. H.; KEHDY, F. de S. G.; KOHLRAUSCH, F.; MAGNO, L. A. V.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O.; DE MORAES, M. E. A.; DE MORAES, M. R.; OJOPI, É. B.; PERINI, J. A.; RACCIOPPI, C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â. K. C.; RIOS-SANTOS, F.; ROMANO-SILVA, M. A.; SORTICA, V. A.; SUAREZ-KURTZ, G. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011.

PEREIRA, E. A.; ISHIKAWA, E. A.; FONTES, C. J. Adherence to Plasmodium vivax malaria treatment in the Brazilian Amazon Region. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 355,

2011. a.

PEREIRA, E. A.; ISHIKAWA, E. A.; FONTES, C. J. Adherence to Plasmodium vivax malaria treatment in the Brazilian Amazon Region. **Malaria Journal**, v. 10, p.355, p. 2–7, 2011. b.

PIRES, C. V.; ALVES, J. R. S.; LIMA, B. A. S.; PAULA, R. B.; COSTA, H. L.; TORRES, L. M.; SOUSA, T. N.; SOARES, I. S.; SANCHEZ, B. A. M.; FONTES, C. J. F.; NTUMNGIA, F. B.; ADAMS, J. H.; KANO, F. S.; CARVALHO, L. H. Blood-stage Plasmodium vivax antibody dynamics in a low transmission setting: A nine year follow-up study in the Amazon region. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0207244, 2018.

POPOVICI, J.; PIERCE-FRIEDRICH, L.; KIM, S.; BIN, S.; RUN, V.; LEK, D.; HEE, K. H. D.; LEE SOON-U, L.; CANNON, M. V; SERRE, D.; MENARD, D. Recrudescence, Reinfection, or Relapse? A More Rigorous Framework to Assess Chloroquine Efficacy for Plasmodium vivax Malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, , v. 219, n. 2, p. 315–322, 2018.

POTTER, B. M. J.; XIE, L. H.; VUONG, C.; ZHANG, J.; ZHANG, P.; DUAN, D.; LUONG, T.-L. T.; BANDARA HERATH, H. M. T.; DHAMMIKA NANAYAKKARA, N. P.; TEKWANI, B. L.; WALKER, L. A.; NOLAN, C. K.; SCIOTTI, R. J.; ZOTTIG, V. E.; SMITH, P. L.; PARIS, R. M.; READ, L. T.; LI, Q.; PYBUS, B. S.; SOUSA, J. C.; REICHARD, G. A.; MARCSISIN, S. R. Differential CYP 2D6 Metabolism Alters Primaquine Pharmacokinetics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 2380–2387, 2015. a.

POTTER, B. M. J.; XIE, L. H.; VUONG, C.; ZHANG, J.; ZHANG, P.; DUAN, D.; LUONG, T.-L. T.; BANDARA HERATH, H. M. T.; DHAMMIKA NANAYAKKARA, N. P.; TEKWANI, B. L.; WALKER, L. A.; NOLAN, C. K.; SCIOTTI, R. J.; ZOTTIG, V. E.; SMITH, P. L.; PARIS, R. M.; READ, L. T.; LI, Q.; PYBUS, B. S.; SOUSA, J. C.; REICHARD, G. A.; MARCSISIN, S. R. Differential CYP 2D6 Metabolism Alters Primaquine Pharmacokinetics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 2380–2387, 2015. b.

PROJEAN, D.; BAUNE, B.; FARINOTTI, R.; FLINOIS, J.-P.; BEAUNE, P.; TABURET, A.-M.; DUCHARME, J. in Vitro Metabolism of Chloroquine: Identification of Cyp2C8, Cyp3a4, and Cyp2D6 As the Main Isoforms Catalyzing N-Desethylchloroquine Formation. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, n. 6, p. 748–754, 2003.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; TARNING, J.; JITTAMALA, P.; CHARUNWATTHANA, P.; LAWPOOLSRI, S.; LEE, S. J.; HANPITHAKPONG, W.; HANBOONKUNUPAKARN, B.; DAY, N. P. J.; ASHLEY, E. A.; WHITE, N. J. Pharmacokinetic interactions between primaquine and chloroquine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 3354–3359, 2014.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; VANIJANONTA, S.; CHANTRA, A.; CLEMENS, R.; WHITE, N. J. Blood stage antimalarial efficacy of primaquine in Plasmodium vivax malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 169, n. 4, p. 932–935, 1994.

