

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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS RECIDIVAS DE *Plasmodium vivax* APÓS
TRATAMENTO COM ACT: estudo de polimorfismos relacionados à resistência do
parasito e metabolismo alterado de CYP2D6**

Por

Danielle Fonseca Rodrigues

Belo Horizonte

2020

DISSERTAÇÃO

MCS – IRR D. F. RODRIGUES

2020

DANIELLE FONSECA RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS RECIDIVAS DE *Plasmodium vivax* APÓS
TRATAMENTO COM ACT: estudo de polimorfismos relacionados à resistência do
parasito e metabolismo alterado de CYP2D6**

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

Orientação: Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito

Coorientação: Dra. Taís Nóbrega de Sousa

Belo Horizonte

2020

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

R696c
2020

Rodrigues, Danielle Fonseca.

Caracterização molecular das recidivas de *Plasmodium vivax* após tratamento com ACT: Estudo de polimorfismos relacionados à resistência do parasito e metabolismo alterado de CYP2D6 / Danielle Fonseca Rodrigues. – Belo Horizonte, 2020.

X, 92 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 71 – 78

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

1. *Plasmodium vivax*/efeitos de fármacos 2. Condutas Terapêuticas/métodos 3. Genes/imunologia 4. Falha terapêutica 5. CYP2D6 I. Título. II. Brito, Cristiana Ferreira Alves de (Orientação). III. Sousa, Taís Nóbrega, (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

DANIELLE FONSECA RODRIGUES

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS RECIDIVAS DE *Plasmodium vivax* APÓS TRATAMENTO COM ACT: estudo de polimorfismos relacionados à resistência do parasito e metabolismo alterado de CYP2D6

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

Banca Examinadora:

Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito	Instituto René Rachou (Presidente)
Dra. Anna Caroline Campos Aguiar	Universidade de São Paulo (Titular)
Dr. Pedro Augusto Alves	Instituto René Rachou (Titular)
Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva	Instituto René Rachou (Suplente)

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 18/05/2020

AGRADECIMENTOS

A realização dessa pesquisa e a finalização desta dissertação não teria sido possível sem a participação de algumas pessoas que compartilharam esses momentos comigo:

À Cristiana Brito, que confiou a mim esse projeto e me guiou durante esses dois anos pelo mundo da ciência em malária, e à Taís Nóbrega, que foi sempre solícita e contribuiu enormemente para as discussões. Às demais pesquisadoras do grupo, Luzia Carvalho e Flora Kano, por todo apoio não só a mim, mas aos estudantes de maneira geral. À toda essa equipe, obrigada pela generosidade, críticas e conselhos.

A todo o corpo docente do IRR, por proporcionarem discussões imprescindíveis para construção da minha criticidade.

Aos colegas e amigos do BMIM. “Estamos aqui uns pelos outros” e vocês estiveram sempre comigo. Luiz Guimarães, Gabriela Assis, Ana Carolina, Michelle Hallais, Carol Puça, Jéssica Rafaela, Denise Alvarenga, Bárbara Andreza, Daniela Robortella, Daniel Guimarães, Mika, Letícia Torres, Camilla Valente, Camila Pantuzzo, Gabriel Costa, Helena, Giovana, Matheus e todos os tantos ICs incríveis que passaram pelo grupo... Andei muito melhor com vocês. Obrigada por tudo!

Aos meus pais Evanilda Fonseca e Antônio Rodrigues e meu irmão Douglas Eric, pelo carinho e por me apoiarem sempre. Vocês são gigantes.

A Jéssica Maciel, por tantas coisas, inclusive por me apresentar seu próprio grupo de pesquisa e me ajudar a identificar as aparências, falácias e desonestidades do mundo. E a Camila Alvarenga, pela amizade mesmo longe na maior parte das vezes.

Aos colaboradores deste trabalho, em especial ao Dr. André Daher e a Rosilene Ruffato, pela disponibilidade e envio das amostras.

À plataforma de PCR em Tempo Real e de Sequenciamento e seus profissionais (Pedro, Viviane, Renata e Ana Salim), pelo fornecimento da infraestrutura e por estarem sempre solícitos a qualquer dúvida que possamos ter. Sem esse apoio nossos projetos não se desenvolveriam tão bem.

Às agências de fomento, pelo apoio financeiro. Em especial, à FAPEMIG pelo financiamento da minha bolsa de mestrado e às demais agências CNPq e FIOCRUZ, pela infraestrutura e demais recursos não só do meu projeto, imprescindíveis para construção da ciência brasileira.

RESUMO

Cloroquina (CQ) e primaquina (PQ) permanecem há décadas como o esquema terapêutico recomendado para tratamento radical de infecções por *P. vivax*, visto que PQ é a única droga comercialmente disponível para atuar contra os hipnozoítos, prevenindo as recaídas. Relatos de falha terapêutica após tratamento com CQ e PQ têm levantado questionamentos a respeito da eficácia desse regime, levando o Ministério da Saúde a uma nova recomendação: terapias combinadas com derivados de artemisinina (ACT) em associação com a PQ. As falhas terapêuticas têm sido associadas tanto a fatores genéticos do hospedeiro, como polimorfismos em CYP2D6 (importante enzima para biotransformação da PQ), quanto a fatores do parasito, como polimorfismos relacionados à redução da suscetibilidade ao tratamento. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se polimorfismos genéticos em CYP2D6 e nos genes *pvcrt-o* e *pvmdr-1* (ortólogos de genes de *Plasmodium falciparum* associados à resistência aos antimaláricos) influenciaram a recidiva de indivíduos tratados com diferentes esquemas de antimaláricos. Pacientes recrutados entre 2012 e 2015 para participarem de um estudo de segurança e eficácia de diferentes esquemas terapêuticos realizado em Manaus/AM e Porto Velho/RO foram randomizados em três grupos de tratamento: CQ+PQ; Artesunato, Mefloquina e PQ (AM+PQ); e Arteméter, Lumefantrina e PQ (AL+PQ). Entre 264 pacientes randomizados que atenderam aos critérios de inclusão, 35 apresentaram recidiva (8 em Manaus e 27 em Porto Velho) durante um período de acompanhamento de 63 dias, sendo 10 do grupo CQ+PQ, 12 em AM+PQ e 13 em AL+PQ. Todos os 35 pacientes foram incluídos nas nossas análises. Durante os anos de recrutamento, os municípios em questão foram avaliados como baixo (Manaus) e médio risco de infecção (Porto Velho), sugerindo baixa probabilidade de reinfeção durante o período de acompanhamento. O tempo de recidiva clínica foi similar entre os grupos de tratamento (mediana de 49 dias em CQ+PQ, 56 dias em AL+PQ e 58 dias em AM+PQ, $p\text{-value} = 0,495$). Dez entre 27 pacientes testados apresentaram DNA de *P. vivax* detectável por PCR em tempo real antes do reaparecimento dos sintomas (3 em 9 do grupo CQ+PQ, 4 em 8 tratados em AM+PQ e 3 em 10 tratados com AL+PQ). Episódios de recrudescência (recidiva até 42 dias) foram identificadas em 6 episódios (60%) no grupo CQ+PQ e 4 (33%) no grupo AM+PQ. Em média, 85% das recidivas sintomáticas em todos os grupos de tratamento foram classificadas como idênticas ou similares à infecção inicial, o que diverge dos dados da literatura que apontam elevada frequência de recaídas heterólogas em indivíduos de área endêmica. Além disso, infecções múltiplas foram mais frequentes entre os episódios de recidiva (40% vs 17% das infecções iniciais, $p\text{-value} = 0,013$), corroborando trabalhos que demonstram alta diversidade genética das infecções. Nesse estudo, o fenótipo de CYP2D6 não influenciou o intervalo entre o episódio inicial e a recidiva dos pacientes, no entanto, de 9 indivíduos (25,7%) preditos como metabolizadores nulos/lentos, 6 foram tratados com AM+PQ, indicando que a mutação em CYP2D6 deve influenciar principalmente o tratamento com a combinação AM+PQ. Por fim, ampliações de número de cópias gênicas (CNV) de *pvmdr-1* e *pvcrt-o* não foram observadas, com exceção de um isolado de *P. vivax*, cuja amplificação de *pvcrt-o* foi observada na infecção inicial de paciente do grupo AM+PQ. Em suma, polimorfismos na CYP2D6 e sua implicação no tratamento com AM+PQ para *P. vivax*, que será administrado nos próximos anos no Brasil, merecem ser investigados. A elevada frequência de recidivas homólogas levanta a hipótese de uma resposta imune individual dos pacientes ineficaz na modulação da susceptibilidade dos parasitos presentes na infecção. Essas investigações precisam ser consideradas para monitoramento dos novos esquemas recomendados no Brasil, bem como de otimizações futuras que possam ser implementadas.

Palavras-chaves: *Plasmodium vivax*, ACT, genes de resistência, falha terapêutica, CYP2D6

ABSTRACT

Chloroquine (CQ) and primaquine (PQ) have remained for decades as the recommended therapeutic regimen for radical treatment of *P. vivax* infections, since PQ is the only commercially available drug to act against hypnozoites, preventing relapses. Reports of therapeutic failure after treatment with CQ and PQ raise questions about the efficacy of this regimen, leading the Brazilian Ministry of Health to a new recommendation: artemisinin-based combination therapies (ACT) with PQ. Therapeutic failures have been associated with both host genetic factors, such as polymorphisms in CYP2D6 (an important enzyme for PQ biotransformation), as well as parasite factors, such as polymorphisms related to reduced susceptibility to treatment. In this context, the aim of this study was to evaluate whether genetic polymorphisms in CYP2D6 and in *pvcrt-o* and *pvmdr-1* genes (*Plasmodium falciparum* orthologous genes related with antimalarials resistance) influenced the recurrence of individuals treated with different antimalarial regimens. Patients recruited between 2012 and 2015 to participate in a safety and efficacy study of different therapeutic regimens conducted in Manaus/AM and Porto Velho/RO were randomized into three treatment groups: CQ+PQ; Artesunate, Mefloquine and PQ (AM+PQ); and Artemether, Lumefantrine and PQ (AL+PQ). Among 264 randomized patients who met the inclusion criteria, 35 presented recurrence (8 in Manaus and 27 in Porto Velho) during a follow-up period of 63 days, 10 of the CQ+PQ group, 12 in AM+PQ and 13 in AL+PQ. All 35 patients were included in our analyses. During the recruitment years, the municipalities were evaluated as low (Manaus) and medium risk of infection (Porto Velho), suggesting low probability of reinfection during the follow-up period. The time of clinical recurrence was similar between the treatment groups (median of 49 days in CQ+PQ, 56 days in AL+PQ and 58 days in AM+PQ, p-value = 0.495). Among 27 patients from Porto Velho, ten of them had *P. vivax* DNA detectable by real-time PCR before the reappearance of symptoms (3 in 9 in the CQ+PQ group, 4 in 8 treated using AM+PQ and 3 in 10 treated with AL+PQ). Recrudescence episodes (relapse up to 42 days) were identified in 6 episodes (60%) in the CQ+PQ group and 4 (33%) in the AM+PQ group. On average, 85% of symptomatic recurrence in all treatment groups were classified as identical or similar to the initial infection, which differs from the literature data that indicate a high frequency of heterologous relapses in individuals from endemic areas. In addition, multiple infections were more frequent among recurrence episodes (40% vs. 17% of initial infections, p-value = 0.013), corroborating studies that demonstrate high genetic diversity of *P. vivax* infections. In this study, the CYP2D6 phenotype did not influence the interval between the initial episode and the recurrence of patients, however, among 9 patients (25.7%) predicted as null/slow metabolisers, 6 were treated with AM+PQ, indicating that the CYP2D6 mutation should mainly influence treatment with the AM+PQ. Finally, copy number variation (CNV) of *pvmdr-1* and *pvcrt-o* genes were not observed, except for an isolate of *P. vivax*, whose amplification of *pvcrt-o* was observed in the initial infection of a patient treated in AM+PQ group. In conclusion, polymorphisms in CYP2D6 and its implication in the treatment with AM+PQ for *P. vivax*, which will be administered in the coming years in Brazil, deserve to be investigated. The high frequency of homologous recurrences raises the hypothesis of an individual immune response of patients ineffective in modulating the susceptibility of parasites present in infection. These investigations need to be considered for monitoring the new schemes recommended in Brazil, as well as future optimizations that can be implemented.

Key-words: *Plasmodium vivax*, ACT, resistance genes, therapeutic failure, CYP2D6

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Incidência de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> em 2017	12
FIGURA 2. Casos de malária notificados entre 1959 e 2018	14
FIGURA 3. Risco de malária por município de infecção, Brasil, 2018	15
FIGURA 4. Ciclo biológico de <i>P. vivax</i>	16
FIGURA 5. Principais produtos de PQ pelas vias metabólicas de MAO-A e CYP2D6.....	20
FIGURA 6. Representação esquemática do mecanismo de ação da primaquina.....	21
FIGURA 7. Esquema dos principais alvos e mecanismos de resistência aos antimaláricos mediados por <i>pvm-dr-1</i> e <i>pvcr-t-o</i>	26
FIGURA 8. Curva Kapla-Meier para o efeito do tratamento antimalárico no tempo de recidiva da infecção por <i>P. vivax</i>	44
FIGURA 9. Representação esquemática dos intervalos entre as recidivas submicroscópicas assintomáticas e clínicas	45
FIGURA 10. Proporções de recrudescências e recaídas identificadas considerando os critérios de 28 e 42 dias por grupo de tratamento.....	47
FIGURA 11. Frequência de parasitos idênticos, similares e heterólogos nos diferentes grupos de tratamento	49
FIGURA 12. Caracterização molecular dos parasitos das recidivas clínicas classificadas enquanto recrudescência.....	50
FIGURA 13. Frequência de variantes de <i>P. vivax</i> por episódio de infecção clínica.....	51
FIGURA 14. Frequência de alelos de <i>CYP2D6</i> por grupo de tratamento.....	54
FIGURA 15. Frequência de fenótipos normais e reduzidos de <i>CYP2D6</i> nas recaídas ≥ 28 dias por grupo de tratamento.....	55
FIGURA 16. Frequência de recidivas por parasitos idênticos, similares e heterólogos à infecção primária em relação ao fenótipo predito de <i>CYP2D6</i>	56
FIGURA 17. Variação do número de cópias de <i>pvm-dr-1</i> nos isolados de infecção primária e recidiva clínica.....	58
FIGURA 18. Variação do número de cópias de <i>pvcr-t-o</i> de isolados de infecção primária e recidiva clínica.....	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Esquemas de tratamento utilizados no estudo clínico	31
TABELA 2. Características dos microssatélites de <i>P. vivax</i> utilizados no estudo.....	34
TABELA 3. Iniciadores e condições de amplificação dos microssatélites e blocos polimórficos de MSP-1 de <i>P. vivax</i>	36
TABELA 4. Haplótipos de CYP2D6 preditos por comparação aos disponíveis no banco de dados <i>PharmVar</i>	39
TABELA 5. Sistema de Pontuação de Atividade de CYP2D6 (<i>Activity Score System</i>)	40
TABELA 6. Sequência de iniciadores senso e anti-senso para protocolo de qPCR CNV <i>pvm-dr-1</i> e <i>pvcrt-o</i>	41
TABELA 7. Características dos pacientes incluídos no estudo de avaliação de eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados de artemisinina para malária não complicada causada por <i>P. vivax</i> (recidiva vs. sem recidiva).....	43
TABELA 8. Características dos microssatélites identificados: tamanho dos fragmentos, frequência alélica, total de alelos e heterozigosidade esperada (H_E).....	48
TABELA 9. Frequência de recidivas idênticas, similares ou heterólogas em relação à infecção primária por grupo de tratamento	49
TABELA 10. Frequência genotípica e alélica de <i>CYP2D6</i> , % (nº de indivíduos).....	52
TABELA 11. Frequência genotípica e alélica de <i>CYP2C8</i> , % (n).....	53
TABELA 12. Frequência de alelos de <i>CYP2D6</i> observados nos 35 indivíduos que apresentaram recidiva clínica após tratamento com diferentes esquemas de antimaláricos	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACT – Terapias combinadas com derivados de artemisinina

ADH – Álcool desidrogenase

AM+LM – Artesunato combinado com lumefantrina

AS – *Activity Score System*

AS+MQ – Arteméter combinado com mefloquina

CNV – Variação do número de cópias

CPIC – *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*

cPQ – Carboxi-primaquina

CPR – Citocromo P450 redutase

Cq – Ciclo de quantificação

DCQ – desetil-cloroquina

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)

FMN – Flavina mononucleotídeo (FMN)

G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance

MAO-A – Monoaminoxidase A

NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

NCBI – Centro Nacional de Informação em Biotecnologia

OMS – Organização Mundial da Saúde

pb – pares de base

PQ – Primaquina

pvcrt-o – Gene de resistência a cloroquina ortólogo de *Plasmodium falciparum*

pvm-dr-1 – Gene de multirresistência às drogas 1

rFU – Unidade de fluorescência arbitrária

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Situação da malária humana no Brasil e no mundo	11
1.2	Ciclo biológico e particularidades de <i>P. vivax</i>	15
1.3	Tratamento da malária não complicada e a relação entre CYP2D6 e primaquina	18
1.4	Caracterização molecular do parasito e diferenciação das recidivas	21
1.5	Falha terapêutica e resistência de <i>P. vivax</i> aos tratamentos	24
2	JUSTIFICATIVA.....	28
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo geral	29
3.2	Objetivos específicos	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	Indivíduos e população de estudo	30
4.2	Aprovações éticas e consentimento dos participantes	32
4.3	Extração de DNA genômico a partir de amostras de sangue em papel de filtro	32
4.3.1	PCR convencional para amplificação do gene <i>abo</i> de grupo sanguíneo: controle de qualidade de extração de DNA	32
4.4	Diagnóstico molecular para confirmação de monoinfecção e detecção precoce do DNA de <i>P. vivax</i>	33
4.5	Genotipagem dos isolados de <i>P. vivax</i> por PCR convencional	34
4.5.1	Amplificação e eletroforese capilar de microssatélites e blocos polimórficos de MSP-1 de <i>P. vivax</i>	34
4.6	Inferência da atividade fenotípica de CYP2D6 por PCR em tempo real (qPCR)	37
4.6.1	Amplificação dos polimorfismos de <i>CYP2D6</i> e <i>CYP2C8</i>	37
4.6.2	Determinação do número de cópias de <i>CYP2D6</i>	38
4.6.3	Predição dos haplótipos e classificação dos fenótipos de CYP2D6	38
4.7	Estimativa do número de cópias dos genes <i>pvmdr-1</i> e <i>pvcrt-o</i>	40
4.8	Análises estatísticas	42
5	RESULTADOS.....	43
5.1	Características dos pacientes incluídos no estudo	43
5.2	Detecção precoce de <i>P. vivax</i> por protocolo molecular	44
5.3	Classificação das recidivas em recrudescência ou recaída	46
5.4	Classificação molecular dos parasitos pareados em infecção primária/recidiva e avaliação de multiplicidade de infecção	47
5.5	Frequência dos alelos e fenótipos de CYP2D6 e CYP2C8	51
5.6	Variação do número de cópias de <i>pvmdr-1</i> e <i>pvcrt-o</i>	56
5.6.1	Padronização de qPCR	56

5.6.2	Estimativa do número de cópias gênicas de <i>pvmdr-1</i> e <i>pvcrt-o</i> dos isolados da infecção primária e da recidiva	57
6	DISCUSSÃO	59
6.1	Implicações do controle de cura por protocolo molecular nas classificações das recidivas	59
6.2	Caracterização molecular das infecções por <i>P. vivax</i>	62
6.3	Diversidade alélica de CYP2D6 e implicações no metabolismo de PQ	65
6.4	Variação do número de cópias de <i>pvmdr-1</i> e <i>pvcrt-o</i> e sua relação com resistência aos diferentes antimaláricos	67
7	CONCLUSÃO	70
8	BIBLIOGRAFIA	71
	GLOSSÁRIO	79
	APÊNDICES	80
	APÊNDICE A. Valores de Cq na detecção molecular de <i>P. vivax</i> para controle de cura dos pacientes de Porto Velho/RO	80
	APÊNDICE B. Genotipagem de <i>CYP2C8</i> e <i>CYP2D6</i> e predição da atividade fenotípica de CYP2D6	82
	APÊNDICE C. Resultados encontrados para os 35 pacientes incluídos no estudo: fenótipo de CYP2D6, dia da recidiva clínica, genótipo do parasito isolado da recidiva, detecção de infecções submicroscópicas assintomáticas	83
	APÊNDICE D. Artigo	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Situação da malária humana no Brasil e no mundo

Apesar dos esforços de controle da doença, a malária permanece como um importante problema de saúde pública de projeção mundial. Trata-se de uma infecção humana causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*, que são transmitidos por mosquitos da família Culicidae, gênero *Anopheles*. Cinco principais espécies são capazes de infectar humanos naturalmente: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. Além destas, *Plasmodium simium*, que infecta primariamente primatas não-humanos neotropicais, foi descrita como responsável por episódios de malária notificados em regiões de Mata Atlântica brasileira, evidenciando a característica zoonótica desta espécie de parasito (BRASIL et al., 2017). A transmissão zoonótica também ocorre no sudoeste asiático pela espécie *P. knowlesi* (SINGH et al., 2004).

Plasmodium falciparum e *P. vivax* são as espécies mais prevalentes, sendo a primeira mais associada com casos de elevada gravidade, enquanto a segunda é geograficamente mais dispersa em regiões densamente povoadas. No cenário global, 219 milhões de casos de malária ocorreram em 2017 de acordo com as estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), o que corresponde a uma redução de 20 milhões (8,4%) de casos em relação a 2010 e a um aumento de 2 milhões (1%) em relação a 2016, sinalizando uma estagnação do progresso contra a malária. Chama atenção que o continente africano, especificamente a região subsaariana, concentra mais de 90% os casos da doença, seguido pelo sudeste asiático (5%). Entretanto, enquanto as estimativas apontam que 99,7% dos casos de malária na África foram causados por *P. falciparum*, nas Américas e no sudeste asiático *P. vivax* representa proporções maiores, sendo responsável por 74% e 37% dos casos nestas regiões, respectivamente (WHO, 2018) (FIGURA 1).

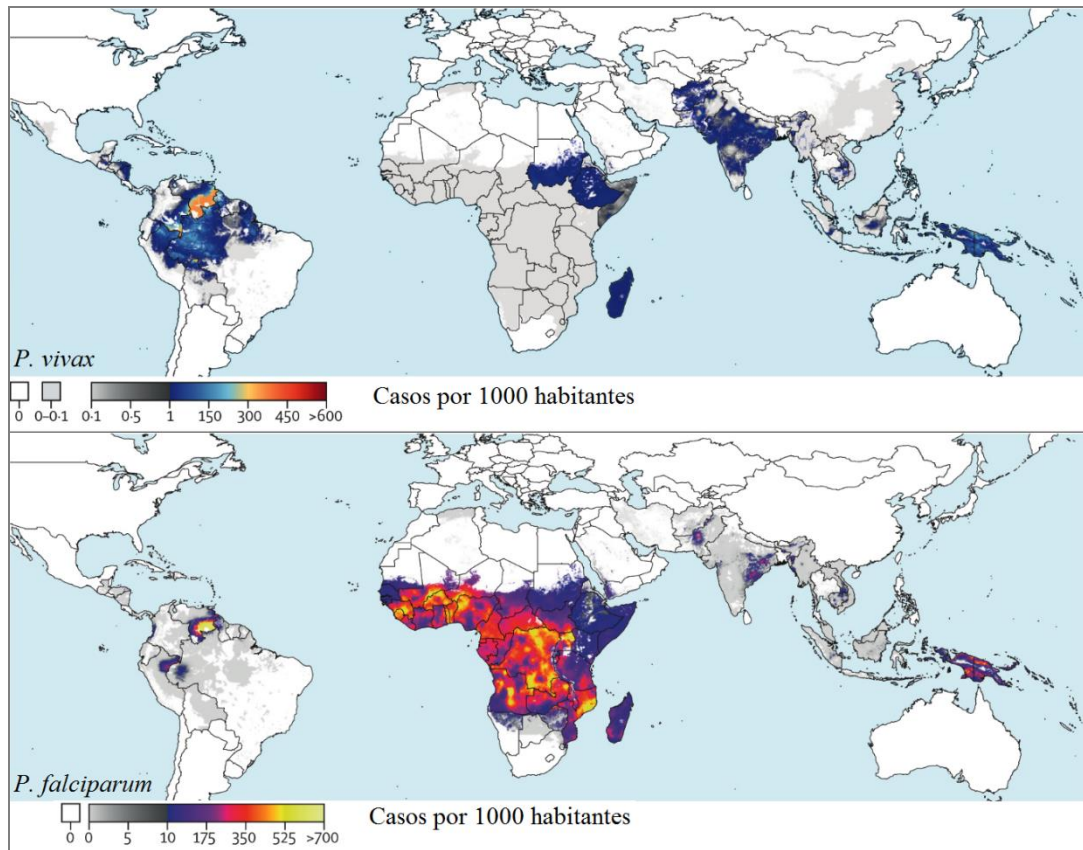


FIGURA 1. Incidência de *P. vivax* e *P. falciparum* em 2017. Fonte: BATTLE et al., 2019; WEISS et al., 2019.

Felizmente, a redução do número de óbitos por malária de 607 mil para 435 mil entre 2010 e 2017 evidencia o impacto dos investimentos em políticas de controle e eliminação da malária, baseadas principalmente no diagnóstico precoce e tratamento oportuno dos pacientes (WHO, 2018). Apesar disso, a incidência parasitária nas Américas vem aumentando desde 2014 devido, sobretudo, ao aumento no Brasil, Nicarágua e Venezuela (WHO, 2018). O caso de maior notoriedade aconteceu na Venezuela, onde, entre 2000 e 2017, foi registrado um aumento acentuado, passando de 45.155 para 411.586 casos (WHO, 2018). Diferentes fatores explicam esse crescimento exorbitante, entre os quais a atividade de garimpo contribuiu significativamente, uma vez que infecções maláricas entre trabalhadores dessa atividade corresponderam a 47% do total de casos no país em 2017 (RECHT et al., 2017). Além disso, desde 2012 o sistema de saúde venezuelano vem sofrendo perdas operacionais e financeiras progressivas, o que impactou diretamente a capacidade dos serviços de controle de surtos e emergenciais (PAGE et al., 2019).

No Brasil, o cenário é diferente. Apesar da expressiva redução de óbitos e número de casos em 85% e 70%, respectivamente, entre 2000 e 2017, o número de casos voltou a subir em 2018, alcançando a marca de 218 mil casos. O decréscimo dos números ocorreu

principalmente devido à adesão do Brasil ao diagnóstico precoce e às políticas de tratamento imediato do Plano de Intensificação das Atividades de Controle da Malária na Amazônia brasileira (PIACM), atividades estas que foram implementadas entre 2000-2003 e adotadas posteriormente pelo Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) (DE PINA-COSTA et al., 2014).

A população brasileira presenciou momentos críticos no passado em relação à malária. Na década de 1930, com a introdução do vetor *Anopheles gambiae* em território nacional decorrente do tráfico marítimo com Senegal, as taxas de letalidade chegaram a 13% na região nordeste. Aproximadamente 10 anos depois, estimativas apontavam que a transmissão da doença aparecia distribuída em todo o território nacional, sendo aproximadamente 20% da população infectadas ao ano, o que não tinha relação com a transmissão por *An. gambiae*. Até 1941, o vetor já havia sido eliminado do país, representando uma importante conquista em políticas públicas de saúde (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Entretanto, outras espécies de anofelinos assumiram o papel de vetores da Malária em outras partes do território nacional.

A partir de meados dos anos 1960, políticas de colonização da Amazônia financiadas pelo governo provocaram a migração massiva de trabalhadores para a região norte, impondo-os uma nova realidade. Durante este episódio da história nacional, os casos de malária atingiram níveis extremos, ultrapassando meio milhão de casos por ano. O maior número registrado ocorreu em 1999, com mais de 600 mil casos (FIGURA 2). Neste momento, mudanças de estratégias no PIACM focaram em ações de controle individuais, incluindo busca ativa dos casos para oferecer um diagnóstico precoce e tratamento adequado. Somado a isso, investimentos em infraestrutura e recursos humanos em saúde foram intensificados, o que contribuiu para a redução da incidência da doença em diferentes regiões (DE PINA-COSTA et al., 2014; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Um novo agravamento da transmissão de malária ocorreu no Brasil entre 2003 e 2005, chegando a níveis registrados em 1999, por razões diversas (FIGURA 2). Além do desinvestimento na implementação e administração das políticas de controle nos municípios, mudanças climáticas, ocupação das periferias das grandes cidades da região Norte, desmatamento para exploração de madeira, pecuária e agricultura e o aumento da população do mosquito vetor contribuíram para o aumento da transmissão na região. Novamente, a intervenção do governo federal em parceria com estados e municípios reduziu substancialmente o número de casos a partir de 2006 (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

É importante destacar ainda que, até aproximadamente 1988, as taxas de incidência de malária causada por *P. vivax* e *P. falciparum* eram similares, o que mudou a partir do final da

referida década, com prevalência de *P. vivax* que atinge atualmente 90% dos casos (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; WHO, 2018) (Figura 2). Atualmente, somente o município de Cruzeiro do Sul, no Acre, contempla cerca de 30% de todos os casos registrados de *P. falciparum* no país. Somado com os municípios vizinhos de Rodrigues Alves e Mâncio Lima, essa localidade responde por cerca de 50% dos casos de malária *falciparum*. Porto Velho, em Rondônia, Itaituba e Anajás no Pará também tem registrado a entrada de *P. falciparum* nos últimos 3 anos (CARLOS et al., 2019).

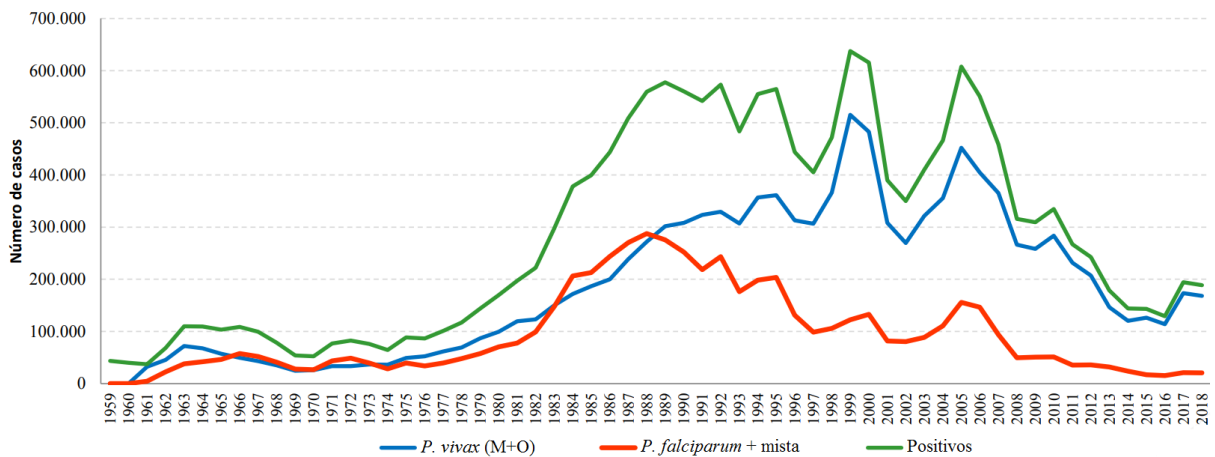


FIGURA 2. Série temporal (1960-2018) do número de casos de malária notificados. Fonte: SVS/MS, 2019a.

Atualmente, o Brasil ainda se encontra em fase de controle da doença. Embora o principal vetor, o mosquito *Anopheles darlingi*, esteja presente em cerca de 80% de todo o território nacional (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010), a região territorial correspondente à Amazônia legal permanece concentrando mais de 90% dos casos de malária, sendo os estados do Acre, Amazonas, Roraima e Amapá aqueles onde há um maior risco de contrair a infecção (FIGURA 3). Ainda que na região Amazônica ocorra a transmissão de pelo menos três espécies de parasitos causadores da malária humana (*P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*) a prevalência elevada de infecções por *P. vivax* desafia as estratégias de controle e prevenção uma vez que essa espécie apresenta características biológicas peculiares que dificultam seu controle.

