

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

**FALHA TERAPÊUTICA NA MALÁRIA POR *PLASMODIUM VIVAX*:
INVESTIGAÇÃO DE FATORES RELACIONADOS À METABOLIZAÇÃO DE
PRIMAQUINA E ESTUDO DE POLIMORFISMOS RELACIONADOS À
RESISTÊNCIA AOS ANTIMALÁRICOS**

Por

Maria Carolina Silva de Barros Puça

Belo Horizonte
2021

DISSERTAÇÃO	DCS – IRR	M. C. S. B. PUÇA	2021
--------------------	------------------	-------------------------	-------------

MARIA CAROLINA SILVA DE BARROS PUÇA

FALHA TERAPÊUTICA NA MALÁRIA POR *PLASMODIUM VIVAX*: INVESTIGAÇÃO DE FATORES RELACIONADOS À METABOLIZAÇÃO DE PRIMAQUINA E ESTUDO DE POLIMORFISMOS RELACIONADOS À RESISTÊNCIA AOS ANTIMALÁRICOS

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. Taís Nóbrega de Sousa

Belo Horizonte

2021

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

P960f
2021

Puça, Maria Carolina Silva de Barros.

Falha Terapêutica na malária por *Plasmodium vivax*: investigação de fatores relacionados à metabolização de primaquina e estudo de polimorfismos relacionados à resistência aos antimaláricosítulo / Maria Carolina Silva de Barros Puça – Belo Horizonte, 2021.

X, 80 f. il.; 210 X 297 mm.

Bibliografia 70-80

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

1. *Plasmodium vivax* 2. CYP2D6 3.
Monoamina oxidase 4. Malária. I. Título. II. Sousa, Taís Nóbrega (orientação).

CDD – 22. ed. – 616.93

MARIA CAROLINA SILVA DE BARROS PUÇA

FALHA TERAPÊUTICA NA MALÁRIA POR *PLASMODIUM VIVAX*: INVESTIGAÇÃO DE FATORES RELACIONADOS À METABOLIZAÇÃO DE PRIMAQUINA E ESTUDO DE POLIMORFISMOS RELACIONADOS À RESISTÊNCIA AOS ANTIMALÁRICOS

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. Taís Nóbrega de Sousa	Instituto René Rachou (Presidente)
Dr. Gregório Guilherme Almeida	Instituto René Rachou (Titular)
Dra. Fernanda Rodrigues Soares	Universidade Federal do Triângulo Mineiro (Titular)
Dra. Daniela de Melo Resende	Instituto René Rachou (Suplente)

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 08/09/2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais **Cláudia Puça** e **Ricardo Puça** por sempre me apoiarem em minhas escolhas e me ensinarem que o nosso maior tesouro é a sabedoria. Ao meu irmão **Ricardo** por sempre acreditar na minha capacidade.

Sou muito grata a minha família por sempre me ajudar nos momentos difíceis. Aos meus amigos que mesmo não sendo da área me ajudaram no que foi preciso, sempre contribuíram no que podiam e deixaram essa jornada mais divertida.

Ao meu companheiro por sempre me dar motivação, acreditar que eu sou capaz e embarcar junto comigo no projeto.

Muita gratidão a minha orientadora **Dra Taís Nóbrega de Souza** por confiar em mim e em meu potencial. A todas as pesquisadoras do BMIM por me receberem de braços abertos e sempre estarem à disposição. A plataforma de PCR em tempo real (PDTIS/FIOCRUZ) e a plataforma de sequenciamento, principalmente a Carol por me ajudar nos meus sequenciamentos e sempre estar lá prontamente disponível para ajudar.

Agradeço ao pessoal da salinha da malária por todas as conversas e momentos de descontração.

A minha companheira de laboratório e *roomate* **Yanka Salazar** por todos os momentos, conversas e saídas, você fez minha estadia em BH mais feliz.

Agradeço ao programa de pós-graduação em ciências da saúde da Fiocruz Minas por me proporcionar um mestrado de alta qualidade que me fez crescer como pessoa e profissional. As agências de fomento CAPES, FAPEMIG, CNPq e FIOCRUZ por me permitirem realizar minha pesquisa e por fim agradeço a todos os pacientes de malária que se disponibilizaram a participar do estudo.

RESUMO

A cura radical da malária causada por *Plasmodium vivax* requer a administração de um esquizotônico sanguíneo para matar os parasitos do estágio sanguíneo e a adição de uma droga capaz de matar os hipnozoítos, estágios latentes do parasito que residem no fígado de pacientes infectados. Atualmente, a primaquina (PQ) é o único medicamento usado para o tratamento de hipnozoítos. No entanto, os efeitos da PQ podem variar de um indivíduo para outro. A família de enzimas do complexo citocromo P450 (CYP) é responsável pela metabolização de antimaláricos como a cloroquina, mefloquina e PQ. Por ser uma pró-droga, a PQ depende da sua ativação que é realizada através da enzima CYP2D6, responsável por reações de redução e oxidação do fármaco e produção de metabólito ativo contra os hipnozoítos. Além da via das CYPs, a PQ também sofre desaminação oxidativa através da via da monoaminoxidase-A (MAO-A). Essa via está associada à produção do metabólito mais abundante da PQ, a carboxi-PQ, e é responsável pela meia vida curta da droga. A ocorrência de polimorfismos nesses genes levam a diferentes respostas terapêuticas, definidas pelos fenótipos: metabolizador lento, intermediário e rápido. Além de fatores ligados ao hospedeiro, a falha terapêutica pode estar associada a fatores do parasito, representado pela resistência do parasito aos antimaláricos. Para *P. vivax*, os estudos tem se concentrado na genotipagem molecular de *pvcr-t* (*chloroquine resistance transporter*) e *pvm-dr1* (*multidrug resistance gene-1*), genes ortólogos a *pfcr-t* e *pfm-dr1* de *P. falciparum* associados à resistência aos antimaláricos. O presente estudo teve como objetivo estudar a influência de fatores genéticos do hospedeiro, enzimas envolvidas na metabolização de primaquina, e genes do parasito que estão sob forte pressão seletiva e que são candidatos à resistência aos antimaláricos, na resposta terapêutica da infecção por *Plasmodium vivax*. A prevalência de indivíduos com atividade reduzida de CYP2D6 (fenótipos gPM, gIM e gNM-S) foi de 32,6% (31/95), semelhante a frequência de indivíduos com MAO-A disfuncional 37% (37/100). Nesse estudo, a atividade enzimática das duas enzimas foi correlacionado ao número de episódios de recorrências da malária. Apenas CYP2D6 parece influenciar as recidivas de *P. vivax* ($P = 0,012$; Teste de Qui-Quadrado), enquanto MAO-A não apresentou uma associação estatisticamente significativa com o número de recivas de malária. É importante ressaltar que nossos achados em relação da metabolização da PQ mostraram a possibilidade da MAO-A ser intensificadora do efeito de CYP2D6 disfuncional nos indivíduos. As análises *in silico* mostraram que alguns SNPs em *pvm-rp1* e *pvm-rp2* devem ter um efeito na exportação de moléculas como drogas antimaláricas. Contudo, nossas análises de variabilidade genética dos genes *pvm-rp1* e *pvm-rp2* do *P. vivax* indicam que os SNPs identificados a partir do sequenciamento de isolados da Amazônia brasileira não apresentam uma relação evidente com o número de episódios de recorrências. Em conjunto, nossos achados têm implicações diretas para os esforços atuais de controle da malária, uma vez que uma parcela significativa dos indivíduos com malária por *P. vivax* podem não responder adequadamente ao tratamento devido a atividade alterada de CYP2D6. Além disso, a identificação de SNPs que possam estar relacionados a uma maior tolerância do *P. vivax* à PQ-CQ poderão direcionar futuras pesquisas a respeito da resistência do parasito aos antimaláricos.

Palavras-chave: *Plasmodium vivax*. CYP2D6. MAO-A. malária. *pvm-rp1*. *pvm-rp2*. recorrências.

ABSTRACT

Radical cure of *Plasmodium vivax* infection requires the administration of a blood schizonticide to eliminate the blood stage parasites and the addition of a drug capable of eliminating the hypnozoites, the dormant stages of the parasite that reside in the liver of infected patients. Primaquine is currently the only drug available to treat hypnozoites. However, primaquine effects may vary from one individual to another. The cytochrome P450 (CYP) family of enzymes is responsible for metabolizing antimalarials such as chloroquine, mefloquine and PQ. As a pro-drug, PQ depends on its activation, which is carried out through the CYP2D6 enzyme, responsible for drug reduction and oxidation reactions and production of active metabolite against hypnozoites. In addition to the CYPs pathway, PQ also undergoes oxidative deamination through the monoamine oxidase-A (MAO-A) pathway, which is responsible for producing the most abundant metabolite, carboxy-PQ, and is responsible for the short half-life of the drug. The occurrence of polymorphisms in these genes lead to different therapeutic responses, defined by phenotypes: slow, intermediate and fast. In addition to host-related factors, therapeutic failure may be associated with parasite factors, represented by parasite resistance to antimalarials. For *P. vivax*, studies have focused on the molecular genotyping of *pvcr-t-o* (chloroquine resistance transporter) and *pvmdr1* (multidrug resistance gene-1), genes orthologous to *pfcr-t* and *pfmdr1* of *P. falciparum* linked to resistance. The present study aimed to study the influence of host's genetic factors, enzymes involved in primaquine metabolization, and parasite genes that are candidates in antimalarial resistance and understand intense selective pressure on the therapeutic response of *Plasmodium vivax* infection. The prevalence of individuals with reduced CYP2D6 activity (gPM, gIM and gNM-S phenotypes) was 32.6% (31/95) similar to the frequency of individuals with dysfunctional MAO-A 37% (37/100). In this study, both enzymes were investigated in relation to the number of episodes of recurrence, only CYP2D6 was shown to be influential in the number of recurrences ($P = 0.012$, Chi-Square test), whereas MAO-A did not present a statistically significant correlation. Importantly, our findings in relation to PQ metabolization showed the possibility of MAO-A be an enhancer to the effect of dysfunctional CYP2D6 in individuals. As for MRP1 and MRP2 SNPs, mutations that could lead to the export of molecules such as antimalarial drugs were mapped through the *in silico* study, where we analyzed the *pvmrp1* and *pvmrp2* genes in our isolates, no SNP was related to the number of recurrence episodes presented by individuals. Taken together, our findings have direct implications for efforts and future studies related to malaria control, as it has been shown that 32% of individuals may not respond adequately to treatment with PQ-CQ due to reduced CYP2D6 activity. In addition to the identification of SNPs that may be related to a greater tolerance of *P. vivax* to PQ, they may guide future research on the parasite's resistance to antimalarials.

Keywords: *Plasmodium vivax*. CYP2D6. MAO-A. malaria. *pvmrp1*. *pvmrp2*. Recurrence.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MAPA DO NÚMERO DE CASOS DE MALÁRIA POR PLASMODIUM VIVAX REGISTRADOS EM 2019	12
FIGURA 2 - RISCO DE MALÁRIA POR MUNICÍPIO DE INFECÇÃO, BRASIL, 2018.	13
FIGURA 3 - CASOS DE MALÁRIA NOTIFICADOS ENTRE 1959 E 2019.....	14
FIGURA 4 - CICLO BIOLÓGICO DO PLASMODIUM VIVAX.	15
FIGURA 5 - ESQUEMA DAS RECORRÊNCIAS DE MALÁRIA POR PLASMODIUM VIVAX.	19
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE AÇÃO DA PRIMAQUINA.....	20
FIGURA 7 - PRINCIPAIS PRODUTOS DE PQ PELAS VIAS METABÓLICAS DE MAO-A E CYP2D6..	23
FIGURA 8- RESPOSTA FARMACOCINÉTICA/CLÍNICA PREVISTA À TERAPIA COM PRIMAQUINA.	25
FIGURA 9- ALELOS DO GENE MAO-A E A SEQUÊNCIA DE REPETIÇÃO MAOA-UVNTR.	27
FIGURA 10 - REGIÕES INCLUÍDAS NO ESTUDO.....	33
FIGURA 11- ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS FENOTÍPICAS PREDITAS PARA CYP2D6 NA POPULAÇÃO DE ESTUDO.	46
FIGURA 12 - FREQUÊNCIA FENOTÍPICA DE CYP2D6 DE ACORDO COM O NÚMERO DE RECORRÊNCIAS DE MALÁRIA CAUSADA POR P. VIVAX.	47
FIGURA 13- FREQUÊNCIA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE MAO-A PREDITA ENTRE OS GRUPOS DE INDIVÍDUOS QUE EXPERIENCIARAM ≤ 1 EPISÓDIO DE RECORRÊNCIA E MÚLTIPLAS RECORRÊNCIAS.....	48
FIGURA 14 - FREQUÊNCIA DA ATIVIDADE DE CYP2D6 PREDITA DENTRE OS INDIVÍDUOS QUE POSSUEM A ATIVIDADE FUNCIONAL E DISFUNCIONAL DE MAO-A.....	50
FIGURA 15 - CURVA KAPLAN-MEIER PARA O EFEITO DA ATIVIDADE DE CYP2D6 NO TEMPO DA PRIMEIRA RECORRÊNCIA.....	52
FIGURA 16 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA MRP1 COM AS MUTAÇÕES MAPEADAS.....	53
FIGURA 17 - INTERAÇÕES DA MUTAÇÃO L128I.....	54
FIGURA 18 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA MRP2 COM AS MUTAÇÕES MATEADAS.....	55
FIGURA 19- MUTAÇÃO A1106S IDENTIFICADA NO GENE PVMRP2.....	55
FIGURA 20 - GRÁFICO DE FREQUÊNCIA DOS SNPs EM MRP1 NOS GRUPOS QUE APRESENTARAM ≤ 1 EPISÓDIO DE RECORRÊNCIA E MÚLTIPLAS RECORRÊNCIAS.	57
FIGURA 21- FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS GERADOS, AGRUPADOS POR NÚMERO DE MUTAÇÕES DO GENE PVMRP1.....	57
FIGURA 22- GRÁFICO DE FREQUÊNCIA DOS SNPs EM MRP2 NOS GRUPOS QUE APRESENTARAM ≤ 1 EPISÓDIO DE RECORRÊNCIA E MÚLTIPLAS RECORRÊNCIAS.	59
FIGURA 23 -FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS GERADOS, AGRUPADOS POR QUANTIDADE DE MUTAÇÃO DO GENE PVMRP2.....	60
FIGURA 24- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DIFERENTES FATORES E DAS QUESTÕES-CHAVE QUE PODERIAM AFETAR O SURGIMENTO E A SELEÇÃO DE PLASMODIUM VIVAX RESISTENTE À PRIMAQUINA.....	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ALELOS DE CYP2D6 SELECIONADOS PARA ESTUDO, RESPECTIVAS ALTERAÇÕES NUCLEOTÍDICAS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA PREDITA E FENÓTIPO DE METABOLIZAÇÃO.....	36
TABELA 2 - SISTEMA DE PONTUAÇÃO DE ATIVIDADE DE CYP2D6 (ACTIVITY SCORE SYSTEM)	37
TABELA 3 - CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR CONVENCIONAL PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE MAOA.	38
TABELA 4 - ALELOS DE MAOA SELECIONADOS PARA ESTUDO.	39
TABELA 5- SEQUÊNCIA DE INICIADORES SENSO E ANTI-SENSO PARA PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO DOS GENES PVMRP1 E PVMRP2.	39
TABELA 6 - DADOS DEMOGRÁFICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS INDIVÍDUOS DO ESTUDO.....	42
TABELA 7 - FREQUÊNCIA DOS ALELOS DE CYP2D6 OBSERVADA NAS TRÊS POPULAÇÕES DO ESTUDO DE ACORDO COM OS GRUPOS DEFINIDOS PELO NÚMERO DE RECORRÊNCIAS.	44
TABELA 8- FREQUÊNCIA DOS FENÓTIPOS PREITOS DE CYP2D6 NOS GRUPOS ≤ 1 EPISÓDIO DE RECORRÊNCIA E MÚLTIPLAS RECORRÊNCIAS NAS TRÊS LOCALIDADES DO ESTUDO.	45
TABELA 9 - FREQUÊNCIA ALÉLICA DE MAO-A OBSERVADA NAS POPULAÇÕES DO ESTUDO DE ACORDO COM OS GRUPOS DEFINIDOS PELO NÚMERO DE RECORRÊNCIAS.....	48
TABELA 10 - FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES EM MRP1 NAS 34 AMOSTRAS DE P. VIVAX SEQUENCIADAS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA.	56
TABELA 11- FREQUÊNCIA DOS HAPLOTIPOS GERADOS DE PVMRP1	58
TABELA 12- FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES EM MRP2 NAS 17 AMOSTRAS DE P. VIVAX SEQUENCIADAS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA	59
TABELA 13- FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS GERADOS DE PVMRP2	60