PYBUS, B. S.; SOUSA, J. C.; XIANNU JIN; JAMES A FERGUSON; ROBERT E

CHRISTIAN; REBECCA BARNHART; CHAU VUONG; RICHARD J SCIOTTI; GREGORY A REICHARD; MICHAEL P KOZAR; LARRY A WALKER; COLIN OHRT; VICTOR MELENDEZ. CYP450 phenotyping and accurate mass identification of metabolites of the 8-aminoquinoline, anti-malarial drug primaquine. **Malaria Journal**, v. 11, p. 259, 2012.

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

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

RAIMUNDO, S.; TOSCANO, C.; KLEIN, K.; FISCHER, J.; GRIESE, E. U.; EICHELBAUM, M.; SCHWAB, M.; ZANGER, U. M. A novel intronic mutation, 2988G>A, with high predictivity for impaired function of cytochrome P450 2D6 in white subjects. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 76, n. 2, p. 128–138, 2004.

RAJAPAKSE, S.; RODRIGO, C.; SD, F. Tafenoquine for preventing relapse in people with Plasmodium vivax malaria. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 29, n. 4, p. CD010458, 2015.

RECHT, J.; WHITE, N. J.; ASHLEY, E.; WORLD HEALTH ORGANIZATION; MAHIDOL OXFORD RESEARCH UNIT. Safety of 8-Aminoquinoline antimalarial medicines. **WHO Geneva**, v. 8, n. 3, p. 61–112, 2015.

RECHT, J.; SIQUEIRA, A. M.; MONTEIRO, W. M.; HERRERA, S. M.; HERRERA, S.; LACERDA, M. V. G. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela : current challenges in malaria control and elimination. **Malaria Journal**, v. 16, n. 273, p. 1–18, 2017.

RECHT, J.; ASHLEY, E. A.; WHITE, N. J. Use of primaquine and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency testing: Divergent policies and practices in malaria endemic countries. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 4, p. 1–27, 2018.

ROTH, A.; MAHER, S. P.; CONWAY, A. J.; UBALEE, R.; CHAUMEAU, V.; ANDOLINA, C.; KABA, S. A.; VANTAU, A.; BAKOWSKI, M. A.; LUQUE, R. T.; ADAPA, S. R.; SINGH, N.; BARNES, S. J.; COOPER, C. A.; ROUILLIER, M.; MCNAMARA, C. W.; MIKOLAJCZAK, S. A.; SATHER, N.; WITKOWSKI, B.; CAMPO, B.; KAPPE, S. H. I.; LANAR, D. E.; NOSTEN, F.; DAVIDSON, S.; JIANG, R. H. Y.; KYLE, D. E.; ADAMS, J. H. A comprehensive model for assessment of liver stage therapies targeting Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2018.

RUEANGWEERAYUT, R.; BANCONE, G.; HARRELL, E. J.; BEELEN, A. P.; KONGPATANAKUL, S.; MÖHRLE, J. J.; ROUSELL, V.; MOHAMED, K.; QURESHI, A.; NARAYAN, S.; YUBON, N.; MILLER, A.; NOSTEN, F. H.; LUZZATTO, L.; DUPARC, S.; KLEIM, J. P.; GREEN, J. A. Hemolytic potential of tafenoquine in female volunteers heterozygous for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficiency (G6PD Mahidol

Variant) versus G6PD-Normal volunteers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 702–711, 2017.

SABBAGH, A.; DARLU, P. Data-mining methods as useful tools for predicting individual drug response: Application to CYP2D6 data. **Human Heredity**, v. 62, n. 3, p. 119–34, 2006.

SANTOS, R. V.; FRY, P. H.; MONTEIRO, S.; MAIO, M. C.; RODRIGUES, J. C.; BASTOS-RODRIGUES, L.; PENA, S. D. J. Color, Race, and Genomic Ancestry in Brazil. **Current Anthropology**, v. 50, n. 6, p. 787–819, 2009.