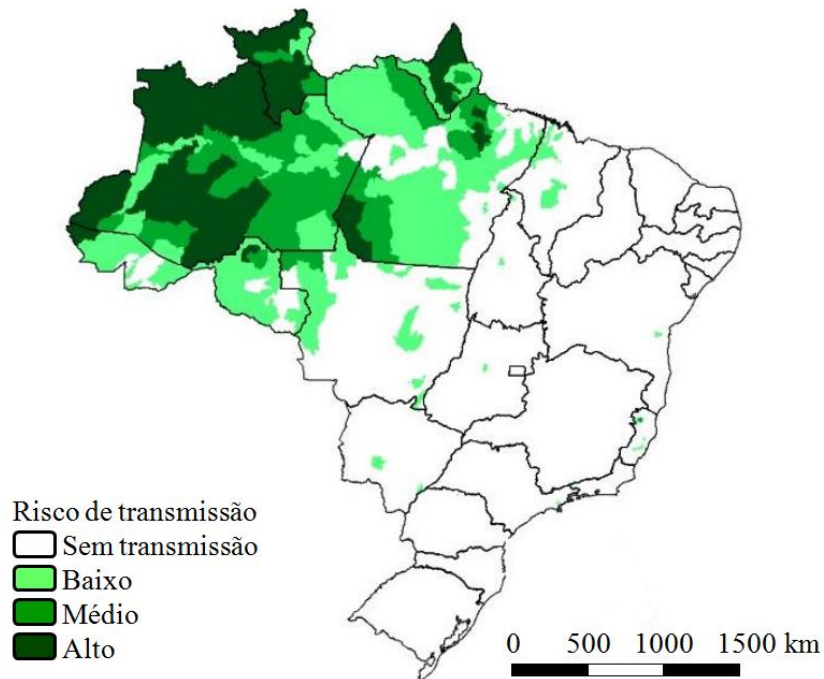


FIGURA 3. Risco de malária por município de infecção, Brasil, 2018. Baixo risco, IPA <10 casos/mil habitantes; Médio risco, IPA 10 a 49 casos mil/habitantes; Alto risco, IPA \geq 50 casos/mil habitantes. Fonte: (SVS/MS, 2018)

1.2 Ciclo biológico e particularidades de *P. vivax*

Indubitavelmente, o ciclo biológico *Plasmodium* sp. é altamente complexo, contando com, pelo menos, duas fases principais no humano (fase hepática e fase sanguínea) para multiplicação assexuada, além do processo de esporogonia no mosquito anofelino, que garante a recombinação genética (FIGURA 4).

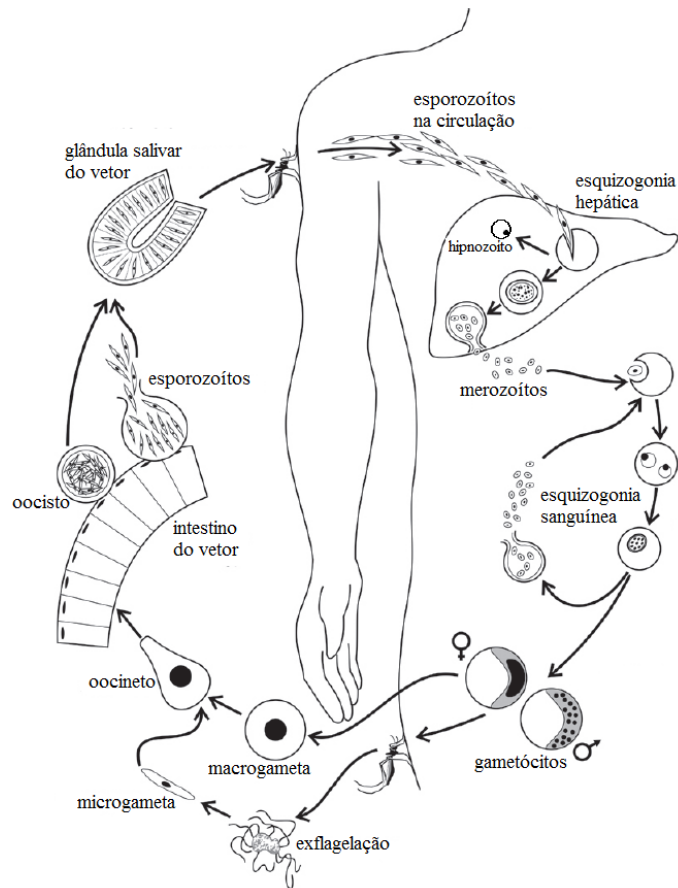


FIGURA 4. Ciclo biológico de *P. vivax*. Fonte: *National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)*, adaptado de OLIVEIRA, 2016.

A infecção nos humanos se dá através da inoculação das formas infectantes, os esporozoítos, transmitidas pela picada de mosquito fêmea infectado do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo. Neste momento, os esporozoítos podem permanecer no tecido subcutâneo do indivíduo por um longo período, exposto à resposta inicial do sistema imune do hospedeiro (AMINO *et al.*, 2006; YAMAUCHI *et al.*, 2007). Os esporozoítos que escapam desse primeiro contato podem alcançar a corrente sanguínea, atingindo o fígado para continuidade do ciclo exoeritrocítico. No órgão em questão, a invasão efetiva dos hepatócitos depende da motilidade do esporozoíto, que migra através de várias células até se desenvolver dentro de um único hepatócito (MOTA *et al.*, 2001), o que corresponde ao processo de esquizogonia tecidual, que varia de 2 a 16 dias, a depender da espécie. Todavia, *P. vivax* e *P. ovale* podem ficar em latência no fígado por meses ou anos, o que corresponde às formas de hipnozoítos (KROTOSKI, 1985; WHITE *et al.*, 2014). Os esporozoítos que seguem o ciclo se desenvolvem no interior do vacúolo parasitóforo, gerando dezenas de milhares de merozoítos, liberados dos esquizontes hepáticos através do brotamento de vesículas denominadas merossomos (STURM *et al.*, 2006). Assim, o ciclo eritrocítico tem início pela invasão dos

eritrócitos pelos merozoítos, onde se multiplicam num período entre 48 e 72 horas, dependendo da espécie de *Plasmodium* até o rompimento da célula hospedeira. A infecção e lise sistemática dos eritrócitos resultam na doença, que inclui sintomas não específicos tais como febre intermitente, calafrios, dores de cabeça e vômito (WHITE et al., 2014).

Após sucessivas replicações, os merozoítos se diferenciam em formas sexuadas infectantes para o vetor anofelino, denominadas macrogametócitos (gametócitos femininos) e microgametócitos (gametócitos masculinos) (JOSLING; LLINÁS, 2015). São estas formas que são ingeridas pela fêmea do mosquito durante o repasto sanguíneo, onde passam rapidamente pela transição a gametas masculinos e femininos ativados. No intestino médio do inseto, o parasito diploide móvel e de vida curta, o oocineto, desenvolve após a fecundação e formação do zigoto. Após migrar para a parede do intestino, o oocineto gera uma forma fixa, o oocisto, que, por redução meiótica, dá origem aos esporozoítos. Estes, por sua vez, são liberados na hemolinfa do mosquito com o rompimento do oocisto e migram para suas glândulas salivares, sendo inoculados no sangue do hospedeiro humano no próximo repasto sanguíneo.

Nos últimos anos, alguns autores tem levantado a hipótese de que o desenvolvimento de *P. vivax* depende ainda de uma passagem pela medula óssea (MALLERET et al., 2015), mas essas evidências seguem por serem esclarecidas. Nesse contexto de alta complexidade, algumas particularidades que colocam *P. vivax* em vantagem evolutiva em relação às demais merecem destaque, pois são aspectos que mantêm essa espécie distribuída globalmente e dificultam seu controle.

Primeiramente, chama atenção o rápido e contínuo desenvolvimento de gametócitos de *P. vivax* em comparação a outras espécies, formas estas infectantes ao mosquito anofelino, e um curto ciclo de desenvolvimento no hospedeiro invertebrado, indicando que a transmissão pode ocorrer antes mesmo do aparecimento dos sintomas (ADAMS; MUELLER, 2017; BOURGARD et al., 2018). Além disso, a parasitemia em infecções causadas por *P. vivax* são relativamente inferiores à parasitemia em malária *falciparum*, o que é atribuído ao tropismo de *P. vivax* pelos reticulócitos (MALLERET et al., 2015), que representam de 1 a 2 % do total de células eritrocíticas. Por vezes, essa parasitemia possui caráter submicroscópico, acompanhada de ausência de sintomas clínicos, o que também favorece a transmissão visto que indivíduos assintomáticos atuam como reservatórios do parasito (VALLEJO et al., 2016).

Plasmodium vivax possui a habilidade de causar episódios de recaída via ativação de estágios hepáticos de longa duração conhecidos como hipnozoítos. Apesar de ter sido descrito por Krotoski ainda na década de 80 (1985), o mecanismo envolvido na latência e ativação dos

hipnozoítos ainda é pouco esclarecido. Alguns estudos sugerem que estímulos externos ao parasito podem levar a sua ativação, como infecção anterior por *Plasmodium* (WHITE, 2011), processos imunológicos desencadeados pela picada do anofelino (HULDÉN; HULDÉN; HELIÖVAARA, 2008), ou infecções bacterianas febris como febre tifoide (SHANKS; WHITE, 2013; WHITE, 2011). Além das recaídas, as recidivas da doença podem ser causadas por parasitos sanguíneos não eliminados pelo tratamento (recrudescência) ou por parasitos de uma nova infecção (SIMÕES et al., 2014).

1.3 Tratamento da malária não complicada e a relação entre CYP2D6 e primaquina

Diante do potencial de *P. vivax* em causar recaídas pela ativação dos hipnozoítos, terapias que atuam somente no ciclo eritrocítico do parasito são insuficientes para cura radical dos pacientes infectados por essa espécie. Por esse motivo, o esquema terapêutico preconizado pelo Ministério da Saúde para a cura radical da infecção por *P. vivax* consiste na associação entre cloroquina (CQ) por 3 dias (dose total de 25 mg/kg) e primaquina (PQ) por 7 dias (dose total de 3–4,2 mg/kg), que atuam como esquizonticida sanguíneo e esquizonticida tecidual, respectivamente (SVS/MS, 2010). Essa estratégia é de elevada importância visto que, na ausência de PQ, episódios de recaída podem alcançar aproximadamente 80% das infecções por *P. vivax* quando somente um esquizonticida sanguíneo é utilizado (BETUELA et al., 2012; COMMONS et al., 2019; ROBINSON et al., 2015). Recentemente, o novo Guia de Tratamento da Malária introduziu terapias combinadas com derivados de artemisinina (ACT), já utilizados anteriormente no tratamento de malária causada por *P. falciparum*, para tratamento da malária *vivax*. Deste modo, as combinações arteméter e lumefantrina (AM+LM) e artesunato e mefloquina (AS+MQ) são recomendadas para tratamento de crianças de até 11 meses, bem como adultos que apresentem recidiva até 60 dias após o início do tratamento convencional. O tratamento de crianças menores de 6 meses e com menos de 5 kg com derivados de ACT aparece como uma estratégia de inibir a seleção de variantes de *P. vivax* resistentes à CQ, uma vez que não necessita do fracionamento do fármaco no momento da sua administração e, conseqüentemente, evita a dosagem subterapêutica (SVS/MS, 2019).

A associação de PQ e CQ merece destaque no contexto de tratamento de infecções por *P. vivax* pelo efeito sinérgico entre as drogas. Além de ser, atualmente, o único fármaco licenciado e comercialmente disponível contra formas teciduais hepáticas do parasito, PQ tem sua biodisponibilidade potencializada na corrente sanguínea pela CQ (PUKRITTAYAKAMEE et al., 2014), o que contribui para a cura radical dos pacientes. Por

esse motivo, a PQ permanece recomendada para todas as faixas etárias, exceto crianças menores de 6 meses e gestantes devido ao risco de complicações relacionados a hemólise, que pode ocorrer em indivíduos com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (SVS/MS, 2019).

Pertencente à classe das 8-aminoquinolinas, a PQ foi desenvolvida pelo Exército dos Estados Unidos da América durante a Segunda Guerra Mundial, em 1946, na Universidade de Columbia (ELDERFIELD; GENSLER, 1946). Foi utilizada na década de 1950, durante a Guerra da Coreia, como tratamento para malária causada por *P. vivax*. Desde então, a PQ foi estabelecida como terapia padrão no tratamento da malária, representando uma importante ferramenta para o bloqueio da transmissão devido ao seu efeito gametocida (MARCSISIN; REICHARD; PYBUS, 2016). Estimativas apontam que aproximadamente 200 milhões de pessoas receberam PQ (ASHLEY; RECHT; WHITE, 2014). No entanto, nos últimos anos, alguns trabalhos tem relatado falha terapêutica no tratamento preconizado da malária causada por *P. vivax*, principalmente na região da Amazônia brasileira (CHEHUAN et al., 2013; DE SANTANA FILHO et al., 2007; MARQUES et al., 2014; PRICE et al., 2014).

Na última década, tornou-se bem estabelecido que PQ é um pró-fármaco, ou seja, sua atividade antimalárica acontece efetivamente após biotransformação no fígado. Esse fenômeno é bem evidenciado por Potter e colaboradores (2015), que verificou falha terapêutica em camundongos *knockout* para determinadas enzimas hepáticas, infectados com *Plasmodium chabaudi*. Além disso, Pybus e colaboradores (2012), utilizando enzimas recombinantes das famílias citocromo P450 e a monoamino oxidase (MAO-A), evidenciaram a formação de metabólitos previamente identificados como terapêuticos e tóxicos durante o tratamento contra malária.

Mais recentemente, a avaliação do metaboloma no plasma e na urina de voluntários saudáveis após administração de PQ permitiu elucidar a complexidade do metabolismo do fármaco, evidenciando três vias distintas pelas quais dezenas de metabólitos são gerados (AVULA et al., 2018). Dentre elas, a via mediada por isoenzimas do complexo P450 promovem a biotransformação da PQ em metabólitos hidroxilados, cuja atividade foi relacionada à eficácia terapêutica da PQ na malária (PYBUS et al., 2013). Especificamente, CYP2D6 aparece como a enzima essencial envolvida na biotransformação da PQ em metabólitos hidroxilados (FIGURA 5), o que de fato tem sido corroborado por relatos de falha terapêutica deste fármaco em indivíduos com malária causada por *P. vivax*, associada ao genótipo alterado de CYP2D6 que implica em atividade reduzida da enzima e consequente alteração da farmacodinâmica da PQ (BRASIL et al., 2018; SILVINO et al., 2016).

Por outro lado, o metabólito mais abundante derivado da PQ corresponde a carboxi-PQ (cPQ), derivado da via mediada por MAO-A (FIGURA 5) que é responsável pela meia-vida curta da droga (aproximadamente 6 horas) (AVULA et al., 2011). A concentração máxima de cPQ foi observada em indivíduos saudáveis após 8 horas da administração da PQ, com concentrações elevadas de cPQ mantidas por até 24 horas (TEKWANI et al., 2015), entretanto, nenhum efeito de cPQ parece estar envolvido na atividade antimalárica da PQ. Apesar de cPQ ser considerado um metabólito não terapêutico e não tóxico, envolvido apenas na excreção da droga do organismo, ainda há a formação de metabólitos hidroxilados derivados de cPQ com potencial antimalárico (AVULA et al., 2018), porém, o impacto terapêutico desses intermediários na eficácia da PQ ainda não foi avaliado.

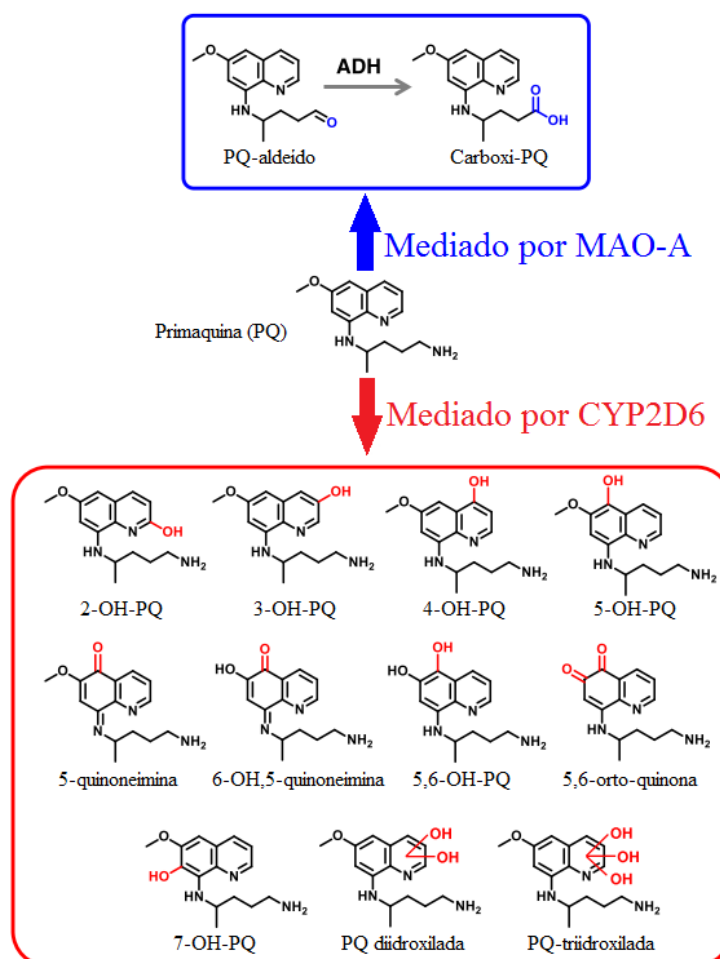


FIGURA 5. Principais produtos de PQ pelas vias metabólicas de MAO-A e CYP2D6.
Fonte: MARCSISIN; REICHARD; PYBUS, 2016, adaptado.

Frente à complexidade de metabólitos aos quais a PQ é convertida, surge o questionamento a respeito do mecanismo de ação do antimalárico. Entender como um princípio ativo atua é essencial para prever mecanismos de resistência do parasito, além de

abrir campos de pesquisa para aprimoramento de fármacos, o que pode ser uma alternativa à descoberta de antimaláricos. Entretanto, a ausência de métodos de cultivo robustos e de longa duração de *P. vivax* tem dificultado avanços nessa área, e por muitos anos o mecanismo de ação da PQ permaneceu pouco compreendido.

Recentemente, Camarda e colaboradores (2019) elucidaram o mecanismo de ação da PQ utilizando modelos de infecção *in vitro* por *P. falciparum* que mimetizam a fisiologia hepática (FIGURA 6). Os autores constataram que a PQ possui atividade antimalárica indireta, em duas etapas, sendo que a atuação da CYP2D6 depende de seu par redox citocromo P450 redutase (CPR). Em um primeiro momento, a PQ é biotransformada em seus metabólitos hidroxilados pelo complexo CYP2D6/CPR. Estes, por sua vez, sofrem oxidação espontânea, formando quinoneiminas e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A enzima CPR, através da recepção de dois elétrons do NADPH, reduz a quinoneimina à forma hidroxilada novamente via cofatores FAD/FMN, perpetuando assim a acumulação de H_2O_2 no fígado e em outros locais de biotransformação, como a medula óssea. Portanto, os parasitos presentes nesses locais são afetados pela ação do H_2O_2 acumulado. Embora esses achados tenham lançado luz sobre questões que permaneceram pouco compreendida por décadas, a influência da MAO-A não foi investigada, dessa forma, seu impacto na eficiência do tratamento com PQ segue por ser elucidada.

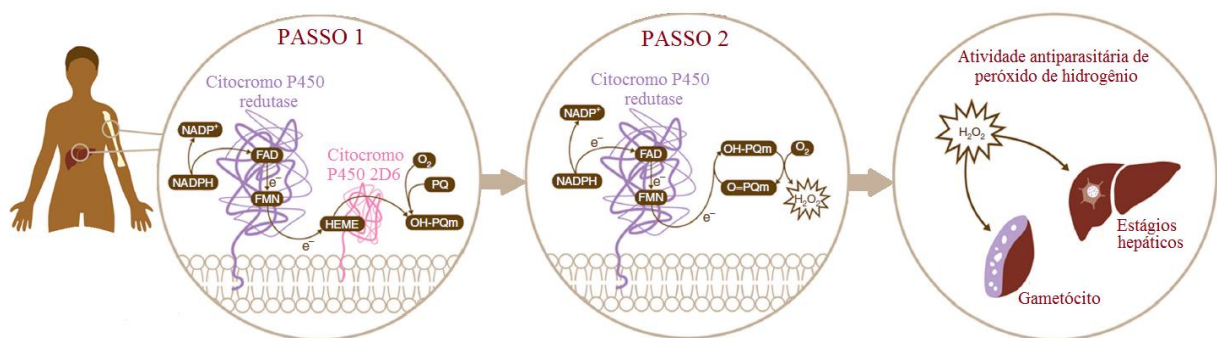


FIGURA 6. Representação esquemática do mecanismo de ação da primaquina

Fonte: CAMARDA *et al.*, 2019, adaptado.

1.4 Caracterização molecular do parasito e diferenciação das recidivas

Recidiva é um conceito clínico, baseado unicamente no aparecimento de um novo quadro de sintomas ocasionado pela presença de formas assexuadas na circulação periférica. Somente com base na observação clínica, não se distingue recrudescência, recaída e reinfeção. Entretanto, tem sido consenso que até 28 dias, as recidivas podem ser

consideradas recrudescências, pois apesar de ainda haver CQ circulante após o tratamento as formas eritrocíticas continuam presentes. A partir de 29 dias, as recidivas podem ser consideradas recaídas até cerca de 6 meses após o tratamento, decorrentes da ativação dos hipnozoítos. Em regiões tropicais como o Brasil, é comum que o intervalo entre a infecção primária e a recaída seja curto, aproximadamente entre 6 e 8 semanas (WHITE, 2011). As reinfecções, ou seja, a entrada de novos esporozoítos pela picada de mosquitos infectados, por sua vez, podem ocorrer a qualquer momento após a eliminação da droga no organismo, desde que haja o contato com o mosquito vetor (SIMÕES et al., 2014).

Para a identificação da presença de parasitos durante e após o tratamento dos pacientes diagnosticados com malária, o Ministério da Saúde preconiza a realização de lâminas de verificação de cura (LVC) que consiste no exame de gota espessa para busca de parasitos persistentes (SVS/MS, 2019). Através deste exame e com base nos critérios supracitados, infere-se quando um episódio de recidiva se trata de recrudescência e, a partir disso, é possível delinear nova estratégia de tratamento. No entanto, diferentes estudos que utilizam métodos moleculares de detecção tem relatado a ocorrência de infecções subpatentes, que são indetectáveis pelo método de gota espessa devido a parasitemias muito baixas (ALVES et al., 2006; VALLEJO et al., 2016). Nesse contexto, levanta-se a hipótese de que o método da gota espessa pode subnotificar as recrudescências devido a sua menor sensibilidade, principalmente por depender da experiência do microscopista, e, por isso, métodos de detecção molecular representam uma alternativa através da detecção precoce do DNA do parasito antes mesmo que este chegue a se desenvolver em quantidades suficientes para continuar a transmissão e causar novo quadro de sintomas clínicos.

A dificuldade de distinção entre recaída, recrudescência e uma nova infecção representa um empecilho para os estudos de resistência às drogas, eficácia terapêutica e até mesmo para o desenvolvimento de novas drogas. Por isso, a caracterização molecular dos parasitos através da genotipagem de microssatélites representa uma importante ferramenta para auxiliar as estimativas gerais das taxas de recorrência em diferentes populações. Através desta metodologia, é possível diferenciar recidivas homólogas (mesmo parasito da infecção inicial) ou heterólogas (parasito distinto da infecção inicial), de acordo com o alelo predominante em cada momento da infecção.

Um estudo do nosso grupo de pesquisa realizado com pacientes adultos mono-infectados por *P. vivax*, que apresentaram recaídas confirmadas por residirem em área não endêmica (Cuiabá – MT), excluindo a chance de reinfecção, verificou a presença de diferentes alelos de microssatélites e blocos polimórficos de PvMSP-1 tanto na infecção primária quanto

na recaída, com variação temporal do alelo predominante. Assim, 46% (N=30) das recaídas reportadas apresentavam o alelo predominante distinto da infecção primária, sugerindo que a maior parte das recaídas decorreram da ativação de hipnozoítos heterólogos. No entanto, entre os 7 indivíduos primo-infectados (primeira infecção malárica da vida do indivíduo), 5 deles apresentaram parasito da recidiva idêntico ao parasito da infecção inicial (DE ARAUJO et al., 2012). Esses achados corroboraram as evidências trazidas por um estudo realizado com pacientes residentes em área de baixa transmissão da Tailândia, em que 65% (N=20) das mulheres incluídas no estudo apresentaram recidiva heteróloga (IMWONG et al., 2012). Além disso, a recaída de 20 crianças primo-infectadas incluídas pelo estudo foram decorrentes principalmente da ativação de parasitos homólogos à primeira infecção. Concomitantemente, essas evidências sugerem que a primeira recaída de indivíduos primo-infectados ocorre predominantemente por hipnozoítos homólogos à infecção inicial, enquanto em indivíduos com episódios prévios de malária, as recaídas ocorrem predominantemente por parasitos heterólogos.

A genotipagem de microssatélites permite identificar ainda a diversidade genética e heterozigosidade das infecções causadas por *P. vivax*, classificando as infecções quanto a sua multiplicidade de parasitos. Infecções múltiplas são definidas pela detecção de dois ou mais alelos de um marcador polimórfico em uma mesma amostra. Nesse contexto, diferentes trabalhos têm evidenciado que as infecções por *P. vivax* incluem geralmente mais de uma variante do parasito, que podem ser provenientes de única ou várias inoculações pelo mosquito vetor (ORJUELA-SÁNCHEZ et al., 2009; WHITE, 2011). Outra observação importante evidencia a flutuação da predominância de alelos nos diferentes momentos das infecções e que parasitos geneticamente idênticos podem ser encontrados em ambas as infecções, porém em frequências distintas (DE ARAUJO et al., 2012; KOEPFLI et al., 2009). Estudos mais recentes tem buscado a caracterização genética dos parasitos através de estratégias mais robustas como o sequenciamento massivo do DNA, que tem permitido identificar um número maior de haplótipos por episódio de infecção em relação à técnica convencional de genotipagem (BRIGHT et al., 2014; LIN et al., 2015).

Apesar da ausência de estudos robustos de análise da estrutura genética de *P. vivax* em populações de vetores naturalmente infectados em área endêmica, Soontarawirat e colaboradores (2017) observaram o desenvolvimento de oocistos em *Anopheles cracens* alimentados artificialmente utilizando sangue de pacientes infectados. Dessa forma, puderam identificar o desenvolvimento tanto de oocistos policlonais quanto oocistos correspondentes a um mesmo clone. Em ambos os casos observaram alelos correspondentes nos parasitos

isolados diretamente do sangue dos pacientes, sugerindo que a multiplicidade de variantes das infecções por *P. vivax* podem ser provenientes da inoculação por um único mosquito vetor ou pela inoculação de variantes distintas por vetores diferentes.

Frente às evidências expostas, recidivas precoces, causadas por parasitos homólogos à infecção primária, sugerem fortemente um episódio de recrudescência, com potencial resistência de *P. vivax* ao antimalárico, entendida como a persistência da parasitemia mesmo diante de concentrações terapêuticas da droga. Como o cultivo de *P. vivax* ainda é uma realidade apenas para pesquisas científicas, o que permite testar a susceptibilidade do parasito a diferentes antimaláricos, a dosagem da droga e seus metabólitos no sangue permanece como ferramenta alternativa para identificar parasitos potencialmente resistentes. Na ausência deste método, recidivas homólogas ainda não podem ser descartadas como recaídas, visto que outras evidências têm apontado para a influência do sistema imune no tratamento e na ocorrência de recidivas homólogas. Já foi observado, a partir de infecção artificial, que a aquisição de imunidade contra estágio sanguíneo de *P. vivax* resulta em intervalos maiores entre as recaídas (WHITE, 2011). Além disso, a observação de parasitemias menores nas recaídas homólogas em relação às recidivas heterólogas em pacientes da Tailândia evidencia um possível desenvolvimento de imunidade adquirida contra os parasitos homólogos que, conseqüentemente, favorece o desenvolvimento da infecção a partir da ativação do hipnozoíto heterólogo (MANEERATTANASAK et al., 2017).

1.5 Falha terapêutica e resistência de *P. vivax* aos tratamentos

No passado, os relatos de falha terapêutica se referiam à resistência de cepas de *P. vivax* à CQ. O primeiro relato data de 1989 (RIECKMANN; DAVIS; HUTTON, 1989), 30 anos após o aparecimento de *P. falciparum* resistente ao fármaco (PRICE et al., 2014). A resistência à CQ é definida como persistência da parasitemia após tratamento do paciente com a dose preconizada do antimalárico e, simultaneamente, concentrações adequadas do medicamento ou seu metabólito no sangue (>100 ng/mL) (BLOLAND, 2001). Porém, a dosagem da droga exige metodologias robustas e acompanhamento próximo ao paciente, pouco viáveis para utilização na rotina em área endêmica.

De forma geral, a resistência do parasito ocorre por mutações, podendo incluir múltiplas mutações em diferentes loci no genoma do parasito. No caso de *P. falciparum*, é bem estabelecido que a resistência à CQ é resultado de mutações no gene *pfcrt* (*chloroquine resistance transporter*), especificamente uma alteração no códon 76 que protege o parasito

contra a acumulação do fármaco no vacúolo digestivo, local onde atua inibindo a síntese de hemozoína (FITCH, 2004). A partir de cruzamento genético entre variantes resistente e sensível à CQ de *P. falciparum*, o gene *pfcr*t foi identificado e associado ao aumento da acidificação no vacúolo parasitóforo como consequência da alteração do fluxo de CQ ou sua ligação com o grupo heme (FIDOCK et al., 2000). A proteína codificada contém 45 kDA, incluindo 10 domínios transmembrana localizados no vacúolo digestivo, o que permite uma menor concentração de CQ nessa organela entre as variantes que apresentam o polimorfismo no códon 76 (FIGURA 7).

Embora a existência de um gene ortólogo de *pfcr*t seja conhecida para *P. vivax* (*pvcrt-o*), a sua associação com resistência não é bem estabelecida para essa espécie, uma vez que não há uma mutação específica comum a todos os isolados resistentes à CQ. As evidências sobre o envolvimento de *pvcrt-o* na resistência à CQ permaneceram limitadas principalmente devido à ausência de protocolos de cultura contínua do parasito *in vitro*, dependendo, assim, de métodos de transfecção em outros organismos. Nesse sentido, os primeiros achados com *P. falciparum* e *Dictyoselium discoideum* transfectados com *pvcrt-o* evidenciaram que sua superexpressão gênica diminuía a susceptibilidade parasitária à CQ (SÁ et al., 2006). Além disso, o aumento da expressão do gene em questão foi observado em isolado de *P. vivax* resistente à CQ (FERNÁNDEZ-BECERRA et al., 2009). No Brasil, Melo e colaboradores (2014) constataram que isolados de pacientes monoinfectados com *P. vivax* clinicamente caracterizados como resistentes à CQ apresentaram aumento da expressão de *pvcrt-o* em quase três vezes quando comparado aos isolados susceptíveis. Entretanto, esses estudos avaliaram somente o aumento da expressão gênica em nível de RNA mensageiro, sem investigar a relação deste aumento com a variação do número de cópias do gene.

Recentemente, Sá e colaboradores (2019) evidenciaram, através de um cruzamento entre variantes de *P. vivax*, alterações na transcrição gênica de *pvcrt-o*. Utilizando primatas não-humanos neotropicais para seleção das variantes e posterior infecção em um chimpanzé sob pressão seletiva de CQ, os pesquisadores identificaram um aumento tanto na transcrição quanto na expressão gênica de *pvcrt-o*, indicando que, de fato, há um envolvimento de *pvcrt-o* na resistência a CQ.

Outro gene de grande importância no contexto de tratamento de malária *vivax* é o *pvmdr-1* (*multidrug resistance 1*), homólogo de *mdr* de mamífero, codificante da glicoproteína P que pertence a família de transportadores ABC, capaz de transportar diferentes classes de drogas (HIGGINS, 2007). Assim como o transportador de resistência à

cloroquina, a glicoproteína P está localizada, principalmente, na membrana do vacúolo digestivo (COWMAN et al., 1991) (FIGURA 7).