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AS: *score* de atividade enzimática
ACT: Tratamento baseado em derivados da artemisinina
ART: Artemisinina
CPQ: Carboxiprimaquina
CNV: Variação do número de cópias (*Copy Number Variation*)
CQ: Cloroquina
CYP2D6: Citocromo P450 2D6
DHFR: *Dihydropteroate reductase*
DHPS: *Dihydropteroate synthase*
gIM: Fenótipo de metabolização intermediária
gNM-F: Fenótipo de metabolização normal
gNM-S: variante lenta do fenótipo de metabolização normal
gPM: Fenótipo de metabolização nula
gUM: Fenótipo de metabolização ultrarrápido
G6PD: *Glicose – 6 – fosfato desidrogenase*
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
MDR1: *Multidrug resistance*
MRP1: proteína associada à resistência a múltiplas drogas-1
MRP2: proteína associada à resistência a múltiplas drogas-2
MAO-A: *Monoamina Oxidase A*
PQ: Primaquina
PCR: Reação em cadeia da Polimerase
pvcrt-o: Plasmodium vivax chloroquine resistance transporter orthologue
SIVEP: Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica de Malária
SNPs: Polimorfismos de Nucleotídeo Único (*Single Nucleotide Polymorphisms*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Situação da malária no Brasil e no mundo	11
1.2	Ciclo biológico e particularidades de <i>P. vivax</i>	14
1.3	Tratamento para malária não complicada por <i>Plasmodium vivax</i>	17
1.3.1	Cloroquina (CQ)	17
1.3.2	Primaquina (PQ)	19
1.4	Metabolismo de Primaquina	21
1.5	Relação entre CYP2D6 e primaquina	23
1.6	Polimorfismos em Monoamina oxidase A (MAO-A)	25
1.7	Estudo de marcadores moleculares em genes associados à resistência aos antimaláricos	27
2	JUSTIFICATIVA	30
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivos específicos	31
4	METODOLOGIA	32
4.1	Indivíduos e população de estudo	32
4.2	Aprovações éticas e consentimento dos participantes	34
4.3	Extração de DNA genômico a partir de amostras de sangue total	34
4.4	Inferência da atividade fenotípica de CYP2D6 por PCR em Tempo Real (qPCR)	34
4.4.1	Amplificação dos polimorfismos de <i>CYP2D6</i> e <i>CYP2C8</i>	
4.4.2	Determinação do número de cópias do gene <i>CYP2D6</i>	35
4.4.3	Predição dos haplótipos e classificação dos fenótipos de CYP2D6	35
4.5	Genotipagem dos isolados de <i>P. vivax</i> por PCR convencional	37
4.6	Análise de polimorfismos nos genes <i>pvmrp1</i> <i>pvmrp2</i>	39
4.7	Análise <i>in silico</i> do efeito de SNPs na estabilidade de MRP1 e MRP2 e afinidade com a Primaquina	40
4.8	Análise estatística	40
5	RESULTADOS	42
5.1	Frequência dos alelos e fenótipos preditos de CYP2D6	43
5.2	Frequência dos alelos e fenótipos de MAO-A	47
5.3	Associação entre recorrências por <i>Plasmodium vivax</i> e as variantes de <i>CYP2D6</i> e <i>MAO-A</i>	49
5.4	Avaliação <i>in silico</i> dos genes <i>pvmrp1</i> e <i>pvmrp2</i>	52
5.5	Frequência de polimorfismos no genes que codificam MRP1 e MRP2 de <i>P. Vivax</i>	56
5.6	Frequência de polimorfismos no genes <i>pvmrp2</i>	58
6	DISCUSSÃO	61
6.1	Influência de CYP2D6 e MAO-A no metabolismo de PQ nos episódios de recorrência em indivíduos infectados por <i>Plasmodium vivax</i>	63
6.2	Frequência de polimorfismos nos genes <i>pvmrp1</i> e <i>pvmrp2</i> e sua influência na susceptibilidade de <i>Plasmodium vivax</i> a CQ-PQ	66
7	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Situação da malária no Brasil e no mundo

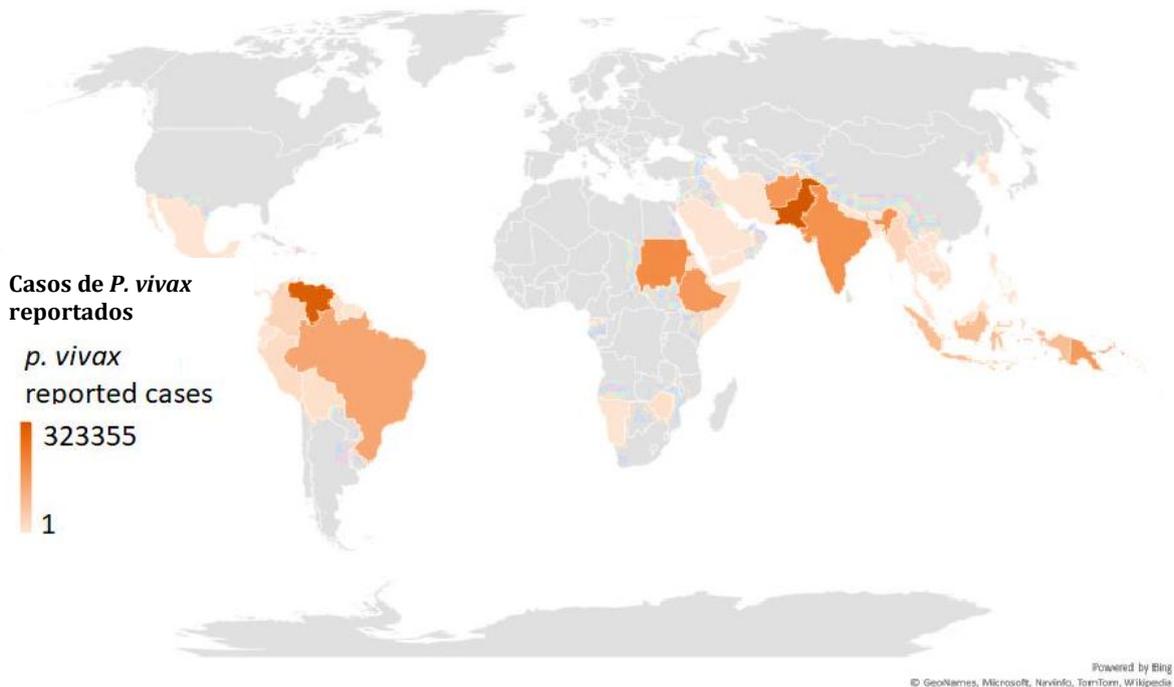
A malária é caracterizada por ser uma infecção febril aguda causada por protozoários do gênero *Plasmodium sp.*, os quais são transmitidos pela picada do mosquito fêmea infectada do gênero *Anopheles sp.* Atualmente existem cinco principais espécies no mundo capazes de infectar o homem, sendo eles: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. Entre as espécies, *P. falciparum* pode evoluir para malária grave, porém complicações e óbitos em infecções causadas por *P. vivax* e *P. knowlesi*, também, foram registradas (COX-SINGH et al., 2008; SHARMA; KHANDURI, 2009). Durante muitos anos, a grande maioria das pesquisas no mundo foram dirigidas a *P. falciparum* que é a principal espécie responsável pelo risco de mortalidade e pela maioria dos casos fatais da doença em toda a África subsaariana (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). No entanto, *P. vivax* possui maior prevalência na região das Américas, sendo responsável pelo maior número de casos da doença (SINGH et al., 2004; WHO, 2018).

As regiões tropicais e subtropicais do globo são os principais sítios de transmissão de malária, onde estão presentes as populações mais vulneráveis à doença devido às questões sociais e demográficas (Figura 1). O número de casos na região das Américas reduziu em 40% e a incidência de casos em 57%. No entanto, em 2019, estima-se que a malária atingiu cerca de 229 milhões de pessoas, causando 409 mil mortes em todo o mundo e está presente em 91 países da África, Sudeste Asiático e América Latina, sendo Colômbia, Venezuela e Brasil os responsáveis por aproximadamente 86% dos casos de malária nesta região.

A incidência da malária 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).

Na América, cerca de 138 milhões de pessoas em 19 países e territórios estão em risco de malária, das quais quase 80% causada por *Plasmodium vivax* (WHO, 2020).

Figura 1 - Mapa do número de casos de malária por *Plasmodium vivax* registrados em 2019



P. vivax é o parasito mais amplamente distribuído geograficamente. É predominante na região das Américas, compreendendo 72,3% dos casos estimados de malária. No Sudeste Asiático, representa 51,7% dos casos estimados e nas regiões do Pacífico Ocidental e do Mediterrâneo Oriental, 33,9% e 23,3% dos casos estimados, respectivamente.

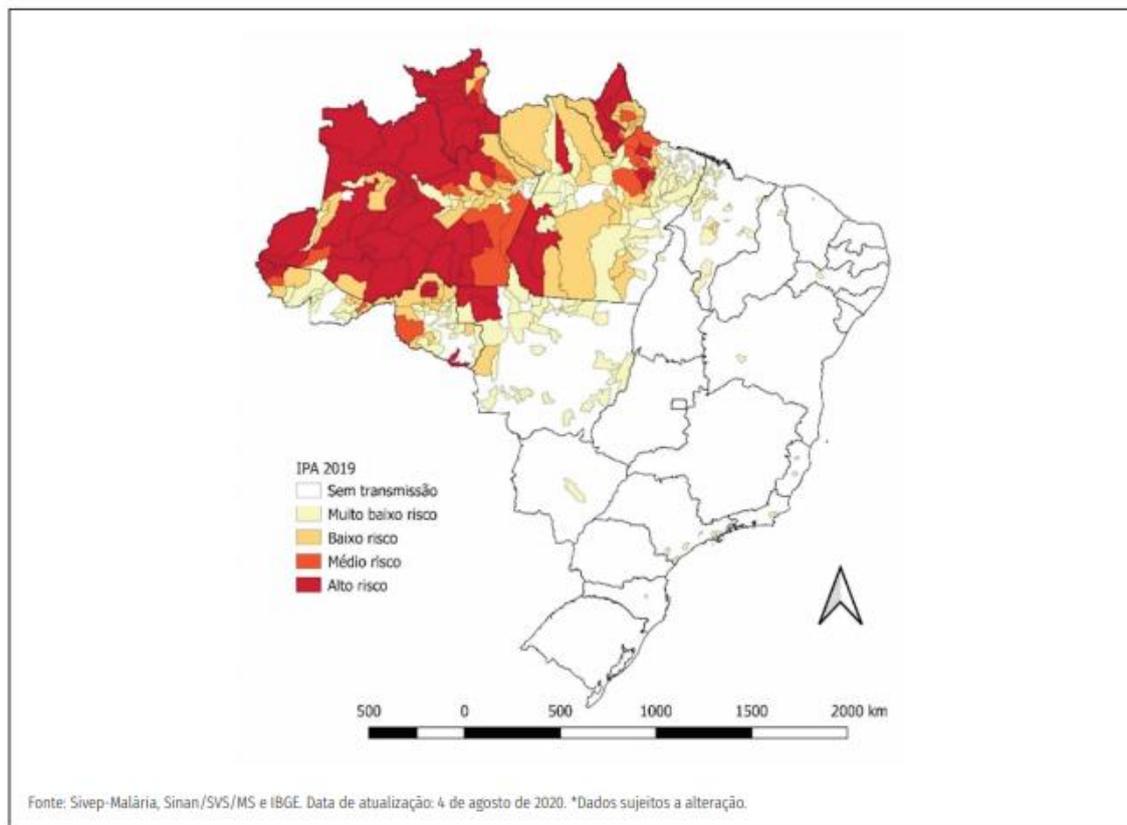
Fonte: (WHO, 2020).

Os primeiros relatos históricos sobre a malária no Brasil datam do início do período colonial. Os projetos de colonização do interior do Brasil, incentivados pelo ciclo econômico da borracha e a construção de ferrovias foram marcantes para a expansão da doença pelo país. Outro importante surto, ocorrido na primeira metade do século XX, ocorreu no Nordeste do Brasil, e foi considerado um dos piores surtos de malária já vistos no país. Este surto foi importante para a história da doença no Brasil, pois marcou a entrada no país do vetor *Anopheles gambiae*, importado do continente africano (FERREIRA e CASTRO MALAR J, 2016).

No Brasil, aproximadamente 99% dos casos da doença são provenientes da região da Amazônia Legal, área que corresponde a 59% do território brasileiro e engloba a totalidade de

nove estados (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) na região norte do país (Figura 2) (FERREIRA et al., 2019). De janeiro a junho de 2020, tanto a região amazônica quanto a região extra-amazônica brasileira tiveram redução no número total de casos autóctones, sendo esta redução de 15,1% e 71,0%, respectivamente. Apenas os estados de Mato Grosso (64,5%), Rondônia (27,7%) e Roraima (18,8%) registraram aumento no número de casos autóctones.

Figura 2 - Risco de malária por município de infecção, Brasil, 2018.



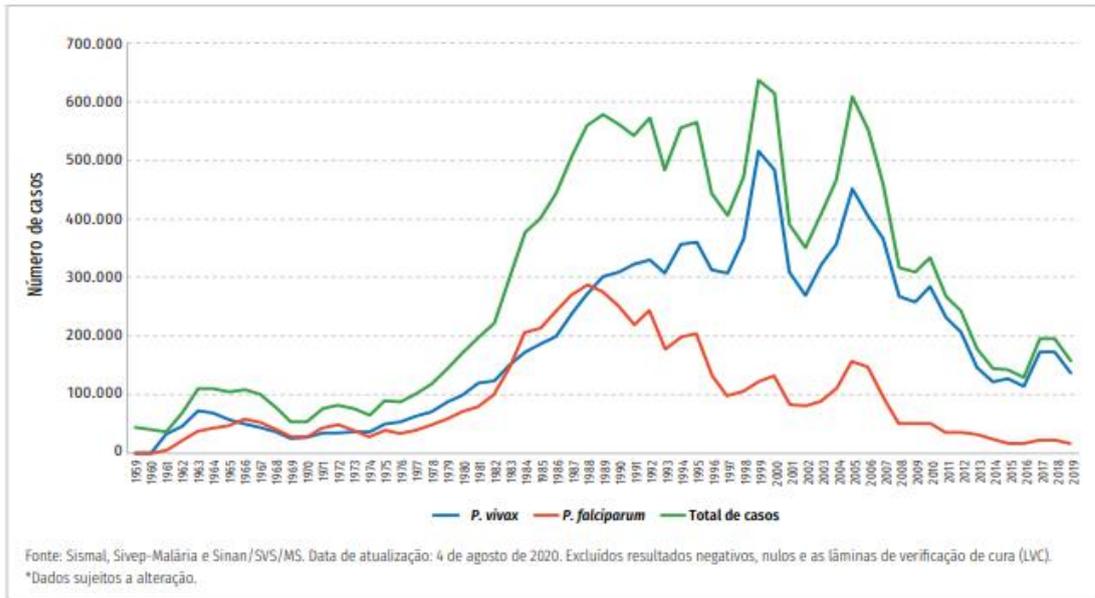
Baixo risco, IPA <10 casos/mil habitantes; Médio risco, IPA 10 a 49 casos mil/habitantes; Alto risco, IPA \geq 50 casos/mil habitantes. Fonte: (SVS/MS, 2020)

Entre os anos de 2006 e 2016, ocorreu uma diminuição do número de casos de malária notificados em território nacional. No ano de 2016, o número de casos notificados na Região Amazônica foi de, aproximadamente, 130 mil, um valor que representa cerca de 20% do número de casos em 2006. Essa diminuição se deve, sobretudo, às ações do Programa Nacional de Controle de Malária, como o diagnóstico e tratamento oportuno dos indivíduos infectados. Entretanto, desde maio de 2017 o número de casos de malária vem aumentando, sendo que, em 2017 esse número subiu para 194 mil casos notificados, o que representa um aumento de 51%

na incidência de malária nesta região (SIVEP-Malária/SVS/MS, 2018).