SATTABONGKOT, J.; YIMAMNUAYCHOKE, N.; LEELAUDOMLIPI, S.; RASAMEESORAJ, M.; JENWITHISUK, R.; COLEMAN, R. E.; UDOMSANGPETCH, R.; CUI, L.; BREWER, T. G. Establishment of a human hepatocyte line that supports in vitro development of the exo-erythrocytic stages of the malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 5, p. 708–715, 2006.

SHANKS, G. D. Control and Elimination of *Plasmodium vivax*. **Advances in Parasitology**, v. 80, n. 5, p. 301–341, 2012.

SHANKS, G. D.; WHITE, N. J. The activation of vivax malaria hypnozoites by infectious diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 10, p. 900–906, 2013.

SHARMA, A.; KHANDURI, U. How benign is benign tertian malaria? **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 46, n. 2, p. 141–144, 2009.

SHIRAISHI, T.; HOSOKAWA, M.; KOBAYASHI, K.; TAINAKA, H.; YAMAURA, Y.; TAGUCHI, M.; CHIBA, K. Effects of G169R and P34S substitutions produced by mutations of CYP2D6*14 On the functional properties of CYP2D6 expressed in V79 cells. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 11, p. 1201–1205, 2002.

SHORTT, H.; GARNHAM, P. Demonstration of persisting exo-erythrocytic cycle in *Plasmodium cynomolgi* and its bearing on the production of relapses. **British Medical Journal**, v. 1, n. 4564, p. 1225–8, 1948.

SHORTT, H.; GARNHAM, P. C. C.; COVELL, G.; SHUTE, P. The pre-erythrocytic stage of human malaria, *Plasmodium vivax*. **British Medical Journal**, v. 1, n. 4550, p. 547, 1948.

SILVINO, A. C. R.; COSTA, G. L.; DE ARAÚJO, F. C. F.; ASCHER, D. B.; PIRES, D. E. V.; FONTES, C. J. F.; CARVALHO, L. H.; DE BRITO, C. F. A.; SOUSA, T. N. 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.

SIMÕES, L. R.; ALVES JR, E. R.; RIBATSKI-SILVA, D.; GOMES, L. T.; NERY, A. F.; FONTES, C. J. F. Factors associated with recurrent *Plasmodium vivax* malaria in Porto Velho, Rondônia State, Brazil, 2009. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1–15, 2014.

SIQUEIRA, A. M.; MESONES-LAPOUBLE, O.; MARCHESINI, P.; SAMPAIO, V. D. S.; BRASIL, P.; TAUIL, P. L.; FONTES, C. J.; COSTA, F. T. M.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; LACERDA, M. V. G.; DAMASCENO, C. P.; SANTELLI, A. C. S. *Plasmodium vivax*

Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. Suppl 6, p. 87–96, 2016.

SISTONEN, J.; SAJANTILA, A.; LAO, O.; CORANDER, J.; BARBUJANI, G.; FUSELLI, S. CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 17, n. 2, p. 93–101, 2007.

SISTONEN, J.; FUSELLI, S.; PALO, J. U.; CHAUHAN, N.; PADH, H.; SAJANTILA, A. Pharmacogenetic variation at CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 at global and microgeographic scales. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 19, n. 2, p. 170–179, 2009.

SORTICA, V.A., OJOPI, E.B., GENRO, J.P., CALLEGARI-JACQUES, S., RIBEIRO-DOS-SANTOS, A., et al. Influence of genomic ancestry on the distribution of SLCO1B1, SLCO1B3 and ABCB1 gene polymorphisms among Brazilians. **Basic and Clinical Pharmacology Toxicology**, v. 110, p. 460–468, 2012.

SUAREZ-KURTZ, G., VARGENS, D.D., SANTORO, A.B., HUTZ, M.H., DE MORAES, M.E., et al. Global Pharmacogenomics: Distribution of CYP3A5 Polymorphisms and Phenotypes in the Brazilian Population. **PLoS ONE**, v. 9, p. e83472, 2014.