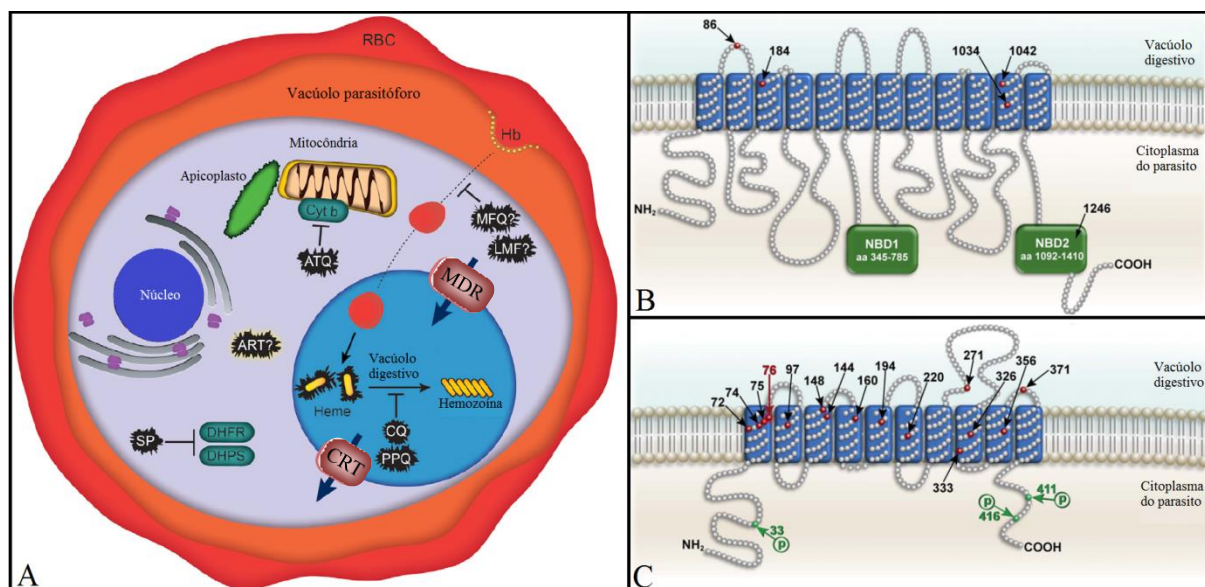


FIGURA 7. Esquema dos principais alvos e mecanismos de resistência aos antimaláricos mediados por *pvmdr-1* e *pvcr-t-o*. (A) Alvos dos principais antimaláricos. ART, artemisinina; ATQ, atovaquona; CQ, cloroquina; Cyt b, citocromo b; DHFR, diidrofolato redutase; Hb, hemoglobina; LMF, lumefantrina; MFQ, mefloquina; PfCRT, transportador de resistência a cloroquina; PPQ, piperaquina; PfMDR-1, transportador de multirresistência-1; RBC, eritrócito. SP, sulfadoxina-pirimetamina. (B) Topologia de MDR1. As setas pretas indicam posições polimórficas de aminoácidos, destacados em vermelho, associadas, em *P. falciparum*, à alteração da resposta a diferentes antimaláricos. (C) Topologia de CRT. As setas pretas indicam aminoácidos polimórficos. A substituição de lisina por treonina na posição 76, indicada pela seta em vermelho, é conservada em *P. falciparum* resistentes à CQ.

Fonte: ROSS; FIDOCK, 2019 e SANCHEZ *et al.*, 2010, adaptado.

O cenário para *pvcr-t-o* se repete quando se trata de *pvmdr-1*. Diferentes polimorfismos em aminoácidos específicos de *P. falciparum* podem comprometer sua susceptibilidade *in vitro* a diferentes antimaláricos visto que a glicoproteína P atua como transportadora dos fármacos para o interior do vacúolo (ROHRBACH et al., 2006). Ou seja, o menor transporte do antimalárico pela proteína P será vantajosa para o parasito quando o fármaco atuar no vacúolo digestivo, enquanto uma atividade elevada de glicoproteína P será benéfica contra antimaláricos que atuam no citoplasma (PRICE et al., 2004; VAN ES et al., 1994). Em *P. vivax*, isolados da Indonésia e Tailândia com a mutação Y976F apresentaram susceptibilidade reduzida à CQ, mas aumentada para artesunato e mefloquina, já os isolados com amplificação gênica de *pvmdr-1* apresentaram susceptibilidade acentuadamente reduzida para mefloquina (SUWANARUSK et al., 2007). No Brasil, isolados clinicamente resistentes à CQ apresentaram expressão de mRNA de *pvmdr-1* aumentada em 2,4 vezes em relação aos clinicamente susceptíveis (MELO et al., 2014). Assim como para *pvcr-t-o*, a variação do

número de cópias do gene não foi avaliada, o que leva a hipótese de que a pressão seletiva exercida pela droga pode selecionar variantes com cópias múltiplas do gene, que poderia implicar no aumento da expressão do transportador, comprometendo o efeito dos antimaláricos.

2 JUSTIFICATIVA

Os fatores determinantes da metabolização de drogas antimaláricas e de resistência aos antimaláricos pelo parasito merecem destaque nas investigações acerca das falhas terapêuticas e da eficácia das drogas preconizadas atualmente para o tratamento da malária causada por *P. vivax*. Atualmente, a PQ é o único fármaco licenciado para eliminar os hipnozoítos do tecido hepático e prevenir as recaídas (WHO, 2017), administrada em associação à CQ. Entretanto, falhas terapêuticas levantaram questionamentos acerca da eficácia desse esquema quimioterápico.

As bases genéticas das falhas terapêuticas ainda permanecem pouco esclarecidas para *P. vivax*. Porém, tanto fatores genéticos do hospedeiro humano quanto do parasito parecem influenciar essa ocorrência. Diferentes estudos buscam estabelecer associações entre polimorfismos de base única e variação de número de cópias de diferentes genes de *P. vivax* relacionados à resistência a antimaláricos (COSTA et al., 2017; SILVA et al., 2018), enquanto outros buscam investigar o impacto de diferentes fenótipos da enzima CYP2D6 do hospedeiro humano, essencial para metabolização da PQ, na ocorrência de recidivas (BRASIL et al., 2018; SILVINO et al., 2016). Diante disso, esquemas terapêuticos com derivados de artemisinina, como artesunato e arteméter, têm sido investigados como alternativa à CQ (DAHER et al., 2018; TAVUL et al., 2018) e seguirá em implementação nos próximos anos, conforme recomendado pelo Ministério da Saúde (SVS/MS, 2019), visto que a otimização do tratamento da malária causada por *P. vivax* é fundamental para aprimoramento do controle da doença.

Dessa forma, a presente proposta pretende contribuir para a caracterização tanto de aspectos genéticos do hospedeiro humano quanto de *P. vivax* relacionados à falha terapêutica em pacientes tratados com diferentes antimaláricos, incluindo o esquema atualmente preconizado (CQ e PQ) e ACT em associação à PQ. Com isso, espera-se contribuir para elucidação de como os fatores genéticos do hospedeiro e do parasito influenciam as recidivas das infecções por *P. vivax*, auxiliando o desenvolvimento de medidas mais efetivas que auxiliem o tratamento e controle da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de polimorfismos em genes do hospedeiro humano e genes de isolados de *P. vivax* em episódios de recidiva caracterizados molecularmente antes e após tratamento com derivados de artemisinina ou cloroquina associados à primaquina.

3.2 Objetivos específicos

- i. Identificar e classificar o genótipo dos parasitos isolados da infecção primária e da recidiva de pacientes de Porto Velho/RO e Manaus/AM, tratados com CQ ou ACT associados à primaquina;
- ii. Comparar a ocorrência de infecções múltiplas nas infecções primárias e nas recidivas de isolados dos mesmos indivíduos;
- iii. Realizar o acompanhamento molecular de cura para identificação das recrudescências;
- iv. Inferir as atividades das enzimas CYP2C8 e CYP2D6 dos pacientes que recidivaram, identificando os fenótipos de biotransformação nulo, lento ou ultrarrápido;
- v. Estimar a variação do número de cópias gênicas de *pvmdr-1* e *pvcrt-o* nos isolados de *P. vivax* pareados (infecção primária/recidiva).

4 METODOLOGIA

4.1 Indivíduos e população de estudo

O presente estudo contou com amostras de pacientes com malária não complicada recrutados para compor um estudo prospectivo e randomizado para monitoramento da eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados de artemisinina (DAHER et al., 2018).

Os indivíduos foram recrutados entre agosto de 2012 e abril de 2015, totalizando 2.475 pacientes atendidos no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM), em Porto Velho/RO, e na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), em Manaus/AM, com resultado de gota espessa positivo durante o período do estudo clínico. Os pacientes com malária não complicada foram incluídos no estudo após informar consentimento livre e esclarecido por escrito e se atenderam aos seguintes critérios de inclusão: idade entre 18 e 70 anos, peso entre 50 e 90 kg, monoinfecção por *P. vivax* confirmada por microscopia, contagem parasitária >250 p/ μ L, temperatura axilar $\geq 37,5$ °C ou histórico de febre durante as últimas 48 horas e dosagem de hemoglobina $> 7,0$ g/dL. Os critérios de exclusão foram: uso de antimaláricos nos 63 dias anteriores, sinais de malária grave, outras condições febris concomitantes ou doenças crônicas (distúrbios cardíacos, hepáticos ou renais graves ou HIV), uso de qualquer medicamento conhecidamente capaz de interferir na farmacocinética do antimalárico¹, histórico de intolerância a qualquer antimalárico do estudo, deficiência conhecida de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), gravidez confirmada por teste de hCG e amamentação.

De 2.475 pacientes, 264 (10,7%) pacientes foram randomizados (1:1:1) em três diferentes grupos para receberem esquemas de tratamento por via oral distintos, sendo 88 indivíduos por grupo: Grupo A, CQ+PQ; Grupo B, Artesunato e Mefloquina +PQ; e Grupo C, Arteméter e Lumefantrina +PQ (TABELA 1).

¹ Antiácidos podem reduzir a absorção da cloroquina, enquanto cimetidina pode aumentar seus efeitos farmacológicos. Quinacrine tem potencial de aumentar a toxicidade da primaquina. Medicamentos que alteram a motilidade gastrointestinal também compuseram os critérios de exclusão. Outros medicamentos relatados de uso concomitantes tiveram seu potencial de interação com os antimaláricos usados no estudo consultados na base de dados *Drug Interaction Checker* (<http://www.medscape.com/druginfo/druginterchecker?cid=med>).

TABELA 1. Esquemas de tratamento utilizados no estudo clínico

Grupo	Antimaláricos	Esquema terapêutico ¹
A	Cloroquina + Primaquina (CQ+PQ)	10 comprimidos de 150 mg de cloroquina (4 no primeiro dia e 3 nos dois dias subsequentes).
B	Artesunato + Mefloquina + Primaquina (AM+PQ)	6 comprimidos de 100 mg de artesunato e 200 mg de mefloquina (2 comprimidos por dia durante um período de 3 dias).
C	Arteméter + Lumefantrina + Primaquina (AL+PQ)	24 comprimidos de 20 mg de arteméter e 120 mg de lumefantrina (8 comprimidos por dia durante um período de 3 dias).

¹Todos os grupos incluíram administração de 2 comprimidos de 15 mg de PQ diariamente durante 7 dias, 8 ou 9 dias, de acordo com três faixas de peso corporal (≥ 50 –69 kg, 70–79 kg e 80–90 kg), conforme recomendação do PNCM (SVS/MS, 2010). A primeira dose dos antimaláricos foi administrada no momento do recrutamento. Para os pacientes tratados com CQ+PQ e AM+PQ, a administração das doses subsequentes foi acompanhada durante os 3 primeiros dias. Já para o grupo tratado com AL+PQ, somente a primeira dose de AL da manhã foi supervisionada, sendo posteriormente questionados a respeito da sua adesão à segunda dose diária (DAHER et al., 2018).

Dos 264 indivíduos randomizados, 198 (75,0%) e 66 (25,0%) foram incluídos pelo CEPEM e pela FMT, respectivamente. Os principais motivos para exclusão de indivíduos foram impossibilidade de atender ao cronograma de avaliações (19,9%), baixa parasitemia (15,9%) e uso de antimaláricos nos últimos 63 dias (15,2%).

Todos os pacientes receberam tratamento parcialmente supervisionado, ou seja,

Os pacientes foram avaliados e tiveram amostra de sangue coletadas no dia de recrutamento (d0) e nos dias 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 42 e 63 após sua inclusão no estudo. Esse esquema de amostragem corresponde ao intervalo recomendado pelo Ministério da saúde para verificação de cura após administração do tratamento com antimaláricos.

Para realização desse trabalho, foram utilizadas amostras dos pacientes que apresentaram episódio de recidiva (reaparecimento dos sintomas clínicos e parasitemia detectada por microscopia óptica) durante o período em que foram acompanhados (até 63 dias). Assim, um total de 35 indivíduos apresentou recidiva única durante este período, os quais foram incluídos nas análises do presente trabalho.

4.2 Aprovações éticas e consentimento dos participantes

O Comitê de Ética do Centro de Medicina Tropical de Rondônia (CEPEM N° 31/11 CEP/CEPEM e 0018.0.046.000-11 CAAE–SISNEP e Plataforma Brasil N° 74869 CEP/CEPEM e N° 05462612.7.0000.0011 CAAE) revisaram e aprovaram o protocolo do estudo clínico. O consentimento livre e esclarecido dos pacientes, adquirido antes do início do estudo clínico, serão mantidos por 5 anos após o término do estudo.

4.3 Extração de DNA genômico a partir de amostras de sangue em papel de filtro

Amostras de sangue estocadas em papel de filtro foram fornecidas pelo Dr. André Daher, Coordenador do Estudo Clínico e representante do Instituto de Tecnologia em Fármacos Farmanguinhos (Rio de Janeiro/RJ).

O DNA das amostras foi extraído usando o kit comercial *QIAamp DNA mini kit* (Gentra Systems, Minneapolis, MN), de acordo com o protocolo do fabricante especificado para amostras de sangue em papel de filtro. As extrações partiram de, aproximadamente, 80 µL de sangue, e o DNA purificado foi hidratado em 150 µL de tampão de hidratação disponível no kit. Somente para os experimentos de verificação de cura por protocolo molecular, descritos no item 4.4, as extrações partiram do mesmo volume aproximado de sangue, e o DNA foi hidratado em 50 µL de água livre de DNAses e RNAses.

4.3.1 PCR convencional para amplificação do gene *abo* de grupo sanguíneo: controle de qualidade de extração de DNA

Com o objetivo de verificar a integridade do DNA extraído de sangue em papel de filtro, as amostras foram submetidas à amplificação em cadeia da polimerase convencional (PCR) para amplificação do grupo sanguíneo ABO, gene constitutivo do genoma humano. A reação incorpora iniciadores dirigidos contra sequências no exon 7 do gene do grupo ABO (5'- GCT GGA GGT GCG CGC TAC -3' e 5'- ACG AAT TCT ACT TGT TCA GGT GGC TGT GCG TC -3'), cujo produto de amplificação possui 419 pares de base (OLSSON et al., 1998).

As reações ocorreram em volume final de 12,5 µL, na presença de 1,6 µM de cada iniciador, PCR Mastex Mix a 1x (PROMEGA), 4,8 mM de MgCl₂ (Invitrogen) e 1 µL de DNA (aproximadamente 5 ng/µL). As amplificações foram realizadas em termocilador *Veriti*

96-well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) ou T-100 Thermal Cycler (BioRad), equipamentos compatíveis com tubos de 0,2 mL específicos para PCR. O desempenho da reação nos dois equipamentos foi idêntico (dados não mostrados).

As condições de amplificação incluíram desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, 34 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 68 °C por 1 minuto (anelamento) e 72 °C por 1 minuto (extensão), finalizando com um ciclo de 5 minutos a 72 °C. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 2% v/v corado com brometo de etídio 5% v/v.

4.4 Diagnóstico molecular para confirmação de monoinfecção e detecção precoce do DNA de *P. vivax*

Para confirmação de monoinfecção por *P. vivax*, amostras de DNA extraídas de sangue coletado no momento do recrutamento de todos os 35 indivíduos aqui incluídos foram submetidas ao diagnóstico molecular descrito por Cotta e colaboradores (2019), utilizando a técnica de PCR em tempo real para amplificação de *Pvr47* e *Pfr364*, sequência sem função conhecida localizada na região subtelomérica do genoma de *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente. Somente os pacientes recrutados em Porto Velho/RO (CEPEM), totalizando 27 indivíduos, foram submetidos ao controle de cura pelo mesmo diagnóstico molecular, de detecção de *Pvr47*, para detecção precoce do DNA de *P. vivax*. Cada paciente de Porto Velho/RO teve entre 2 e 3 pontos de coleta de sangue anteriores ao da recidiva clínica submetidos ao controle molecular de cura, conforme indicado no APÊNDICE A.

Para amplificação de *Pvr47*, foram utilizadas as respectivas sequências de iniciadores e sonda: 5'-TCCGCAGCTCACAAATGTTC-3' (senso), 5'-ACATGGGGATTCTAAGCCAATTTA-3' (anti-senso) e 5'-HEX-TCCGCGAGGGCTGCAA-MGB-3' (sonda). Já para *Pfr364*, as sequências de iniciadores e sonda foram: 5'-ACTCGCAATAACGCTGCAT-3' (senso), 5'-TTCCCTGCCCAAAAACGG-3' (anti-senso) e 5'-FAM-GGTGCCGGGGTTTCTACGC-MGB-3'.

As reações de amplificação de *Pvr47* foram realizadas em placas de 384 poços, para um volume total de 10 µL, utilizando 5 µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix 2x* (Thermo Fisher Scientific), 50 nM de iniciador senso, 900 nM de iniciador anti-senso, 250 nM de sonda e 2 µL de DNA. A amplificação de *Pf364* foi realizada nas mesmas condições, com exceção de iniciadores e sondas: 900 nM de iniciador senso, 300 nM de iniciador anti-senso e 150 nM de sonda. A termociclagem e detecção da fluorescência foi realizada utilizando o

equipamento *Viiia7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)*, disponível na Plataforma de PCR em Tempo Real do Instituto René Rachou. As condições da termociclagem obedeceram a seguinte configuração: 50 °C por 2 minutos e desnaturação inicial a 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 52 °C e 1 minuto a 60 °C. Finalizada a reação, os resultados foram analisados no *QuantStudio Real Time PCR software v1.3*.

4.5 Genotipagem dos isolados de *P. vivax* por PCR convencional

A genotipagem dos isolados de *P. vivax* foi realizada utilizando dois marcadores do gene codificante da proteína polimórfica MSP-1 (bloco 2 e 10) e os microssatélites MS2, MS6 e MS7, descritos pelo nosso grupo de pesquisa (REZENDE et al., 2010). Os marcadores encontram-se distribuídos pelos cromossomos 7, 3, 14 e 2, respectivamente, com baixo desequilíbrio de ligação entre eles (TABELA 2). O microssatélite MS2 possui repetições de dinucleotídeos (CA) enquanto MS6 e 7 possuem repetições de trinucleotídeos (TGA e TAA, respectivamente).

TABELA 2. Características dos microssatélites de *P. vivax* utilizados no estudo

Microssatélite	Cromossomo	Unidade repetitiva ¹	Varição de tamanho do fragmento (pb) ²	TOP HIT	Posição no genoma
MS2	3	CA12	290-312	Proteína hipotética	782947-783248
MS6	14	TGA19	194-298	Proteína hipotética	2835596-2835833
MS7	2	TAA22	349-388	Não codificadora	1552239-152633
MPS1b12	7	PUTAPORNTIP et al., 2002	352-460	Principal antígeno de superfície do estágio sanguíneo Pv200	1157742-1163137
MSP1b10	7	PUTAPORNTIP et al., 2002	226-329	Principal antígeno de superfície do estágio sanguíneo Pv200	1157742-1163137

¹Número de repetições em Sal-1, GenBank: AAKM00000000.1 (CARLTON et al., 2009); ²Varição do fragmento em REZENDE et al., 2010.

4.5.1 Amplificação e eletroforese capilar de microssatélites e blocos polimórficos de MSP-1 de *P. vivax*

A amplificação dos marcadores pela técnica de PCR convencional foi realizada utilizando iniciador senso marcado com fluoresceína para posterior genotipagem por eletroforese capilar. As reações ocorreram em termocicladores *Veriti 96-well Thermal Cycler*

(*Thermo Fisher Scientific*) ou *T-100 Thermal Cycler (BioRad)*, equipamentos compatíveis com tubos de 0,2 mL específicos para PCR. O desempenho da reação nos dois equipamentos foi idêntico (dados não mostrados).

Todas as amplificações foram realizadas para volume final de 20 μ L na presença de 1,0 μ M de cada iniciador para MS6 e MS7 ou 0,5 μ M para MS2, 0,125 mM de dNTP, tampão 1x (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl, *Invitrogen*), 1,5 mM de MgCl₂ (*Invitrogen*), 0,05 U/ μ L de Taq DNA polimerase recombinante (*Invitrogen*) e 2 μ L de DNA. A termociclagem ocorreu em 40 ciclos, após desnaturação por 2 minutos à 94 °C, nas seguintes condições: 94 °C por 30 segundos, 58,6 °C para MS6 e 60,0°C para MS2 e MS7 por 20 segundos (anelamento), e 72 °C por 30 segundos (extensão), finalizando com um ciclo de 2 minutos à 72 °C (TABELA 3).

As amplificações dos blocos 2 e 10 da proteína MSP-1 foram realizadas utilizando a técnica de nested-PCR. A primeira etapa foi realizada para volume final de 10 μ L, na presença de 0,5 μ M de cada iniciador, 0,125 mM de dNTP, tampão 1x (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl, *Invitrogen*), 0,75 mM de MgCl₂, 0,1 U/ μ L de Taq DNA polimerase recombinante (*Invitrogen*) e 2 μ L de DNA. A termociclagem da primeira etapa ocorreu em 30 ciclos, após abertura da fita de DNA a 94°C por 4 minutos, nas seguintes condições: 94 °C por 1 minuto, 55 °C para MSP1bl2 e 63 °C para MSP1bl10 por 1 minutos (anelamento), 72 °C por 30 segundos (extensão), finalizando com um único ciclo de 5 minutos a 72 °C. A segunda etapa foi realizada para volume final de 20 μ L, na presença de 0,5 μ M de cada iniciador, 0,125 mM de dNTP, tampão 1x (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl, *Invitrogen*), 3,0 mM de MgCl₂, 0,075 U/ μ L de Taq DNA polimerase recombinantes (*Invitrogen*) e 1 μ L de DNA da primeira reação diluído 1:50 e 1:500 v/v para MSP1bl2 e MSP1bl10, respectivamente. Essa diluição do DNA amplificado se faz importante para reduzir a formação de produtos inespecíficos durante a segunda etapa da amplificação. A termociclagem da segunda etapa ocorreu em 37 ciclos, após abertura da fita de DNA a 94°C por 4 minutos, nas seguintes condições: 94 °C por 40 segundos, 63 °C para MSP1bl2 e 60 °C para MSP1bl10 por 30 segundos (anelamento), 72 °C por 30 segundos (extensão), finalizando com um único ciclo de 5 minutos a 72 °C.

O resultado de todas as reações foi visualizado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio 5% v/v.

TABELA 3. Iniciadores e condições de amplificação dos microssatélites e blocos polimórficos de MSP-1 de *P. vivax*

Marcador	Iniciador senso (5'-3')	Iniciador anti-senso (5'-3')	TM (°C)	[MgCl ₂] mM
MS2	CATCATTTGGGTAAGTCGGG	GCAGCCACAAAATCAACACC	60	1,5
MS6	ACACATTTGACACAGTTCC	ATGCCCTGGTCCCTACAA	58,6	1,5
MS7	GTATTCCCCGCTTGTCC	CTTCTCCGTTCTTATTCT	56	1,5
MSP1b12 externo	TATGATTTGTTGAGGGCGAAGC	TGCTTCCATCATCTGGATTTTGC	55	0,75
MSP1b12 interno	GACGATATTGGAAAATTGGA	CTCCTTCAGCACTTTCACGCGCTT	63	3
MSP1b110 externo	GGAGAACATAAGCTACCTGTCC	GTTGTACTTGGTCTTCTCTCC	63	0,75
MSP1b110 interno	CAAGCCTACCAAGAATTGATCCCCAA	ATTACTTTGTCGTAGTCTCGGCGTAGTCC	60	3

Fonte: KOEPFLI et al., 2009; REZENDE et al., 2010.

Posteriormente, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese capilar, em sequenciador automático *ABI 3730 (Life Technologies)* disponível na Plataforma de Sequenciamento do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas (RPT01E), para resolução do tamanho exato dos fragmentos, o que não é possível de verificar com precisão em gel de agarose. Os produtos amplificados foram adicionados em duplicata em placas de 96 poços (*MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate with Barcode, Life Technologies*), juntamente com 0,3 µL de padrão de peso molecular *GeneScan 500 LIZ dye Size Standard (Thermo Fisher Scientific®)* e quantidade suficiente para 10 µL de formamida Hi-Di (*Thermo Fisher Scientific®*). Após a separação das amostras, os resultados foram compilados e analisados utilizando o programa *GeneMapper 4.1v*.

A comparação da similaridade genética entre os diferentes isolados permite classificar os parasitos em: geneticamente idênticos ou homólogos (5 marcadores de mesmo tamanho), similares (4 marcadores de mesmo tamanho) e geneticamente diferentes ou heterólogos (≤ 3 marcadores de mesmo tamanho). Sabe-se que o parasito em sua fase eritrocítica é haploide, portanto, a presença de mais de um pico no eletroferograma de uma mesma amostra evidencia uma infecção múltipla. Na presença de dois ou mais picos, aquele com maior nível de fluorescência foi considerado como alelo predominante. O *cut off* mínimo considerado para a altura dos picos foi de 150 unidades de fluorescência arbitrária (rFu), conforme descreveu Araújo e colaboradores (2012), mas só foram considerados picos com mais de ¼ do tamanho do pico predominante.

4.6 Inferência da atividade fenotípica de CYP2D6 por PCR em tempo real (qPCR)

A atividade enzimática correspondente de cada alelo de *CYP2D6* é determinada ou predita em experimentos *in vivo* e *in vitro* e as informações específicas de cada variante genética já descrita são compiladas na plataforma de dados PharmVar, disponível em: <<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>>. Os polimorfismos de *CYP2D6* aqui estudados foram escolhidos previamente por Silvino e colaboradores (2016; 2019) após revisão da literatura sobre polimorfismos de base única (SNPs), deleções e/ou duplicações com repercussões funcionais importantes e, também, frequentes na população brasileira.

4.6.1 Amplificação dos polimorfismos de CYP2D6 e CYP2C8

Oito SNPs de *CYP2D6* (C-1584G [rs1080985], C100T [rs1065852], C1023T [rs28371706], G1846A [rs3892097], C2850T [rs16947], G2988A [rs28371725], G3183A [rs59421388], G4180C [rs1135840], e uma deleção 2615_2617delAAG [rs5030656]) e dois SNPs de *CYP2C8* (A805T [rs11572080] e G416A [rs1157103]), foram genotipados por PCR em tempo real (qPCR) utilizando sondas de hidrólise específicas para cada polimorfismo (*TaqMan SNP Genotyping Assay, Thermo Fisher Scientific*), cuja sequências são determinadas de acordo com as variantes genéticas descritas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

As reações de amplificação foram realizadas em placas de 384 poços, para um volume total de 5 µL, utilizando 2,5 µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific)*, 0,25 µL de *TaqMan SNP Genotyping Assay (Thermo Fisher Scientific)*, 1,25 µL de água ultrapura livre de nucleases, e 1 µL de DNA alvo diluído 1:5 v/v (aproximadamente 1 ng/µL). A diluição das amostras de DNA reduz os níveis de contaminantes com potencial capacidade de inibição da reação e favorece a amplificação do alvo. Em todos os experimentos foram incluídas amostras controle conhecidamente homocigotas e heterocigotas para cada SNP, além de controles negativos compostos somente por água ultrapura no lugar do DNA.

A termociclagem e detecção da fluorescência foi realizada utilizando o equipamento *Vii7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)*, disponível na Plataforma de PCR em Tempo Real do Instituto René Rachou. As condições da termociclagem obedeceram a

seguinte configuração: desnaturação inicial a 95 °C durante 10 min, 50 ciclos de 15 segundos a 92°C e 90 segundos a 60 °C. Finalizada a reação, os resultados foram analisados no *QuantStudio Real Time PCR software v1.3*.

4.6.2 Determinação do número de cópias de *CYP2D6*

O número de cópias do gene *CYP2D6* foi determinado por qPCR utilizando o ensaio Hs00010001_cn (*Applied Biosystems*) para avaliação de deleção/duplicação do gene. O número de cópias do gene alvo (*CYP2D6*) foi comparado com um gene de referência (*RNAse P*), já descrito por não ser polimórfico para duplicações e deleções. Todas as reações de amplificação foram realizadas para volume final de 10 µL, na presença de 0,5 µL do ensaio Hs00010001_cn, 5,0 µL de *Universal PCR Master Mix 2x* (*Thermo Fisher Scientific*), 0,5 µL *Copy Number Assay* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), 3 µL de água ultrapura livre de nucleases e 1 µL de DNA diluído 1:5 v/v (aproximadamente 1 ng/µL). As reações, em triplicata, foram realizadas em placa de 384 poços. A amplificação e detecção da fluorescência foi realizada no equipamento *ViiA7 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*) da Plataforma de PCR em Tempo Real do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas (RPT09D), utilizando a seguinte termociclagem: 95 °C por 10 minutos seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 60 segundos. Finalizada a reação, os resultados foram analisados no *QuantStudio Real Time PCR software v1.3*.

A predição do número de cópias foi realizada através do *CopyCaller® Software v.2.1*, capaz de calcular os intervalos de confiança e *z-score* absoluto para cada amostra. Somente resultados das triplicatas com valores de confiança superiores a 95% e *z-score* absolutos (estimativa de desvio para a métrica do intervalo de confiança) < 1,75 foram considerados.

4.6.3 Predição dos haplótipos e classificação dos fenótipos de *CYP2D6*

A inferência fenotípica da enzima *CYP2D6* foi realizada através do software *PHASE v2.1*, utilizando os dados de genótipo obtidos após procedimento descrito no item 4.6.1. O algoritmo foi executado três vezes com 50.000 etapas de *burn-in*, seguidas por 400.000 interações e um intervalo de 1.000 iterações. Os haplótipos gerados pelo *PHASE* foram comparados aos haplótipos de *CYP2D6* derivados da base de dados *Pharmaceutical Variation Consortium (PharmVar)* (GAEDIGK et al., 2018) (TABELA 4), o que permite

identificar o alelo correspondente. Os haplótipos sem alelos correspondentes no *PharmVar* foram designados como indeterminados.

TABELA 4. Haplótipos de CYP2D6 preditos por comparação aos disponíveis no banco de dados *PharmVar*

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

xN, número de cópias do alelo >2.

Para classificação dos fenótipos de CYP2D6, foi utilizado o Sistema de Pontuação de Alelos (*Activity Score System – AS*), critério recomendado pelo *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC)*. O Sistema AS, descrito por Gaedigk e colaboradores (2008), funciona como uma ferramenta de fácil aplicação para traduzir dados genotípicos para predição da atividade fenotípica de CYP2D6. Para sua aplicação, assume-se que ambos os alelos contribuem igualmente para determinar a atividade da enzima. Por conseguinte, a cada alelo é atribuído uma pontuação, variando de 0 a 2, de acordo com sua funcionalidade percebida a partir de ensaios *in vivo* e *in vitro*. Considera-se o valor de 1 ao alelo *1, que é referência de atividade totalmente funcional, e 0 aos alelos não funcionais. Alelos duplicados ou com multiplicações gênicas recebem o dobro do valor atribuído àquele de cópia única. Por fim, alelos de atividade reduzida recebem valor de 0,5, correspondendo aos níveis de redução de atividade da enzima. Assim, a soma dos valores atribuídos a cada alelo forma o valor de AS, que prediz a atividade fenotípica de CYP2D6.

Resumidamente, as pontuações atribuídas para cada funcionalidade alélica são: 0 para alelos não funcionais (*4, *4xN, *5); 0,5 para alelos de função reduzida (*10, *17, *29, *41); 1 para alelos funcionais (*2, *35); e 2 para alelos de função aumentada (*1xN, *2xN, *35xN)

(TABELA 5). A soma dos valores dos alelos inferidos dá origem a cinco grupos AS, que classifica os indivíduos em: metabolizadores genéticos nulos (gPM, AS=0), intermediários/reduzidos (gIM, AS=0,5), normais (gNM, $1 \leq AS \leq 2$) e ultrarrápidos (gUM, AS>2). É importante ressaltar que indivíduos considerados como metabolizadores genéticos normais apresentam extensa variação em seu metabolismo, podendo apresentar atividade enzimática similar a de indivíduos gIM. Em vista disso, indivíduos com AS=1 foram distinguidos como gNM-*slow* (gNM-S) enquanto indivíduos com AS=1,5 e AS=2 foram classificados como gNM-*fast* (gNM-F) (GAEDIGK et al., 2008).

TABELA 5. Sistema de Pontuação de Atividade de CYP2D6 (*Activity Score System*)

Pontuação atribuída aos alelos (AS)	Alelos	Atividade enzimática	Fenótipo predito ¹
0	*4, *4xN, *5	Nula	gPM
0,5	*10, *17, *29, *41	Reduzida	gIM
1	*1, *2, *35	Normal	gNM-S
2	*1xN, *2xN, *35xN	Aumentada	gNM-F
ND	*34	Indeterminada	gUM

¹Fenótipo predito após a soma da pontuação atribuída a cada alelo do indivíduo.

FONTE: GAEDIGK et al., 2007, adaptado.