O número de casos de malária registrados no ano de 2019 obtiveram um decréscimo de 19,1% em relação ao ano anterior (Figura 3). Tal redução ocorreu devido à adesão do Brasil a políticas de tratamento e diagnóstico precoce do Plano de Intensificação das Atividades de Controle da Malária na Amazônia brasileira (PIACM) (MS, 2020).

Figura 3 - Casos de malária notificados entre 1959 e 2019.

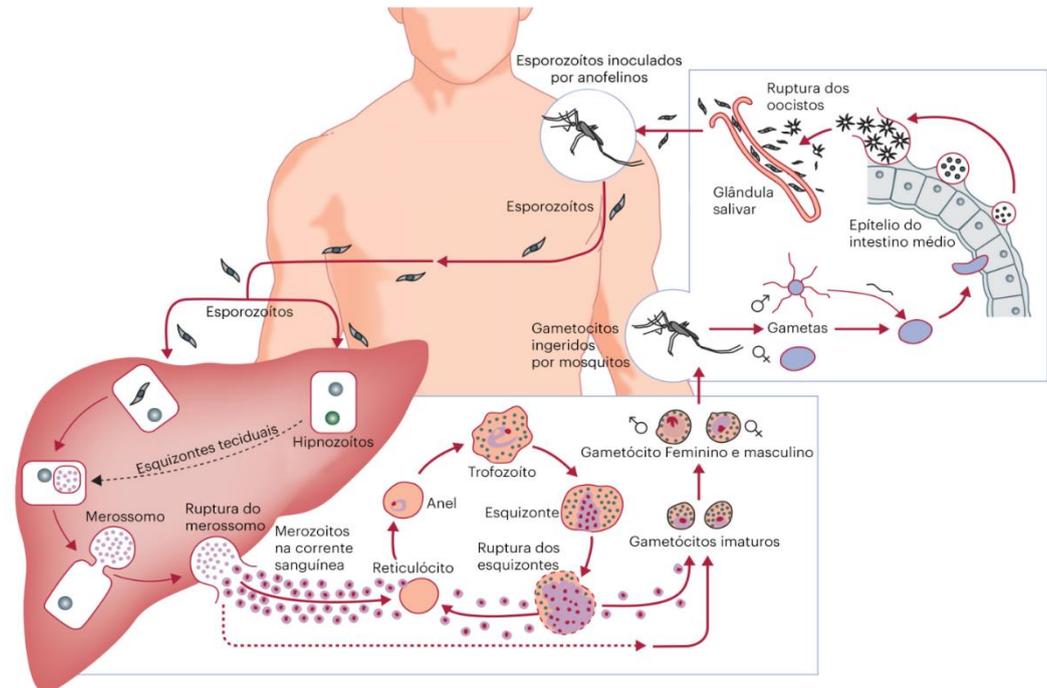


Fonte: SVS/MS, 2020.

1.2 Ciclo biológico e particularidades de *P. vivax*

Diferentes aspectos inerentes à biologia do *Plasmodium* representam dificuldades para os processos de controle e erradicação da malária. O ciclo biológico do parasito é altamente complexo, envolvendo a infecção de um hospedeiro vertebrado e invertebrado. Nos humanos, o ciclo assexuado apresenta duas etapas principais: A fase hepática, na qual ocorre a multiplicação do parasito nos hepatócitos, correspondendo a esquizogonia exoeritrocítica e, a fase eritrocítica, onde ocorre a multiplicação e diferenciação dentro dos eritrócitos, correspondendo a esquizogonia eritrocítica, produzindo também formas sexuadas para posterior multiplicação no *Anopheles sp.* (MUELLER et al., 2009) (Figura 4)

Figura 4 - Ciclo biológico do Plasmodium vivax.



O ciclo do parasito

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

A infecção nos humanos se dá através da inoculação das formas infectantes, os esporozoítos, transmitidos através da picada do mosquito fêmea infectada do gênero *Anopheles sp.* durante o repasto sanguíneo. Os esporozoítos podem permanecer no tecido subcutâneo do indivíduo por algum tempo, no entanto aqueles que conseguem driblar esse primeiro contato inicial com o sistema imune do hospedeiro, migram rapidamente para o fígado, onde invadem os hepatócitos e se diferenciam em esquizontes ou hipnozoítos, formas latentes presentes em infecções causadas por *P. vivax*. Os esporozoítos presentes nos hepatócitos se diferenciam em esquizontes a partir de repetidas divisões esquizogônicas, o que leva ao rompimento dos hepatócitos, liberando merozoítos na circulação sanguínea (MULLER et al., 2009)

O ciclo eritrocítico inicia quando os merozoítos entram em contato, se fixam e invadem os eritrócitos. Os merozoítos possuem uma forma ligeiramente ovalada que está adaptada para

invadir com sucesso as hemácias. Dentro do eritrócito, este é capaz de se multiplicar e fazer a digestão de hemoglobina, permanecendo protegido contra qualquer ameaça do sistema imunológico do hospedeiro. Após diversas replicações do parasito, o eritrócito se rompe, liberando merozoítos que infectam outros glóbulos vermelhos ao redor. Em cada ciclo, cerca de 10% do parasito se desenvolve nas formas sexuadas do *Plasmodium sp.*, os gametócitos, capazes de infectar os anofelinos. (KARIUKI et al., 2020)

O determinante biológico que estabelece o estado ativo ou dormente dos hipnozoítos ainda não é bem estabelecido. A ativação dessas formas do parasito após semanas, meses ou até mesmo anos após a infecção inicial ocasiona o reaparecimento dos sintomas clínicos da doença, ou seja, o ciclo do parasito se inicia novamente. O retorno da malária devido a ativação dos hipnozoítos se mostra um obstáculo nos esforços do controle e eliminação da malária (KROTOSK, 1985)

O ciclo esporogônico inicia quando há ingestão de gametócitos pelo anofelino. No entanto, apenas a presença destas formas sexuadas no sangue periférico não garante a infecção do mosquito, visto que isso depende de alguns fatores como o estágio de maturação do gametócito e até mesmo o sistema imune do hospedeiro invertebrado (BOUSEMAN, 2012).

A formação e maturação dos gametócitos ocorrem em cinco estágios morfológicamente diferentes. Os mosquitos são infectados quando estes são capazes de ingerir gametócitos em estágio V maduro presentes no sangue periférico. Uma vez ingerido pelos mosquitos, cada gametócito forma um macrogameta fêmea ou até oito microgametas machos. No intestino médio do mosquito, a fusão dos gametas resulta na formação de um zigoto que se desenvolve em um oocineto móvel que pode penetrar na parede do intestino médio para formar oocistos. Os oocistos aumentam de tamanho com o tempo e se rompem para liberar esporozoítos que migram para a glândula salivar do mosquito, tornando-o infectante para os seres humanos (BOUSEMAN, 2012).

Plasmodium vivax possui características biológicas que o diferenciam facilmente entre as espécies. As características mais óbvias que distinguem *P. vivax* de *P. falciparum* incluem o desenvolvimento de hipnozoítos no fígado que, após a sua ativação, causam infecções no sangue chamadas recaídas. O aparecimento de gametócitos arredondados no sangue periférico, às vezes antes do início dos sintomas clínicos, ou seja, se diferenciando daqueles em forma de banana produzidos em infecções por *P. falciparum*. Outra importante característica do *P. vivax*, é a predileção de merozoítos por reticulócitos como células hospedeiras (MULLER et al., 2009).

1.3 Tratamento para malária não complicada por *Plasmodium vivax*

O tratamento da malária visa atingir o parasito em momentos cruciais de seu ciclo biológico, interrompendo a esquizogonia sanguínea, responsável pelas manifestações clínicas da infecção. Assim como também atua na eliminação dos hipnozoítos presentes em infecções de *P. vivax*, o que impossibilita o aparecimento de sintomas tardios da doença após a ativação destas formas latentes (MS, 2019).

O tratamento preconizado pela OMS para o tratamento de malária causada por *P. vivax* é a utilização de Primaquina (PQ) em associação com a Cloroquina (CQ) ou derivados de artemisinina. O regime terapêutico recomendado para tratamento de malária não grave causada por *P. vivax* é a administração de CQ durante 3 dias (10mg base/kg no 1º e no 2º dia e 5mg/kg no 3º dia) e PQ durante 7 dias (0,5mg/kg/dia). Considera-se que houve falha do tratamento com CQ ou PQ quando ocorre o reaparecimento dos sintomas a partir do 5º até o 60º dia após o início do tratamento. Assim, o novo guia de tratamento da malária preconiza o uso de um tratamento mais eficaz contra hipnozoítos utilizando artemeter/lumefantrina ou artesunato/mefloquina durante três dias e PQ por 14 dias (MS, 2020).

1.3.1 Cloroquina (CQ)

A CQ é um fármaco de grande importância na história da indústria farmacêutica e seu principal metabólito é a Desetilcloroquina (DCQ) que vem sendo estudado desde 1966. Após a perda do grupo N-etila, a CQ é convertida em DCQ e esse composto apresenta ação antimalárica semelhante a CQ (VALE, N; MOREIRA, R; GOMES, P, 2005).

A droga irá atuar na eliminação das formas assexuadas sanguíneas do parasito, sendo então um esquizotocida sanguíneo. Seu mecanismo de ação consiste no bloqueio da formação de cristais de hemozoína durante o ciclo eritrocítico do *Plasmodium* sp., que são formados durante a digestão de hemoglobina. No entanto, durante sua metabolização há produção de hematina e essa por sua vez é tóxica para o parasito, que então converte-a em cristais de hemozoína. A CQ faz com que esse processo não ocorra, levando à intoxicação e morte do parasito.

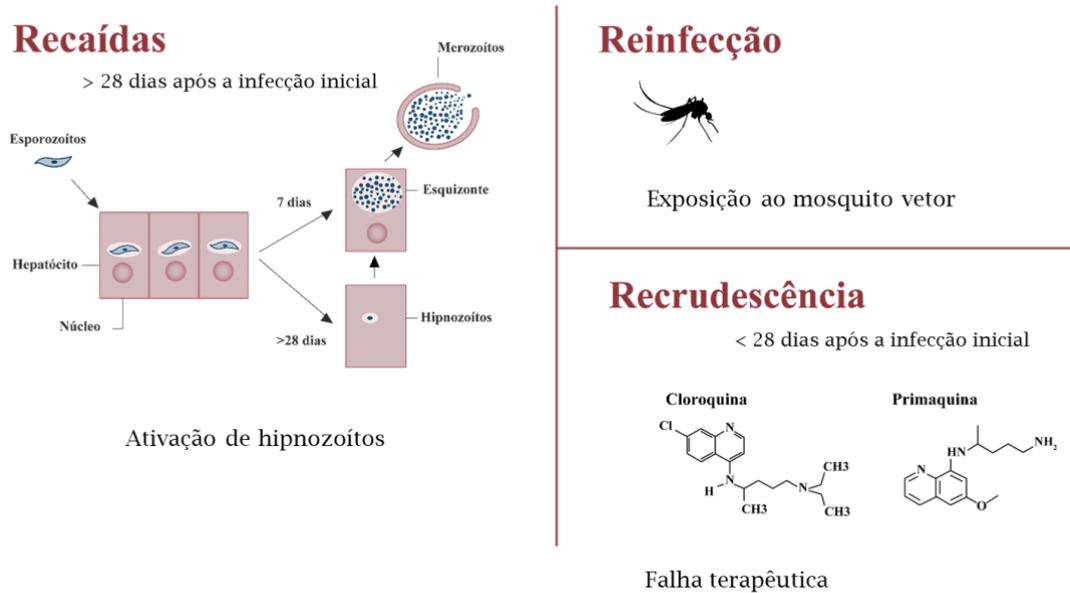
Uma das maiores ameaças aos esforços de controle e eliminação da malária é a disseminação de parasitos resistentes às drogas antimaláricas em diferentes regiões do mundo. Estudos *in vitro* são utilizados para determinar o grau de susceptibilidade do parasito às drogas, uma vez que fatores como erro de administração do antimalárico e fatores do próprio organismo

do paciente, como o sistema imune, não influenciam no ensaio. Isso faz com que o monitoramento sobre o efeito do medicamento auxilie na melhor escolha terapêutica para indivíduos de uma mesma região (WHO, 2011).

A resistência à CQ por *P. vivax* foi descrita pela primeira vez em 1989, na Papua Nova Guiné (RIECKMANN, K.H; DAVIS, D.R; HUTTON, D.C., 1989). Posteriormente, houve relatos de resistência na Oceania e Sudeste Asiático e em países da América do Sul, como Guiana, Brasil e Bolívia (BAIRD, J.K et al., 1991; MYAT PHONE, K et al., 1993; PHILLIPS E.J; KEYSTONE, J.S; KAIN, K.C, 1996; ALECRIM, M.dG et al., 1999; PHAN, G.T et al., 2002; BAIRD, J.K, 2004; LIN, J.T et al., 2013; ANEZ, A et al., 2015).

A resistência de *P. vivax* a CQ *in vivo* é definida pela persistência de estágios assexuais sanguíneos do parasito, apesar da presença de concentrações terapêuticas adequados de CQ ou do seu metabólito ativo DCQ, no plasma ou sangue total. Esses episódios são classificados como recrudescência da malária por *P. vivax*. O retorno da parasitemia e dos sintomas é denominado como recidiva ou recorrência, que possui diferentes classificações de acordo com a causa da permanência de parasitos na corrente sanguínea (Figura 5). A reinfecção ocorre quando a infecção anterior de um paciente é clinicamente curada, mas este é picado novamente por um mosquito infectado, o que leva ao desenvolvimento da doença novamente. Assim, o retorno da parasitemia causada por resistência do paciente à CQ classifica-se como recrudescência, já quando ocorre a reativação dos hipnozoítos caracteriza-se como uma recaída (BAIRD et al., 1997; BAIRD, 2009; GAMA et al., 2011).

Figura 5 - Esquema das recorrências de malária por *Plasmodium vivax*.