SOUZA-SILVA, F. A.; TORRES, L. M.; SANTOS-ALVES, J. R.; TANG, M. L.; SANCHEZ, B. A. M.; SOUSA, T. N.; NOGUEIRA, P. A.; ROCHA, R. S.; BRITO, C. F. A.; ADAMS, J. H.; KANO, F. S.; CARVALHO, L. H. Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC) Polymorphisms and Its Involvement in Acquisition of Inhibitory Anti-Duffy Binding Protein II (DBPII) Immunity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93782, 2014.

SUTANTO, I.; TIAHJONO, B.; BASRI, H.; ROBERT TAYLOR, W.; PUTRI, F. A.; MEILIA, R. A.; SETIABUDY, R.; NURLEILA, S.; EKAWATI, L. L.; ELYAZAR, I.; FARRAR, J.; SUDOYO, H.; KEVIN BAIRD, J. Randomized, open-label trial of primaquine against vivax malaria relapse in indonesia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 1128–1135, 2013.

SCHWARTZ, E.; REGEV-YOCHAY, G. e KURNIK, D. Short Report: A Consideration of Primaquine Dose Adjustment for Radical Cure of Plasmodium Vivax Malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n.3, p. 393–395, 2000.

TUTTON, R. Pharmacogenomic biomarkers in drug labels: What do they tell us? **Pharmacogenomics**, v. 15, n. 3, p. 297–304, 2014.

VARELA, N.; QUIÑONES, L. A.; STOJANOVA, J.; GARAY, J.; CÁCERES, D.; CESPEDES, S.; SASSO, J.; MIRANDA, C. Characterization of the CYP2D6 drug metabolizing phenotypes of the Chilean mestizo population through polymorphism analyses. **Pharmacological Research**, v. 101, p. 124–129, 2015.

VITOR-SILVA, S.; SIQUEIRA, A. M.; DE SOUZA SAMPAIO, V.; GUINOVART, C.; REYES-LECCA, R. C.; DE MELO, G. C.; MONTEIRO, W. M.; DEL PORTILLO, H. A.; ALONSO, P.; BASSAT, Q.; LACERDA, M. V. G. Declining malaria transmission in rural Amazon: Changing epidemiology and challenges to achieve elimination. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2016.

- WANG, D.; PAPP, A. C.; SUN, X. Functional characterization of CYP2D6 enhancer polymorphisms. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. 6, p. 1556–1562, 2015.
- WANG, D.; POI, M. J.; SUN, X.; GAEDIGK, A.; LEEDER, J. S.; SADEE, W. Common CYP2D6 polymorphisms affecting alternative splicing and transcription: Long-range haplotypes with two regulatory variants modulate CYP2D6 activity. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 1, p. 268–278, 2014.
- WELLS, T. N. C.; BURROWS, J. N.; BAIRD, J. K. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 3, p. 145–51, 2010.
- WHITE, N. Chloroquine treatment of severe malaria in children: pharmacokinetics, toxicity, and new dosage recommendations. **The New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 23, p. 1493–500, 1988.
- WHITE, N. J. et al. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 297, 2011.
- WHITE, N. J. Malaria parasite clearance. **Malaria Journal**, v. 16, n. 88, p. 1–14, 2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2016**. 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2017**. 2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2018**. 2018.
- YÉPEZ, M. C., ZAMBRANO, D., CARRASCO, F., & YÉPEZ, R. F. Factores asociados con el incumplimiento del tratamiento antipalúdico en pacientes ecuatorianos. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 52, n. 2, p. 81–89, 2000.
- ZANGER, U. M.; RAIMUNDO, S.; EICHELBAUM, M. Cytochrome P450 2D6: Overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 369, n. 1, p. 23–37, 2004.
- ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 138, n. 1, p. 103–141, 2013.
- ZEEMAN, A.; AMSTERDAM, S. M. Van; MCNAMARA, C. W.; WEL, A. V. Der; KLOOSTER, E. J.; KOCKEN, C. H. M. KAI407, a Potent Non-8-Aminoquinoline Compound That Kills *Plasmodium cynomolgi* Early Dormant Liver Stage Parasites In Vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1586–1595, 2014.
- ZHOU, S.-F. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 48, n. 11, p. 689–723, 2009.