4.7 Estimativa do número de cópias dos genes *pvmdr-1* e *pvcr-t-o*

Os isolados de *P. vivax* do dia 0 e da recidiva clínica dos 35 pacientes incluídos neste estudo foram submetidos à qPCR para estimativa do número de cópias dos genes *pvmdr-1* e *pvcr-t-o*, considerando o gene constitutivo *β -tubulin* de *P. vivax* como controle endógeno (normalizador). Uma amostra de campo contendo isolado de *P. vivax* com cópia única dos genes alvos, caracterizada por nosso grupo de pesquisa e publicadas por Costa e colaboradores (2017) e por Silva e colaboradores (2018), foi utilizada como amostra calibradora. As reações demandaram a utilização de iniciadores específicos para cada gene (TABELA 6), o que requereu otimização prévia das concentrações dos mesmos, bem como avaliação da eficiência dos protocolos através de curva-padrão.

TABELA 6. Sequência de iniciadores senso e anti-senso para protocolo de qPCR CNV *pvmdr-1* e *pvcr-t-o*

Gene	Sequência senso e anti-senso	Fragmento
<i>pvmdr-1</i> (IMWONG et al., 2008)	5' CAG CCT GAA AGA TTT AGA AGC CTT 3' 5' CGG CTG TTG GAA TCA CTT TGA 3'	78 pb
<i>pvcr-t-o</i> (SILVA et al., 2018)	5' AAC GCA GGA GGA GAA TTC CA 3' 5' GGG TCG CCA AAT CCT ACA ATC 3'	72 pb
<i>pvtubulin</i> (PVP01_0205700)	5' CAT GTT CGT TAA GAT TTC CTG GT 3' 5' GTT AGT GGT GCA AAA CCA ATC A 3'	112 pb

Primeiramente, os iniciadores foram testados nas concentrações de 50 nM, 300 nM e 900 nM, combinadas entre si, utilizando DNA de *P. vivax* isolado de paciente infectado. Verificadas as melhores concentrações dos iniciadores para amplificação de cada gene, plasmídeos disponíveis no Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular e Imunologia da Malária (*pvcr-t-o*+pGEM-T Easy, *pvmdr-1*+pGEM-T Easy e *pvtubulin*+pGEM-T Easy), previamente usados para transformar bactérias *Escherichia coli* TOP10 competentes e purificados com o kit *QIAprep Miniprep* (*QIAGEN*), foram linearizados com a enzima de restrição *ApaI*, a 37 °C por 3 horas, e dosados em *Qubit 2.0 Fluorometer* (*Life Technologies*). O número de moléculas de cada plasmídeo foi estimado e as diluições seriadas dos DNAs plasmidiais foram preparadas para construção de curva-padrão contendo 6 pontos, com concentração variando de $4,5 \times 10^6$ a $4,5 \times 10^1$ cópias/ μ L.

As reações foram realizadas em placas de 384 poços no equipamento *Vii7 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystem*), disponível na Plataforma de PCR em Tempo Real do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas (RPT09D). As amplificações de cada ponto foram realizadas em triplicata para um volume final de 10 μ L na presença de: 5 μ L de *GoTaq qPCR Master Mix 2x* (*PROMEGA*), 1 μ L de DNA plasmidial e 900 nM de cada iniciador. Os parâmetros de ciclagem para a qPCR foram: 50 °C por 2 minutos seguidos de desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C. Posteriormente, as curvas de dissociação foram observadas através da avaliação da fluorescência por temperatura, através do *software QuantStudio Real Time PCR software v1.3*.

Após avaliação da eficiência das reações, as configurações supracitadas foram mantidas para avaliação dos isolados do parasito, utilizando amostras extraídas conforme descritas no item 4.3. As reações procederam utilizando as mesmas condições descritas no parágrafo

acima, bem como 10 ng/uL de DNA (aproximadamente 1-2 μ L de amostra extraída). As análises procederam pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$, considerando nas análises somente ampliações com Cq (ciclo de quantificação, número do ciclo da reação no qual a fluorescência gerada supera o limiar de fluorescência) inferior a 32 e desvio padrão de Cq entre as triplicatas inferior a 0,3. Por definição, considera-se amplificação gênica quando o número de cópias mínimo estimado, representado pelo valor de RQ_{min} (quantidade relativa do alvo, $2^{-[RQ - \text{desvio padrão}]}$), for maior que 1,5.

4.8 Análises estatísticas

A correlação entre variáveis quantitativas (“idade” e “tempo de recidiva”) foram realizadas pelo Teste de Correlação de Spearman. Para comparações de distribuições não paramétricas, incluindo entre dados categóricos e quantitativos, foram utilizados os testes Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, teste exato de Fisher ou qui-quadrado. O tempo até a primeira recidiva de malária por grupo de tratamento foi estimado com a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier e comparado com o Teste de Log-rank. Todas essas análises foram realizadas usando o *software GraphPad Prism v7*.

Heterozigosidade esperada (H_E), definida como a probabilidade de um par de alelos obtidos aleatoriamente da população ser distinto entre si, e a inferência dos haplótipos dos alelos identificados a partir dos dados de microssatélite foram realizadas utilizando o *software Arlequin v3.0*. Já a diversidade genética dos parasitos da infecção primária e da recidiva foi comparada pelo mesmo *software* utilizando a análise de variância molecular (AMOVA).

5 RESULTADOS

5.1 Características dos pacientes incluídos no estudo

Para realização deste estudo, foram utilizadas amostras de indivíduos recrutados para comporem um estudo prospectivo de acompanhamento de eficácia e segurança de tratamentos combinados com derivados de artemisinina para malária não complicada causada por *P. vivax*, que apresentaram recidiva clínica durante o período de acompanhamento (63 dias). O estudo de fase II/III, coordenado pelo Dr. André Daher, representante do Instituto de Tecnologia em Fármacos Farmanguinhos, teve início em agosto de 2012 (data de inclusão do primeiro paciente) e foi finalizado em abril de 2015 (data do término do acompanhamento do último paciente), totalizando 264 pacientes recrutados (TABELA 7). Destes, 35 pacientes apresentaram recidiva clínica, caracterizada pelo retorno dos sintomas clínicos e parasitemia detectável por microscopia óptica, após administração do tratamento no intervalo de acompanhamento, os quais foram aqui incluídos.

TABELA 7. Características dos pacientes incluídos no estudo de avaliação de eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados de artemisinina para malária não complicada causada por *P. vivax* (recidiva vs. sem recidiva)

Características	CQ+PQ		AM+PQ		AL+PQ		Total	
	Recidiva (n=10)	Sem recidiva (n=78)	Recidiva (n=12)	Sem recidiva (n=76)	Recidiva (n=13)	Sem recidiva (n=75)	Recidiva (n=35)	Sem recidiva (n=229)
Idade, anos ^{1,2} (intervalo)	43 (26-61)	42 (20-65)	39 (21-50)	39 (20-66)	25 (20-64)	37 (18-64)	34 (20-64)	39 (18-66)
Gênero, homem:mulher	4:1	2,9:1	1,4:1	1,8:1	2,25:1	2,75:1	2,2:1	2,4:1
Local de recrutamento								
FMT, n (%)	1 (10)	21 (27)	3 (25)	19 (25)	3 (23)	19 (25)	7 (20)	59 (26)
CEPEM, n(%)	9 (90)	57 (73)	9 (75)	57 (75)	10 (77)	56 (75)	28 (80)	170 (74)
Tempo de recidiva, dias ^{1,3} (intervalo)	49 (37-63)	.	58 (47-63)	.	57 (21-63)	.	56 (21-63)	.

¹Mediana. ²*p-value* = 0,167, teste Mann-Whitney para comparação entre “recidiva” e “sem recidiva”; ³ *p-value* = 0,495, teste Kruskal-Wallis para comparação entre grupos de tratamento.

Dentre os 35 pacientes, 10 foram tratados com os antimaláricos convencionais para tratamento de malária não complicada, cloroquina e primaquina (CQ+PQ), e 25 receberam tratamento combinado com derivados de artemisinina, sendo que em 12 deles foi administrado artesunato e mefloquina (AM+PQ) e os 13 restantes receberam arteméter e lumefantrina (AL+PQ). O tratamento com PQ foi administrado para todos os indivíduos.

A mediana do tempo de recidiva por grupo de tratamento foi similar, próximo a 56 dias (49 dias em CQ+PQ, 58 dias em AM+PQ e 56 dias em AL+PQ, $p\text{-value} = 0,495$, teste Krustal-Wallis) (TABELA 7 e FIGURA 8). Curiosamente, recidivas anteriores a 28 dias foram observadas em apenas 3 indivíduos, todos tratados com AL+PQ. Não houve correlação entre tempo de recidiva e idade ($\rho = 0,037$, $p\text{-value} = 0,834$, correlação de Spearman), e também não houve diferença estatisticamente significativa entre as medianas de tempo de recidiva por gênero (61 e 56, respectivamente, medianas dos grupos feminino e masculino, $p\text{-value} = 0,055$).

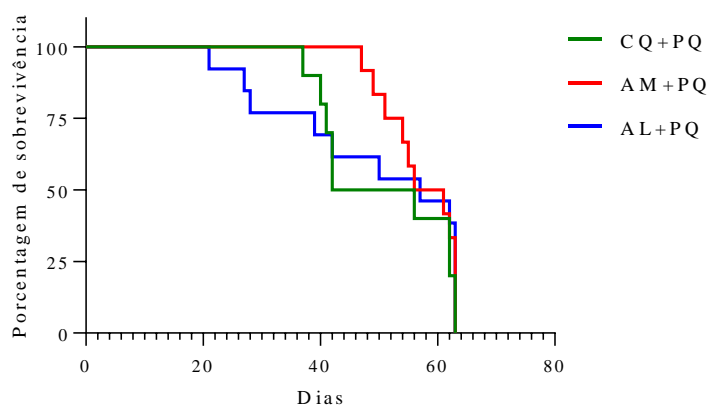


FIGURA 8. Curva Kaplan-Meier para o efeito do tratamento antimalárico no tempo de recidiva da infecção por *P. vivax*. O tempo mediano para o episódio de recidiva de malária por *P. vivax* foi de 49 dias (95% IC, 37 – 63 dias) para pacientes tratados com os antimaláricos convencionais (CQ+PQ), 58 dias (95% IC, 47 – 63 dias) para indivíduos tratados com AM+PQ e 57 dias (95% IC, 21 – 63 dias) para AL+PQ, $p\text{-value} = 0,682$, Teste de Log-rank.

5.2 Detecção precoce de *P. vivax* por protocolo molecular

Com o objetivo de identificar se o DNA de *P. vivax* é detectável molecularmente antes do reaparecimento dos sintomas clínicos, considerado o momento da recidiva, foi realizado o diagnóstico por qPCR em amostras de DNA extraídas de sangue coletado nos pontos de controle de cura (dias 7, 14, 21, 28 e 42) para os 27 pacientes de Porto Velho/RO. Cada paciente teve, no mínimo, 2 pontos anteriores ao da recidiva testados para detecção do DNA do parasito. Um aspecto importante que deve ser destacado é que nesta análise foi considerado qualquer valor de Cq na qPCR e a maioria deles foi acima de 36 ciclos (APÊNDICE A).

Ao todo, 10 de 27 indivíduos testados (37%) apresentaram DNA de *P. vivax* detectável no sangue antes da recidiva clínica, definido aqui como infecção submicroscópica

assintomática, sendo 3 de 9 (33%) pacientes que receberam CQ+PQ, 4 de 8 (50%) tratados com AM+PQ e 3 de 10 (30%) dos pacientes tratados com AL+PQ (FIGURA 9, APÊNDICE C).

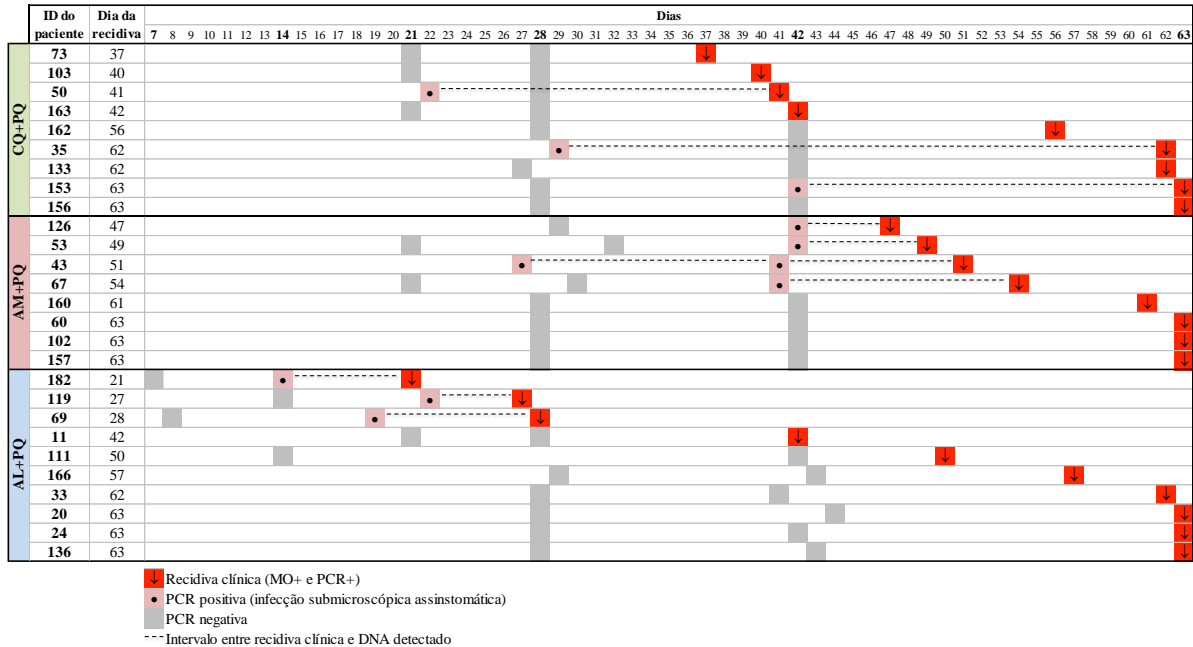


FIGURA 9. Representação esquemática dos intervalos entre as recidivas submicroscópicas assintomáticas e clínicas. Os indivíduos de Porto Velho/RO (n=27) aparecem agrupados por grupo de tratamento (CQ+PQ em verde, AM+PQ em vermelho, AL+PQ em azul), em ordem crescente entre o dia de recrutamento (d0) e o dia da recidiva clínica. A linha do tempo na parte superior do quadro compreende o tempo de acompanhamento dos indivíduos (máximo de 63 dias). Quadrados em cinza indicam PCR negativa. Quadrados contendo um ponto escuro indicam recidiva submicroscópica detectada por PCR. Quadrados em vermelho contendo uma seta indicam a recidiva clínica detectada tanto por microscopia óptica quanto por PCR.

Entre os pacientes do grupo tratado com CQ+PQ, dois deles apresentaram infecção submicroscópica assintomática, caracterizada por DNA detectável por qPCR, no dia 22 e 29, sendo que um deles desenvolveu recidiva clínica no dia 41 e o outro no dia 62, respectivamente. Nos pontos anteriores à recidiva clínica desses indivíduos a presença do parasito não foi detectada por qPCR. Em um terceiro paciente, com recidiva clínica no dia 63, infecção submicroscópica assintomática foi identificada no dia 42. No grupo AM+PQ, 4 pacientes apresentaram DNA de *P. vivax* nos dias 41 ou 42, sendo que um destes também apresentou infecção submicroscópica assintomática no dia 27. É importante destacar que todos os pacientes incluídos nesse grupo apresentaram recidiva clínica após o dia 46. No grupo tratado com AL+PQ, os 3 pacientes que apresentaram recidivas anteriores ou iguais a 28 dias tiveram DNA do parasito detectado nos dias 14, 22 e 19, sendo esse intervalo, respectivamente, 7, 5 e 9 dias antes da recidiva clínica.

5.3 Classificação das recidivas em recrudescência ou recaída

Considerando as infecções submicroscópicas assintomáticas identificadas nos pacientes de Porto Velho/RO (n=27) pelo controle molecular de cura, em conjunto às recidivas clínicas dos pacientes de Manaus/AM (n=8), a recidiva dos pacientes foi reclassificada em recrudescência ou recaída, considerando a detecção de infecção submicroscópica assintomática ou recidiva clínica em dois momentos: ≤ 28 ou ≤ 42 dias (FIGURA 10, APÊNDICE C). Não há um consenso do período em que uma recidiva pode ser considerada como recrudescência em tratamentos com mefloquina ou lumefantrina, por isso, foi considerado o tempo de meia-vida dos fármacos para utilização dos critérios de 28 e 42 dias. Pacientes tratados com mefloquina foram incluídos nessas análises visto que o tempo de meia-vida da droga (33 dias) é próximo dos critérios de 28 e 42 dias. Essas análises não foram expandidas para pacientes tratados com lumefantrina pois o tempo médio de meia vida é de até 6 dias, acentuadamente inferior ao critério de 28 dias.

A princípio, o controle de cura molecular permitiu identificar somente três pacientes com recrudescência submicroscópica assintomática anterior a 28 dias (consideramos também o dia 29 de um paciente), sendo dois tratados com CQ+PQ e outro com AM+PQ. No entanto, não foi detectado o DNA do parasito no ponto subsequente à recrudescência submicroscópica desses indivíduos, que vieram a apresentar recidiva clínica no dia 41 e 62, respectivamente. Diante disso, somente a recidiva do paciente tratado com AM+PQ foi classificada como recrudescência considerando o critério de 28 dias, enquanto as demais foram incluídas como recaídas.

Considerando como critério de recrudescência as recidivas clínicas que ocorreram até 42 dias após o tratamento, 50% (5 em 10 pacientes) dos indivíduos tratados com CQ+PQ apresentaram recrudescência clínica confirmada por microscopia óptica. Além destes, outro paciente deste grupo apresentou detecção de DNA do parasito no dia 42, permitindo identificar, assim, 6 em 10 pacientes com recrudescência. No grupo tratado com AM+PQ nenhum paciente apresentou recidiva clínica anterior ao dia 42, mas 4 tiveram infecção submicroscópica identificada pela qPCR antes deste dia. Assim, a detecção molecular do parasito permitiu reclassificar as recidivas e identificar proporções maiores de recrudescência em ambos os grupos, nos quais somente o critério clínico não foi suficiente para identificá-las. A utilização do critério de 42 dias juntamente com a detecção molecular permitiu aumentar de

5 para 6 episódios (aumento de 10%) de recrudescência no grupo CQ+PQ e de zero para 4 no grupo AM+PQ (aumento de 33%). As demais recidivas foram classificadas como recaídas da infecção por *P. vivax*.

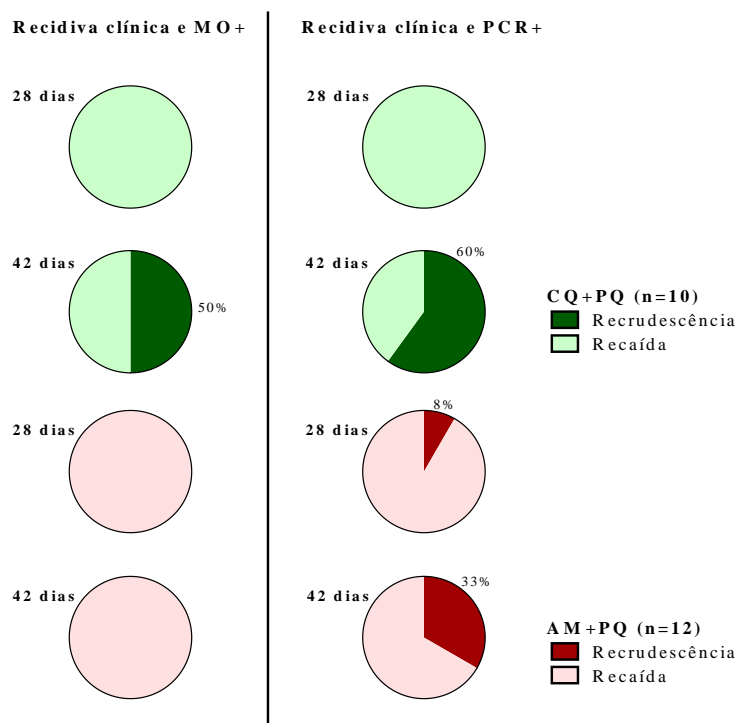


FIGURA 10. Proporções de recrudescências e recaídas identificadas considerando os critérios de 28 e 42 dias por grupo de tratamento. À esquerda, a recidiva clínica dos indivíduos confirmada por microscopia positiva anterior ao critério estabelecido (≤ 28 ou ≤ 42 dias) foi classificada como recrudescência. À direita, indivíduos com sintomas e microscopia positiva ou infecção submicroscópica assintomática (qPCR positiva subsequente a recidiva clínica) anterior ao critério estabelecido (≤ 28 ou ≤ 42 dias) apresentaram recidiva classificada como recrudescência. Infecção submicroscópica assintomática identificada no dia 29 foi incluída como dia 28 (paciente ID35).

5.4 Classificação molecular dos parasitos pareados em infecção primária/recidiva e avaliação de multiplicidade de infecção

Os isolados da infecção primária e da recidiva dos 35 indivíduos incluídos no presente estudo foram genotipados com sucesso para os três microssatélites e dois fragmentos polimórficos do gene codificador da proteína MSP-1, totalizando 70 isolados. O painel de 5 marcadores moleculares revelou uma alto nível de diversidade haplotípica (0.9818 ± 0.0056), sendo encontrados 42 haplótipos únicos e uma diversidade genética avaliada pelo índice de heterozigosidade esperada (H_E) que variou de 0,51 a 0,83 entre os loci (média = $0,71 \pm 0,13$) (TABELA 8). Somente a análise de H_E dos lócus polimórficos de MSP1b12 apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento (teste de AMOVA,

$p=0.005$). Nas infecções primárias e nas recidivas, o índice H_E foi similar, variando entre 0,44 e 0,83, para o primeiro grupo de isolados, e 0,58 e 0,84 para o segundo.

TABELA 8. Características dos microssatélites identificados: tamanho dos fragmentos, frequência alélica, total de alelos e heterozigosidade esperada (H_E)

Alelos	Frequência alélica por fragmento ¹ por locus (%)				
	MS2	MS6	MS7	MSP1b12	MSP1b10
1	292 (0,14)	200 (0,08)	340 (0,01)	381 (0,01)	223 (0,13)
2	294 (0,18)	209 (0,68)	343 (0,03)	392 (0,01)	233 (0,03)
3	298 (0,51)	224 (0,03)	349 (0,40)	397 (0,23)	237 (0,13)
4	300 (0,11)	230 (0,11)	352 (0,08)	405 (0,03)	242 (0,11)
5	302 (0,01)	233 (0,07)	355 (0,16)	408 (0,03)	249 (0,01)
6	312 (0,01)	257 (0,01)	358 (0,11)	409 (0,01)	255 (0,24)
7	342 (0,01)		361 (0,10)	410 (0,34)	264 (0,06)
8			385 (0,03)	414 (0,04)	290 (0,27)
9			388 (0,01)	426 (0,26)	327 (0,01)
10			390 (0,01)	NA (0,03)	
11			393 (0,01)		
12			427 (0,01)		
13			430 (0,01)		
Total de alelos²	7	6	13	9	9
Tamanho³	292-342	200-257	340-430	381-426	223-327
H_E	0,677	0,511	0,793	0,757	0,829

¹Tamanho dos fragmentos em pares de bases; ²Número de alelos identificados por locus; ³Intervalo de tamanho dos fragmentos amplificados por loci em pares de bases.

A análise dos alelos predominantes por loci possibilitou classificar o pareamento infecção primária/recidiva de acordo com a similaridade genética entre os parasitos isolados nestes dois momentos. Somente em dois isolados de pacientes distintos, sendo um isolado da infecção primária e outro da recidiva, não foi possível amplificar um dos marcadores. Por isso, a comparação entre os parasitos destes dois indivíduos foi realizada considerando os quatro marcadores restantes.

As frequências de parasitos idênticos (tamanho dos fragmentos idênticos entre os alelos predominantes da infecção primária e da recidiva), similares (1 alelo predominante de tamanho diferente) e heterólogos (2 ou mais alelos predominantes de tamanhos diferentes) foram representadas na TABELA 9 e no FIGURA 11. Parasitos idênticos e similares apareceram em maior frequência (92,3%) no grupo tratado com AL+PQ, conseqüentemente,

somente 7,7% das recidivas deste grupo correspondiam a parasitos heterólogos, entretanto as diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significativas.

TABELA 9. Frequência de recidivas idênticas, similares ou heterólogas em relação à infecção primária por grupo de tratamento

Grupo	Idênticas, (n)	Similares, (n)	Heterólogas, (n)
CQ+PQ	0,50 (5)	0,30 (3)	0,20 (2)
AM+PQ	0,66 (8)	0,17 (2)	0,17 (2)
AL+PQ	0,62 (8)	0,31 (4)	0,07 (1)
Total	0,60 (21)	0,26 (9)	0,14 (5)

Teste Qui-Quadrado comparando a frequência de recidivas por parasitos idênticos, similares e heterólogos entre os grupos, p -value = 0,824.

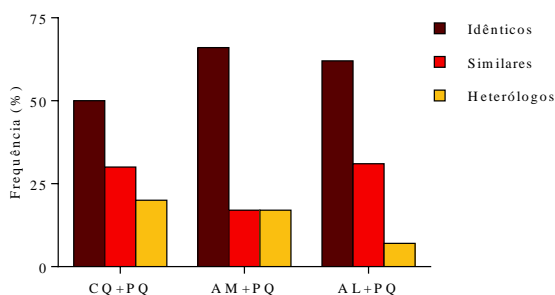


FIGURA 11. Frequência de parasitos idênticos, similares e heterólogos nos diferentes grupos de tratamento. Foram considerados idênticos os parasitos com alelos de mesmo tamanho em todos os loci estudados; similares os parasitos com alelos de tamanhos distintos em apenas 1 locus analisado; e heterólogos os parasitos que apresentaram tamanhos diferentes na genotipagem em mais de 1 locus estudado.

Especificamente em dois indivíduos tratados com CQ+PQ, que apresentaram infecção submicroscópica assintomática nos dias 22 e 29, a caracterização molecular dos parasitos no dia 41 e 62 da recidiva clínica foi heteróloga, entretanto, estes dois pacientes apresentaram um ponto do acompanhamento de cura negativo por qPCR entre a recidiva clínica (sintomas e MO+) e a falha parasitológica (qPCR+). O terceiro indivíduo desse grupo que apresentou recrudescência submicroscópica no dia 42 apresentou parasito classificado como similar na recidiva clínica. Entre os pacientes tratados com AM+PQ, que apresentaram recrudescência submicroscópica nos dias 41 e 42 (n=4), as recidivas foram classificadas como homólogas (3 de 4 indivíduos) ou similar (1 de 4 indivíduos), reforçando que a recidiva desses pacientes de fato se tratava de uma recrudescência.

Diante dessas observações, A caracterização molecular dos parasitos permitiu identificar ainda a alteração das proporções de parasitos idênticos, similares e heterólogos de acordo com a classificação da recidiva (recrudescência ou recaída). De fato, as recidivas

classificadas como recrudescências incluíram predominantemente parasitos idênticos e similares à infecção inicial nos grupos tratados com CQ+PQ e AM+PQ. (FIGURA 12).

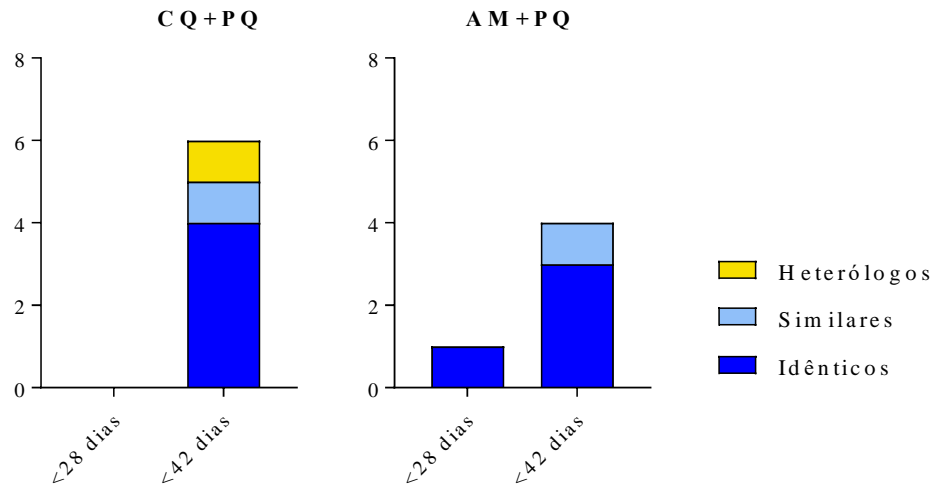


FIGURA 12. Caracterização molecular dos parasitos das recidivas clínicas classificadas enquanto recrudescência. A frequência (%) em cada barra indica a soma das frequências de parasitos idênticos e similares somente na recidiva clínica. A classificação em recrudescência ou recaída considerou a detecção molecular do parasito e a recidiva clínica confirmada por microscopia óptica positiva em dois momentos distintos (até 28 dias e até 42 dias), conforme descrito no item 5.3.

Em parte dos isolados, foi observado mais de um pico de fluorescência (com menor intensidade que o pico predominante) em pelo menos um loci, o que identifica a presença de mais de uma variante de *P. vivax* na infecção. A análise da complexidade das infecções correspondente à multiplicidade de variantes do parasito por episódio (2 ou mais picos de fluorescência em pelo menos um loci) evidenciou maior frequência de infecções múltiplas na recidiva (40%) e em 17% das infecções primárias (FIGURA 13). Infecções múltiplas não foram identificadas na infecção primária dos indivíduos tratados com CQ+PQ, porém metade deles desenvolveu recidiva clínica com 2 até 4 variantes. Cinco em 7 (42%) pacientes tratados com AM+PQ e 4 em 13 (31%) indivíduos do grupo AL+PQ desenvolveu recidiva clínica com 2 ou 3 variantes.

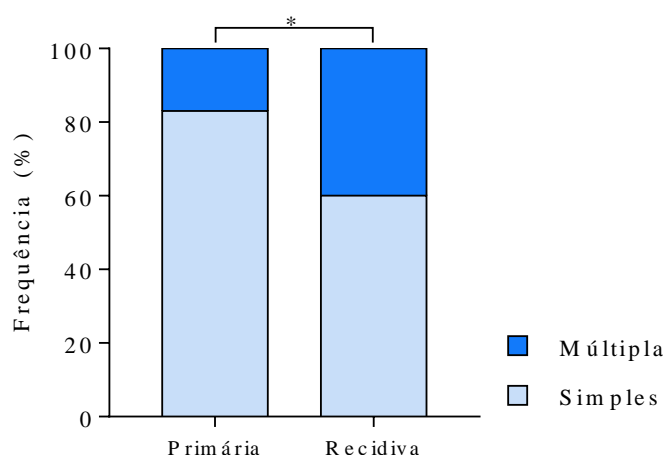


FIGURA 13. Frequência de variantes de *P. vivax* por episódio de infecção clínica. A detecção de dois ou mais alelos em um mesmo loci classificam a infecção como múltipla. **p-value* = 0,013, Teste Exato de Fisher.

5.5 Frequência dos alelos e fenótipos de *CYP2D6* e *CYP2C8*

Todos os indivíduos incluídos ($n=35$) no estudo foram genotipados para *CYP2D6* com sucesso. As frequências dos polimorfismos de *CYP2D6* estão apresentadas na TABELA 10. Os SNPs C2850T e G4180C (presentes em alelos com atividade nula, reduzida ou normal) foram observados com maior frequência entre todos os indivíduos, correspondendo a 80% e 60% do total de alelos, respectivamente. Os SNPs C-1584G, C100T e G1846A, determinantes de alelos com função nula ou reduzida da enzima, apresentaram, frequência de 54%, 40% e 31% do total de alelos, respectivamente (TABELA 10, APÊNDICE B). O SNP G3183A não foi identificado na população estudada. Não foram observadas diferenças significativas das frequências dos genótipos em nenhum locus analisado entre os grupos estudados.

Em relação à genotipagem de *CYP2C8*, foi identificado um único indivíduo homocigoto mutado para o SNP G416A, indicativo de atividade enzimática reduzida. Somado a este paciente, 4 dos 5 heterocigotos para o SNP G416A pertenciam ao grupo tratado com AM+PQ, e somente 1 foi tratado com CQ+PQ. Nenhum deles apresentou recidiva clínica ou submicroscópica anterior ao dia 28. Quanto ao SNP A805T, nenhum alelo mutado foi identificado na população de estudo (TABELA 11, APÊNDICE B).