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

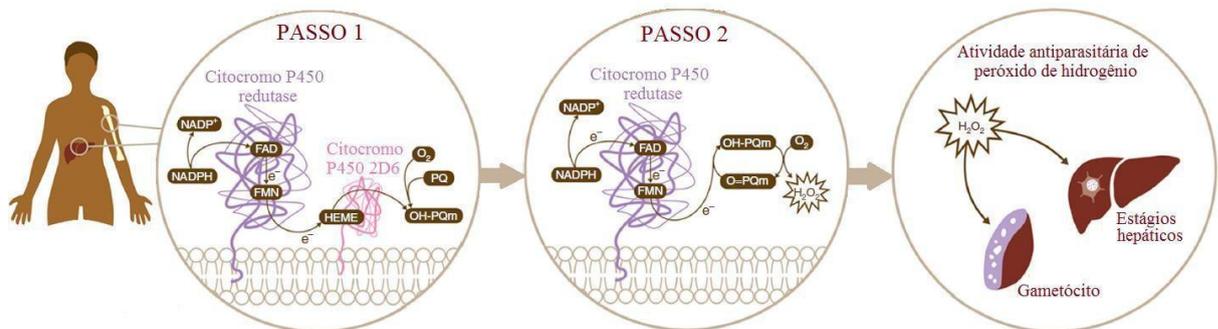
1.3.2 Primaquina (PQ)

Desenvolvida em meados dos anos 50 pelo exército americano, a PQ tem sido constantemente usada no tratamento de malária. Pertencente à classe das 8-aminoquinolinas, a PQ é a principal droga regulamentada para uso no combate e controle da malária, uma vez que ela irá atuar na eliminação dos hipnozoítos e gametócitos. Porém, nos últimos anos, alguns trabalhos registraram falha terapêutica no tratamento da infecção 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).

De absorção rápida, a PQ apresenta pico de concentração plasmática em até quatro horas, com biodisponibilidade de 96% e meia-vida de eliminação de 4 - 6 horas. A PQ é um esquizonticida tecidual que precisa ser biotransformado em metabólito ativo para exercer a sua função hipnozoiticida e gametocitocida. O seu mecanismo de ação ainda não é bem esclarecido, no entanto estudos Camarda *et al.* (2019) mostraram que em infecções causadas por *P. falciparum*, a PQ é convertida em metabólitos hidroxilados com conseqüente formação de H₂O₂ (VASQUEZ-VIVAR E AUGUSTO, 1992 ; VÁSQUEZ-VIVAR E AUGUSTO, 1994 ; MARCSISIN et

al., 2016;CAMARDA et al., 2019). Estes compostos se acumulam em sítios de transformação metabólica o que levaria à ação antiparasítica (Figura 6).

Figura 6 - Representação esquemática do mecanismo de ação da primaquina.



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

Ao contrário de outras drogas antimaláricas amplamente utilizadas, a PQ exerce um amplo espectro de atividade contra vários estágios do parasito (BAIRD; RIECKMANN, 2003), sendo ativa contra as formas pré-eritrocíticas em desenvolvimento (atividade profilática), contra os hipnozoítos (somente para *P. vivax* e *P. ovale*), contra gametócitos (de todas as espécies que causam malária humana) e ainda, pouco ativa, contra os estágios sanguíneos assexuados (PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 1994).

Pacientes que possuem deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), apresentam reações adversas graves, como hemólise, anemia grave, fadiga, icterícia e urina escura. Isso ocorre pois esta enzima possui importância crítica para o metabolismo redox em todas as células em aerobiose, protegendo os eritrócitos contra danos oxidativos. Na ausência desta, as espécies reativas de oxigênio produzidas durante a metabolização da PQ levam à destruição das hemácias (LUZZATO, 2016).

No Brasil, utiliza-se o esquema terapêutico de sete dias de administração da PQ para melhorar a adesão ao tratamento. No entanto, alguns pacientes podem interromper o tratamento após o desaparecimento dos sintomas clínicos. A não adesão ao tratamento completo leva ao reaparecimento dos sintomas, caracterizando uma recorrência clínica de malária. A falha terapêutica pode ocorrer devido a diversos fatores, seja pela interrupção do tratamento ou até mesmo fatores genéticos do paciente, como a presença de polimorfismos em genes que codificam enzimas metabolizadoras das drogas antimaláricas. Esses polimorfismos podem influenciar diretamente a metabolização de drogas.

Estima-se que 50 a 80% do número total de infecções por *P. vivax* sejam advindas de recaídas em crianças que vivem em Papua Nova Guiné, área onde a malária é hiperendêmica.

Além disso, as infecções por *P. vivax* geralmente são multiclonais, portanto, as recidivas podem resultar da ativação de hipnozoítos homólogos ou heterólogos, dificultando a caracterização das recidivas mesmo em pacientes com infecção recente. No Brasil, a taxa de recorrência (devido a recrudescência, recaída ou reinfeção) foi estimada entre 20 e 40% após o tratamento com cloroquina (CQ) e primaquina (PQ) (BETUELA et al., 2021).

Dessa forma, os dados disponíveis na literatura indicam que a recorrência aumenta significativamente a carga geral da infecção por *P. vivax*. Levando em consideração a incidência de novas infecções em áreas endêmicas, para determinar a eficácia da PQ nessas regiões é necessário avaliar a taxa de recorrência fora do período preventivo após o tratamento. Assim como deve-se também ter tempo suficiente para detectar a maioria das taxas de recorrência, sendo ideal o período de seis meses (WHITE et al., 2011; KIM et al., 2012; COMMONS et al., 2018).

Além disso algumas cepas de *P. vivax* parecem ser tolerantes a PQ, já que recaídas foram observadas repetidamente em infecções naturais ou experimentais tratadas com regimes CQ-PQ em ambientes livres de malária (FERNANDO et al., 2011; THOMAS et al., 2016). Dois exemplos são a cepa Brasil-1 (infecção original adquirida na Amazônia brasileira em 1994; NAYAR et al., 1997) e a cepa Chesson (infecção original adquirida em Papua Nova Guiné em 1944; ALVING et al., 1960). Regimentos de PQ de alta dose são atualmente recomendados para a cura radical da malária vivax no sudeste da Ásia e Oceania (HILL et al., 2006; WHO, 2015; CHU e WHITE, 2016), mas a distribuição global da tolerância putativa de PQ permanece desconhecida (GOLLER et al., 2007; THOMAS et al., 2016)

1.4 Metabolismo de Primaquina

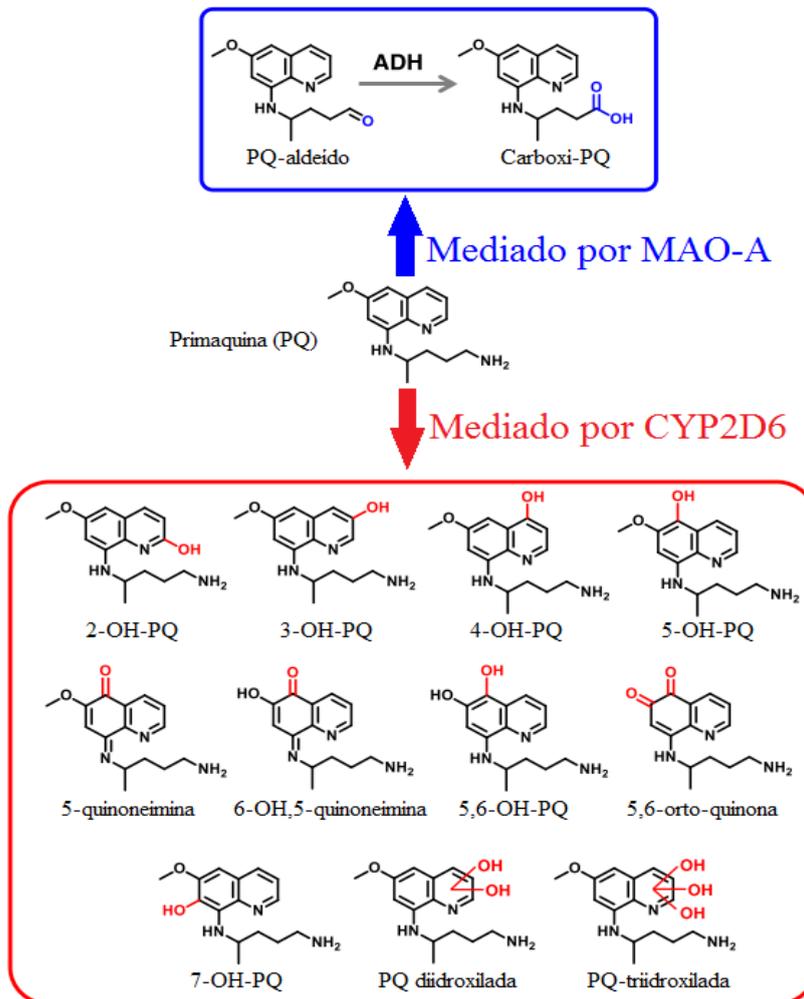
Os metabólitos originados a partir da metabolização da PQ são compostos gerados por oxidação e ciclo redox de metabólitos PQ hidroxilados, principalmente 5-hidroxiprimaquina, produzidos pelo CYP2D6. A monoamina oxidase A (MAO-A), outra enzima importante do fígado, está envolvida na formação de carboxiprimaquina (cPQ) (CONSTANTINO et al., 1999; PYBUS et al., 2012), que parece não ter efeitos farmacológicos ou tóxicos (CONSTANTINO et al., 1999; MIHALY et al., 1985). O rápido metabolismo pela via MAO-A pode ser responsável pela curta meia-vida do PQ, estimada em 4 h (AVULA et al., 2018).

A avaliação recente do metaboloma no plasma e na urina de voluntários saudáveis após a administração de PQ pode esclarecer a complexidade do metabolismo da droga, demonstrando, assim, três vias diferentes que produzem dezenas de metabólitos (AVULA et al., 2018). Dentre eles, a via do complexo P450 mediada por isoenzimas que promovem a biotransformação da PQ

em metabólitos hidroxilados, cuja atividade está relacionada à eficácia terapêutica da PQ na malária (PYBUS et al., 2013). Especificamente, CYP2D6 parece ser uma enzima essencial envolvida na bioconversão de PQ em metabólitos hidroxilados (Figura 7). Esse fato tem sido corroborado por relatos de falha terapêutica em indivíduos com malária causada por *P. vivax*, associada a polimorfismos em CYP2D6 relacionados a uma atividade reduzida da enzima e consequente alteração da farmacodinâmica da PQ (BRASIL et al., 2018; SILVINO et al., 2016).

Pybus et. al. (2012) demonstraram que a MAO-A e a CYP2D6 são responsáveis por produzir cerca de 93% dos metabólitos de PQ. O metabólito mais abundante derivado da metabolização da PQ é a carboxi-PQ (cPQ), proveniente da via mediada por MAO-A (Figura 7). A metabolização por MAO-A é responsável pela meia-vida curta da droga de 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 7 - Principais produtos de PQ pelas vias metabólicas de MAO-A e CYP2D6.



Fonte: MARCSISIN; REICHARD; PYBUS, 2016, adaptado.

1.5 Relação entre CYP2D6 e primaquina

O citocromo P450 (CYP450) é um grupo de enzimas que atua no metabolismo de medicamentos nas reações de fase I (oxidação/redução). Nas reações de fase I pode ocorrer a inativação de um fármaco, ou seja, a perda de atividade farmacológica, ou até mesmo a ativação de um pró-fármaco em metabólito ativo, mantendo a sua atividade terapêutica. Estas enzimas do complexo CYP450 são amplamente variáveis, sendo influenciadas por fatores genéticos, ambientais e biológicos que podem interferir na metabolização correta de drogas (BRUNTON, CHABNER e KNOLLMANN, 2012).

Alguns estudos já identificaram a importância de fatores genéticos do hospedeiro na ocorrência de falha terapêutica, o que poderia influenciar na metabolização das drogas utilizadas no tratamento antimalárico. A presença de polimorfismos de nucleotídeo único

(SNPs) em genes codificadores de enzimas metabolizadoras de drogas é um dos principais fatores que poderiam contribuir para este desfecho clínico, assim como a variação do número de cópias (CNV) dos genes (RAMAMOORTHY e SKAAR, 2011; BENNETT et al., 2013; PYBUS et al., 2013).

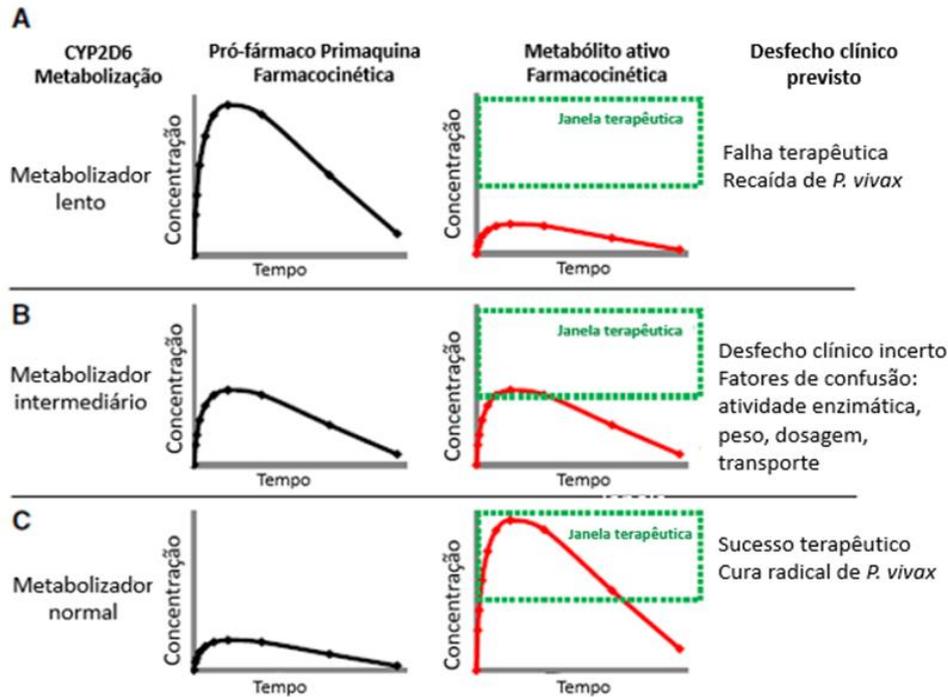
O citocromo P450 2D6 (CYP2D6) é uma enzima codificada por um gene altamente polimórfico, sendo localizado no cromossomo 22q13.2 próximo a dois pseudogenes. Esta é expressa principalmente no fígado, mas também em órgãos extra-hepáticos como o cérebro e intestino (PAN, NING e JEONG, 2016). Estudos sugerem que o evento metabólico necessário para a eliminação de hipnozoítos é a ativação da PQ pela via metabólica da CYP2D6 (PYBUS et al., 2012; BENNETT, et al., 2013). Assim, esta é considerada uma das principais enzimas envolvidas na sua metabolização, atuando na biotransformação da PQ em metabólito ativo para que possua efeito terapêutico (MARCSISIN; REICHARD e PYBUS, 2016).

Os estudos realizados sobre a farmacocinética da PQ demonstraram a sua dependência metabólica pela via da CYP2D6, sugerindo também que a presença de polimorfismos no gene pode alterar a taxa de metabolização da PQ. Essas alterações de função enzimática podem ocasionar o aumento de recorrências clínicas de malária através da ativação de hipnozoítos, visto que a sua ação terapêutica está comprometida (PYBUS et al., 2012; DEYE e MAGILL, 2014; SILVINO et al., 2016).

Existem mais de 100 variantes alélicas de CYP2D6 que ocorrem em função de diferentes SNPs, deleções e multiplicações gênicas (CNV) que podem variar de acordo com a população estudada. Os polimorfismos no gene resultam em quatro fenótipos definidos pela combinação de alelos e do número de cópias do gene. Estes podem ser classificados como metabolizadores lentos, intermediários, normais ou ultrarrápidos (Figura 8) (TEH e BERTILSSON, 2012; BRIGHT et al., 2013; ELEWA e WILBY, 2017).

A análise do genótipo, bem como a predição dos fenótipos de CYP2D6 é de alta complexidade e requer a utilização de softwares que demandam do usuário um conhecimento prévio de linguagem de programação, visto que é necessário executar os processos através de linhas de comando.

Figura 8- Resposta farmacocinética/clínica prevista à terapia com primaquina.



Previsto para (A.) metabolizador reduzido de CYP2D6, (B.) metabolizadores intermediários e (C.) metabolizadores extensivos. As respostas farmacocinéticas previstas para a primaquina original e metabólito (s) ativo (s) e os resultados clínicos prováveis são indicados em cada cenário. Adaptado de Marcisin et al., 2016.

1.6 Polimorfismos em Monoamina oxidase A (MAO-A)

A ativação e metabolização de muitas drogas têm o envolvimento de três principais vias metabólicas: a via do citocromo P450, monoamina oxidase (MAO) e monooxigenase contendo flavina (FMO). Em humanos, o citocromo P450 está altamente concentrado no fígado e desenvolve papel crucial no metabolismo de componentes endógenos, assim leva à detoxificação de moléculas xenobióticas (JIN et al., 2014).

O estudo realizado por Jin e colaboradores (2014) demonstrou que embora Constantino e colaboradores (1999) tenham demonstrado que CYP450 e MAO contribuem igualmente para o metabolismo da PQ no fígado, a MAO parece ter um papel mais crítico que CYP450 tanto no metabolismo da PQ quanto na formação de cPQ.

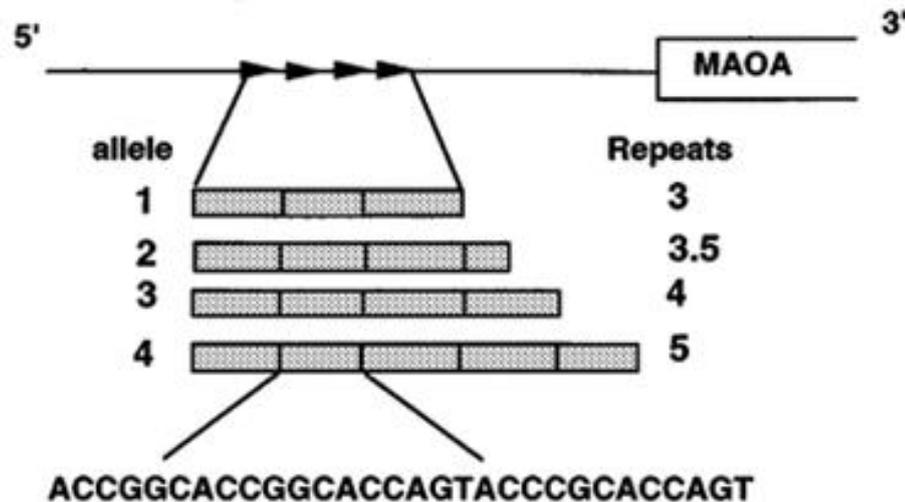
MAO é uma enzima principalmente mitocondrial, embora algumas enzimas da família só tenham atividade descrita na fração microssomal. A MAO-A é altamente associada com a membrana mitocondrial externa e alguns estudos já sugeriram que essa enzima pode não ser uma proteína da membrana integral, mas pode ser anexada com uma porção dela à membrana mitocondrial (SABOL et al., 1998)

Em mamíferos, tanto a MAO-A quanto MAO-B estão presentes em muitos tecidos como em órgãos do sistema periférico, no sistema nervoso central e, principalmente, no fígado. Os níveis de expressão desta enzima são específicos a cada tecido e as taxas de síntese de degradação determinam diferentes meia-vida, variando de 3 a 6 dias no fígado e acima de 30 dias no cérebro (SABOL et al., 1998; EDWARDS et al., 2010).

As MAOs são divididas em duas isoenzimas, MAO-A e MAO-B, assim como existem metabolizadores lentos que possuem atividade baixa ou nula de enzimas CYP, também existem indivíduos que possuem baixa atividade tanto de MAO-A quanto MAO-B ou as duas. Os genes destas enzimas contêm 15 éxons e 14 íntrons e são localizados no braço curto do cromossomo X (SABOL et al., 1998; EDWARDS et al., 2010)

O gene MAO-A tem 30 pares de base na região polimórfica ligada ao gene que afeta a eficiência da transcrição. Estudos anteriores já identificaram a presença de variações genéticas de repetições variáveis em tandem (SHIH and THOMPSON, 1999; WU et al., 2011; DUNCAN et al., 2012). A sequência do gene MAO-A contém quatro repetições exatas de uma sequência de 30 pb localizada nas posições -1142 a -1262. Esta sequência é internamente repetida e consiste em cinco repetições da sequência AGC (A/G/C) G (C/T) (SABOL e HAMER, 1998). Estudos demonstram que repetições na região promotora altera a expressão de MAO-A dependendo do número de repetições, sugerindo que quatro alelos repetidos (4R) estão associados com alta atividade de transcrição em relação a três alelos repetidos (3R). Seis polimorfismos VNTR (número variável de repetições em série) de MAO-A têm sido caracterizadas com base em seis diferentes números de repetições (2, 3, 3.5, 4, 5 e 6). O estudo de Stetler et al. 2014 demonstrou que as variantes de 2 e 3 repetições estão associadas a baixa eficiência transcricional e atividade enzimática. Em particular a variante de 2 repetições é extremamente rara na população em geral.

Figura 9- Alelos do gene MAO-A e a sequência de repetição MAOA-uVNTR.



Adaptado de Sabol et al., 1998

A MAOA-uVNTR na região promotora do gene MAO-A funciona como um marcador de função do gene, influenciando a transcrição do gene. Os alelos 2 e 3 contendo 3.5 e 4 repetições, respectivamente, da sequência de 30pb são significativamente expressos mais eficientemente que os alelos contendo entre 1 a 4 sequências repetidas.

1.7 Estudo de marcadores moleculares em genes associados à resistência aos antimaláricos

A resistência do parasito ocorre, em sua maioria, por mutações espontâneas, podendo incluir múltiplas mutações em diferentes loci no genoma do parasito. Estudos recentes do genoma do *P. vivax* têm identificado genes que estão localizados em regiões de forte pressão seletiva, possivelmente como resultado do uso constante de antimaláricos. A pressão dos antimaláricos no genoma do *P. falciparum* tem demonstrado um papel importante da pressão seletiva na formação da composição genética em isolados, portanto pode ter impacto semelhante em *P. vivax*. Estudos genômicos mostraram que os antimaláricos conferem uma das mais fortes pressões sobre o genoma do parasito (AUBURN et al., 2018; BENAVENTE et al., 2017).

O gene que codifica o ortólogo de *pfmdr-1* em *P. vivax*, um fator de resistência CQ secundário em *P. falciparum*, foi caracterizado em 2005 (BREGA et al., 2005; SÁ et al., 2005). Duas substituições de nucleotídeos não-sinônimas comuns foram identificadas no locus *pvmdr-1*, Y976F e F1076L, mas nenhuma associação causal pôde ser estabelecida com a resistência a

CQ. No entanto, os valores de IC50 para CQ foram 4 a 6 vezes maiores entre as amostras de *P. vivax* de Papua, Indonésia, que abrigam a alteração Y976F, em comparação com as amostras de tipo selvagem da Tailândia (SUWANARUSK et al., 2007).

Mutações nos loci *pvdhps* e *pvdhfr* que levam à resistência ao antifolato são comumente encontradas em isolados de *P. vivax* de todo o mundo (IMWONG et al., 2001; HASTINGS et al., 2004). As respostas terapêuticas de *P. vivax* à combinação de sulfadoxina-pirimetamina (SP) são geralmente fracas (PUKRITTAYAKAMEE et al., 2000). Curiosamente, este parasito parece ter se tornado resistente a SP mais rápido do que *P. falciparum*. Antifolatos não são atualmente recomendados como tratamento de primeira linha da malária vivax (WHO, 2015).

Estudos de genoma mostrando que os genes que codificam algumas dessas proteínas, MDR1, DHPS, DHFR, MRP1 e MRP2 estão sob forte pressão seletiva. Entretanto, existem poucos estudos genéticos que envolvam esses genes.

Proteínas transportadoras pertencentes à superfamília ATP-binding cassette (ABC) são bem conhecidas por estarem envolvidas no efluxo de drogas, pois estão associadas à resistência em uma grande variedade de sistemas biológicos filogeneticamente diferentes (KLAASSEN et al., 2010). Essas proteínas são capazes de transportar substratos através das membranas celulares contra um gradiente de concentração, uma ação impulsionada pela hidrólise do ATP. Em particular, a subclasse semelhante à proteína associada à resistência a múltiplas drogas (MRP) dos transportadores ABC é bem conhecida pelo transporte de drogas para fora das células, contribuindo para a resistência às drogas e também para a via do metabolismo redox (Haimeur A et al., 2004). Uma vez que a CQ, e potencialmente a mefloquina (MQ), podem ser transportadas para fora do vacúolo parasitóforo pelas proteínas MRP1 e MRP4 humanas, especulou-se que o MRP de *P. falciparum* poderia ter a mesma capacidade e, assim, contribuir para a resistência aos antimaláricos (VEZMAR et al., 1998). *Plasmodium falciparum* contem em seu genoma dois genes que codificam para proteínas semelhantes a MRP, a saber, *pfmrp1* e *pfmrp2* (BOZDECH et al., 2004; KLOKOUZAS et al., 2004). As proteínas MRP1 e MRP2 estão localizadas na membrana citoplasmática do parasito nos estágios assexuados (KAVISHE et al., 2009).

Além disso, foi observado que a perda da capacidade de transporte da droga por *pfmrp1* resultou em um aumento do acúmulo de antimaláricos que foi acompanhado por um aumento da suscetibilidade *in vitro* a várias drogas, incluindo CQ, quinina e artesunato (ART). Uma série de estudos sobre a diversidade de *pfmrp1* associaram SNPs neste gene às respostas do parasito às drogas *in vivo*, caracterizado pela seleção de SNPs específicos durante o tratamento (DAHLSTROM et al., 2009; RAJ et al., 2009).

Em contraste, nosso conhecimento sobre *pfmrp2* é bastante limitado, e sua variabilidade genética e possível envolvimento na resistência aos antimaláricos ainda são escassos. A localização de *pfmrp2* na membrana plasmática sugere que este transportador ABC pode ser relevante no efluxo de xenobióticos do citoplasma do parasito, como relatado anteriormente para a proteína estruturalmente relacionada *pfmrp1* (Sisowath C et al., 2007). Além disso, foi demonstrado recentemente que após a exposição à MQ *in vitro*, diferentes níveis de indução da transcrição de *pfmrp2* foram observados entre cepas sensíveis e menos suscetíveis. Além disso, os genes *pfmrp1* e *pfmrp2* têm padrões de transcrição essencialmente opostos ao longo do ciclo celular intraeritrocítico assexuado de *P. falciparum*, de modo que cada proteína é expressa durante diferentes estágios morfológicos. Este padrão sugere ainda uma complementação funcional potencial entre as duas proteínas que pode ser relevante em fenótipos complexos da resposta a drogas específicas do estágio do ciclo celular (BERECZKY et al., 2006).

Diversas pesquisas relacionadas a genes associados a resistência a antimaláricos tem sido realizadas para *P. falciparum*, no entanto para *P. vivax* pouco se sabe. Um grupo de pesquisadores da Suécia concluiu que *pfmrp1* pode influenciar a resposta *in vivo* às drogas antimaláricas por meio de dois mecanismos não mutuamente exclusivos: (1) por efluxo da droga, levando a uma diminuição significativa na concentração da droga no citosol e, portanto, limitando seu acesso ao alvo, e / ou (2) por ser um importante contribuinte no manejo do estresse oxidativo causado por antimaláricos, assumindo que *pfmrp1* representa a principal bomba de efluxo de glutathione oxidada (GSSG) em *P. falciparum*, como observado em outros sistemas biológicos (BOZDECH et al., 2004; LEIER et al., 1996).

Diante da escassez de estudos relacionados ao *P. vivax*, a investigação simultânea de polimorfismos em genes distintos em isolados de pacientes com recidiva torna-se promissor para elucidação dos aspectos moleculares que reduzem a suscetibilidade do parasito aos antimaláricos preconizados atualmente.

2 JUSTIFICATIVA

Diversos fatores podem influenciar na resposta do indivíduo aos medicamentos, tais como gênero, idade, dieta e características genéticas. O conhecimento dessas características individuais é fundamental no sucesso das terapias farmacológicas impedindo que ocorra falha terapêutica. Assim como o entendimento dos aspectos genéticos relacionados ao *P. vivax* na susceptibilidade a antimalários contribuíram também para o controle e eliminação da malária.

Compreender o real motivo que levou à falha terapêutica pode indicar novos esquemas de tratamentos personalizados capazes de aperfeiçoar a efetividade da metabolização da PQ. A compreensão das variações no genótipo da CYP2D6 pode permitir a antecipação do risco de efeitos adversos e/ou ineficácia terapêutica da PQ, auxiliando na identificação de biomarcadores que podem favorecer a compreensão dos mecanismos de redução da eficácia da resposta terapêutica ou aumento das reações adversas.

Genes do parasito que sofrem alta pressão seletiva podem estar potencialmente relacionados a menor eficácia do tratamento preconizado para malária causada por *P. vivax* com CQ-PQ. Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo abrirão perspectivas para que novos estudos sejam realizados, auxiliando a compreender as bases genéticas e aprimorar as ferramentas moleculares utilizadas na detecção e monitoramento da resistência.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a influência de fatores genéticos do hospedeiro, genes que codificam enzimas envolvidas na metabolização de primaquina, e genes do parasito que estão sob forte pressão seletiva e que são candidatos à resistência aos antimaláricos, na resposta terapêutica da infecção por *Plasmodium vivax*.

3.2 Objetivos específicos

- i. Desenvolver uma ferramenta que auxilie na análise dos fenótipos de CYP2D6
- ii. Analisar a associação entre polimorfismos no gene que codifica a enzima CYP2D6 e ocorrência de episódios de recaída por *P. vivax*;
- iii. Investigar polimorfismos na enzima Monoaminaoxidase-A e associação à falha terapêutica em indivíduos infectados por *P. vivax*;
- iv. Avaliar o perfil de marcadores moleculares em genes potencialmente associados à resistência aos antimaláricos em isolados de *P. vivax*.

4 METODOLOGIA

4.1 Indivíduos e população de estudo

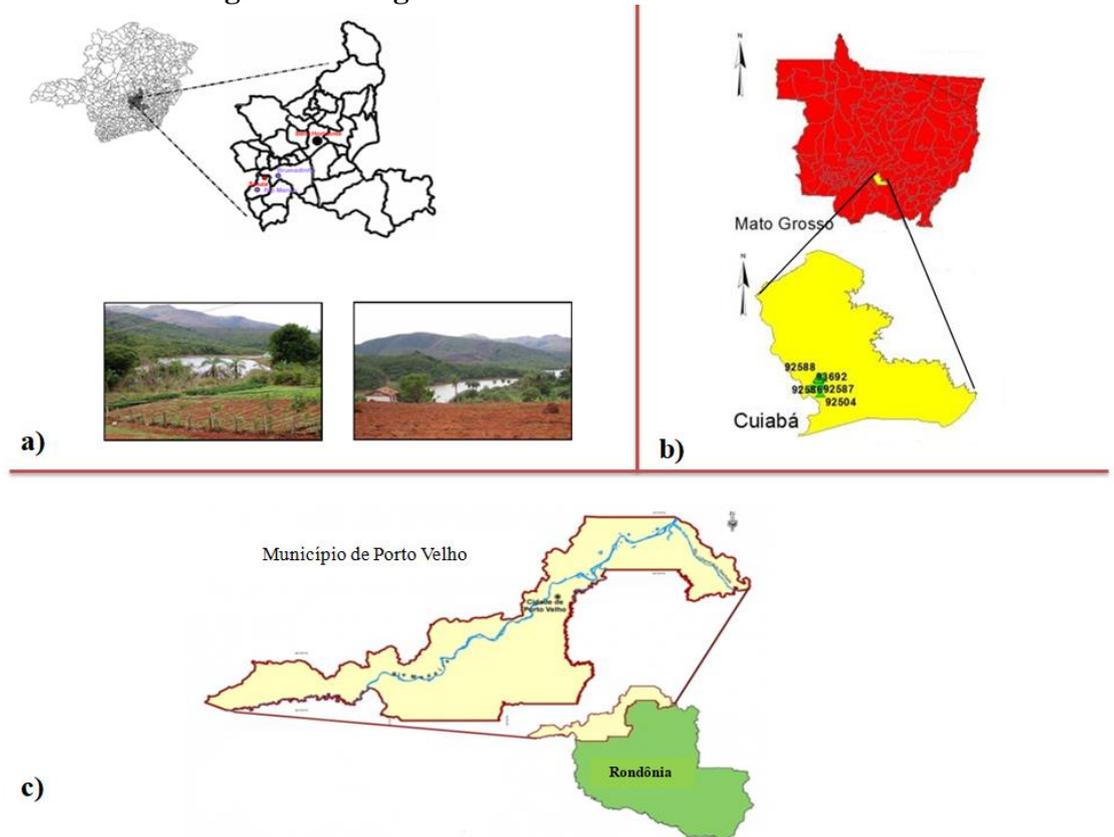
O presente estudo obteve amostras de pacientes infectados por *P. vivax* de três áreas com diferentes características epidemiológicas: Souza/Minas Gerais, Porto Velho/Rondônia e Cuiabá/Mato Grosso.