TABELA 10. Frequência genotípica e alélica de CYP2D6, % (n° de indivíduos)

CYP2D6						
C-1584G	CC	CG	GG	CG+GG	p-value¹	G²
CQ+PQ	0,500 (5)	0,300 (3)	0,200 (2)	0,500 (5)	0,824	0,350
AM+PQ	0,667 (8)	0,167 (2)	0,167 (2)	0,334(4)		0,250
AL+PQ	0,615 (8)	0,308 (4)	0,077 (1)	0,384 (5)		0,231
Total	0,600 (21)	0,286 (9)	0,143 (5)	0,400 (14)		0,543
C100T	CC	TC	TT	TC+TT		T
CQ+PQ	0,900 (9)	0,100 (1)	.	0,100 (1)	0,232	0,050
AM+PQ	0,416 (5)	0,500 (6)	0,083 (1)	0,583 (7)		0,333
AL+PQ	0,615 (8)	0,384 (5)	.	0,384 (5)		0,192
Total	0,628 (22)	0,343 (12)	0,028 (1)	0,371 (13)		0,400
C1023T	CC	CT	TT	CT+TT		T
CQ+PQ	1,000 (10)	.	.	.	0,235	.
AM+PQ	1,000 (12)
AL+PQ	0,769 (10)	0,154 (2)	0,077 (1)	0,231 (3)		0,154
Total	0,914 (32)	0,057 (2)	0,028 (1)	0,086 (3)		0,114
G1846A	GG	GA	AA	GA+AA		A
CQ+PQ	0,900 (9)	0,100 (1)	.	0,100 (10)	0,398	0,050
AM+PQ	0,583 (7)	0,333 (4)	0,083 (1)	0,416 (5)		0,250
AL+PQ	0,692 (9)	0,308 (4)	.	0,308 (4)		0,154
Total	0,714 (25)	0,514 (18)	0,028 (1)	0,543 (19)		0,314
2615_2617delAAG	AA	CA	CC	CA+CC		C
CQ+PQ	1,000 (10)	.	.	.	NA	.
AM+PQ	0,083 (10)	0,167 (2)	.	0,167 (2)		0,083
AL+PQ	1,000 (13)
Total	0,943 (33)	0,057 (2)	.	0,057 (2)		0,057
C2850T	CC	TC	TT	TC+TT		T
CQ+PQ	0,400 (4)	0,300 (3)	0,300 (3)	0,600 (6)	0,923	0,450
AM+PQ	0,583 (7)	0,167 (2)	0,250 (3)	0,417 (5)		0,333
AL+PQ	0,461 (6)	0,231 (3)	0,308 (4)	0,538 (7)		0,423
Total	0,486 (17)	0,228 (8)	0,286 (10)	0,514 (18)		0,800
G2988A	GG	GA	AA	GA+AA		A
CQ+PQ	0,800 (8)	0,200 (2)	.	0,200 (2)	NA	0,100
AM+PQ	0,833 (10)	0,167 (2)	.	0,167 (2)		0,083
AL+PQ	0,846 (11)	0,154 (2)	.	0,154 (2)		0,077
Total	0,829 (29)	0,171 (6)	.	0,171 (6)		0,171
G3183A	GG	GA	AA	GA+AA		A
CQ+PQ	1,000 (10)	.	.	.	NA	.
AM+PQ	1,000 (12)
AL+PQ	1,000 (13)
Total	1,000 (35)
G4180C	GG	GC	CC	GC+CC		C
CQ+PQ	0,400 (4)	0,200 (2)	0,400 (4)	0,600 (6)	0,087	0,500
AM+PQ	.	0,667 (8)	0,333 (4)	1,000 (12)		0,667
AL+PQ	0,231 (3)	0,308 (4)	0,461 (6)	0,769 (10)		0,615
Total	0,200 (7)	0,400 (14)	0,400 (14)	0,800 (28)		0,600

¹Teste Qui-Quadrado (n=70), comparando a frequência genotípica (heterozigoto e homozigoto mutado *versus* não mutado) entre indivíduos tratados com CQ+PQ, AM+PQ e AL+PQ; ²Frequência de alelos mutados em um total de 70 alelos. NA, Não testado; Frequências iguais a 0 estão representadas por “.”.

TABELA 11. Frequência genotípica e alélica de *CYP2C8*, % (n)

CYP2C8						
G416A	GG	GA	AA	GA+AA	p-value	A
CQ+PQ	0,900 (9)	0,100 (1)	.	0,100 (1)	0,080	0,050
AM+PQ	0,583 (7)	0,333 (4)	0,083 (1)	0,417 (5)		0,250
AL+PQ	1,000 (13)
Total	0,823 (29)	0,143 (5)	0,028 (1)	0,171 (6)		0,100
A805T	AA	AT	TT	GA+AA		A
CQ+PQ	1,000 (10)	.	.	.	NA	.
AM+PQ	1,000 (12)
AL+PQ	1,000 (13)
Total	1,000 (35)

¹Teste Qui-Quadrado (n=70), comparando a frequência genotípica (heterozigoto e homozigoto mutado *versus* não mutado) entre indivíduos tratados com CQ+PQ, AM+PQ e AL+PQ; NA, Não testado; Frequências iguais a 0 estão representadas por “.”.

A inferência haplotípica de *CYP2D6* foi construída a partir das variantes polimórficas genotipadas e analisadas concomitantemente ao número de cópias gênicas, a fim de identificar potenciais alelos associados à função reduzida da enzima. Todavia, os resultados genotípicos de dois indivíduos impediram a identificação dos alelos correspondentes, uma vez que a combinação de nucleotídeos não correspondeu aos alelos de *CYP2D6* descritos no banco de dados *PharmVar*. Estes dois pacientes receberam tratamento com AL+PQ.

Quatro pacientes (11%) apresentaram amplificação gênica de *CYP2D6* (3 cópias), enquanto nenhum paciente foi identificado como homozigoto para deleção do gene. Foram identificados 10 haplótipos que permitiram caracterizar variantes alélicas distintas: *1, *2D, *9, *2A/*35, *17, *10, *41, *4 e *5 (deleção); bem como alelos duplicados: *35xN/*2xN e *4x2 (TABELA 12). Os alelos mais frequentes foram *1/*1xN (37,1%) e *2A/*35 (22,9%), que determinam atividade normal da enzima, enquanto alelos que levam ao aumento da função enzimática foi observada em apenas 1 cromossomo dentre os investigados. Interessantemente, houve maior frequência de alelos de função reduzida (reduzida ou nula) no grupo de pacientes tratados com AM+PQ (54,2%) em relação aos pacientes tratados com AL+PQ (30,8%) e CQ+PQ (15%) , sendo essa diferença estatisticamente significativa quando comparada com o grupo tratado com antimaláricos convencionais para *P. vivax* (*p-value* = 0,011, teste Exato de Fisher) (FIGURA 14).

TABELA 12. Frequência de alelos de *CYP2D6* observados nos 35 indivíduos que apresentaram recidiva clínica após tratamento com diferentes esquemas de antimaláricos

Atividade de <i>CYP2D6</i>	Alelos de <i>CYP2D6</i>	CQ+PQ, % (n)	AM+PQ, % (n)	AL+PQ, % (n)	Total, % (n)
Normal	*1/*1xN	50,0 (10)	25,0 (6)	38,5 (10)	37,1 (26)
Normal	*2D	.	.	3,8 (1)	1,4 (1)
Normal	*2A/*35	35,0 (7)	16,7 (4)	19,2 (5)	22,9 (16)
Aumentada	*2xN/ *35xN	.	4,2 (1)	.	1,4 (1)
Reduzida	*9	.	8,3 (2)	.	2,9 (2)
Reduzida	*10	.	8,3 (2)	3,8 (1)	4,3 (3)
Reduzida	*17	.	.	11,5 (3)	4,3 (3)
Reduzida	*41	10,0 (2)	8,3 (2)	7,7 (2)	8,6 (6)
Nula	*4/*4x2	5,0 (1)	25,0 (6)	7,7 (2)	12,9 (9)
Nula	*5	.	4,2 (1)	.	1,4 (1)
ND	Outros	.	.	7,7 (2)	2,9 (2)

n, número de cromossomos; n(CQ+PQ) = 20, n(AM+PQ) = 24, n(AL+PQ) = 26, n (Total) = 70. Frequência igual a zero está representada por “.”; ND, não determinado.

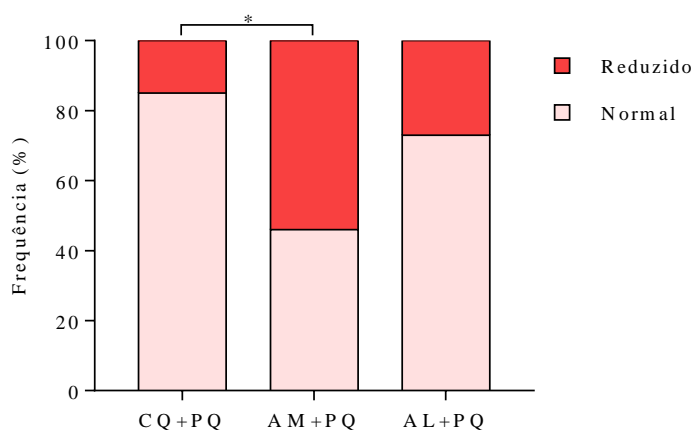


FIGURA 14. Frequência de alelos de *CYP2D6* por grupo de tratamento. Alelos de função reduzida incluem alelos de atividade reduzida ou nula, e alelos de função normal ou aumentada foram agrupados como alelos de função normal; CQ+PQ, cloroquina e primaquina; AM+PQ, artesunato, mefloquina e primaquina; AL+PQ, arteméter, lumefantrina e primaquina. **p-value* = 0,011, teste Exato de Fisher comparando CQ+PQ vs. AM+PQ.

Para verificar a relevância clínica das frequências alélicas de *CYP2D6*, os fenótipos da enzima foram preditos utilizando o sistema *Activity Score*, visto que somente a análise qualitativa dos alelos é insuficiente para prever a atividade fenotípica da enzima dos indivíduos. Entre os 35 pacientes do estudo, um único indivíduo (3%) foi predito como metabolizador ultrarrápido (gUM), este tratado com AM+PQ. Além disso, 23 pacientes (65,7%) foram preditos como metabolizadores normais (gNM-F) e 9 (25,7%) indivíduos com comprometimento da atividade de *CYP2D6*: metabolizador nulo (gPM; 1 indivíduo, 3%),

intermediário (gIM; 1 indivíduo, 3%) e atividade normal-reduzida (gNM-S; 7 indivíduos, 20%). Os haplótipos de dois indivíduos (5,7%) impediram a predição dos fenótipos da enzima.

Nas recidivas classificadas como recaídas após o dia 28, é importante destacar que a maior frequência de alelos de atividade enzimática reduzida no grupo tratado com AM+PQ refletiu em uma maior frequência de fenótipos preditos com atividade reduzida neste mesmo grupo (54% vs. 11% em CQ+PQ), embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa (FIGURA 15, $p\text{-value}=0,064$, teste Qui-Quadrado). As frequências dos fenótipos reduzidos de CYP2D6 permaneceram similares quando todos os episódios de recidiva foram considerados, ou seja, 1 paciente em 10 tratado com CQ+PQ e 6 em 12 tratados com AM+PQ. As proporções se alteram somente nas classificações das recaídas consideradas após 42 dias, registrando todos os indivíduos que receberam CQ+PQ como metabolizadores normais de CYP2D6 (4 indivíduos) e 38% (3 em 8) dos pacientes tratados com AM+PQ. No grupo tratado com AL+PQ, a frequência de fenótipo reduzido foi de 19% (2 em 11 indivíduos).

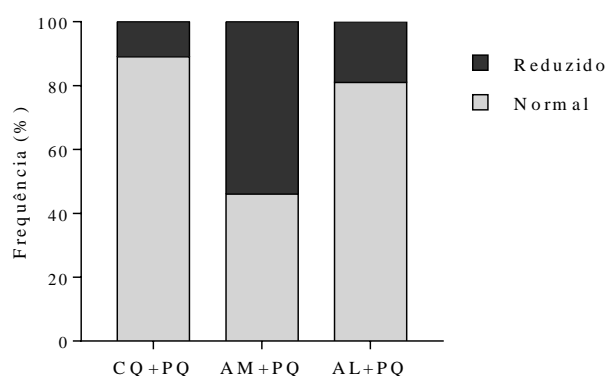


FIGURA 15. Frequência de fenótipos normais e reduzidos de CYP2D6 nas recaídas ≥ 28 dias por grupo de tratamento. Fenótipos de função reduzida incluem gPM, gIM e gNM-S, e fenótipos normais incluem gNM-F e gUM; CQ+PQ = 9 indivíduos; AM+PQ = 12 indivíduos; AL+PQ = 11 indivíduos; $p\text{-value} = 0,064$, teste Qui-Quadrado.

Explorando os dados de genotipagem dos parasitos da infecção primária e da recidiva e cruzando esses resultados com o fenótipo de CYP2D6, foi possível identificar que, embora a frequência de recidivas por parasitos idênticos e similares à infecção primária tenha sido semelhante entre os pacientes com fenótipo normal e reduzido de CYP2D6, (75 e 89%, respectivamente), houve uma frequência maior de parasitos idênticos nas recidivas dos pacientes com fenótipo reduzido da enzima (78% contra 50% nos pacientes com fenótipo normal) (FIGURA 16).

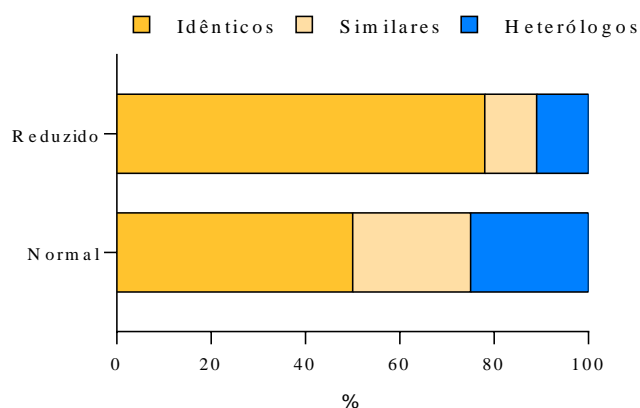


FIGURA 16. Frequência de recidivas por parasitos idênticos, similares e heterólogos à infecção primária em relação ao fenótipo predito de CYP2D6. Fenótipos de função reduzida incluem gPM, gIM e gNM-S (n=9), e fenótipos normais incluem gNM-F e gUM (n=24); Foram considerados idênticos os parasitos com alelos de mesmo tamanho em todos os loci estudados; similares os parasitos com alelos de tamanhos distintos em apenas 1 locus analisado e heterólogos os parasitos que apresentaram tamanhos diferentes na genotipagem em mais de 1 locus estudado. $p\text{-value} = 0,536$, Teste Qui-Quadrado.

5.6 Variação do número de cópias de *pvmdr-1* e *pvcrt-o*

5.6.1 Padronização de qPCR

Para caracterizar o número de cópias gênicas de *pvmdr-1* e *pvcrt-o* dos isolados de *P. vivax*, foi utilizada a técnica de PCR em tempo real adaptada do método de detecção por sondas (SILVA et al., 2018) para o método de *sybr green*. Inicialmente, foi necessário otimizar a concentração de iniciadores para os genes alvos e o gene normalizador (*pvtubulin*, codificante da β -tubulina de *P. vivax*, presente em única cópia no genoma do parasito), bem como verificar a eficiência das reações para cada gene a fim de determinar o método de análise a ser aplicado para as amostras.

A otimização de iniciadores permitiu identificar a concentração de 900 nM como concentração ótima dos iniciadores senso e anti-senso para amplificação dos três alvos, caracterizada pelo menor valor de Cq (ciclo da reação em que a intensidade de fluorescência ultrapassa a intensidade basal, chamada de *threshold*) e maior ΔRn (diferença entre o sinal de fluorescência máximo e o sinal de fluorescência basal do *reporter* normalizado).

Quanto à eficiência, a construção das curvas-padrão para *pvmdr-1*, *pvcrt-o* e *pvtubulin* permitiu identificar que as três reações possuem eficiência muito próxima, definida pelo valor de *slope* próximo a -3,32, sendo -3,19, -3,32 e -3,30 ($r^2 = 0,999$) respectivamente para cada gene, o que implica em eficiências de 105% para o primeiro alvo e 100% para dois restantes. Por definição, quando as reações para o gene alvo e para o gene normalizador apresentam

eficiência similar, próxima a 100%, aplica-se o método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) para inferir o número de cópias, tornando necessária a utilização de amostra referência, caracterizada como portadora de cópia única dos genes alvos.

5.6.2 Estimativa do número de cópias gênicas de *pvmdr-1* e *pvcrt-o* dos isolados da infecção primária e da recidiva

A caracterização do número de cópias de *pvmdr-1* e *pvcrt-o* ocorreu com sucesso em 64 isolados. Somente em um paciente, incluído no grupo tratado com AL+PQ, não foi possível estimar o número de cópias de ambos os genes tanto do isolado da infecção primária quanto da recidiva. Outros quatro isolados da recidiva de quatro indivíduos diferentes também não puderam ter o número de cópias gênicas de *pvmdr-1* e *pvcrt-o* estimado.

Dois pontos são importantes de serem destacados. Primeiramente, sendo haploide o parasito de fase sanguínea, na qual o DNA do parasito é isolado, considera-se amplificação gênica quando 2 ou mais cópias são estimadas. Além disso, uma estimativa acima de 1,5 cópias (RQ mínimo > 1,5) foi considerada como amplificação gênica. Considerando esses preceitos, apenas um isolado apresentou duas cópias de *pvmdr-1* (FIGURA 17), correspondente à infecção primária de paciente tratado com AM+PQ, enquanto os demais apresentaram cópia única tanto para *pvmdr-1* quanto para *pvcrt-o* (FIGURA 18).

Dentre os 42 haplótipos identificados pela caracterização por microssatélites, o parasito identificado com duas cópias de *pvmdr-1* corresponde ao haplótipo 26, único entre os 70 isolados, classificado como heterólogo em relação à recidiva do paciente. Os demais isolados, incluindo todos de pacientes tratados com antimaláricos convencionais, apresentaram cópia única para ambos os genes.

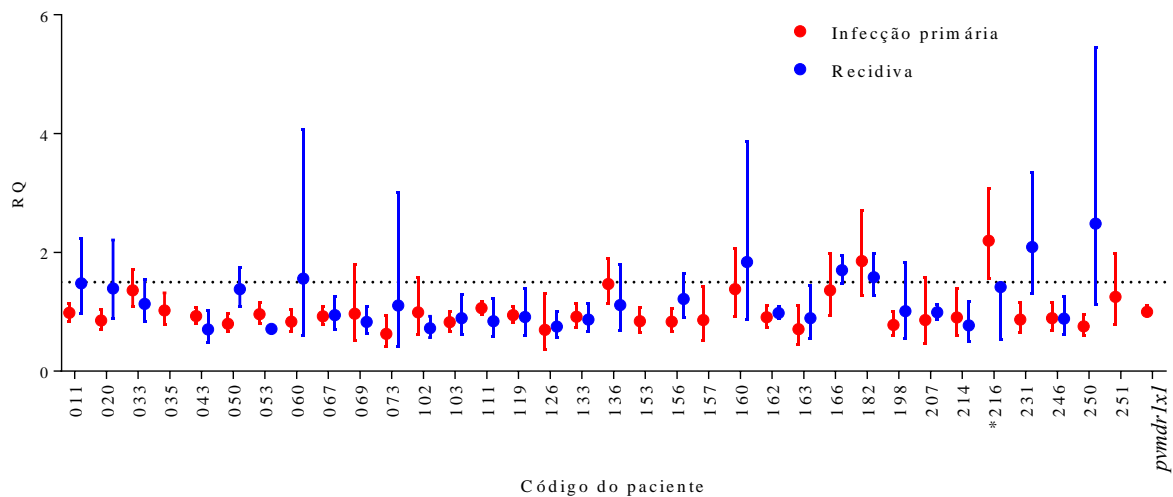


FIGURA 17. Variação do número de cópias de *pvmdr-1* nos isolados de infecção primária e recidiva clínica. *pvmdr1x1*, isolado de *P. vivax* previamente caracterizado como portador de cópia única de *pvmdr-1*. O asterisco indica amplificação estimada em duas cópias gênicas de *pvmdr-1* no isolado da infecção inicial do paciente. As barras indicam o desvio padrão da quantidade estimada do gene alvo após triplicata.

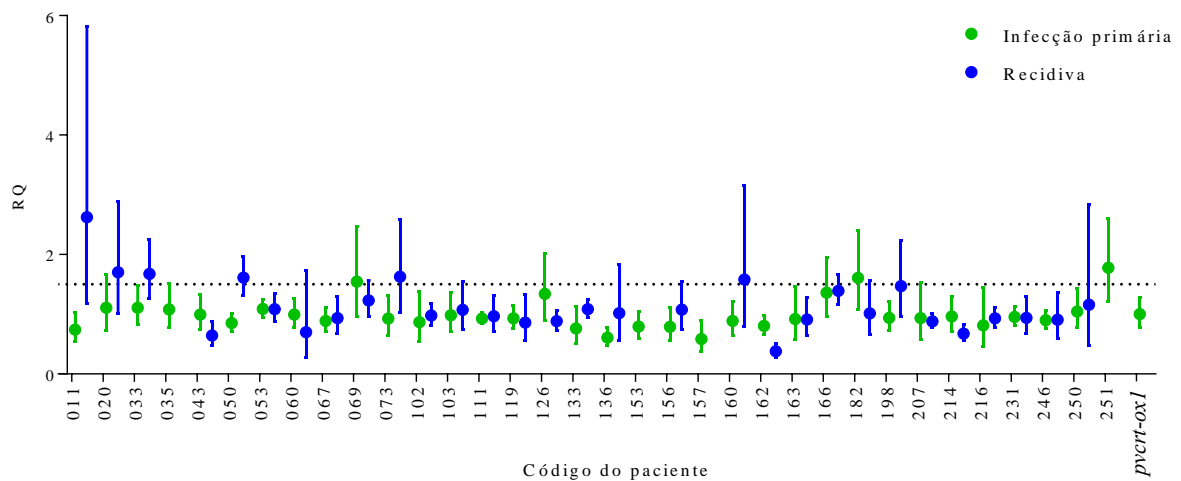


FIGURA 18. Variação do número de cópias de *pvcr-t-o* de isolados de infecção primária e recidiva clínica. *pvcr-t-ox1*, isolado de *P. vivax* previamente caracterizado como portador de cópia única de *pvcr-t-o*. As barras indicam o desvio padrão da quantidade estimada do gene alvo após triplicata.

6 DISCUSSÃO

No atual cenário brasileiro caracterizado por maior prevalência de infecções maláricas causadas por *P. vivax* e relatos de falhas terapêuticas após tratamento por CQ e PQ, investigar os aspectos genéticos tanto do hospedeiro quanto do parasito que contribuem para esse processo merecem destaque a fim de contribuir para o controle e eliminação da malária. O tratamento preconizado atualmente já é utilizado há 60 anos, e sendo a PQ o único fármaco licenciado para cura radical e segura dos pacientes, a ocorrência de episódios de recidiva chama atenção e impõe um desafio a mais para se avaliar a otimização do regime terapêutico e garantir a cura radical efetiva, que implique na redução da transmissão e consequente diminuição do número de casos da doença.

Terapias combinadas com derivados de artemisinina (ACT) já são usadas para tratamento de malária causada por *P. falciparum* no Brasil desde a década de 1990, o que foi essencial para mudança no perfil de prevalência entre as espécies, com redução na prevalência de *P. falciparum*. A introdução recente de ACT no tratamento da malária *vivax* pretende inibir impedir que variantes resistentes sejam selecionadas, entretanto, pouco se sabe a respeito do impacto desse novo regime na ocorrência de recidivas da doença, principalmente em episódios de recaída e recrudescência.

Nesse contexto, o presente trabalho propôs estudar aspectos genéticos tanto do hospedeiro quanto de isolados de *P. vivax* que podem influenciar as recidivas da doença, com ênfase no perfil genético de variantes enzimáticas do complexo hepático Citocromo P450 de pacientes de área endêmica tratados com ACT, bem como no perfil genético de *P. vivax*, isolados destes pacientes, relacionado à resistência a antimaláricos.

6.1 Implicações do controle de cura por protocolo molecular nas classificações das recidivas

Os indivíduos aqui incluídos, recrutados para comporem um estudo de eficácia e segurança de ACT para tratamento de malária *vivax* não complicada, apresentaram intervalo de recidiva curto, de 3 a 9 semanas, correspondendo ao perfil de variantes de regiões tropicais (WHITE, 2011). É importante ressaltar que o acompanhamento dos pacientes foi apenas até o dia 63, último ponto do acompanhamento de cura preconizado pelo Ministério da Saúde.

Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre a mediana do tempo de recidiva de cada grupo de tratamento, os 35 pacientes analisados apresentaram recidiva anterior à mediana brasileira, que é de 71 dias (DAHER et al., 2019), semelhante à mediana registrada para o município de Porto Velho/RO em 2009, 69,5 dias (SIMÕES et al., 2014). Alguns fatores de risco contribuem para um tempo mais curto de recidiva no Brasil, como idade, gênero masculino, ocupação doméstica e *background* genético caucasiano (DAHER et al., 2019). Além de mediana do tempo de recidiva ser menor entre as mulheres aqui incluídas (54 vs. 59 dias para os homens), sem diferença estatística, os demais fatores de risco não puderam ser observados entre os indivíduos aqui estudados. Os fatores de risco associados à recidiva em infecções causadas por *P. vivax* após tratamento com ACT deverão ser avaliados nos próximos anos, após nova recomendação do Ministério da Saúde, que incluiu artesunato e mefloquina ou arteméter e lumefantrina para tratamento de malária não complicada causada por *P. vivax*, principalmente após recidiva (SVS/MS, 2019).

Embora não tenha sido observada diferença estatística entre o tempo de recidiva em cada grupo de tratamento, o grupo de indivíduos tratados com CQ+PQ apresentou a menor mediana do tempo de recidiva (49 dias). Apesar disso, o menor tempo de recidiva foi observado em um indivíduo do grupo tratado com AL+PQ (21 dias), seguido por indivíduo do grupo CQ+PQ (37 dias) e do grupo AM+PQ (47 dias). Sabe-se que derivados de artemisinina possuem tempo de depuração plasmática rápida, com meia-vida de cerca de 2 horas. Já lumefantrina e mefloquina são antimaláricos de duração plasmática longa, com tempo de meia-vida de 4 a 6 dias e 15 a 33 dias, respectivamente. Já para CQ, é consenso que até 28 dias ainda há droga circulante (SIMÕES et al., 2014). Considerando esses valores, identifica-se que nenhuma nas recidivas clínicas ocorreu em momento anterior ao tempo de meia-vida de, pelo menos, um dos antimaláricos usados no esquema terapêutico, o que exclui as recidivas enquanto episódio de recrudescência e enquadra-as enquanto prováveis recaídas precoces. Uma limitação do desenho do estudo é que recaídas tardias não puderam ser detectadas devido ao curto período de acompanhamento (até dia 63). Acompanhamentos mais longos são importantes mesmo em infecções por variantes tropicais visto que recaídas após um longo período de latência (superior a um ano) já foram relatadas após inoculação única por mosquito infectado (WHITE, 2011), indicando que a ocorrência de recaídas tardias não pode ser excluída entre os indivíduos que participaram do estudo.

Em áreas endêmicas, diferenciar episódios de recidiva em recaída, recrudescência ou nova infecção, não é possível somente considerando aspectos clínicos. A ausência de um biomarcador ou assinatura do parasito que diferencie a origem da recidiva dificulta as

estimativas correspondentes a cada tipo de episódio. No Brasil, alguns critérios podem ser utilizados de maneira a caracterizar cada episódio de recorrência identificado, considerando sua endemicidade de baixa a média, esquema terapêutico utilizado e baixa ocorrência de variantes resistentes do parasito. Recidivas dentro de um intervalo de 28 dias são episódios de recrudescência em potencial nos casos de tratamentos com CQ, visto que neste tempo ainda há dosagem terapêutica da droga em circulação. Após 28 dias até 6 meses, considera-se recaída em potencial, pois é a faixa de maior ocorrência deste tipo de episódio de malária. Acima deste período, há chances mais altas de se tratar de uma nova infecção, visto que a região endêmica brasileira apresenta uma periodicidade curta de recaída.

Uma estratégia importante para auxiliar a distinção de recrudescência e recaída/reinfecção é o acompanhamento após administração do tratamento pela execução de lâminas de microscopia para verificação de cura. Entretanto, a baixa sensibilidade deste método sugere a necessidade em realizar o acompanhamento de cura por protocolos moleculares, ainda sendo realizado apenas pelos laboratórios de referência. Entre as novas recomendações para tratamento de malária preconizadas pelo Ministério da Saúde, um resultado positivo por métodos moleculares é suficiente para confirmação do diagnóstico, o que exige notificação e administração do tratamento apropriado a situação (SVS/MS, 2019).

A detecção indireta do parasito por protocolo molecular permitiu identificar 10 pacientes (28,5%) que apresentaram infecção submicroscópica em coletas anteriores ao dia da recidiva clínica, nos quais aparasitemia foi detectável molecularmente de 5 a 21 dias antes do aparecimento dos sintomas. No nordeste do Cambódia, Popovici e colaboradores (2018) encontraram uma frequência inferior, especificamente 10% dos pacientes com recidiva submicroscópica no dia 28. De fato, alguns trabalhos tem relatado altas frequências de recidivas submicroscópicas e assintomáticas após administração de antimaláricos de fase sanguínea e PQ (NGUYEN et al., 2018; VAN DEN EEDE et al., 2011), o que pode representar um problema do ponto de vista epidemiológico visto que indivíduos com infecções subpatentes podem apresentar gametócitos circulantes e potencialmente infectantes para o vetor (MARTINS-CAMPOS et al., 2018; VALLEJO et al., 2016).

Diferentes trabalhos que comparam a eficácia de tratamentos com ACT e CQ avaliam o efeito dos antimaláricos nos dias 28 e 42 após o primeiro dia de tratamento (COMMONS et al., 2019; POPOVICI et al., 2018; SIQUEIRA et al., 2017), conforme recomendação da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2009). Embora as recaídas possam ser consideradas como aquelas recidivas que ocorrem após 28 dias do tratamento, há relatos em que dosagens terapêuticas da CQ (100 ng/mL) podem permanecer no sangue até aproximadamente o dia 42

(POPOVICI et al., 2018; SIQUEIRA et al., 2017). Estes dados sugerem que a utilização do critério de 28 dias para detecção do parasito por microscopia óptica, por ser um método de baixa sensibilidade, pode subestimar ainda mais as recrudescências.

As recrudescências também podem ser subestimadas quando são utilizados tratamentos que envolvem a combinação com mefloquina ou outro antimalárico de longa duração. Diante da ausência da dosagem dos metabólitos dos antimaláricos no plasma dos pacientes incluídos no presente estudo, a detecção molecular dos parasitos nos pontos incluídos para controle de cura, somada a utilização dos dias 28 e 42 como ponto de corte para definição das recrudescências e recaídas, permitiram sugerir a ocorrência de outras recrudescências principalmente no grupo tratado com AM+PQ, indetectáveis apenas pela microscopia óptica. Apesar do pequeno número de indivíduos analisados, o critério de 28 dias parece insuficiente para definição das recrudescências após AM+PQ, o que, a longo prazo, pode dificultar a detecção de resistência e contribuir para seleção de variantes resistentes a esse regime, principalmente à mefloquina.

6.2 Caracterização molecular das infecções por *P. vivax*

No cenário endêmico em que indivíduos estão constantemente expostos à transmissão, uma nova infecção não pode ser descartada, assim, a estimativa de falha terapêutica por PQ é dificultada. Durante o período em que os pacientes foram recrutados, que compreendeu os anos de 2012 a 2015, o risco de transmissão de malária no município de Porto Velho/RO foi classificado como médio (IPA 10-49 casos/1.000 habitantes) nos três primeiros anos e baixo no último (IPA <10 casos/1.000 habitantes) (dados disponíveis em: <<http://saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria#epidemiologia>>). Esses dados sugerem um risco de baixo a médio de reinfecção durante o período de acompanhamento do estudo. Compreender quais recidivas corresponderam a episódio de recaída ou nova infecção é complexo, por isso, a abordagem por microssatélites pretende auxiliar nessa distinção, embora não resolva completamente, ao permitir classificar as recidivas de acordo com a similaridade genética entre os parasitos de cada episódio.