Souza, Minas Gerais – amostras provenientes de um surto que ocorreu em 2003 ($n \approx 16$) que entre os meses de abril e maio de 2003 foi identificado, pela Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais e Coordenação de Gestão da Região Metropolitana de Belo Horizonte, MG. O distrito de Souza tem cerca de 1.100 habitantes e encontra-se situado a 64km de Belo Horizonte (região metropolitana nas margens de um dos braços da represa de Brumadinho, onde existe uma alta densidade do mosquito *Anopheles darlingi* (CERBINO et al., 2004; ZUMPARO et al., 2004). A investigação epidemiológica realizada pelos órgãos encarregados de controlar o surto sugeriu que a transmissão se iniciou a partir de um único indivíduo (caso importado) que se infectou após visitar uma área endêmica de malária, no município de Humaitá, Estado do Amazonas (distância de 2.000km, aproximadamente, da região que ocorreu o surto). Vinte e cinco casos autóctones foram diagnosticados pela Coordenação Regional da Fundação Nacional de Saúde, FUNASA, sendo o surto prontamente controlado pelo tratamento dos doentes com antimaláricos (cloroquina + primaquina), e pela aplicação espacial e residencial de inseticidas residuais (cipermetrina). A ausência de novos casos desde o dia 21 de maio de 2003 demonstrou que o ciclo de transmissão foi interrompido (CERBINO et al., 2004).

Provenientes de Cuiabá, Mato Grosso – amostras pareadas da infecção inicial e recaída dos mesmos indivíduos ($N \approx 40$) que se encontram no biorrepositório do laboratório serão utilizadas nesse estudo. Essas amostras foram obtidas de indivíduos atendidos no centro de referência de malária do Hospital Universitário Julio Muller (UFMT) pelo Dr. Cor Jesus Fernandes Fontes, médico infectologista que tem colaborado há muitos anos com o nosso grupo de pesquisa. Essa área apresenta uma vantagem para os estudos de recaídas, uma vez que Cuiabá não é uma área de transmissão ativa de malária. Resultados acerca do fenótipo de metabolização de CYP2D6 dessa população já foi publicado pelo nosso grupo de pesquisa (SILVINO et al., 2006) e no presente estudo foi realizada uma caracterização mais ampla de CYP2D6, assim como foi realizada a análise cinética da enzima MAO-A dos indivíduos de Mato Grosso.

As amostras de Porto Velho/RO (N=49) são provenientes de pacientes atendidos no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) e no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI-FIOCRUZ). As coletas foram pela equipe do colaborador Dr. Dhélio Pereira. Coletas realizadas nos anos de 2019 e 2020.

Figura 10 - Regiões incluídas no estudo.



Em a) temos o distrito de Souza, que fica situado na cidade de Rio Manso no estado de Minas Gerais. B) Compreende pela região do município de Cuiabá/MT e em c) o Município de Porto Velho/RO

Os critérios gerais de inclusão no estudo foram: (1) participação voluntária, através de consentimento por escrito; (2) ausência de infecção por *P. falciparum* e/ou *P. malariae*; (3) ausência de sinais ou sintomas relacionados à malária clínica grave, tais como confusão mental e; (4) em caso do sexo feminino, ausência de gravidez.

4.2 Aprovações éticas e consentimento dos participantes

Os aspectos éticos e metodológicos de parte do estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisas em Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou (Nº parecer: 2.803.756). 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 total

O DNA das amostras foi extraído usando o kit comercial *QIAamp DNA mini kit* (Genra Systems, Minneapolis, MN), de acordo com o protocolo do fabricante especificado para amostras de sangue total. Ao todo, 200 µL de sangue total foram utilizados para extração e o DNA purificado foi eluído em 100 µL de água livre de DNAses e RNAses.

4.4 Inferência da atividade fenotípica de CYP2D6 por PCR em Tempo Real (qPCR)

Polimorfismos nos genes *CYP2D6*, selecionados na literatura (com base na frequência na população brasileira) por Silvino e colaboradores (2016; 2019) e Ladeira-Andrade e colaboradores (2019), foram escolhidos para serem genotipados, nesse estudo, utilizando o método de PCR em Tempo Real de acordo com protocolos previamente descritos.

4.4.1 Amplificação dos polimorfismos de *CYP2D6* e *CYP2C8*

Os SNPs selecionados incluíram 8 SNPs do gene *CYP2D6*: G1846A [rs3892097], G2988A [rs28371725], G3183A [rs59421388], C100T [rs1065852], C1023T [rs28371706], C1584G [rs1080985], C2850T [rs16946], G4180C [rs1135840]; e uma deleção 2613_2615delAGA [rs5030656]).

Estes polimorfismos foram genotipados utilizando 0,25 µL de *TaqMan® SNP Genotyping Assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) específico para cada SNP. Todas as reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 5 µL e na presença de 2,5 µL de *TaqMan® 2x Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, New Jersey, USA), 1,25 µL de água para biologia molecular e 1 µL de DNA (≈ 10 ng/µL), em placas de 384 poços. As condições da PCR foram: um ciclo de 95 °C por 10 minutos, 50 ciclos de 92 °C por 15 segundos e 60 °C por 90 segundos. A amplificação e detecção de fluorescência

foram feitas no *Applied Biosystems ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* da Plataforma de PCR em Tempo Real do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas (RPT09D). Ao final das reações os resultados foram analisados no *QuantStudio Real Time PCR software v1.3*.

4.4.2 Determinação do número de cópias do gene *CYP2D6*

O número de cópias do gene *CYP2D6* foi determinado através da técnica de PCR em Tempo Real utilizando o ensaio Hs00010001_cn (*Applied Biosystems*) para avaliação de deleção/duplicação do gene. O número de cópias gênicas foi determinado por comparação da amplificação do gene alvo (*CYP2D6*) com um gene de referência (RNAse P), já descrito por não ser polimórfico para duplicações e deleções.

Todas as reações de amplificação foram feitas na presença de 0,5 µL do ensaio Hs00010001_cn, 5,0 µL de *TaqMan® 2x Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, New Jersey, USA)*, 0,5 µL *Copy Number Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)*, 3 µL de água e 1 µL de DNA (≈10 ng/µL). A detecção do número de cópias em *CYP2D6* foi feita em triplicata usando placa de 384 poços (volume total de 10 µL/poço). As condições da PCR foram: 95°C por 10 minutos seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos.

A amplificação e detecção da fluorescência foram realizadas utilizando o equipamento *ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* da Plataforma de PCR em Tempo Real do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas (RPT09D) e, posteriormente, analisada através do software *CopyCaller® software v2.0*.

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

A predição dos fenótipos de metabolização de *CYP2D6* dos indivíduos foi realizada conforme publicado por nosso grupo de pesquisa (SILVINO et al., 2020).

Dessa forma, com base na análise dos polimorfismos no gene *CYP2D6* discriminados no item 4.4.1, foi definido os alelos e inferido os fenótipos dos indivíduos do estudo, a fim de avaliar e classificar os mesmos quanto à metabolização de *CYP2D6*: gPM (metabolizadores lentos), gIM (metabolizadores intermediários), gNM-S (metabolizadores normal com atividade reduzida), gNM-F (metabolizadores extensivos) ou gUM (metabolizadores ultrarrápidos). A predição dos fenótipos de metabolização foi realizada através da identificação das variantes

alélicas *CYP2D6*1*, *CYP2D6*2*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*5*, *CYP2D6*10*, *CYP2D6*17*, *CYP2D6*29*, *CYP2D6*34*, *CYP2D6*41* e de duplicações/deleções do gene *CYP2D6* (Tabela 1). Para predição dos fenótipos de *CYP2D6* foi utilizado o software Haplelo que foi desenvolvido em código aberto, publicado no Github. Será disponibilizada uma interface web, utilizando HTML+CSS+JS que consultará uma API HTTP no servidor. O software da API foi feito com a linguagem Go, realizando chamadas de sistema diretamente ao binário do PHASE (versão v2.1.1).

Tabela 1 - Alelos de *CYP2D6* selecionados para estudo, respectivas alterações nucleotídicas, atividade enzimática predita e fenótipo de metabolização.

Alelo <i>CYP2D6</i>	Promotor	Éxon 1	Éxon 2	.	.	Éxon 6	.	Éxon 7	Éxon 9	CNV	Atividade enzimática predita
	C-1584G	C100T	C1023T	G1846A	2615_2617del AAG	C285 0T	G2988A	G3183A	G4180C		
*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 >

Os dados de genotipagem de *CYP2D6* obtidos por PCR em Tempo Real foram analisados a partir dos resultados da amplificação e detecção de fluorescência dos ensaios *TaqMan® SNP Genotyping Assays*, utilizando o software *Applied Biosystems ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*.

Tabela 2 - Sistema de Pontuação de Atividade de CYP2D6 (Activity Score System)

Valores atribuídos aos alelos de CYP2D6	Alelos	Atividade Enzimática
0	*4, *4xN, *5	Nula
0,25	*10	Reduzida
0,5	*17, *29, *41	Reduzida
1	*1, *2, *35	Normal
2	*1xN, *2xN, *35xN	Aumentada
ND	*34	Indeterminada

¹Fenótipo predito após a soma da pontuação atribuída a cada alelo do indivíduo. FONTE: GAEDIGK et al., 2019, adaptado.

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

Para realização da genotipagem do polimorfismo uVNTR em MAOA foi feita PCR convencional com iniciadores específicos conforme descrito por Zhu e colaboradores (1992) (Tabela) seguido de visualização em gel de agarose e eletroforese capilar. As reações ocorreram no termociclador *Veriti 96-well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific)*.

A sequência de iniciadores utilizadas para identificação do polimorfismo do gene que codifica a enzima MAO-A de *P. vivax* foram:

MAOa PB1-F 5' GAACGGACGCTCCATTACGGA 3' e MAOa PT1-R FAM 5' ACAGCCTGACCGTGGAGAAG 3'

Para a realização desse ensaio foram utilizados 0,2 µL de Taq DNA Polymerase, recombinant (Thermo Fisher), 10nM de cada um dos iniciadores, 1,5nM da magnésio, 10x de tampão e 2µL de DNA, volume final de 20uL completado com água para biologia molecular.

Tabela 3 - Condições de amplificação da PCR convencional para amplificação do gene MAOA.

Condições do Ciclo PCR (MAO-A)		
1 ciclo	95°C	10 min
	95°C	1 min
x35 ciclos	62°C	1 seg
	72°C	1 min
x1 ciclo	72°C	5 min
	4°C	∞

O resultado de todas as reações foi visualizado em gel de agarose 1,8% corado com brometo de etídio 5% v/v.

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 análise do tamanho exato dos fragmentos.

As amostras foram colocadas em placas de 96 poços, 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®*). Os resultados foram compilados e analisados utilizando o programa *GeneMapper 4.1v*.

A avaliação da atividade da MAO-A foi feita a partir da análise do tamanho dos fragmentos obtidos para cada amostra, de acordo com a relação descrita em Sabol e colaboradores (1998) (Tabela 4). O tamanho do fragmento esperado para cada número de repetição: 3R – 321; 3,5R – 336; 4R – 351.

Para classificação das mulheres heterozigotas foi estabelecido que elas possuem atividade predita da MAO-A como metabolizadoras extensivas, esse critério foi realizado com base nos dados de Matsusue e colaboradores (2019), em que foi mostrado que as mulheres heterozigotas apresentavam atividade semelhante àquelas que eram homozigotas para o alelo extensivo.

Tabela 4 - Alelos de MAOA selecionados para estudo.

Número de repetições	Alelos*	Classificação	Atividade predita
3,5 a 4	2 ou 3	Homozigoto	Metabolizador extensivo
3 / 3,5 a 4	1 / 2 ou 3	Heterozigoto	Metabolizador extensivo
3	1	Homozigoto	Metabolizador lento

*Nomenclatura de acordo com Sabol e colaboradores (1998).

4.6 Análise de polimorfismos nos genes *pvmrp1* *pvmrp2*

Para realização da caracterização genética dos genes *pvmrp1* (5181 pb) PVX_097025 e *pvmrp2* (6072 pb) PVX_124085 foi feita PCR convencional com iniciadores específicos desenhados os dois genes. Selecionamos regiões específicas de ambos os genes para cobertura total da região polimórfica. Após a etapa de amplificação foi realizado o sequenciamento pelo método de Sanger. O par de iniciadores utilizados na amplificação e sequenciamento dos genes estão descritos na tabela 5.

Tabela 5- Sequência de iniciadores senso e anti-senso para protocolo de amplificação dos genes *pvmrp1* e *pvmrp2*.

Gene	Sequência senso e anti-senso
<i>pvmrp1</i>	5' ACT CGT TAG ACA ATG GAT TT 3' 5' GCT GGT GGG TCT ACA ATA 3'
<i>pvmrp2</i>	5' TCT TCT GAA GGA GTG CCT AGA 3' 5' CAT CGG TAG CGT CAG CAT TA 3'

Os iniciadores foram desenhados no software IDT–PrimerQuest Tool.

Para a reação para o gene *pvmrp1* preparou-se um MIX para utilizando 12,1 µl Água para Biologia Molecular + 1µl do *Primer PvMRP1_1F (IDT)* + 1µl do *PrimerMRP1_1R (IDT)* + 2µl de dNTP (1,25µM) + 2µl de Tampão + 0,6µl de Magnésio (3mM) + 0,3µl de Taq Polimerase.

Condições de amplificação: desnaturação e extensão inicial a 94°C por 5min, 94°C por 1min, seguida por amplificação por 35 ciclos com temperatura de anelamento de 52°C 30seg e 72° no decorrer de 1min. Por fim uma extensão final em 72°C por 5min.

Já para o gene *pvmrp2* preparou-se um MIX para utilizando 11,5 µl Água para Biologia Molecular + 1µl do *Primer PvMRP2_middle (IDT)* + 1µl do *PrimerMRP2_middle (IDT)* + 2µl de dNTP (3µM) + 2µl de Tampão + 1,2µl de Magnésio (3mM) + 0,3µl de Taq Polimerase.

Condições de amplificação: desnaturação e extensão inicial a 94°C por 5min, 94°C por 1min, seguida por amplificação por 35 ciclos com temperatura de anelamento de 58°C 30seg e 72° no decorrer de 1min. Por fim uma extensão final em 72°C por 5min.

As amplificações foram realizadas no termociclador *Veriti™ 96-Well* da *Applied Biosystems*.

Após a etapa de amplificação do alvo foi realizado o sequenciamento do fragmento pelo método de Sanger. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o sistema *BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems)*, que se baseia no método de terminação de cadeia com ddNTPs descrito por Sanger e colaboradores (1977). Os produtos obtidos pela reação de sequenciamento foram analisados por eletroforese capilar no sequenciador *3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems)*.

Para identificar os polimorfismos, as sequências de cada gene foram alinhadas utilizando os programas *ClustalW* (Thompson *et al.* 1994) e *Contig Assembly Program (CAP)* (Huang 1992), dentro do pacote *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall 1999). A confirmação dos polimorfismos foi feita a partir da análise da qualidade da sequência no programa *chromas*. Para gerar os haplótipos de cada gene utilizamos o software *DNAsp*.

4.7 Análise *in silico* do efeito de SNPs na estabilidade de MRP1 e MRP2 e afinidade com a Primaquina

A estrutura das proteínas MRP1 e MRP2 foram modeladas por homologia usando um conjunto de estruturas cristalinas experimentais de proteínas transportadoras (bombas de ATP) (PDB IDs: 6c3o, 6bhu, 5uja, 5wua, 5uj9, 5ykf). Os modelos foram então minimizados usando o campo de força MMF94s em Sybyl-X 2.1.1 (Certara LP, St Louis, MO), apresentando como estrutura final mais de 95% dos resíduos na região designada no diagrama de Ramachandran.

4.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos a um teste de normalidade para avaliar o padrão de distribuição. As variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias foram descritas pela média e desvio-padrão. A diferença entre as médias foi avaliada pelo *Teste T*. Variáveis que não preencheram os requisitos para análise paramétrica foram descritas como medianas e quartis e a diferença de medianas intergrupos foram testadas pelo *Teste de Mann-Whitney*. As diferenças entre a frequência de indivíduos com polimorfismos em *CYP2D6* e *MAO-A* e recidiva por *P. vivax* foram testada pelo teste qui-quadrado, com nível de

significância de 5%. Para os valores menores que cinco, utilizamos o Teste de Fisher. Correlações lineares foram avaliadas pelo coeficiente de Pearson (variáveis com distribuição normal) ou pelo coeficiente de Spearman.

5 RESULTADOS

O estudo contou com um total de 105 indivíduos de diferentes localidades, sendo elas, Cuiabá/MT (40), Porto Velho/RO (49) e Souza/MG (16). As amostras coletadas foram provenientes de pacientes que tiveram diagnóstico positivo para malária vivax.

Os indivíduos considerados elegíveis ao estudo foram classificados em dois grupos de acordo com o número de recorrências: um ou nenhum episódio de recorrência ($n = 74$) e múltiplas recorrências ($n = 31$; de 2 a 4 episódios de recorrência por *P. vivax*). A divisão entre esses dois grupos foi embasada em dados anteriores do nosso grupo de pesquisa, em que foi demonstrado que o status de metabolização da PQ influencia no número de recorrências (SILVINO et al., 2016;2020). No grupo ≤ 1 episódio de recorrência, a maioria apresentou um episódio de recorrência (80,6%) enquanto 19,3% ($n = 12$) não apresentaram novos episódios de malária no período de tempo do estudo. Para os grupos que apresentaram única e múltiplas recorrências, a mediana do tempo entre a infecção inicial e a primeira recorrência de *P. vivax* foi estimada em 59 dias (IQR = 42 – 76 dias).

Os indivíduos do estudo tinham uma mediana de idade de 36 anos (IQR = 25 – 49 anos) e não houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (≤ 1 episódio e múltiplas recorrências) para idade, sexo e localidade (Tabela 6).

Tabela 6 - Dados demográficos e epidemiológicos dos indivíduos do estudo.

Características	≤ 1 recorrências (n = 39)	Múltiplas recorrências (n = 31)	P - value	População total (n = 70)
Idade, anos (mediana, IQR)	35 (22 – 48)	42 (25 – 52)	0,0725 ^a	36 (25 – 49)
Sexo, n (%)				
Masculino	21 (33)	22 (31)	0,3133 ^b	45 (64)
Feminino	16 (23)	9 (13)		25 (36)
Local de Moradia, n (%)				
Cuiaba, MT	24 (22,8)	16 (15,2)	0,1294 ^c	40 (38)
Souza, MG	11 (10,4)	5 (4,7)		16 (15,2)
Porto Velho, RO	39 (37,1)	10 (9,5)		49 (46,6)

^a Teste t;

^b Teste Fisher;

^c Teste Chi-quadrado.

Os 35 pacientes provenientes de Porto Velho/RO foram 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 foi coordenado pelo Dr. André Daher. Esse grupo amostral é composto por indivíduos adultos. (DAHER et al., 2019)

5.1 Frequência dos alelos e fenótipos predeitos de CYP2D6

Todos os 105 indivíduos do estudo foram genotipados com sucesso e tiveram o número de cópias de *CYP2D6* determinado. No entanto, quatro indivíduos apresentaram alelos de *CYP2D6* indeterminados após análise de inferência dos haplótipos. Isso porque a combinação de nucleotídeos, determinante dos haplótipos, não teve correspondência com nenhum alelo de *CYP2D6* descrito no banco de dados *PharmVar*.

Para identificar e investigar potenciais alelos associados à função reduzida de CYP2D6, os haplótipos dos indivíduos incluídos no estudo foram construídos a partir das variantes polimórficas selecionadas na literatura. Essas variantes foram selecionadas por apresentar maior frequência na população brasileira e serem determinantes dos principais alelos com atividade reduzida/nula de CYP2D6. Dentre os indivíduos incluídos no estudo, 3,8% (n = 4) apresentaram mais de duas cópias de *CYP2D6*. Nenhuma amostra foi identificada como homozigota para a deleção do gene. Foram identificados onze haplótipos que permitiram a caracterização das variantes alélicas de CYP2D6: *1; *2/*35; *4; *5; *9; *10; *17; *34, *41 e *63, incluindo variantes caracterizadas por apresentarem aumento do número de cópias: *1x2, *2x2/*35x2, *4x2 e *17x2. Os alelos *1 e *2A/*35 que determinam atividade normal da enzima foram observados em maior frequência na população estudada, enquanto alelos associados ao aumento da função enzimática foram observados em apenas um cromossomo dentre os investigados (Tabela7).

Tabela 7 - Frequência dos alelos de CYP2D6 observada nas três populações do estudo de acordo com os grupos definidos pelo número de recorrências.

n = número de cromossomos, n=210; ≤1 episódio de recorrência, n=274; múltiplas recorrências, n=144. Os fenótipos

Alelos	Atividade	≤1 episódio de recorrência, (n)	Múltiplas recorrências, (n)	Total por atividade
*1	Normal	0,261 (55)	0,076 (16)	0,638 (134)
*2/*35	Normal	0,214 (45)	0,066 (14)	
*5	Normal	0,009 (2)	0,004 (1)	
*34	Normal	0,004 (1)	-	
*2/35x2	Aumentada	0,004 (1)	-	0,004 (1)
*9	Reduzida	0,009 (2)	0,009 (2)	0,147 (31)
*10	Reduzida	0,014 (3)	0,019 (4)	
*17	Reduzida	0,028 (6)	0,014 (3)	
*41	Reduzida	0,042 (9)	0,009 (2)	
*4	Nula	0,095 (20)	0,095 (20)	0,19 (40)
*63	Indeterminada	0,004 (1)	-	0,004 (1)
Outros	Indeterminada	0,019 (4)	-	0,019 (4)

de CYP2D6 estão representados como atividade normal (gNM-F), atividade reduzida (gIM/gNM-S), atividade nula (gPM) e atividade aumentada (gUM). Os indivíduos cujo fenótipo não foi determinado por ausência de dados de número de cópias ou predição alélica de *CYP2D6* estão apresentados como indeterminado. Os alelos com atividade aumentada correspondem às variantes: *1x2, *2x2/*35x2, *4x2 ou *17x2. Frequências iguais a 0 estão representadas por “-”

Para verificar a relevância clínica das frequências alélicas de *CYP2D6*, os fenótipos da enzima foram preditos utilizando o sistema Activity Score (AS), visto que somente a análise qualitativa dos alelos é insuficiente para prever o fenótipo. Entre os 105 pacientes do estudo, um único indivíduo (0,9%) foi predito como metabolizador ultrarrápido (gUM). Além disso, 64% dos indivíduos foram preditos como metabolizadores normais (gNM-F) e 36 (34%) indivíduos com comprometimento da atividade de CYP2D6: metabolizador nulo (gPM; 9 indivíduos, 8,5%), intermediário (gIM; 4 indivíduos, 3,8%) e atividade normal-reduzida (gNM-S; 21 indivíduos, 20%) (Tabela 8).

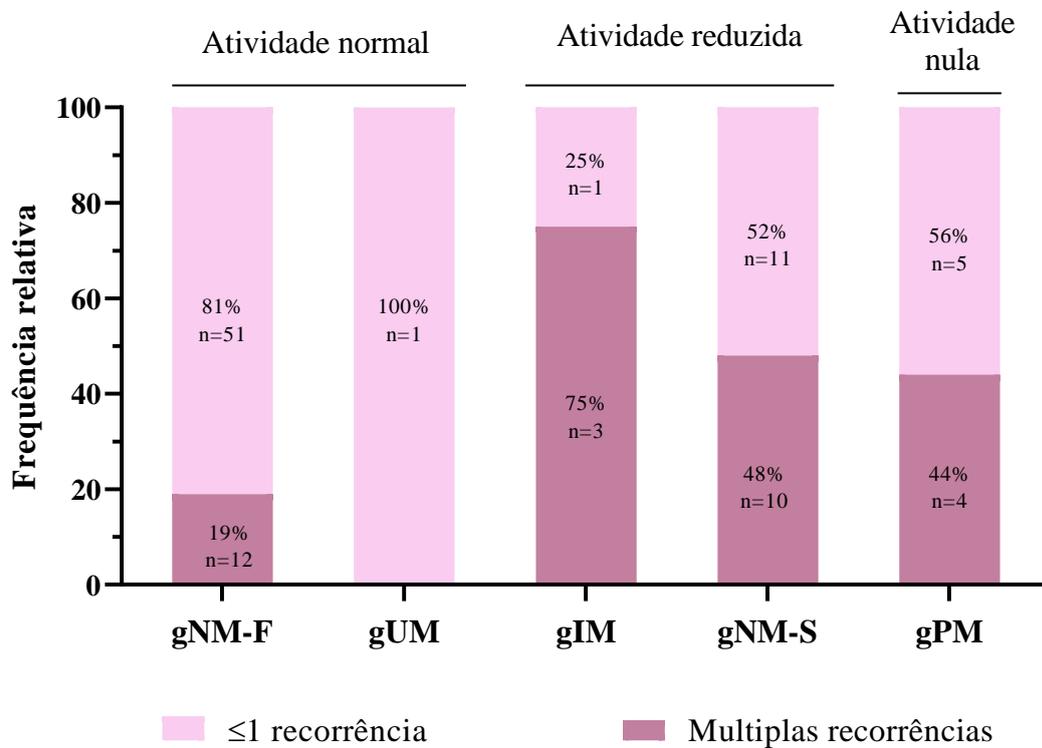
A predição da atividade de CYP2D6 foi realizada no software *Haplelo* desenvolvido nesse estudo, que permite a automatização do processo de predição. Em seguida, os haplótipos gerados no *Haplelo* foram comparados com os dados gerados no *Phase* e analisados manualmente para a construção dos haplótipos. Para as 95 observações analisadas pelos dois métodos, houve concordância de 100% na inferência dos haplótipos a partir dos SNPs genotipados de *CYP2D6*.

Tabela 8- Frequência dos fenótipos pretos de CYP2D6 nos grupos ≤ 1 episódio de recorrência e múltiplas recorrências nas três localidades do estudo.

Quando analisada a prevalência dos fenótipos agrupados por função (normal versus disfuncional), onde os indivíduos normais possuíam $AS > 1$ e os disfuncionais $AS \leq 1$, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos definidos de acordo com o número de recorrências ($P = 0,002$, Teste de Qui-Quadrado) (Figura 11 e Figura 12). Considerando os grupos definidos de acordo com o número de episódios de recorrência, observou-se uma maior frequência de *CYP2D6* mutado no grupo que apresentou múltiplas recorrências (45%), enquanto os indivíduos com atividade enzimática normal estavam em maior frequência no grupo com ≤ 1 episódio de recorrência (81%) (Figura 11).

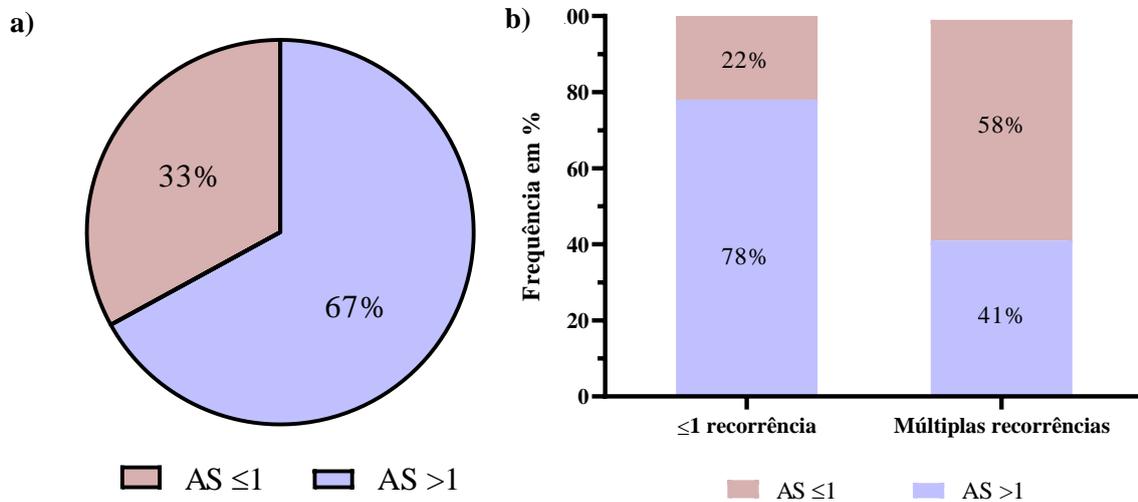
Fenótipo CYP2D6	Score de atividade	≤ 1 episódio de recorrência, (n)	Múltiplas recorrências, (n)	Total, (n)	Total em Cuiabá-MT, (n)	Total em Souza-MG, (n)	Total em Porto Velho-RO, (n)
gPM	0	0,051 (5)	0,004 (4)	0,091 (9)	0,071 (7)	0,001 (1)	0,001 (1)
gIM	0.5	0,001 (1)	0,003 (3)	0,04 (4)	-	0,001 (1)	0,003 (3)
gNM-S	1	0,112 (11)	0,01 (10)	0,214 (21)	0,071 (7)	0,003 (3)	0,112 (11)
Total, (n)	AS $\leq 1,0$	0,173 (17)	0,173 (17)	0,347 (34)	0,143 (14)	0,051 (5)	0,153 (15)
gNM-F	1,5 ou 2	0,52 (51)	0,122 (12)	0,642 (63)	0,234 (23)	0,112 (11)	0,296 (29)
gUM	> 2	0,001 (1)	-	0,001 (1)	-	-	0,001 (1)
Total, (n)	AS > 1,0	0,53 (52)	0,122 (12)	0,653 (64)	0,234 (23)	0,092 (9)	0,306 (30)

Figura 11- Análise das frequências fenotípicas previstas para CYP2D6 na população de estudo.



gNM-F, metabolizador extensivo/normal; gUM, metabolizador ultrarrápido; gIM, metabolizador intermediário; gNM-S, metabolizador reduzido; gPM, metabolizador nulo.

Figura 12 - Frequência fenotípica de CYP2D6 de acordo com o número de recorrências de malária causada por *P. vivax*.