A análise genotípica dos parasitos isolados dos 35 pares de infecção primária/recidiva permitiu identificar, em média, 60% de parasitos idênticos por grupo de tratamento, além de alta diversidade genética (AMOVA = 0.9818 ±0.0056) que corrobora dados da literatura. Entretanto, estudos moleculares das recaídas por *P. vivax*, que também utilizaram microssatélites para caracterização molecular, evidenciaram uma frequência elevada de

recaídas heterólogas (parasitos geneticamente distintos dos parasitos da infecção primária), além de alta diversidade genética dos parasitos (IMWONG et al., 2007; RESTREPO et al., 2011; VAN DEN EEDE et al., 2010). No Brasil, um estudo realizado com pacientes em área de baixa transmissão identificou 26 recorrências, em 28, provenientes de parasitos diferentes à infecção primária (ORJUELA-SÁNCHEZ et al., 2009). De maneira semelhante, um estudo de nosso grupo de pesquisa, investigando casos importados registrados em área não endêmica, evidenciou uma frequência de 46% (N=30) de recaídas heterólogas. Todavia, recaídas homólogas (parasitos geneticamente idênticos entre infecção primária e recidiva) foram identificadas em todos os pacientes primoinfectados (DE ARAUJO et al., 2012) como também identificado na Papua Nova Guiné (IMWONG et al., 2012). O contexto dos pacientes do trabalho de Araujo e colaboradores (2012) (residentes em área sem transmissão de malária, mas que haviam viajado e se infectado em área endêmica) garantiu uma alta probabilidade de tratar-se de recaída.

Embora os pacientes tenham sido atendidos em centros de referência inseridos em área endêmica, dados referentes ao número de malárias prévias, primo-infecção e tempo de residência em área endêmica não foram coletados no momento do recrutamento. Apesar disso, a frequência elevada de recidivas homólogas contrariam os achados da literatura, que atribuem maior frequência de recidivas heterólogas em indivíduos de área endêmica. Todavia, a distinção das recaídas em relação às rescrudescência, principalmente pelo critério de 42 dias como ponto de corte, permitiu identificar frequências de 25% e 38% para recaídas heterólogas nos grupos CQ+PQ e AM+PQ, respectivamente.

A despeito da ausência de diferença significativa na frequência dos genótipos do parasito entre os grupos de tratamento, chama atenção principalmente o grupo tratado com CQ+PQ. Apesar de nenhum paciente ter sofrido recidiva clínica anterior a 28 dias, o que classificaria uma rescrudescência clínica em potencial, somente 2 indivíduos (20%) apresentaram parasito heterólogo na recidiva, uma frequência baixa quando comparado aos achados com isolados de *P. vivax* do Brasil. Outro fato interessante sobre esses dois pacientes é que ambos apresentaram infecção submicroscópica assintomática no dia 22 e 29, respectivamente, mas que foi indetectável no ponto subsequente, ou seja, logo antes da recidiva clínica, sugerindo cura parasitológica. Entretanto, a ausência da genotipagem dos parasitos das infecções submicroscópicas identificadas dificulta dizer se estes correspondem aos parasitos da recidiva clínica, não sendo detectado entre os dois momentos devido ao limite de detecção da técnica, ou mesmo da infecção inicial. Alternativamente, levanta-se a hipótese

de que o sistema imune pode ter contribuído para eliminar os parasitos recrudescentes, e a ativação de hipnozoítos heterólogos levou a recaída clínica nesses pacientes.

A caracterização molecular dos parasitos das infecções submicroscópicas se faz necessária para sugerir que o parasito é geneticamente idêntico ao da infecção inicial, o que caracterizaria, de fato, uma recrudesência submicroscópica assintomática no dia 29. Por outro lado, a identificação de parasito na infecção submicroscópica idêntico ao da recidiva clínica levantaria a hipótese de que o indivíduo recaiu precocemente, com ativação do hipnozoíto heterólogo anterior ao dia 28.

É importante salientar que foi identificada maior ocorrência de infecções múltiplas na recidiva (40% vs. 17,4%, *p-value* = 0,013). Essa multiplicidade de variantes por infecção torna complexa a definição de uma ativação heteróloga de hipnozoítos, visto que diferentes variantes podem estar presentes. Isso significar dizer que o mesmo parasito predominante em uma primeira infecção pode ser encontrado nos episódios subsequentes, porém em menor frequência. A busca e identificação por alelos raros ilustra bem esse processo. Utilizando a técnica de clonagem em bactérias, Araujo e colaboradores (2012) identificaram uma flutuação da predominância de alelos em cada momento da infecção, com parasitos geneticamente idênticos podendo ser encontrados tanto na infecção primária quanto na recaída, mas em frequências distintas. Dessa forma, no contexto de área endêmica, genótipos distintos do parasito podem ressurgir ao longo dos processos de recidiva. O mesmo foi observado nos pacientes aqui estudados. Dentre os parasitos de recidivas similares ou distintos ao genótipo da infecção primária, a presença de alelos comuns aos dois momentos da infecção foi observada em diferentes pacientes, havendo alteração da predominância entre os mesmos na recidiva (dados não mostrados).

Alguns trabalhos têm sugerido que o sistema imune possui alguma influência nas recidivas por *P. vivax* (MANEERATTANASAK et al., 2017; WHITE, 2011). Embora não tenha sido foco do presente trabalho avaliar essa influência, a alta frequência de recidivas por parasitos idênticos entre os pacientes e o maior número de infecções múltiplas na recidiva levantam a hipótese de que o sistema imune dos indivíduos não foi capaz de reconhecer e gerar uma resposta humoral eficiente contra os parasitos da infecção inicial, consequentemente mantendo-os susceptíveis a recidiva pelos mesmos parasitos iniciais. Essa falha do sistema imune pode ser devido à baixa exposição destes indivíduos à transmissão, já que existe uma correlação direta entre tempo de exposição e resposta imune (KANO et al., 2018). Esse processo merece ser investigado em estudos futuros, uma vez que indivíduos não

imunes que não respondem bem ao tratamento representam um desafio para o controle da transmissão de *P. vivax*.

6.3 Diversidade alélica de CYP2D6 e implicações no metabolismo de PQ

A compreensão dos aspectos farmacogenéticos envolvidos na biotransformação da PQ, somado aos estudos que verificam as distribuições alélicas de CYP2D6 em diferentes populações e seu impacto na atividade terapêutica do fármaco, desenvolvido nos últimos anos, tem permitido identificar o papel relevante da enzima hepática CYP2D6 no processo de biotransformação e consequente eficácia contra as formas teciduais hepáticas (AVULA et al., 2018; CAMARDA et al., 2019). O Brasil, tendo passado por diferentes processos de imigração e sofrido políticas de miscigenação ao longo da história, teve o *background* genético populacional alterado ao longo dos séculos. Uma vez que as frequências alélicas de CYP2D6 variam de acordo com o *background* genético das populações (FRIEDRICH et al., 2014), elucidar a distribuição dos alelos de CYP2D6 em diferentes subpopulações brasileiras constitui uma ferramenta importante, principalmente em área endêmica para malária, para orientar a escolha do regime terapêutico, assim como a dosagem terapêutica mais adequada, sempre com o objetivo de evitar as recidivas e efeitos adversos da droga.

Embora o presente trabalho não ofereça dados suficientes para esse tipo de compreensão, todos os alelos identificados entre os indivíduos correspondem a variantes de CYP2D6 já descritos anteriormente na população brasileira, incluindo alelos pouco frequentes. A opção por utilizar categorias fenotípicas para predição da atividade enzimática em substituição aos dados de genótipo deve ser feita com cautela, visto que alguns relatos têm indicado heterogeneidade na correspondência genótipo-fenótipo entre grupos populacionais, isto é, diferentes fenótipos podem ser inferidos pelo mesmo genótipo em regiões e grupos étnicos distintos (GAEDIGK et al., 2017; LLERENA et al., 2014; NARANJO et al., 2018). Por isso, no presente estudo, foi utilizada a classificação proposta como padrão pelo Consórcio de Implementação Farmacogenética Clínica (CPIC), feita pelo Sistema de Pontuação de CYP2D6, que tem sido utilizada em estudos de malária que avaliam CYP2D6 e resposta à PQ (BENNETT et al., 2013; BRASIL et al., 2018; HE et al., 2019; JOAN INGRAM et al., 2014). Nesse sistema, dados da literatura sugerem que o genótipo gNM-S (AS=1) tem atividade próxima ao gIM. Consequentemente, indivíduos com AS igual a zero (gPM), 0,5 (gIM), 1 (gNM-S) e 2 (gUM) foram agrupados como metabolizadores alterados,

sendo os três primeiros classificados como metabolizadores nulos/reduzidos e o último como metabolizadores ultrarrápidos, identificado em um único indivíduo tratado com AM+PQ.

Ainda que a frequência de metabolizadores alterados tenha sido baixa (25,7%, n=9), 6 deles estavam incluídos no mesmo grupo de esquema terapêutico (AM+PQ). A combinação entre AM e PQ já foi avaliada e recomendada para tratamento de malária *falciparum*, pois contribui para redução do tempo de eliminação dos gametócitos (SMITHUIS et al., 2010; VÁSQUEZ et al., 2009; WHITE, 2013), inclusive no Brasil (SVS/MS, 2010, 2019). Além disso, sabe-se que a mefloquina é primeiramente metabolizada por enzimas CYP3A (FONTAINE et al., 2000), especificamente pela enzima CYP3A4, o que foi evidenciado pela coadministração de cetoconazol e rifampicina, inibidor e indutor da enzima, respectivamente, em indivíduos saudáveis (RIDTITID et al., 2000, 2005). Ainda que Bangchang e colaboradores (1992a, 1992b) tenham evidenciado um comprometimento da metabolização de mefloquina e primaquina *in vitro* quando co-incubadas em microsomas hepáticos, nenhum estudo clínico demonstrou alguma alteração na farmacocinética destes fármacos quando co-administrados.

Devido à ausência de dados fenotípicos de CYP2D6 dos 229 pacientes que não manifestaram recidiva clínica no período de acompanhamento, não é possível afirmar que o fenótipo alterado da CYP2D6 tenha maior impacto nos pacientes tratados com AM+PQ. Embora existam evidências suficientes que demonstram que a metabolização de mefloquina e da PQ ocorram por vias diferentes, sendo CYP2D6 o principal determinante para o sucesso terapêutico da PQ, a CYP3A4 participa em alguma medida da metabolização da mesma (PYBUS et al., 2012). Portanto, a competição dos dois fármacos em questão, com impacto na formação dos metabolitos ativos atuantes contra hipnozoítos, não pode ser descartado e merece ser investigado.

O metabolismo da CQ é feito predominantemente pela isoforma hepática do citocromo P450 CYP2C8. Pacientes com mutação em *CYP2C8* apresentaram recidiva precoce (<42 dias) em maior frequência, além de uma proporção maior de parasitas geneticamente semelhantes (idênticos ou similares), o que sugere a possibilidade de recrudescência devido à falha terapêutica da CQ (SILVINO et al., 2016). Curiosamente, mutações em *CYP2C8* foram identificados somente em 5 indivíduos, heterozigotos para um alelo mutado em G416A. Apenas um deles foi tratado com CQ+PQ, e os demais com AM+PQ. O único indivíduo do grupo CQ+PQ de fato apresentou PCR positivo no dia 42, seguido de recaída por parasito geneticamente similar à infecção inicial no dia 63.

Outro aspecto importante no tratamento de malária com potencial implicação nas recidivas que merecem ser investigados são as interações entre antimaláricos que podem interferir no tratamento. Especificamente a mefloquina administrada após lumefantrina pode contribuir para redução dos níveis plasmáticos de lumefantrina (LEFÈVRE et al., 2000). No presente estudo, não é possível falar em interação medicamentosa de lumefantrina com outros antimaláricos entre o grupo tratado com esse fármaco ou mesmo entre os pacientes dos demais grupos, uma vez que a ausência de uso de antimalárico nos últimos 63 dias foi um dos critérios de inclusão para participação no estudo, garantindo que a meia-vida terminal dos fármacos já estaria superada. Por outro lado, há inibição *in vitro* descrita de enzimas do complexo P450, incluindo a CYP2D6, por lumefantrina (WHITE; VAN VUGT; EZZET, 1999), o que sugere o comprometimento da farmacocinética da PQ visto que sua eficácia depende da atividade enzimática de CYP2D6. Uma vez que os três indivíduos que apresentaram recidiva anterior a 30 dias, após o tratamento com AL+PQ, possuem fenótipo extensivo de CYP2D6, sugere-se que a eficiência da atividade da PQ contra os hipnozoítos pode ter sido comprometida pela inibição da principal enzima envolvida no processo de biotransformação do fármaco. Entretanto, um estudo de metanálise recente, que compilou estudos prospectivos que avaliaram a eficiência de antimaláricos contra *P. vivax* publicados entre 2000 e 2018, evidenciou que a co-administração de PQ e AL resulta em uma redução de 80% na taxa de recorrência até o dia 42 (COMMONS et al., 2019), sugerindo que, havendo alguma inibição de CYP2D6 por lumefantrina, trata-se de inibição parcial, que não compromete significativamente o efeito da PQ.

6.4 Variação do número de cópias de *pvmdr-1* e *pvcr1-o* e sua relação com resistência aos diferentes antimaláricos

Devido ao impacto que a resistência aos antimaláricos pode oferecer, monitorar o desenvolvimento de fenótipos e genótipos de resistência aos atuais fármacos utilizados para tratamento da malária *vivax* é de suma importância para o controle da doença, principalmente em áreas endêmicas. Diferentes fatores podem contribuir para a seleção e propagação de variantes resistentes, como o uso de dosagens subterapêuticas devido à ausência de ajuste pelo peso do paciente, má qualidade do medicamento instituído e abandono do tratamento (DUARTE et al., 2001), ou ainda fatores genéticos do próprio parasito, tais como polimorfismos em genes importantes envolvidos na atividade dos fármacos (SILVINO et al., 2016). Os pacientes aqui incluídos foram tratados adequadamente, de acordo com os métodos

da OMS para vigilância da eficácia dos medicamentos antimaláricos, e acompanhados até o final do tratamento, garantindo que a adesão fosse mantida mesmo após eliminação dos sintomas clínicos.

No Brasil, a resistência à CQ já foi reportada em algumas localidades, caracterizada como recidiva clínica anterior a 28 dias e persistência da parasitemia na presença de dosagem terapêutica (100 ng/mL de CQ e desetil-CQ) verificada através de dosagem por HPLC. Os marcadores de resistência têm sido bem caracterizados para *P. falciparum*, entretanto, na malária vivax ainda não estão bem esclarecidos. Embora a relação entre *pvcrt-o* e resistência de *P. vivax* à CQ tenha sido sugerida nos últimos anos, ainda não foi descrito um marcador genético de resistência para essa espécie. Evidências que demonstram o aumento da expressão gênica de *pvcrt-o* e *pvm-dr-1* levantam a hipótese de que polimorfismo do tipo CNV destes genes pode estar relacionado à diminuição da susceptibilidade à CQ (MELO et al., 2014; SÁ et al., 2019; SILVA et al., 2018). Outros trabalhos realizados com indivíduos de área endêmica do Brasil identificaram polimorfismos do tipo CNV em *pvm-dr-1* em isolados do Acre, embora em baixa frequência (2 isolados em 215) (VARGAS-RODRÍGUEZ et al., 2012), bem como um trabalho do nosso grupo de pesquisa, que identificou 7 em 35 isolados com amplificação de *pvm-dr-1*, derivados de diferentes regiões como Mato Grosso, Pará, Rondônia e Guiana Francesa (COSTA et al., 2017). Em Manaus, a amplificação gênica de *pvm-dr-1* foi observada em 10,7% e 11,1%, respectivamente, de isolados susceptíveis e resistentes à CQ antes do tratamento. A mesma similaridade de frequências, nos mesmos isolados, com amplificação de *pvcrt-o* foi observada (7,1% e 7,7%, respectivamente), não associando assim a amplificação destes alvos à resistência. Entretanto, entre os isolados da recidiva, 33% apresentaram múltiplas cópias de *pvcrt-o* no dia da recorrência (SILVA et al., 2018).

Em regiões onde a mefloquina é utilizada para tratamento de malária causada por *P. falciparum*, múltiplas cópias de *pvm-dr-1* tem sido associadas à resistência a esse antimalárico e ao aumento da sensibilidade a CQ (ROSS; FIDOCK, 2019). É importante lembrar que *pvm-dr-1* codifica uma proteína no vacúolo digestivo, que remove a mefloquina do seu sítio de ação (citoplasma do parasito) para o interior do vacúolo, impedindo seu efeito. Já para CQ, o efeito é o inverso, visto que a proteína promove o efluxo do fármaco para o seu sítio de ação, consequentemente aumentando a susceptibilidade do parasito. No Brasil, a mefloquina já foi utilizada para tratamento de malária *falciparum* e infecções mistas por *P. vivax* e *P. falciparum* nos anos 2000, o que pode ter contribuído para a seleção do genótipo de aumento de número de cópias de *pvm-dr-1*, descritos nos trabalhos supracitados.

Entre os indivíduos incluídos no presente estudo, somente um isolado da infecção primária de paciente tratado com AM+PQ apresentou duas cópias para *pvmdr-1*, correspondendo a único haplótipo entre os 42 identificados pelo painel de microsatélite. Já em relação a *pvcrt-o*, nenhum isolado foi identificado com duas ou mais cópias do gene. Apesar desta única exceção encontrada, os demais isolados apresentavam cópia única para ambos os genes, sugerindo que polimorfismos do tipo CNV não contribuíram para as recidivas destes indivíduos, independente do tratamento administrado. Porém, não é possível excluir que o aumento da expressão gênica tenha contribuído entre os episódios, uma vez que a expressão gênica a nível de RNA e proteína não foi avaliada. Além disso, esses achados evidenciam que a utilização de artesunato e mefloquina para tratamento de infecções mistas por *P. falciparum* e *P. vivax* no Brasil parece não estar contribuindo para a seleção de isolados de *P. vivax* com duplicação gênica de *pvmdr-1*, indicativo de resistência à mefloquina e aumento da sensibilidade a CQ. Com relação a *pvcrt-o*, os achados evidenciam que o tratamento com CQ, já utilizado há pelo menos cinco décadas, parece não estar selecionando variantes com múltiplas cópias do gene, o que poderia implicar em aumento da expressão do transportador e ineficácia do tratamento com CQ.

Ao contrário do que é observado para *P. falciparum*, em que a rápida disseminação de variantes resistentes à CQ demandou a substituição do tratamento por ACT, a resistência em *P. vivax* parece alterar a capacidade de desenvolvimento do parasito. Sá e colaboradores (2019) verificou que só era possível detectar a variante resistente à CQ em infecção experimental em chimpanzé após pressão seletiva da droga. Uma vez retirada a pressão seletiva, a variante susceptível tornava a prevalecer. Isso explica em alguma medida a razão pela qual a resistência a CQ é pouco disseminada, principalmente no Brasil.

Embora os polimorfismos de *pvmdr-1* e *pvcrt-o* não tenham sido suficientes para identificar se variantes resistentes aos esquizotocidas sanguíneos foram selecionados após o tratamento, a elevada frequência de recidivas homólogas não descarta que exista a redução da susceptibilidade dos parasitos, mas sugerem uma possível influência do sistema imune dos pacientes. Ausência da imunidade dos indivíduos contra a infecção inicial somada a atividade reduzida de CYP2D6, que interfere em uma resposta adequada ao tratamento, representa mais um importante desafio para controle da transmissão. O processo de recidivas da malária causada por *P. vivax* é complexo e merece ser investigado profundamente. Os resultados obtidos permitem atentar-se principalmente quanto a utilização de artesunato e mefloquina, visto que metade dos indivíduos tratados com esse regime são metabolizadores lentos de CYP2D6. Os dados de genotipagem por microsatélites e a utilização do ponto de 42 dias

para classificação das recaídas permitiram corroborar as evidências que identificam uma proporção expressiva de recaídas heterólogas. Embora o número de indivíduos aqui estudado seja reduzido, as detecções precoces do parasito por protocolo molecular em conjunto com o critério de 42 dias e a genotipagem dos parasitos parece o método mais apropriado para identificar as recrudescências. A implementação de ACTs no tratamento da malária *vivax* no Brasil poderá tornar obsoleto o critério de 28 dias para definição das recrudescências. Estudos que incluam um número maior de indivíduos precisam ser realizados para confirmar essa mudança.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- i. O uso de diferentes antimaláricos de fase sanguínea não influenciou no intervalo entre a infecção inicial e a recidiva dos pacientes, visto que não houve diferença significativa da mediana do tempo de recidiva entre os grupos;
- ii. Recidivas subpatentes foram detectadas molecularmente antes da recidiva clínica, sugerindo serem recrudescências em alguns pacientes. A dosagem dos metabólitos dos antimaláricos faz-se necessária para comprovar a resistência como causa desta recrudescência;
- iii. Recidivas homólogas e similares foram mais frequentes em todos os grupos de tratamento (entre 80-93%), o que sugere uma ausência de resposta imune eficaz nestes pacientes;
- iv. A recidiva envolve maior complexidade genética dos parasitos, indicada pela maior frequência de infecções múltiplas, sugerindo ausência de modulação da infecção pelo sistema imune e consequente aumento da susceptibilidade às recidivas;
- v. Apesar de não ter sido observada relação entre fenótipo de CYP2D6 alterado e tempo de recidiva, o fenótipo de CYP2D6 predito como alterado parece influenciar principalmente recidivas após o tratamento com AM+PQ. O fenótipo dos indivíduos que não apresentaram recidivas durante o período de acompanhamento deve ser investigado em pesquisas futuras;
- vi. As recidivas após ACT não foram influenciadas pela presença de por variantes com amplificação nos genes *pvmdr-1* e *pvcrt-o*. Investigações sobre expressão desses genes em nível de mRNA e proteína após o tratamento e sua relação com polimorfismos de número de cópias merecem ser investigadas.

8 BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, J. H.; MUELLER, I. The biology of *Plasmodium vivax*. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2017.
- ALVES, F. P. et al. Asymptomatic Carriers of *Plasmodium* spp. as Infection Source for Malaria Vector Mosquitoes in the Brazilian Amazon. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 5, p. 777–779, 2006.
- AMINO, R. et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nature Medicine**, v. 12, n. 2, p. 220–224, 2006.
- ASHLEY, E. A.; RECHT, J.; WHITE, N. J. Primaquine: The risks and the benefits. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2014.
- AVULA, B. et al. Analysis of primaquine and its metabolite carboxyprimaquine in biological samples: Enantiomeric separation, method validation and quantification. **Biomedical Chromatography**, v. 25, n. 9, p. 1010–1017, 2011.
- AVULA, B. et al. Metabolism of primaquine in normal human volunteers: Investigation of phase I and phase II metabolites from plasma and urine using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2018.
- BANGCHANG, K. N.; KARBWANG, J.; BACK, D. J. Primaquine metabolism by human liver microsomes: effect of other antimalarial drugs. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 3, p. 587–590, 1992a.
- BANGCHANG, K. N.; KARBWANG, J.; BACK, D. J. Mefloquine metabolism by human liver microsomes. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 9, p. 1957–1961, maio 1992b.
- BATTLE, K. E. et al. Mapping the global endemicity and clinical burden of *Plasmodium vivax*, 2000–17: a spatial and temporal modelling study. **The Lancet**, v. 394, n. 10195, p. 332–343, 2019.
- BENNETT, J. W. et al. Primaquine Failure and Cytochrome P-450 2D6 in *Plasmodium vivax* Malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 14, p. 1381–1382, 3 out. 2013.
- BETUELA, I. et al. Relapses contribute significantly to the risk of *Plasmodium vivax* infection and disease in Papua New Guinean children 1-5 years of age. **Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 11, p. 1771–1780, 2012.
- BLOLAND, P. B. Drug resistance in malaria. **Geneva: World Health Organization**, n. 0, p. 32, 2001.
- BOURGARD, C. et al. *Plasmodium vivax* Biology: Insights Provided by Genomics, Transcriptomics and Proteomics. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2018.
- BRASIL, L. W. et al. CYP2D6 activity and the risk of recurrence of *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: A prospective cohort study. **Malaria Journal**, 2018.
- BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 10, p. e1038–e1046, 2017.

- BRIGHT, A. T. et al. A High Resolution Case Study of a Patient with Recurrent *Plasmodium vivax* Infections Shows That Relapses Were Caused by Meiotic Siblings. v. 8, n. 6, 2014.
- CAMARDA, G. et al. Antimalarial activity of primaquine operates via a two-step biochemical relay. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.
- CARLOS, B. C. et al. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. **Pathogens and Global Health**, v. 113, n. 1, p. 1–13, 2019.
- CARLTON, J. M. et al. NIH Public Access. v. 455, n. 7214, p. 757–763, 2009.
- CHEHUAN, Y. F. et al. In vitro chloroquine resistance for *Plasmodium vivax* isolates from the Western Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, 2013.
- COMMONS, R. J. et al. The efficacy of dihydroartemisininpiperaquine and artemether-lumefantrine with and without primaquine on *Plasmodium vivax* recurrence: A systematic review and individual patient data meta-analysis. **PLoS Medicine**, v. 16, n. 10, p. 1–21, 2019.
- COSTA, G. L. et al. Assessment of copy number variation in genes related to drug resistance in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* isolates from the Brazilian Amazon and a systematic review of the literature. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2017.
- COWMAN, A. F. et al. A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. **Journal of Cell Biology**, v. 113, n. 5, p. 1033–1042, 1991.
- DAHER, A. et al. Efficacy and safety of artemisinin-based combination therapy and chloroquine with concomitant primaquine to treat *Plasmodium vivax* malaria in Brazil: An open label randomized clinical trial RBR-79s56s RBR. **Malaria Journal**, 2018.
- DAHER, A. et al. Evaluation of *Plasmodium vivax* malaria recurrence in Brazil 11 Medical and Health Sciences 1117 Public Health and Health Services. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2019.
- DE ARAUJO, F. C. F. et al. Multiple-Clone Activation of Hypnozoites Is the Leading Cause of Relapse in *Plasmodium vivax* Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–9, 2012.
- DE PINA-COSTA, A. et al. Malaria in Brazil: What happens outside the Amazonian endemic region. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 618–633, 2014.
- DE SANTANA FILHO, F. S. et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon [8]. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1125–1126, 2007.
- DUARTE, E. C. et al. 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.
- ELDERFIELD, R. C.; GENSLER, S. J. Alkylaminoalkyl derivatives of 8-aminoquinoline. **Journal of the American Chemical Society**, v. 68, n. 2, p. 1524–1529, 1946.
- FERNÁNDEZ-BECERRA, C. et al. Increased expression levels of the *pvcrt-o* and *pvm-dr1* genes in a patient with severe *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria Journal**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2009.
- FIDOCK, D. A. et al. Mutations in the *P. falciparum* Digestive Vacuole Transmembrane Protein PfCRT and Evidence for Their Role in Chloroquine Resistance. **Molecular Cell**, v. 6, n. 4, p. 861–871, 1 out. 2000.
- FITCH, C. D. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. **Life Sciences**, v. 74, n. 16, p. 1957–1972, 2004.

- FONTAINE, F. et al. Role of cytochrome P450 3A in the metabolism of mefloquine in human and animal hepatocytes. **Life Sciences**, v. 66, n. 22, p. 2193–2212, 2000.
- FRIEDRICH, D. C. et al. Distribution of CYP2D6 alleles and phenotypes in the Brazilian population. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 5–12, 2014.
- GAEDIGK, A. et al. The CYP2D6 Activity Score: Translating Genotype Information into a Qualitative Measure of Phenotype. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, n. 2, p. 234–242, fev. 2008.
- GAEDIGK, A. et al. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. **Genetics in Medicine**, v. 19, n. 1, p. 69–76, 2017.
- GAEDIGK, A. et al. 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.
- HE, X. et al. Multiple relapses of *Plasmodium vivax* malaria acquired from West Africa and association with poor metabolizer CYP2D6 variant: A case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1–7, 2019.
- HIGGINS, C. F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. **Nature**, v. 446, n. 7137, p. 749–757, 2007.
- HULDÉN, L.; HULDÉN, L.; HELIÖVAARA, K. Natural relapses in *vivax* malaria induced by Anopheles mosquitoes. **Malaria Journal**, v. 7, p. 1–11, 2008.
- IMWONG, M. et al. 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.
- IMWONG, M. et al. Gene amplification of the multidrug resistance 1 gene of *Plasmodium vivax* isolates from Thailand, Laos, and Myanmar. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2657–2659, 2008.
- IMWONG, M. et al. The First *Plasmodium vivax* Relapses of Life Are Usually Genetically Homologous. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 4, p. 680–683, 15 fev. 2012.
- JOAN INGRAM, R. H. et al. The clinical and public health problem of relapse despite primaquine therapy: Case review of repeated relapses of *Plasmodium vivax* acquired in Papua New Guinea. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2014.
- JOSLING, G. A.; LLINÁS, M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: Knowing when it's time to commit. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 573–587, 2015.
- KANO, F. S. et al. 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. 13851, 14 dez. 2018.
- KOEPFLI, C. et al. Evaluation of *Plasmodium vivax* Genotyping Markers for Molecular Monitoring in Clinical Trials . **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 7, p. 1074–1080, 2009.
- 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, 1985.
- LEFÈVRE, G. et al. Pharmacokinetic interaction trial between co-artemether and mefloquine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 2, p. 141–151, 2000.

- LIN, J. T. et al. Using Amplicon Deep Sequencing to Detect Genetic Signatures of *Plasmodium vivax* Relapse. **Journal of Infectious Diseases**, v. 212, n. 6, p. 999–1008, 2015.
- LLERENA, A. et al. Interethnic variability of CYP2D6 alleles and of predicted and measured metabolic phenotypes across world populations. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 10, n. 11, p. 1569–1583, 2014.
- MALLERET, B. et al. Regular Article *Plasmodium vivax* : restricted tropism and rapid remodeling of. **Blood**, v. 125, n. 8, p. 1314–1325, 2015.
- MANEERATTANASAK, S. et al. Molecular and immunological analyses of confirmed *Plasmodium vivax* relapse episodes. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2017.
- MARCSISIN, S. R.; REICHARD, G.; PYBUS, B. S. Primaquine pharmacology in the context of CYP 2D6 pharmacogenomics: Current state of the art. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 161, p. 1–10, 2016.
- MARQUES, M. M. et al. *Plasmodium vivax* chloroquine resistance and anemia in the western brazilian amazon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2014.
- MARTINS-CAMPOS, K. M. et al. Infection of Anopheles aquasalis from symptomatic and asymptomatic *Plasmodium vivax* infections in Manaus, western Brazilian Amazon. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2018.
- MELO, G. C. et al. Expression levels of pvcrt-o and pvmdr-1 are associated with chloroquine resistance and severe *Plasmodium vivax* malaria in patients of the Brazilian Amazon. **PLoS ONE**, 2014.
- MOTA, M. M. et al. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. **Science**, v. 291, n. 5501, p. 141–144, 2001.
- NARANJO, M. E. G. et al. 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. 575–588, 2018.
- NGUYEN, T. N. et al. The persistence and oscillations of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections over time in Vietnam: an open cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 565–572, 2018.
- OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 115, 2010.
- OLIVEIRA, T. C. DE. **Genômica populacional de *Plasmodium vivax* : níveis e mecanismos de diversidade genética na América**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2016.
- OLSSON, Martin L. et al. A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. **Transfusion**, v. 38, n. 2, p. 168–173, 1998.
- ORJUELA-SÁNCHEZ, P. et al. 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.
- PAGE, K. R. et al. Venezuela's public health crisis: a regional emergency. **The Lancet**, v. 393, n. 10177, p. 1254–1260, 2019.

- POPOVICI, J. et al. Recrudescence, Reinfection, or Relapse? A More Rigorous Framework to Assess Chloroquine Efficacy for *Plasmodium vivax* Malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, 2018.
- POTTER, B. M. J. et al. Differential CYP 2D6 metabolism alters primaquine pharmacokinetics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 2380–2387, 2015.
- PRICE, R. N. et al. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased pfmdr1 gene copy number. **The Lancet**, v. 364, n. 9432, p. 438–447, jul. 2004.
- PRICE, R. N. et al. Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: A systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, 2014.
- PUKRITTAYAKAMEE, S. et al. Pharmacokinetic interactions between primaquine and chloroquine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 3354–3359, 2014.
- PUTAPORNTIP, C. et al. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 25, p. 16348–16353, 2002.
- PYBUS, B. S. et al. CYP450 phenotyping and accurate mass identification of metabolites of the 8-aminoquinoline, anti-malarial drug primaquine. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 1, 2012.
- PYBUS, B. S. et al. The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP 2D6. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 1, 2013.
- RECHT, J. et al. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: Current challenges in malaria control and elimination. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2017.
- RESTREPO, E. et al. High genetic polymorphism of relapsing *P. vivax* isolates in northwest Colombia. **Acta Tropica**, v. 119, n. 1, p. 23–29, 2011.
- REZENDE, A. M. et al. Microsatellite loci: Determining the genetic variability of *Plasmodium vivax*. **Tropical Medicine and International Health**, v. 15, n. 6, p. 718–726, 2010.
- RIDTITID, W. et al. Effect of Rifampin on Plasma Concentrations of Mefloquine in Healthy Volunteers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, n. 10, p. 1265–1269, 2000.
- RIDTITID, W. et al. Ketoconazole increases plasma concentrations of antimalarial mefloquine in healthy human volunteers. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 30, n. 3, p. 285–290, 2005.
- RIECKMANN, K. H.; DAVIS, D. R.; HUTTON, D. C. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? **The Lancet**, 1989.
- ROBINSON, L. J. et al. Strategies for Understanding and Reducing the *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* Hypnozoite Reservoir in Papua New Guinean Children: A Randomised Placebo-Controlled Trial and Mathematical Model. **PLoS Medicine**, v. 12, n. 10, p. 1–26, 2015.
- ROHRBACH, P. et al. Genetic linkage of pfmdr1 with food vacuolar solute import in *Plasmodium falciparum*. **EMBO Journal**, v. 25, n. 13, p. 3000–3011, 2006.
- ROSS, L. S.; FIDOCK, D. A. Elucidating Mechanisms of Drug-Resistant *Plasmodium falciparum*. **Cell Host and Microbe**, v. 26, n. 1, p. 35–47, 2019.

- SÁ, J. M. et al. Expression and function of pvcrt-o, a *Plasmodium vivax* ortholog of pfcrt, in *Plasmodium falciparum* and *Dictyostelium discoideum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 150, n. 2, p. 219–228, 2006.
- SÁ, J. M. et al. *Plasmodium vivax* chloroquine resistance links to pvcrt transcription in a genetic cross. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 4300, 2019.
- SANCHEZ, C. P. et al. **Transporters as mediators of drug resistance in *Plasmodium falciparum*** *International Journal for Parasitology*, 2010.
- 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.
- SILVA, S. R. et al. Chloroquine resistance is associated to multi-copy pvcrt-o gene in *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, 2018.
- SILVINO, A. C. R. et al. Variation in Human Cytochrome P-450 drug-metabolism genes: A gateway to the understanding of *Plasmodium vivax* relapses. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–14, 2016.
- SILVINO, A. C. R.; SOUSA, T. N.; DE BRITO, C. F. A. **Recorrências na malária por *Plasmodium vivax*: variabilidade genética da enzima do complexo citocromo P450 2D6 (CYP2D6) e sua influência na falha terapêutica por primaquina**. Belo Horizonte: Dissertação de Mestrado. Instituto René Rachou, 2019. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/35371>>.
- SIMÕES, L. R. et al. Factors associated with recurrent *Plasmodium vivax* malaria in Porto Velho, Rondônia State, Brazil, 2009. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1403–1417, 2014.
- SINGH, B. et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **Lancet**, 2004.
- SIQUEIRA, A. M. et al. Fixed-dose artesunate-amodiaquine combination vs chloroquine for treatment of uncomplicated blood stage *P. vivax* infection in the Brazilian Amazon: An open-label randomized, controlled trial. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 2, p. 166–174, 2017.
- SMITHUIS, F. et al. Effectiveness of five artemisinin combination regimens with or without primaquine in uncomplicated *falciparum* malaria: An open-label randomised trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 10, p. 673–681, 2010.
- SOONTARAWIRAT, I. et al. *Plasmodium vivax* genetic diversity and heterozygosity in blood samples and resulting oocysts at the Thai-Myanmar border. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2017.
- STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287–1290, 2006.
- SUWANARUSK, R. et al. Chloroquine resistant *Plasmodium vivax*: In vitro characterisation and association with molecular polymorphisms. **PLoS ONE**, 2007.
- SVS/MS. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. 1. ed. Brasília - DF, Brasil: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2010.
- SVS/MS. **Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2018**. Brasília - DF, Brasil: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2018.

SVS/MS. **Guia de tratamento da malária no Brasil**. 1. ed. Brasília - DF, Brasil: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2019.

SVS/MS. **Situação Epidemiológica da Malária no Brasil**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis, Coordenação-Geral de Vigilância de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial, 2019a. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/03/3.%20a%20-%20Situa%C3%A7%C3%A3o%20Epidemiol%C3%B3gica%20da%20Mal%C3%A1ria_Brasil_CIT_28.11.2018.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2019.

TAVUL, L. et al. Efficacy of artemether-lumefantrine and dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated malaria in Papua New Guinea. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2018.

TEKWANI, B. L. et al. Enantioselective pharmacokinetics of Primaquine in healthy human volunteers. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 43, n. 4, p. 571–577, 2015.

VALLEJO, A. F. et al. *Plasmodium vivax* gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2016.

VAN DEN EEDE, P. et al. High complexity of *Plasmodium vivax* infections in symptomatic patients from a rural community in central Vietnam detected by microsatellite genotyping. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 2, p. 223–227, 2010.

VAN DEN EEDE, P. et al. *Plasmodium vivax* sub-patent infections after radical treatment are common in peruvian patients: Results of a 1-year prospective cohort study. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

VAN ES, H. H. et al. Expression of the plasmodial pfmdr1 gene in mammalian cells is associated with increased susceptibility to chloroquine. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 4, p. 2419–2428, 1994.

VARGAS-RODRÍGUEZ, R. D. C. M. et al. Single-nucleotide polymorphism and copy number variation of the multidrug resistance-1 locus of *Plasmodium vivax*: Local and global patterns. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2012.

VÁSQUEZ, A. M. et al. Therapeutic efficacy of a regimen of artesunate-mefloquine-primaquine treatment for *Plasmodium falciparum* malaria and treatment effects on gametocytic development. **Biomédica : revista del Instituto Nacional de Salud**, v. 29, n. 2, p. 307–319, 2009.

WEISS, D. J. et al. Mapping the global prevalence, incidence, and mortality of *Plasmodium falciparum*, 2000–17: a spatial and temporal modelling study. **The Lancet**, v. 394, n. 10195, p. 322–331, 2019.

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

WHITE, N. J. Primaquine to prevent transmission of *falciparum* malaria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 175, 2013.

WHITE, N. J. et al. Malaria. **The Lancet**, v. 383, n. 9918, p. 723–735, 2014.

WHITE, N. J.; VAN VUGT, M.; EZZET, F. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Artemether-Lumefantrine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 37, n. 2, p. 105–125, 23 set. 1999.

WHO. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. **World Health Organization**,

p. 90, 2009.

WHO. **World Malaria report 2018**. Geneva: World Health Organization, 2018.

YAMAUCHI LUCY M., L. M. et al. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1215–1222, 2007.

GLOSSÁRIO

Infecção: presença de parasitos no organismo em qualquer uma de suas formas.

Infecção assintomática: presença de parasitemia assexuada sem sintomas clínicos característicos da malária.

Infecção submicroscópica: presença de parasitos assexuados de fase sanguínea detectável por métodos moleculares, mas indetectáveis por métodos convencionais (microscopia ou teste rápido), podendo ocorrer sintomas clínicos ou não.

Nova infecção: parasitemia originada de inoculação de novos esporozoítos subsequente ao tratamento da infecção inicial.

Recidiva: sinônimo de recorrência, parasitemia que ocorre em qualquer momento após a eliminação da parasitemia da infecção inicial, detectada por métodos convencionais (microscopia óptica ou teste rápido) e acompanhada de sintomas clínicos, sem origem conhecida enquanto reinfecção, recrudescência ou recaída.

Recrudescência: evento após tratamento da infecção inicial, quando os parasitos assexuados de fase sanguínea permanecem presentes devido à eliminação incompleta dos parasitos após o tratamento, causando infecção sintomática ou assintomática.

Recaída: parasitemia originada da ativação de hipnozoítos.

Terapia combinada à base de artemisinina: Combinação de um derivado de artemisinina com outro antimalárico de longa duração com mecanismo de ação distinto.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Valores de Cq na detecção molecular de *P. vivax* para controle de cura dos pacientes de Porto Velho/RO

ID do paciente	Dia da coleta	NR-qPCR ¹ (100 µL) ²	NR-qPCR (100 µL)	NR-qPCR (50 µL)	NR-qPCR	NR-qPCR	Snounou ³	Culleton ⁴	Microsatélite
011	0	.	.	.	29,9	.	+	.	+
	21	ND	.	.	.
	28	ND	ND	.	ND	ND	ND	ND	.
	42	.	.	.	39,2	.	.	.	+
020	0	.	.	.	23,7	.	+	.	+
	28	ND	.	.	.
	44	ND	ND	.	ND	ND	ND	ND	.
	63	.	.	.	31,7	.	+	.	+
024	07	.	.	.	ND	ND	ND	.	+
	28	ND	.	.	.
	42	ND	ND	.	ND	ND	ND	ND	.
	63	.	.	.	37,9	38,5	+	.	+
033	0	.	.	.	25,3	.	+	.	+
	28	ND	.	.	.
	41	ND	ND	.	ND	ND	ND	ND	.
	62	.	.	.	32,9	.	+	.	+
035	0	.	.	.	28,1	.	+	.	+
	29	34,9	.	.	.
	42	ND	ND	.	ND	ND	ND	ND	.
	62	.	.	.	25,9	.	+	.	+
043	0	.	.	.	22,7	.	+	.	+
	27	38,4	.	.	.
	41	37,3	35,5	36,8	ND	ND	ND	ND	.
	51	.	.	.	28,9	.	+	.	+
050	0	.	.	.	24,9	.	+	.	+
	22	31,2	.	.	.
	28	ND	ND	.	ND	ND	ND	ND	.
	41	.	.	.	24,6	.	+	.	+
053	0	.	.	.	19,9	.	+	.	+
	21	.	.	.	ND	ND	.	.	.
	32	ND	.	.	.
	42	37,6	.	ND	ND	ND	ND	ND	.
060	0	.	.	.	24,7	.	+	.	+
	28	ND	.	.	.
	42	.	.	ND	ND	ND	.	.	.
	63	.	.	.	31,9	.	+	.	+
067	0	.	.	.	25,9	.	+	.	+
	21	.	.	.	ND	ND	.	.	.
	30	ND	.	.	.
	41	36,9	ND	ND	36,4	ND	ND	ND	.
069	0	.	.	.	29,3	.	+	.	+
	08	.	.	.	36,2	.	+	.	+
	19	ND	36,5	ND	ND	ND	ND	ND	.
	28	.	.	.	24,6	.	+	.	+
073	0	.	.	.	31,2	.	+	.	+
	21	ND	.	.	.
	28	ND	ND	.	ND	ND	ND	ND	.
	37	.	.	.	30,8	.	+	.	+
102	0	.	.	.	30,1	.	+	.	+
	28	ND	.	.	.
	42	ND	ND	.	ND	ND	ND	ND	.
	63	.	.	.	ND	ND	+	.	+
103	0	.	.	.	31,8	.	+	.	+
	21	.	.	.	ND	ND	.	.	.
	28	ND	ND	.	ND	ND	ND	ND	.
	40	.	.	.	32,5	.	+	.	+

¹NR indica protocolo de qPCR de alvo não ribossomal. ²Volume de hidratação do DNA após extração. ³PCR convencional, detecção de alvo ribossomal de *P. vivax*. ⁴PCR convencional, detecção de alvo mitocondrial de *P. vivax*. Os pontos (.) indicam amostras não submetidas ao protocolo de amplificação. ND indica amostra submetida ao protocolo e ausência de amplificação do DNA alvo Sinal de positivo (+) indica amplificação qualitativa por protocolo convencional.

APÊNDICE A. Valores de Cq na detecção molecular de *P. vivax* para controle de cura dos pacientes de Porto Velho/RO

ID do paciente	Dia da coleta	NR-qPCR ¹ (100 µL) ²	NR-qPCR (100 µL)	NR-qPCR (50 µL)	NR-qPCR (50 µL)	NR-qPCR (50 µL)	Snounou	Culleton	Microsatélite
111	0	.	.	.	ND	ND	+	.	+
	14	ND	.	.	.
	42	.	.	.	ND	ND	.	.	.
	50	.	.	ND	34,1	.	+	.	+
119	0	.	.	.	35,5	.	+	.	+
	14	ND	.	.	.
	22	32,8	38,8	39,0	ND	ND	+	+	.
	27	.	.	.	31,0	.	+	.	+
126	0	.	.	.	ND	33,2	+	.	+
	29	ND	ND	.	ND	ND	ND	ND	.
	42	.	.	ND	31,3	31,8	ND	ND	.
	47	.	.	.	ND	.	+	.	+
133	0	.	.	.	30,2	.	+	.	+
	27	ND	.	.	.
	42	ND	ND	.	ND	ND	ND	ND	.
	62	.	.	.	31,1	.	+	.	+
136	0	.	.	.	33,9	.	+	.	+
	28	ND	.	.	.
	43	ND	ND	.	ND	ND	ND	ND	.
	63	.	.	.	34,7	.	+	.	+
153	0	.	.	.	31,9	.	+	.	+
	28	ND	ND	.	.	ND	ND	ND	.
	42	.	.	35,8	30,6	30,3	ND	ND	.
	63	.	.	.	33,9	.	+	.	+
156	0	.	.	.	21,2	.	+	.	+
	28	ND	.	.	.
	42	ND	ND	.	ND	ND	ND	ND	.
	63	.	.	.	28,6	.	+	.	+
157	0	.	.	.	28,4	.	+	.	+
	28	ND	ND	.	.	ND	ND	ND	.
	42	.	.	ND	ND	ND	ND	ND	.
	63	.	.	.	33,9	.	+	.	+
160	0	.	.	.	27,4	.	+	.	+
	28	ND	.	.	.
	42	ND	ND	.	ND	ND	ND	ND	.
	61	.	.	.	29,3	.	+	.	+
162	0	.	.	.	23,2	.	+	.	+
	28	ND	.	.	.
	42	ND	ND	.	ND	ND	ND	ND	.
	56	.	.	.	24,0	.	+	.	+
163	0	.	.	.	27,8	.	+	.	+
	21	ND	.	.	.
	28	ND	ND	.	ND	ND	ND	ND	.
	42	.	.	.	30,4	.	+	.	+
166	0	.	.	.	24,3	.	+	.	+
	29	ND	.	.	.
	43	ND	ND	.	ND	ND	ND	ND	.
	57	.	.	.	24,7	.	+	.	+
182	0	.	.	.	25,1	.	+	.	+
	7	ND	.	.	.
	14	33,9	36,4	36,7	37,4	37,3	ND	+	.
	21	.	.	.	31,4	.	+	.	+

¹NR indica protocolo de qPCR de alvo não ribossomal. ²Volume de hidratação do DNA após extração. ³PCR convencional, detecção de alvo ribossomal de *P. vivax*. ⁴PCR convencional, detecção de alvo mitocondrial de *P. vivax*. Os pontos (.) indicam amostras não submetidas ao protocolo de amplificação. ND indica amostra submetida ao protocolo e ausência de amplificação do DNA alvo Sinal de positivo (+) indica amplificação qualitativa por protocolo convencional.

APÊNDICE B. Genotipagem de *CYP2C8* e *CYP2D6* e predição da atividade fenotípica de *CYP2D6*

	CYP2C8				CYP2D6										Número de cópias	AS ^b	Alelo 1	AS	Alelo 2	Total Score Activity ^c	Fenótipo CYP2D6 ^b
	Código do paciente	G416A	A805T	G1846A	G2988A	G3183A	C100T	C1023T	-1584 G>C	C2850T	G4180C	2615_2617 delAAG	Haplótipo ^a	Alelo 1							
CQ+PQ	73	GG	AA	GG	GG	GG	CC	CC	CG	TC	GC	AA	PV073: (2,4)	*1	*2A/*35	2	1	1	2	gNM-F	
	103	GG	AA	GG	GA	GG	CC	CC	CG	TT	CC	AA	PV103: (4,7)	*2A/*35	*41	2	1	0,5	1,5	gNM-F	
	50	GG	AA	GG	GG	GG	CC	CC	CC	CC	GG	AA	PV050: (2,2)	*1	*1	2	1	1	2	gNM-F	
	163	GG	AA	GA	GA	GG	TC	CC	CC	TC	CC	AA	PV163: (7,8)	*41	*4/*4x2	3	0,5	0	0,5	gIM	
	214	GG	AA	GG	GG	GG	CC	CC	GG	TT	CC	AA	PV214: (4,4)	*2A/*35	*2A/*35	2	1	1	2	gNM-F	
	162	GG	AA	GG	GG	GG	CC	CC	CG	TC	GC	AA	PV162: (2,4)	*1	*2A/*35	2	1	1	2	gNM-F	
	35	GG	AA	GG	GG	GG	CC	CC	CC	CC	GG	AA	PV035: (2,2)	*1	*1	2	1	1	2	gNM-F	
	133	GG	AA	GG	GG	GG	CC	CC	CC	CC	GG	AA	PV133: (2,2)	*1	*1	2	1	1	2	gNM-F	
	153	GA	AA	GG	GG	GG	CC	CC	CC	CC	GG	AA	PV153: (2,2)	*1	*1	2	1	1	2	gNM-F	
	156	GG	AA	GG	GG	GG	CC	CC	GG	TT	CC	AA	PV156: (4,4)	*2A/*35	*2A/*35	2	1	1	2	gNM-F	
AM+PQ	126	GG	AA	GA	GG	GG	TC	CC	CC	CC	GC	AA	PV126: (2,8)	*1	*4	2	1	0	1	gNM-S	
	53	GG	AA	GG	GG	GG	TC	CC	CC	CC	GC	AA	PV053: (2,6)	*1	*10	2	1	0,5	1,5	gNM-F	
	43	GG	AA	GA	GG	GG	TC	CC	CC	CC	GC	AA	PV043: (2,8)	*1	*4	2	1	0	1	gNM-S	
	67	GG	AA	AA	GG	GG	TT	CC	CC	CC	CC	AA	PV067: (8,8)	*4	*4	2	0	0	0	gPM	
	216	GA	AA	GA	GG	GG	TC	CC	CC	CC	GC	AA	PV216: (2,8)	*1/*1xN	*4/*4x2	3	2	0	2	gNM-S	
	207	GA	AA	GG	GG	GG	CC	CC	CG	TC	GC	CA	PV207: (3,4)	*9	*2A/*35	2	0,5	1	1,5	gNM-F	
	160	GG	AA	GA	GG	GG	TC	CC	CC	CC	GC	AA	PV160: (2,8)	*1	*4	2	1	0	1	gNM-S	
	198	GG	AA	GG	GG	GG	TC	CC	CC	CC	GC	CA	PV198: (3,6)	*9	*10	2	0,5	0,5	1	gNM-S	
	60	GG	AA	GG	GG	GG	CC	CC	GG	TT	CC	AA	PV060: (4,4)	*2A/*35	*35xN/*2xN	3	1	2	3	gUM	
	102	GA	AA	GG	GA	GG	CC	CC	CC	TC	GC	AA	PV102: (2,7)	*1	*41	2	1	0,5	1,5	gNM-F	
AL+PQ	157	GG	AA	GG	GG	GG	CC	CC	GG	TT	CC	AA	PV157: (4,4)	*2A/*35	*5	1	1	1	2	gNM-F	
	251	GA	AA	GG	GA	GG	CC	CC	CG	TT	CC	AA	PV251: (4,7)	*2A/*35	*41	2	1	0,5	1,5	gNM-F	
	182	GG	AA	GG	GA	GG	CC	CC	CC	TC	GC	AA	PV182: (2,7)	*1	*41	2	1	0,5	1,5	gNM-F	
	119	GG	AA	GG	GG	GG	CC	CT	CG	TT	CC	AA	PV119: (4,5)	*2A/*35	*17	2	1	0,5	1,5	gNM-F	
	69	GG	AA	GG	GG	GG	CC	CC	CC	CC	GG	AA	PV069: (2,2)	*1	*1	2	1	1	2	gNM-F	
	246	GG	AA	GA	GG	GG	TC	CC	CC	CC	GC	AA	PV246: (2,8)	*1	*4	2	1	0	1	gNM-S	
	11	GG	AA	GG	GA	GG	CC	CC	CG	TT	CC	AA	PV011: (4,7)	*2A/*35	*41	2	1	0,5	1,5	gNM-F	
	111	GG	AA	GG	GG	GG	CC	CC	CC	CC	GG	AA	PV111: (2,2)	*1	*1	2	1	1	2	gNM-F	
	166	GG	AA	GG	GG	GG	CC	CC	CG	TT	CC	AA	PV166: (1,4)	*2D	*2A/*35	2	1	1	2	gNM-F	
	33	GG	AA	GA	GG	GG	TC	TT	CC	TC	CC	AA	PV033: (5,10)	*17	NP	2	0,5	ND	ND	ND	
20	GG	AA	GG	GG	GG	TC	CC	CC	CC	GC	AA	PV020: (2,6)	*1	*10	2	1	0,5	1,5	gNM-F		
24	GG	AA	GG	GG	GG	CC	CT	CG	TT	CC	AA	PV024: (4,5)	*2A/*35	*17	2	1	0,5	1,5	gNM-F		
136	GG	AA	GA	GG	GG	TC	CC	CC	CC	GC	AA	PV136: (2,8)	*1	*4	2	1	0	1	gNM-S		
231	GG	AA	GA	GG	GG	TC	CC	GG	TC	CC	AA	PV231: (4,9)	*2A/*35/*2xN	NP	3	1	ND	ND	ND		
250	GG	AA	GG	GG	GG	CC	CC	CC	CC	GG	AA	PV250: (2,2)	*1	*1	2	1	1	2	gNM-F		

(a) Haplótipo de *CYP2D6* inferido usando o *software* PHASE. (b) Activity Score e inferência dos fenótipos de *CYP2D6*: metabolizador normal-fast (gNM-F, AS = 1,5 ou 2); metabolizador ultrarrápido (gUM, AS>2, mais de 2 cópias do alelo normal); metabolizador normal-slow (gNM-S, AS=1); metabolizador intermediário (gIM, AS=0,5); metabolizador nulo (gPM, AS=0), de acordo com Gaedigk e colaboradores (2008). (c) Soma dos valores de AS atribuídos ao alelo 1 e alelo 2 de *CYP2D6*.

APÊNDICE C. Resultados encontrados para os 35 pacientes incluídos no estudo: fenótipo de CYP2D6, dia da recidiva clínica, genótipo do parasito isolado da recidiva, detecção de infecções submicroscópicas assintomáticas

	Código do paciente	Fenótipo CYP2D6 ^a	Dia da recidiva clínica ^b	Parasito da recidiva ^c	PCR+ d28 ou anterior?	PCR+ entre d28 e d42?
CQ+PQ	73	gNM-F	37	Idêntico	Não	Sim
	103	gNM-F	40	Idêntico	Não	Sim
	50	gNM-F	41	Heterólogo	Sim	Sim
	163	gIM	42	Idêntico	Não	Sim
	214	gNM-F	42	Idêntico	.	Sim
	162	gNM-F	56	Similar	Não	Não
	35	gNM-F	62	Heterólogo	Sim ^e	Não ^e
	133	gNM-F	62	Idêntico	Não	Não
	153	gNM-F	63	Similar	Não	Sim
	156	gNM-F	63	Idêntico	Não	Não
AM+PQ	126	gNM-S	47	Similar	Não	Sim
	53	gNM-F	49	Idêntico	Não	Sim
	43	gNM-S	51	Idêntico	Sim	Sim
	67	gPM	54	Idêntico	Não	Sim
	216	gNM-S	55	Heterólogo	.	.
	207	gNM-F	56	Similar	.	.
	160	gNM-S	61	Idêntico	Não	Não
	198	gNM-S	62	Idêntico	.	.
	60	gUM	63	Heterólogo	Não	Não
	102	gNM-F	63	Idêntico	Não	Não
AL+PQ	157	gNM-F	63	Heterólogo	Não	Não
	251	gNM-F	63	Similar	.	.
	182	gNM-F	21	Idêntico	Sim	Sim
	119	gNM-F	27	Idêntico	Sim	Sim
	69	gNM-F	28	Idêntico	Sim	Sim
	246	gNM-S	39	Idêntico	.	Sim
	11	gNM-F	42	Idêntico	Não	Sim
	111	gNM-F	50	Heterólogo	Não	Não
	166	gNM-F	57	Similar	Não	Não
	33	ND	62	Similar	Não	Não
20	gNM-F	63	Idêntico	Não	Não	
24	gNM-F	63	Heterólogo	Não	Não	
136	gNM-S	63	Idêntico	Não	Não	
231	ND	63	Idêntico	.	.	
250	gNM-F	63	Similar	.	.	

(a) Fenótipos inferidos de CYP2D6. (b) Recidiva confirmada por microscopia óptica positiva e sintomas clínicos presentes. (c) Caracterização molecular do parasito isolado da recidiva clínica confirmada por microscopia óptica. (d) Recidivas clínicas (MO+) confirmadas por PCR ou infecção assintomática detectável por qPCR. (e) d29 do paciente foi incluído no acompanhamento como dia 28. (ND) Não determinado.

APÊNDICE D. Artigo

Daher et al. *Malar J* (2019) 18:325
<https://doi.org/10.1186/s12936-019-2950-4>


Malaria Journal

RESEARCH

Open Access



Pharmacokinetics/pharmacodynamics of chloroquine and artemisinin-based combination therapy with primaquine

André Daher^{1,2,3*} , Ghait Aljayyousi³, Dhelio Pereira^{4,5}, Marcus V. G. Lacerda^{6,7}, Márcia A. A. Alexandre⁷, Cristiana T. Nascimento⁷, Júlio Castro Alves⁸, Laís Bastos da Fonseca⁹, Diego Medeiros Dias da Silva⁹, Douglas Pereira Pinto⁹, Danielle Fonseca Rodrigues¹⁰, Ana Carolina Rios Silvino¹⁰, Taís Nóbrega de Sousa¹⁰, Cristiana Ferreira Alves de Brito¹⁰, Feiko O. ter Kuile³ and David G. Lalloo³

Abstract

Background: Activation of hypnozoites of vivax malaria causes multiple clinical relapses, which contribute to the *Plasmodium vivax* burden and continuing transmission. Artemisinin-based combination therapy (ACT) is effective against blood-stage *P. vivax* but requires co-administration with primaquine to achieve radical cure. The therapeutic efficacy of primaquine depends on the generation of a therapeutically active metabolite via cytochrome P450 2D6 (CYP2D6). Impaired CYP2D6 metabolism has been associated with primaquine treatment failure. This study investigated the association between impaired CYP2D6 genotypes, drug-exposure to the long-acting ACT component (schizonticidal drugs) and tolerance and efficacy.

Methods: Adult patients with acute vivax malaria were enrolled in a recently completed trial and treated with artesunate–mefloquine, chloroquine or artemether–lumefantrine. All received concomitant primaquine (0.5 mg/kg/day for 7–9 days). The association between efficacy and safety and drug exposure was explored using area-under-the-curve (AUC) and half-life ($t_{1/2}$) estimates obtained by non-compartmental analysis of the long half-life drugs. Parasite recurrences by day 63 were categorized as related relapses or re-infections/unrelated hypnozoite activation by genotyping three microsatellite loci and two polymorphic loci of merozoite surface antigen-1. The CYP2D6 genotype was identified with Taqman assays by real-time PCR to 9 polymorphisms (8 SNPs and one deletion). Impaired CYP2D6 activity was inferred using the Activity Score System.

Results: Most recurrences in the ASMQ (67%), CQ (80%) and AL (85%) groups were considered related relapses. Eight of nine (88.9%) of the patients with impaired CYP2D6 activity relapsed with related parasite compared to 18/25 (72%) with normal activity (RR = 1.23, 0.88; 1.72, $p = 0.40$). There were no associations between the measured PK parameters and recurrence. Patients with longer chloroquine half-lives had more pruritus (RR = 1.09, 1.03; 1.14, $p = 0.001$). Higher CQ AUCs were associated with reduced falls in haemoglobin by day 14 (Coef = 0.02, − 0.005; − 0.03, $p = 0.01$). All regimens were well tolerated.

Conclusion: Genotyping of *P. vivax* showed that activation of related (homologous) hypnozoites was the most frequent cause of recurrence. The high proportion of the impaired CYP2D6 activity among patients with recurrent infections suggests that slow primaquine metabolism might influence related relapse rates in Brazil among patients receiving primaquine for radical cure, although confirmatory studies are needed. There was no association between drug exposure of the long-acting ACT component (schizonticidal drugs) and risk of related relapse. ACT was well

*Correspondence: andredaher@gmail.com

¹ Institute of Drug Technology (Farmanguinhos), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

tolerated. These results provide further re-assurance about the safety and efficacy of ACT when combined with short course primaquine to treat uncomplicated malaria vivax in Brazil.

Trial registration RBR-79s56s ([http://www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-79s56s/](http://www ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-79s56s/))

Keywords: Malaria, *Plasmodium vivax*, Anti-malarial treatment, Chloroquine, Mefloquine, Lumefantrine, Primaquine, Artemisinin-based combination therapy, ACT, Pharmacokinetics, Clinical trial

Background

The biological features of vivax malaria provide major challenges for pre-elimination and elimination programmes in areas co-endemic for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* [1]. These features include the early appearance of gametocytes, a high proportion of asymptomatic or chronic carriers [2] and the parasite latent form hypnozoites that produce relapses. Relapses make a major contribution to the global *P. vivax* burden [3]. It was estimated that relapses constituted 76–90% and 79% of total infections in Papua New Guinea and Thailand, respectively [4]. To eliminate this reservoir of latent infections, simple effective radical treatment of vivax using 8-aminoquinolines, such as primaquine or the recently approved analogue tafenoquine, is required.

In most countries with endemic *P. vivax*, the preferred first-line radical treatment for *P. vivax* remains chloroquine, combined with 7- to 14-day primaquine regimens, and this has barely changed since the 1950s [5]. Chloroquine is no longer recommended for the case management of falciparum malaria due to the spread of parasite resistance [6], resulting in the use of different treatment regimens for *P. vivax* and *P. falciparum* in areas where these species are co-endemic. This is programmatically complicated. The use of a single regimen to treat all species of malaria would simplify malaria treatment guidelines [7]. Artemisinin-based combination therapy (ACT) is emerging as the best option in this context, particularly in settings where there are concerns about chloroquine-resistant *P. vivax* [8]. ACT is effective against the blood stage of *P. vivax* [9], but must be co-administered with primaquine to eliminate *P. vivax* hypnozoites [8, 10]. Short-course primaquine regimens are preferable as they have been proven to have an efficacy not inferior to the standard 14 days' regimens [11–14]. However, there is a relative lack of data on the safety, pharmacodynamics and pharmacokinetics of ACT when provided in combination with daily primaquine regimens for the radical cure of *P. vivax* [15]. Safety is a major concern when deploying new treatments, but there are also concerns that primaquine/ACT drug interactions may reduce the overall regimen efficacy by inhibiting CYP2D6 or reducing synergistic effect of the current regimen. There are uncertainties about the best partner ACT, as drugs with a longer half-life may prevent early relapses.

Characterization of parasites and patients' drug metabolism is needed to ascertain the pharmacodynamics, pharmacokinetics and therapeutic success of these regimens. The main malaria clinical trials outcomes are parasitological clearance and recurrence rate [16]. Vivax recurrence includes: (i) recrudescence of parasites that have been previously cleared and microscopically undetectable; (ii) re-infection from another mosquito bite; and, (iii) relapses, i.e., activation of hypnozoites, genetically related (homologous) or unrelated (heterologous). The primaquine metabolite that is active against human hypnozoite is unknown [17], but the metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on the cytochrome P450 enzyme CYP2D6 [17–19]. Low CYP2D6 activity results in slow metabolism of primaquine to the active metabolite. CYP2D6 activity may be a proxy of primaquine's active metabolite exposure and a risk factor for relapse among primaquine recipients [20–22]. Similarly, the cytochrome P450 enzymes CYP2C8 was investigated as it is known to participate in the metabolism of chloroquine [23].

A previous randomized clinical trial in Brazil of the treatment of uncomplicated vivax malaria compared the safety and efficacy of the fixed-dose ACT artemether-lumefantrine and artesunate-mefloquine against the standard treatment with chloroquine, all three in combination with short-course primaquine (0.5 mg/kg/day for 7–9 days) [24]. This current study investigated the pharmacokinetics of the long-acting ACT component (schizonticidal drugs) with concomitant primaquine upon the safety and efficacy of these three treatment regimens and the influence of genetic variability of parasite and host, including the frequency of mutations in CYP2D6 gene over relapse rate.

Methods

Overview study design

The patients included in the current analysis were enrolled in a larger clinical trial previously published and designed in accordance with WHO guidelines [16]. The trial was designed to evaluate the safety and efficacy of the schizonticidal drugs with concomitant use of primaquine for vivax cure. The details of the trial design and methods have been reported elsewhere [24]; in brief, patients were eligible if they had acute uncomplicated

malaria due to *P. vivax* mono-infection confirmed by microscopy, with fever or a history of fever in the previous 48 h, were aged 18 to 70 years old, weighed between 50 and 90 kg, and had parasite densities $>250/\mu\text{L}$ and haemoglobin levels >7.0 g/dL. G6PD deficiency was not an exclusion criterion. They were randomly allocated to three treatment groups: (a) artesunate–mefloquine (100+200 mg QD for 3 days) (ASMQ); (b) chloroquine (CQ) (600 mg on day 1, and 450 mg on days 2 and 3); and, (c) artemether–lumefantrine (20+120 mg BID for 3 days) (AL). All three arms received the same concomitant primaquine regimen (7–9 days: 0.5 mg/kg/day).

Patients were assessed on the day of enrolment and days 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 42, and 63. The main endpoints were either treatment failure or adequate clinical and parasitological response. Blood samples were collected for parasite counts at every scheduled visit, on any day of treatment failure and for drug levels on days 0, 3, 7, 14, 21, 28, 42, and 63. Samples (100 μL) were transferred to Whatman (USA) ET 31 CHR E 3MM filter papers for later pharmacokinetic analysis and parasite genotyping [25].

Parasitological densities were estimated using Giemsa-stained blood slides at a magnification of 1000 \times using WHO-recommended methods [16]. Adverse events (AE) were assessed at each follow-up visit, and patients were encouraged to return to the clinic if they were ill in between scheduled visits. All AEs, including laboratory abnormalities, were categorized by body system.

Pharmacokinetics/pharmacodynamics

Whole blood concentrations of mefloquine (MQ), chloroquine (CQ) and lumefantrine (LMF) were measured using a validated HPLC-MS/MS method in accordance with Brazilian [26] and international regulatory requirements for bio-analytical methods [27]. The pharmacokinetics assays were conducted at the Equivalence and Pharmacokinetics Service (SEFAR)/Oswaldo Cruz Foundation, which is accredited by the Brazilian regulatory agency, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Non-compartmental analysis was performed for CQ, LMF and MQ using the Pmetrics[®] [28] package to estimate two main parameters; the overall area under the curve (AUC)_(3–63 days) and the terminal elimination half-life ($t_{1/2}$). The terminal elimination half-life was only calculated for subjects with five or more available samples. These two parameters were used as proxy indicators for overall drug exposure for correlation analyses with drug efficacy and safety profiles.

The correlation between drug exposure and treatment failure was evaluated using the Mann–Whitney test. The effect of pharmacokinetic parameters on the frequency of AEs likely or probably related to the test drug was

expressed as the relative risks (RR) obtained from random effects generalized estimation equation (GEE) log-binomial regression models. Linear regression was used to test the effects of PK parameters on the fall in haemoglobin (Hb) concentrations by day 14 relative to enrolment values [29]. The effects of these pharmacokinetic parameters on treatment failure (both early and later failures) were evaluated as odds ratios (OR) from binomial logit link regression models, using generalized linear models (GLM). Time to failure was tested using standard Cox regression. The proportion of clonal variability at recurrence was compared between treatment arms using Fisher's exact test. Two-sided p-values of <0.05 were considered statistically significant.

DNA extraction and genotyping of parasites microsatellites and polymorphic blocks of MSP-1 and patients' CYP2D6 and CYP2C8

DNA was extracted from dried blood using QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the instructions of the manufacturer. Three microsatellite loci (MS2, MS6, MS7) and two polymorphic loci (blocks 2 and 10) of Merozoite surface antigen 1 (MSP-1) were amplified using specific primers and conditions as previously described [30, 31]. The exact length and relative abundance (fluorescence levels) of each PCR product were determined in the DNA automatic sequencer (ABI 3730, Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) with fluorescein-labelled forward primers and an internal size standard (GeneScan 500 LIZ, Applied Biosystems). The predominant allele for each locus was identified as the highest peak of fluorescence in the electropherogram using GeneMapper 4.1 software (Applied Biosystems). The multiplicity of parasite variants was estimated measuring extra peaks in the electropherogram with fluorescence above the cut-off (150 arbitrary fluorescence units) and at least one-third the high of the main peak. Parasite recurrences within 63 days were categorized as 'related', including totally identical (homologues) if all five polymorphic loci (MS2; MS6; MS7; MSP1B2; MSP1B10) were identical and 'similar' if 80% of their alleles were identical; and otherwise as unrelated (heterologous) (Additional file 1). Number of alleles and heterozygosity expected were calculated in Arlequin software v. 3.5.2.2 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>).

The cytochrome P450 enzymes CYP2D6 [17, 19] and CYP2C8 [23] are known to participate in the metabolism of the primaquine and chloroquine, respectively. Two SNPs (G416A[rs11572080] and A805T [rs11572103]) were genotyped in the *CYP2C8* gene. In the *CYP2D6* gene eight SNPs were genotyped; (G-1584C [rs1080985], C100T [rs1065852], C1023T [rs28371706], G1846A

[rs3892097], C2850T [rs16947], G2988A [rs28371725], G3183A [rs59421388] and G4180C [rs1135840]) and one deletion (2615-2617delAAG [rs5030656]) were genotyped. The copy number was also determined. All SNPs genotyping were performed by real-time PCR using specific hydrolysis probe [22] in ViiA 7 Real-time PCR system (Applied Biosystems). Haplotypes and *CYP2D6* star alleles were inferred using the Phase software (version 2.1). *CYP2D6* gene copy number was determined with Hs00010001_cn assay (Applied Biosystem) in Real-time PCR [20]. Each allele got one value that was used to calculate the *CYP2D6* activity score (AS). Patient were categorized based on their AS score into normal metabolizer fast (gNM-F) (AS=1.5 or 2.0), normal metabolizer slow (gNM-S) (AS=1), intermediate metabolizer (gIM) (AS=0.5), poor metabolizer (gPM) (AS=0), and ultra metabolizer (gUM) (more than 2 copies of the normal allele) (AS ≥ 2.0). Impaired *CYP2D6* activity was defined as AS scores less than 1.5 (Additional file 2).

Results

Population

The study is based on a sub-set of samples from the original trial. Only 2/3 of samples (1400 samples of 175 patients) were evaluated in pharmacokinetics/pharmacodynamics analysis due to logistical issues, however the baseline characteristics of this sub-set were similar across the three arms (Table 1). Characterization of parasites and drug metabolism was conducted in all 35 patients with parasite recurrence within 63 days.

Characterization of parasites and drug metabolism in the population with treatment failure

The frequency of related (homologous and similar) and unrelated (heterologous) parasites among 35 patients with parasite recurrence within 63 days by study arm is shown in Table 2. Overall, 67, 80 and 85% of the recurrent malaria in the ASMQ, CQ and AL groups, respectively, were considered related relapses. Among the recurrences the pooled percentage of related relapses across the three arms was 77.1%.

Genetic analysis of the parasite populations comparing all recurrences also demonstrated that 77.1% (27/35) of patients presented with a single clonal infection at the initial infection and at the recurrence. The number of parasite variants between initial infection and recurrence remained the same in 23 (65.7%) of the 35 patients with recurrent infections and increased in 10 (28.5%) and decreased in 2 (5.7%). There was no difference in multiplicity of parasite clones at recurrence between treatment arms ($p=0.51$).

Cyp2d6

Eight of 9 (88.9%) patients classified to have reduced enzymatic activity for primaquine metabolism based on their *CYP2D6* genotypes relapsed with related parasites (RR = 1.23 95% CI (0.88–1.72) $p=0.40$) (Table 3). Eighteen out of 25 (72%) normal metabolisers had related relapses.

Table 1 Baseline characteristics of the study population

	ASMQ	CQ	AL
N of patients	60	58	57
Male n (%)	35 (58)	46 (79)	39 (68)
Weight in kg	70 (11)	73 (10)	73 (10)
Haemoglobin in g/dL	13.4 (1.8)	14.0 (3)	13.6 (2)
Parasitaemia/ μL^{a}	2145.56 [258–13,335]	2155.78 [285–17,685]	2444.71 [270–19,815]
Age in years	39.0 (11)	42.1 (10.5)	38.7 (11)

Data represent n (%) and means and (SD)

^a Parasitaemia was expressed by geometric mean and [min–max]

Table 2 Clinical outcomes aggregated by drug treatment (%)

Clinical outcome (%)	PCR results	ASMQ		CQ		AL		Overall	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Related relapse	Homologous	6	66.7%	6	80.0%	8	84.6%	20	77.1%
	Similar	2		2		3		7	
Reinfections or unrelated hypnozoites' activation	Heterologous	4	33.3%	2	20.0%	2	15.4%	8	22.9%
Overall		12		10		13		35	

Table 3 Inferred phenotype of CYP2D6 based on genotyping by treatment arm (%)

CYP2D6 metabolism	AS	Phenotype	ASMQ		CQ		AL ^a	
Normal	1.5 or 2	gNM-F	5	50.0%	9	90.0%	9	81.8%
	≥ 2	gUM	1		0		0	
Impaired	1	gNM-S	5	50.0%	0	10.0%	2	18.2%
	0.5	gIM	0		1		0	
	0	gPM	1		0		0	

AS activity score, gNM-F normal-fast metabolizer, gUM ultrarapid metabolizer, gNM-S normal-slow metabolizer, gIM intermediate metabolizer, gPM poor metabolizer

^a CYP2D6 phenotype of two patients (ID 33 and 231) could not be defined

Table 4 Inferred phenotype of CYP2C8 based on genotyping by drug treatment group

CYP2C8 (SNP)	Genotype	MQ	CQ	LMF
G416A	Normal	7	9	13
	Mutant ^a	5	1	0
A805T	Normal	12	10	13
	Mutant	0	0	0

^a All mutants are heterozygotes

Cyp2c8

The frequency of two polymorphisms in *CYP2C8* gene in the population who failed is presented in Table 4. Out of the 10 patients in the CQ arm with parasite recurrence, one had the SNP G416A genotype indicative of reduced enzyme activity of *CYP2C8*. The AUC and half-life for chloroquine of this patient were 91.9 µg/mL h and 11.32 days, respectively, compared with 102.3 µg/mL h and 19.3 days in the 9 *CYP2C8* non-mutated genotypes in the CQ arm. These results for the patient with the mutated genotype fall within the 95% CI for the overall population (Table 5).

Pharmacokinetics/pharmacodynamics

AUC_{0–63 day} values were calculated for each patient in each arm; the terminal elimination half-life ($t_{1/2}$) could

only be calculated for those receiving CQ or MQ. Figure 1 shows the terminal PK profile generated for MQ, CQ and LMF.

Drug exposure (defined by AUC_{3–63 day} or elimination half-life) under the therapeutic threshold could potentially explain the relapses and recrudescence, but not re-infections. The relationship of drug exposure (defined by AUC_{3–63 day} or elimination half-life) to recurrence was investigated by comparing the PK parameters in the cured population with those with confirmed related relapse (homologous+ similar). There were no statistically significant differences in AUC_{3–63 day} or elimination half-life for MQ, CQ or LMF between patients without recurrent infections by day 63 and those with relapses in univariate (Table 5). Weight and gender were also not associated with parasite recurrence by day 63 (Additional file 3), parasite clearance by day 3 (Additional file 4), or time to failure (Additional file 5).

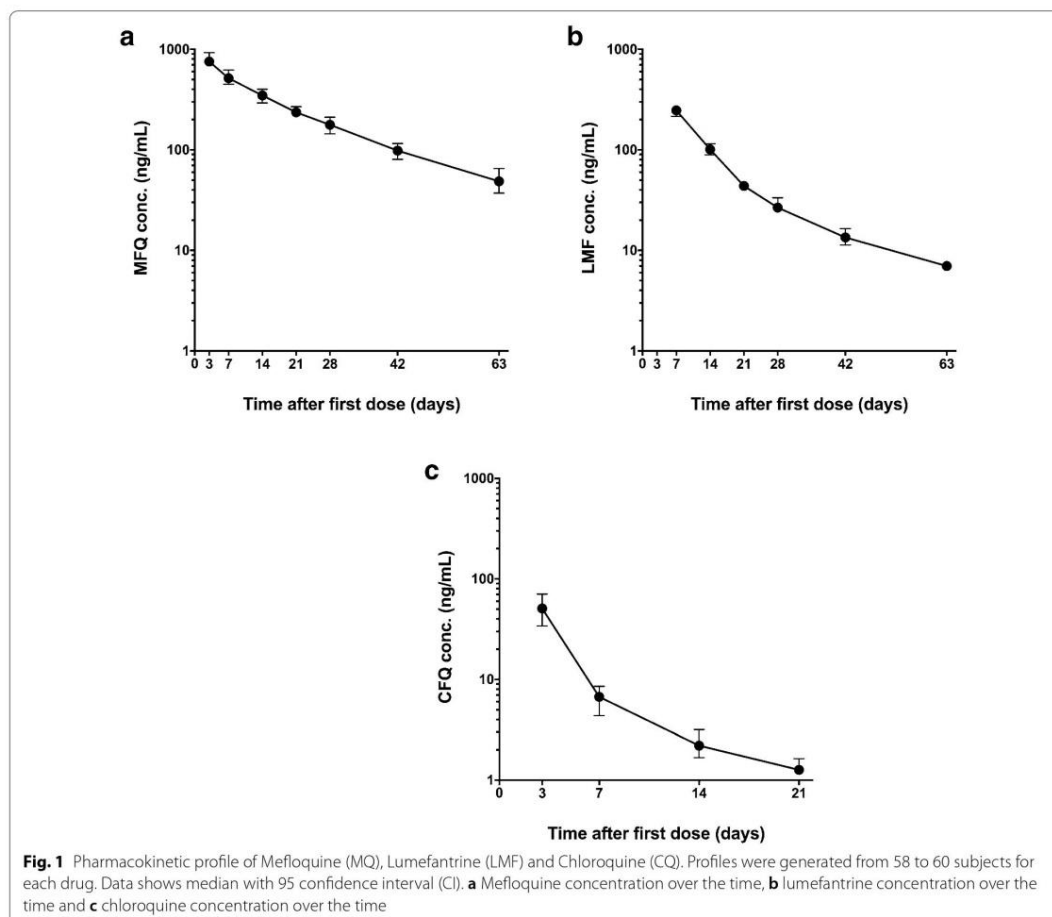
Higher drug exposures could be associated with a higher frequency of AEs. The influence of AUC, half-life and weight on the frequency of AEs likely and probably related to the treatment per body systems ($n \geq 30$) are presented in Additional file 6. The relative risk of having pruritus increased as the half-life of CQ increased (RR 1.09, 95% CI 1.03–1.14, $p=0.001$). Conversely, the influence of drug exposure on the Hb drop (defined as Hb at

Table 5 Median of pharmacokinetic parameters for mefloquine, chloroquine and lumefantrine in patients with homologous parasites by treatment outcome

	Mefloquine			Chloroquine			Lumefantrine		
	Cure	Relapse	p-value	Cure	Relapse	p-value	Cure	Relapse	p-value
N of patients	53	6	–	52	7	–	52	7	–
AUC _(0–63 day) (µg/mL h)									
Per outcome	338.6	302.0	0.67	105.9	95.8	1.0	7.3	3.73	0.96
Overall	338.6 [256.0–408.0]			103.8 [83.0–126.3]			6.7 [2.7–12.0]		
Half-life (days)									
Per outcome	17.7	25.6	0.58	18.5	19.3	0.42	NA	NA	–
Overall	17.8 [15.0–24.8]			18.7 [15.4–27.8]			NA		

Overall values are median with 25–75 percentiles in square brackets and N=59

NA non-applicable



day 14 – Hb at baseline/Hb at baseline) shown that the higher the AUC of CQ the lower the reduction in the Hb decline (Coef = 0.02, 95% CI = 0.03; - 0.00, $p=0.01$) (Additional file 7). Please number in sequence i.e. first 6 then 7).

Discussion

This study showed by genotyping polymorphic loci of *P. vivax* that relapse due to related parasites was the most frequent cause of recurrence by day 63 in all three treatment arms of the previous trial [32], where 13–16% of infections recurred by day 63. The current study also showed that the treatment failure rate in patients with reduced inferred CYP2D6 activity (26%) was higher than in the general population ($\cong 11\%$) [33]. Moreover, 8 out of 9 recurrences among patients with low

CYP2D6 activity were related relapses compared to 18 out of 25 with inferred normal CYP2D6 activity. Low CYP2D6 activity and presumptive low exposure to the active metabolite of primaquine or disruption of the PQ-enzyme interactions might influence related relapse rates in Brazil, although further studies are need to elucidate this effect. Likewise, the impaired activity of CYP2C8 may result in a lower exposure to desethylchloroquine, the chloroquine active metabolite. The PK parameters and clinical outcomes of the single patient with impaired CYP2C8 in CQ arm did not differ from the overall population.

Other causes of low exposure to primaquine are also potential risk factors for relapses, such as low adherence or impaired bioavailability. Similarly, others factors which affect the success of anti-infective therapeutics may influence the responses to the radical treatment, such as

differences in the biology of the parasite, the immune status of the patients and the density of latent hypnozoites [34].

This was the first time that some of the ACT combinations, namely ASMQ, were evaluated for the cure of *P. vivax* in clinical trial conditions, and thus in combination with daily primaquine (0.5 mg/kg/day for 7–9 days) regimens. The correlation between drug exposure to the long-acting components of the ACT and the risk of recurrence and AEs was also assessed. Potential interactions between primaquine and the ACT, and also the safety of these regimens, have not been extensively assessed [15]. Drug interactions such as lumefantrine inhibiting CYP2D6 [35] may reduce the overall regimen efficacy; on the other hand, drugs with a longer half-life may prevent early relapses. This study could not demonstrate a significant associations between the PK parameters of the long half-life drugs and the risk of recurrence, or the risk of relapse due to either homologous and heterologous relapses or time to recurrence (Additional files 3, 4, 5), although the numbers of relapses were small. Patients with longer chloroquine elimination half-life estimates were more likely to report pruritus. Transient, mild to moderate pruritus is a well-known adverse effect of chloroquine [36] and a threat to treatment adherence. A smaller drop in haemoglobin by day 14 was associated with higher CQ exposure (AUC), which may reflect better therapeutic efficacy achieved with higher concentrations of CQ [37].

This study has several limitations. The blood sampling schedule was designed to evaluate the blood levels of the long half-life drugs; the pharmacokinetic data allowed the prediction of the drug exposures up to 63 days post-treatment with up to 8 sample points available for each patient. It did not allow a proper modelling of primaquine levels and limited the calculation of the elimination half-life of lumefantrine. The absence of desethylchloroquine blood levels measurement is another study limitation. A trial designed with 6 months follow-up would have been able to evaluate relapses with more accuracy, as the median time to vivax recurrence in Brazil is 71 days [13]. The characterization of parasites and drug metabolism were conducted only in 35 patients with treatment failure limiting the comparisons. Genotyping vivax parasites to infer relapse frequencies also presents limitations. Genotyping in vivax does not allow differentiation between new infections (reinfections) or activation of unrelated (heterologous) hypnozoites. In this study, only recurrences with homologous and similar parasites were considered relapses. However, relapses are often heterologous activation of hypnozoites [31, 38]. The recrudescence of sub-microscopic parasite population [39] is also

a biologically plausible explanation for homologous parasites in two samples. Future use of more sensitive parasite detection strategies, such as ultrasensitive PCR of all consecutive samples of the patients who failed could elucidate these results.

Conclusion

The genotyping of polymorphic loci of *P. vivax* showed that relapse due to genetically related parasites was the most frequent cause of recurrence in all three treatment arms. The high proportion of CYP2D6 genetic polymorphisms among patients with recurrent infections suggests that impaired primaquine metabolism might influence the related relapse rates in Brazil among patients receiving primaquine for radical cure, further studies are needed to confirm this finding. The three ACT regimens were very effective, and there was no association between drug exposure levels of the long-acting components of the ACT and risk of relapse. The ACT was well tolerated overall. These results provided further reassurance about the safety of the combined use of ACT and short-course primaquine (0.5 mg/kg/day for 7–9 days) to treat uncomplicated malaria vivax in Brazil.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2950-4>.

Additional file 1. Genotyping of *Plasmodium vivax* polymorphic loci from patients during initial infection and recurrence. Size of PCR products in base pairs (bp). ^aNumber of patient and day of sample collection; d0—diagnosis and treatment, dX—the day of recurrence. *Allele similar to initial infection present in lower intensity. NA non-amplified.

Additional file 2. Genotyping of CYP2C8 gene and CYP2D6 gene and predicted phenotype of CYP2D6 activity. a CYP2D6 haplotype inferred using Phase software. b Activity score and inferred phenotype of CYP2D6: AS = 1.5 or 2 — normal metabolizer fast (gNM-F); AS ≥ 2 — ultra metabolizer (gUM) (more than 2 copies of the normal allele); AS = 1 — normal metabolizer slow (gNM-S); AS = 0.5 — intermediate metabolizer (gIM); AS = 0 — poor metabolizer (gPM), according to Gaedigk et al. [20]. c Sum of AS attributed to allele 1 and 2 of CYP2D6 gene. NP not performed.

Additional file 3. Evaluation of pharmacokinetics' parameters, gender and weight as predictors of failures per treatment drug (Generalized Linear Model, binomial logit link).

Additional file 4. Evaluation of pharmacokinetics' parameters and weight as predictors of D3 failures per treatment drug (Generalized Linear Model, binomial logit link). Only available to chloroquine, all males. ASMQ and AL 100% presented clearance at D3.

Additional file 5. Evaluation of pharmacokinetics' parameters, gender and weight as predictors of time to failures per treatment drug (Cox regression).

Additional file 6. Evaluation of pharmacokinetics' parameters as predictors of frequent (n ≥ 30) adverse event (possible and likely related to treatment) per system and drug using Generalized Estimation Equation log-binomial regression. *CQ AUC and weigh correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). Weight was excluded as a covariate.

Additional file 7. Evaluation of pharmacokinetics' parameters and weight as predictors of the drop in haemoglobin* at day 14 using ordinary least squares. *Hb at day 14 – Hb at baseline/Hb at baseline. **CQ AUC and weight correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). Weight was excluded as a covariate. NA non-applicable.

Abbreviations

ACT: artemisinin-based combination therapy; AE: adverse events; AL: fixed dose combination of 20 + 120 mg artemether and lumefantrine with concomitant use of primaquine; ANVISA: National Regulatory Agency; AS: CYP2D6 activity score; ASMQ: fixed dose combination of 100 + 200 mg artesunate and mefloquine with concomitant use of primaquine; AUC: area-under-the-curve; CQ: chloroquine; CI: confidence interval; CQ: chloroquine with concomitant use of primaquine; G6PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase; GEE: generalized estimation equation; GLM: generalized linear models; Hb: haemoglobin; HPLC-MS/MS: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LMF: lumefantrine; MQ: mefloquine; OR: odds ratio; PCR: polymerase chain reaction; RR: relative risks; SD: standard deviations; SEFAR: Equivalence and Pharmacokinetics Service; $t_{1/2}$: half-life; WHO: World Health Organization.

Acknowledgements

The authors thank all the patients who participated in this study, and CEPEM, FMT-HVD, VPPLR/Fiocruz and SEFAR/Fiocruz, teams. The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for the use of the DNA sequencing (RPT01E) and Real-Time PCR (RPT09D) facilities. CAB and TNS thank CNPq for the research scholarship support. ACRS thanks the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for scholarship support (Finance Code 001). DFR thanks Fapemig for scholarship support. MVL is a CNPq fellow. The Brazilian National Council of Research by Science Without Border programme (233618/2014-7) granted funds to AD scholarship.

Authors' contributions

AD was the study coordinator. DP and MVL were the principal investigators. MAAA, CTN, collected the clinical data. JCA and AD performed the analysis of the data. LBF, DMDS, DPP performed the pharmacokinetics analysis. GA performed the analysis of the pharmacokinetics data. CFAB, ACRS, TNS and DFR performed the PCR analysis. AD, JCA, DGL, FOIK, CFAB participated in interpretation of the data and critical revisions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The Brazilian National Council of Research by the Fiocruz Programme of Excellence in Clinical Research (402131/2011-80) granted funds to this study. The Institute of Drug Technology (Farmanguinhos), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Ministry of Health of Brazil provided additional funding. This work was supported in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Availability of data and materials

The evaluation of pharmacokinetics' parameters, gender and weight as predictors of failures per treatment drug (LGM, binomial logit link); evaluation of pharmacokinetics' parameters and weight as predictors of D3 failures per treatment drug (LGM, binomial logit link); and evaluation of pharmacokinetics' parameters, gender and weight as predictors of time to failures per treatment drug (Cox regression, binomial logit link) are provided in the additional file.

Ethics approval and consent to participate

The Ethics Committee at the Tropical Medicine Research Centre of Rondonia (CEPEM Nº 31/11 CEP/CEPEM e 0018.0.046.000-11 CAAE-SISNEP and Plataforma Brasil Nº 74869 CEP/CEPEM e Nº 05462612.7.0000.0011 CAAE) reviewed and approved the clinical study protocol and informed consent from all participants was acquired before the study initiation, as declared in the ethics and regulatory statement. All signed informed consent forms are kept for at least 5 years after the study end.

Consent for publication

This manuscript does not contain any individualized data. The confidentiality of the patients' records has been observed according to ethical regulations.

Competing interests

The authors declare following competing interests and financial disclosure: André Daher is an employee of the Institute of Drug Technology (Farmanguinhos), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), a Brazilian governmental institution of Ministry of Health. Farmanguinhos is one of the study sponsors. He was involved in the study design, decision to publish, and preparation of the manuscript. Farmanguinhos does not sell medicine on the market. The Brazilian Ministry of Health exclusively drives its drug production. These disclosures do not alter our adherence policies on sharing data and materials. There are no restrictions on the sharing of data and/or materials.

Author details

¹Institute of Drug Technology (Farmanguinhos), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil. ²Vice-presidency of Research and Biological Collections, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil. ³Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, UK. ⁴Tropical Medicine Research Center of Rondonia (CEPEM), Porto Velho, Rondonia, Brazil. ⁵Federal University of Rondonia (UNIR), Porto Velho, Rondonia, Brazil. ⁶Research Institute Leônidas & Maria Deane, FIOCRUZ, Manaus, Brazil. ⁷Foundation of Tropical Medicine Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil. ⁸National Institute of Infectious Disease, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil. ⁹Laboratory of Pharmacokinetics (SEFAR), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil. ¹⁰Institute René Rachou, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Belo Horizonte, Brazil.

Received: 1 May 2019 Accepted: 7 September 2019

Published online: 23 September 2019

References

1. Gething PW, Elyazar IR, Moyes CL, Smith DL, Battle KE, Guerra CA, et al. A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1814.
2. Chen I, Clarke SE, Gosling R, Hamainza B, Killeen G, Magill A, et al. "Asymptomatic" malaria: a chronic and debilitating infection that should be treated. *PLoS Med*. 2016;13:e1001942.
3. Betuela I, Rosanas-Urgell A, Kiniboro B, Stanisic DI, Samol L, De Lazzari E, et al. Relapses contribute significantly to the risk of *Plasmodium vivax* infection and disease in Papua New Guinean children 1–5 years of age. *J Infect Dis*. 2012;206:1771–80.
4. White MT, Karl S, Koepfli C, Longley RJ, Hofmann NE, Wampfler R, et al. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection dynamics: reinfections, recrudescences and relapses. *Malar J*. 2018;17:170.
5. Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;64(1–2 Suppl):97–106.
6. Welles TE, Plowe CV. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis*. 2001;184:770–6.
7. Price RN, Douglas NM, Anstey NM, von Seidlein L. *Plasmodium vivax* treatments: what are we looking for? *Curr Opin Infect Dis*. 2011;24:578–85.
8. WHO. Guidelines for the treatment of malaria. 3rd ed. Geneva: World Health Organization; 2015.
9. Sinclair D, Gogtay N, Brand F, Olliaro P. Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated *Plasmodium vivax* malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011;7:CD008492.
10. Alving AS, Hankey DD, Coatney GR, Jones R Jr, Coker WG, Garrison PL, et al. Korean vivax malaria. II. Curative treatment with primaquine and primaquine. *Am J Trop Med Hyg*. 1953;2:970–6.
11. Taylor R. Improving the radical cure of *P. vivax*—the efficacy results of the IMPROV study. In: Annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, New Orleans. 2018.
12. Chu CS, Phyto AP, Turner C, Win HH, Poe NP, Yotyingaphiram W, et al. Chloroquine versus dihydroartemisinin-piperaquine with standard high-dose primaquine given either for 7 days or 14 days in *Plasmodium vivax* malaria. *Clin Infect Dis*. 2019;68(8):1311–9.

13. Daher A, Silva J, Stevens A, Marchesini P, Fontes CJ, Ter Kuile FO, et al. Evaluation of *Plasmodium vivax* malaria recurrence in Brazil. *Malar J*. 2019;18:18.
14. Abdon NP, Pinto AY, Silva RDS, de Souza JM. Assessment of the response to reduced treatment schemes for vivax malaria. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34:343–8.
15. WHO. Control and elimination of vivax malaria: a technical brief. Geneva: World Health Organization; 2015.
16. WHO. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva: World Health Organization; 2009.
17. Baird JK, Louisa M, Noviyanti R, Ekawati L, Elyazar I, Subekti D, et al. Association of impaired cytochrome P450 2D6 activity genotype and phenotype with therapeutic efficacy of primaquine treatment for latent *Plasmodium vivax* malaria. *JAMA Netw Open*. 2018;1:e181449.
18. Pybus BS, Marcsisin SR, Jin X, Deye G, Sousa JC, Li Q, et al. The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP 2D6. *Malar J*. 2013;12:212.
19. Bennett JW, Pybus BS, Yadava A, Tosh D, Sousa JC, McCarthy WF, et al. Primaquine failure and cytochrome P-450 2D6 in *Plasmodium vivax* malaria. *N Engl J Med*. 2013;369:1381–2.
20. Silvino ACR, Costa GL, de Araújo FCF, Ascher DB, Pires DEV, Fontes CJF, et al. Variation in human cytochrome P-450 drug-metabolism genes: a gateway to the understanding of *Plasmodium vivax* relapses. *PLoS ONE*. 2016;11:e0160172.
21. Brasil LW, Rodrigues-Soares F, Santoro AB, Almeida AC, Kühn A, Ramasawmy R, et al. CYP2D6 activity and the risk of recurrence of *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: a prospective cohort study. *Malar J*. 2018;17:57.
22. Ladeia-Andrade S, Menezes MJ, de Sousa TN, Silvino ACR, de Carvalho JF, Salla LC, et al. Monitoring the efficacy of chloroquine–primaquine therapy for uncomplicated *Plasmodium vivax* malaria in the main transmission hot spot of Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63:e01965–18.
23. Gil JP, Gil Berglund E. CYP2C8 and antimalaria drug efficacy. *Pharmacogenomics*. 2007;8:187–98.
24. Pereira D, Daher A, Zanini G, Maia I, Fonseca L, Pitta L, et al. Safety, efficacy and pharmacokinetic evaluations of a new coated chloroquine tablet in a single-arm open-label non-comparative trial in Brazil: a step towards a user-friendly malaria vivax treatment. *Malar J*. 2016;15:477.
25. WHO. Methods and techniques for assessing exposure to antimalarial drugs in clinical field studies. Geneva: World Health Organization; 2011.
26. Ministério da Saúde, ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, 2003.
27. Food and Drug Administration. Bioanalytical method validation—guidance for industry. 2001.
28. Neely MN, van Guilder MG, Yamada WM, Schumitzky A, Jelliffe RW. Accurate detection of outliers and subpopulations with Pmetrics, a non-parametric and parametric pharmacometric modeling and simulation package for R. *Ther Drug Monit*. 2012;34:467–76.
29. Uthman OA, Graves PM, Saunders R, Gelband H, Richardson M, Garner P. Safety of primaquine given to people with G6PD deficiency: systematic review of prospective studies. *Malar J*. 2017;16:346.
30. Rezende AM, Tarazona-Santos E, Fontes CJ, Souza JM, Couto AD, Carvalho LH, et al. Microsatellite loci: determining the genetic variability of *Plasmodium vivax*. *Trop Med Int Health*. 2010;15:718–26.
31. de Araujo FC, de Rezende AM, Fontes CJ, Carvalho LH, de Brito CFA. Multiple-clone activation of hypnozoites is the leading cause of relapse in *Plasmodium vivax* infection. *PLoS ONE*. 2012;7:e49871.
32. Daher A, Pereira D, Lacerda MVG, Alexandre MAA, Nascimento CT, Alves de Lima ESJC, et al. Efficacy and safety of artemisinin-based combination therapy and chloroquine with concomitant primaquine to treat *Plasmodium vivax* malaria in Brazil: an open label randomized clinical trial. *Malar J*. 2018;17:45.
33. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Klein T, Leeder JS. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet Med*. 2017;19:69–76.
34. White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2011;10:297.
35. Administration. UFA. Clinical pharmacology and biopharmaceutics review. Application Number: 22-268. 2008.
36. Liu Q, Tang Z, Surdenikova L, Kim S, Patel KN, Kim A, et al. Sensory neuron-specific GPCR Mrgprs are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. *Cell*. 2009;139:1353–65.
37. Commons RJ, Simpson JA, Thriemer K, Humphreys GS, Abreha T, Alemu SG, 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. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:1025–34.
38. Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, Nandy A, et al. Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis*. 2007;195:927–33.
39. Nguyen TN, von Seidlein L, Nguyen TV, Truong PN, Hung SD, Pham HT, et al. The persistence and oscillations of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections over time in Vietnam: an open cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:565–72.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