(a) Gráfico de proporção de atividade de CYP2D6 geral dos indivíduos, onde em atividade normal estão agrupados aqueles que apresentam fenótipo de atividade normal para a enzima (AS > 1) e aqueles que estão no grupo de atividade alterada apresentam um fenótipo de atividade reduzida (AS ≤ 1). (b) No grupo de atividade alterada é mostrado a proporção de indivíduos que apresentaram um ou nenhum episódio de recorrência e múltiplas recorrências.

5.2 Frequência dos alelos e fenótipos de MAO-A

Nesse estudo, a enzima monoaminoxidase-a (MAO-A) foi genotipada com sucesso em 100 indivíduos do estudo. A partir da análise do polimorfismo de tamanho na região promotora do gene, foi inferida a atividade enzimática para cada um dos indivíduos. Apenas dois alelos foram identificados, o alelo 3 (54,5%, n = 83) e alelo 1 (44,5%, n = 58), que confere atividade enzimática normal e reduzida, respectivamente (Tabela 9). Nesse estudo, as mulheres foram classificadas de acordo com os critérios usados por Matsusue e colaboradores (2019), que definem que mulheres heterozigotas (1/3) apresentam atividade enzimática semelhante às homozigotas normais (3/3). Na população estudada, foi observada uma prevalência de 47% (n = 34) para o genótipo 3/3; 32% (n = 23) para o genótipo 1/1 e 21% (n = 15) para o genótipo 1/3 no grupo de indivíduos que apresentaram ≤ 1 episódio de recorrência. No grupo com múltiplas recorrências foi observada uma prevalência de 43% (n = 12) para o genótipo 3/3; 50% (n = 14) para o genótipo 1/1 e 7% (n = 2) para o genótipo 1/3.

Quando segmentamos os indivíduos em dois grupos de acordo com o número de recorrências, a frequência de indivíduos com um ou nenhum episódio de recorrência foi de 78% (n = 49) entre os indivíduos com fenótipo de MAO-A funcional, enquanto 38% apresentavam

MAO-A disfuncional. Por outro lado, a frequência de múltiplas recorrências foi maior entre os indivíduos que apresentavam atividade reduzida de MAO-A (Figura 13). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os alelos MAO-A nos diferentes grupos ($P = 0,109$; Teste de Qui-Quadrado).

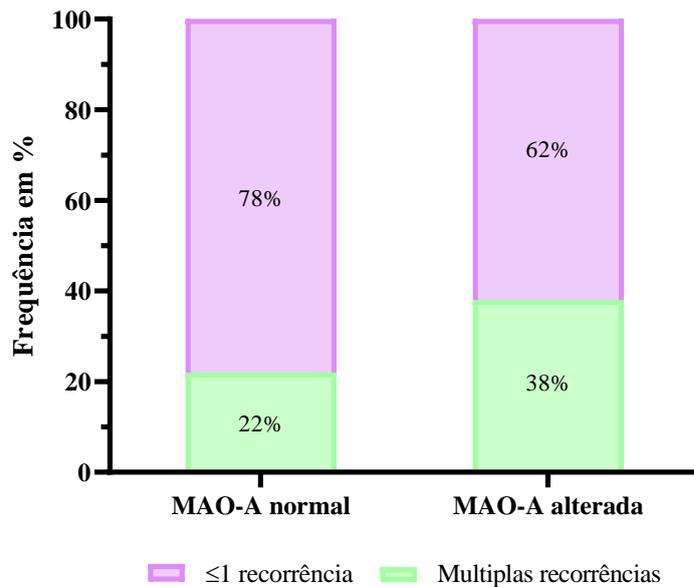
Tabela 9 - Frequência alélica de MAO-A observada nas populações do estudo de acordo com os grupos definidos pelo número de recorrências.

Alelos ^a	Atividade	Repetições	≤1 episódio de recorrência, (n)	Múltiplas recorrências, (n)	Total por atividade, (n)
3	Normal	4	0,415 (83)	0,13 (26)	0,545 (109)
1	Reduzida	3	0,295 (59)	0,15 (30)	0,445 (89)
Outros	Indeterminada	-	0,01 (2)	-	0,010 (2)

n = número de cromossomos, n=200; ≤1 episódio de recorrência, n=144; múltiplas recorrências, n=56. Os fenótipos de MAO-A estão representados como atividade normal, atividade reduzida. Os indivíduos cujo fenótipo não foi determinado por ausência de dados a respeito de sua atividade na literatura estão apresentados como indeterminado. Frequências iguais a 0 estão representadas por “-”.

^a Os alelos foram definidos de acordo com Sabol et al., 1998.

Figura 13- Frequência da atividade enzimática de MAO-A predita entre os grupos de indivíduos que experienciaram ≤1 episódio de recorrência e múltiplas recorrências.



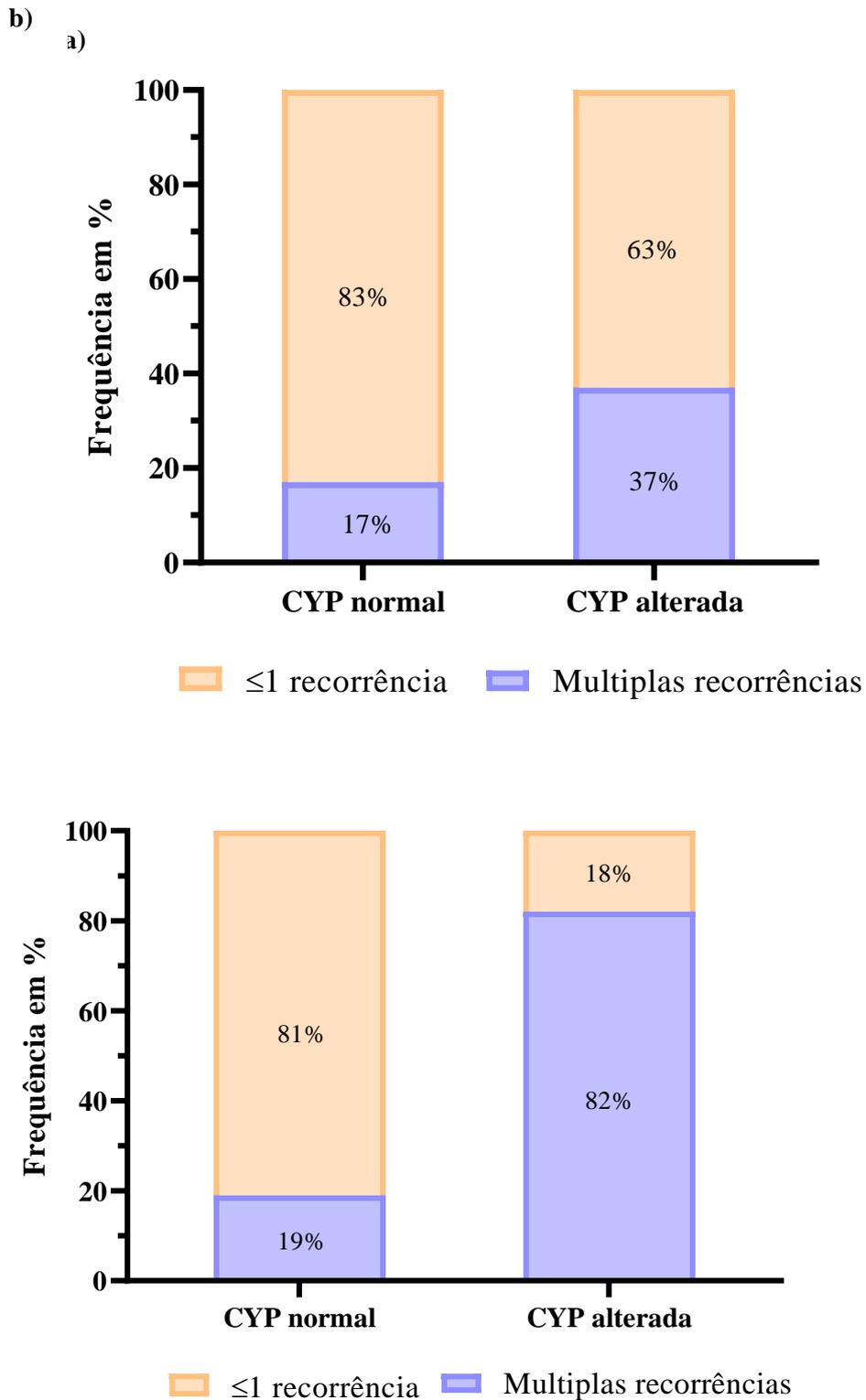
MAO-A normal, n = 63 e MAO-A alterada, n = 37.

5.3 Associação entre recorrências por *Plasmodium vivax* e as variantes de CYP2D6 e MAO-A

Para avaliar se o metabolismo da PQ por CYP2D6 e MAO-A influenciaria nos episódios clínicos recorrentes de malária, correlacionamos os fenótipos preditos de ambas as enzimas com o número de recorrências de *P. vivax*.

Para avaliar a influência independente das duas enzimas (MAO-A e CYP2D6) nos episódios de recorrência, os dados foram estratificados de acordo com a atividade predita para cada enzima. Entre os indivíduos com atividade normal de MAO-A, a maioria (83%) apresentou 1 ou nenhum episódio de recorrência quando CYP2D6 também era funcional. Por outro lado, os indivíduos com atividade alterada de CYP2D6 apresentaram episódios de múltiplas recorrências com maior frequência (37% versus 17%), embora essa diferença não seja estatisticamente significativa ($P = 0,180$; Teste de Qui-Quadrado) (Figura 14A). Da mesma forma, foi observada uma maior frequência (82%) de indivíduos com múltiplas recaídas entre os indivíduos com as duas enzimas com atividade reduzida ($P = 0,0006$; Teste Qui-quadrado) (Figura 14B).

Figura 14 - Frequência da atividade de CYP2D6 predita dentre os indivíduos que possuem a atividade funcional e disfuncional de MAO-A.

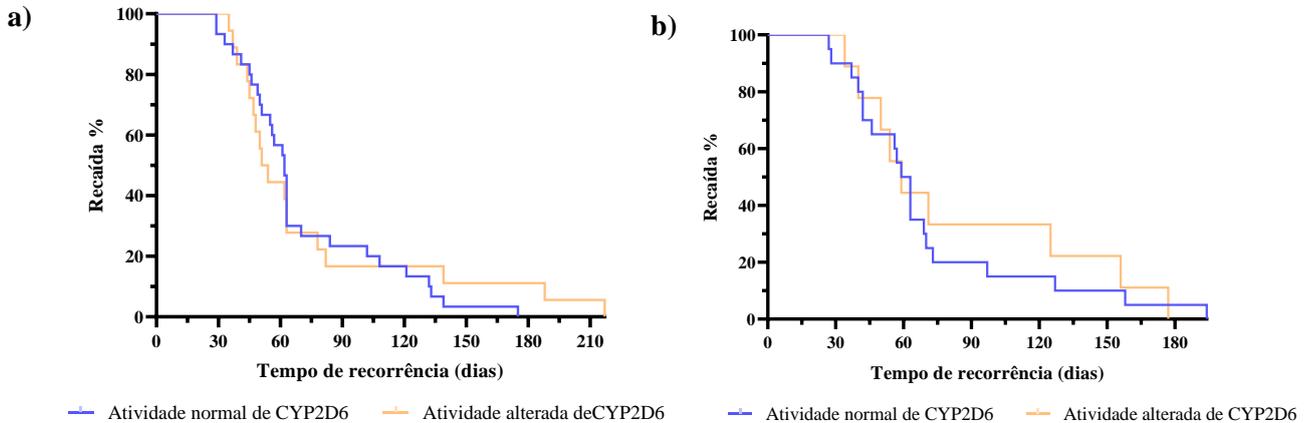


(A) Frequência da atividade de CYP2D6 predita dentre os indivíduos que possuem a atividade normal de MAO-A. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de CYP2D6 dentre aqueles que possuem MAO-A funcional ($P = 0,180$; Teste de Qui-Quadrado). (B) Frequência da atividade de CYP2D6 predita dentre os indivíduos que possuem a atividade alterada de MAO-A. Foi observada diferença estatisticamente

significativa entre os grupos de CYP2D6 dentre aqueles que possuem MAO-A disfuncional ($P = 0,0006$; Teste de Qui-Quadrado).

Em seguida, foi avaliado se o fenótipo predito de CYP2D6 e MAO-A influenciava no tempo de recorrência da infecção por *P. vivax*. O tempo entre a infecção inicial e a primeira recorrência não diferiu entre os grupos, sendo a mediana igual a 62 dias (IC 95%, 57,2 – 85) para o grupo com atividade normal de MAO-A e CYP2D6 e de 52 dias (IC 95%, 48,4 – 100,7) para o grupo com atividade reduzida apenas para CYP2D6 ($P = 0,074$, Teste de Log-rank) (Figura 15A). Já no grupo MAO-A alterada, a mediana foi de 61 dias (IC 95%, 50,3 – 90,7) para aqueles que tinham atividade de CYP2D6 normal e de 59 dias (IC 95%, 44 – 126,1) para os indivíduos que tinham atividade enzimática de CYP2D6 reduzida ($P = 0,110$, Teste de Log-rank) (Figura 15B).

Figura 15 - Curva Kaplan-Meier para o efeito da atividade de CYP2D6 no tempo da primeira recorrência



No grupo de indivíduos que possuem atividade enzimática de MAO-A funcional (A) e MAO-A disfuncional (B). (A) A mediana do tempo para o primeiro episódio de recorrência de malária por *P. vivax* foi de 52 dias para indivíduos com atividade reduzida de CYP2D6 e 62 dias para indivíduos com atividade normal ($P = 0,074$, Teste de Log-rank). (B) Mediana de dias foi de 59 dias para CYP2D6 mutada e 61 dias para os indivíduos com atividade enzimática de CYP normal ($P = 0,110$, Teste de Log-rank).

5.4 Avaliação *in silico* dos genes *pvmrp1* e *pvmrp2*

Para avaliar o efeito de SNPs nos genes da proteína associada à resistência a múltiplas drogas-1 e 2 (*pvmrp1* e *pvmrp2*) realizamos uma análise onde mapeamos os polimorfismos que poderiam estar associados a resistência ou maior tolerância às drogas comumente utilizadas no tratamento da malária por *P. vivax*. Para esse estudo, inicialmente foram selecionados 7 SNPs de MRP1 descritos em estudos genômicos relacionados a genes do *P. vivax* que estão em regiões de forte pressão seletiva (WINTER et al., 2015; BRIGHT et al., 2016; PEARSON et al., 2016; BENAVENTE et al., 2017). A partir da modelagem por homologia da estrutura tridimensional de MRP1 foi possível mapear e estudar o efeito de quatro (I1213, L1282, F1629 e V1478) das sete mutações selecionadas. Outros três SNPs estavam em loops não estruturados para os quais não tínhamos modelos confiáveis para modelar.

O resíduo I1232 está presente na região transmembranar, entre α -hélices. Foi observado que uma substituição para leucina nesta região deve afetar a formação de poros de exportação de drogas, desestabilizando o empacotamento local e levando à exportação facilitada de drogas. Da mesma forma, a mutação no resíduo L1282 deve desestabilizar o ambiente local na dobradiça entre o domínio de ligação ao ATP e o canal transmembranar, levando a mudanças conformacionais que alteram a exportação de drogas (Figura17).

O resíduo F1629 está localizado perto do domínio de hidrólise de ATP, que conduz a mudança conformacional necessária para hidrólise. Uma mutação em F1629 para leucina levaria

a uma redução no volume da cadeia lateral, abrindo ainda mais o canal de ligação da droga. O resíduo V1478 está presente em um ambiente muito hidrofóbico e a mutação para isoleucina foi prevista aumentar a estabilidade da proteína e reduzir a entropia vibracional.

Figura 16 - Estrutura da proteína MRP1 com as mutações mapeadas

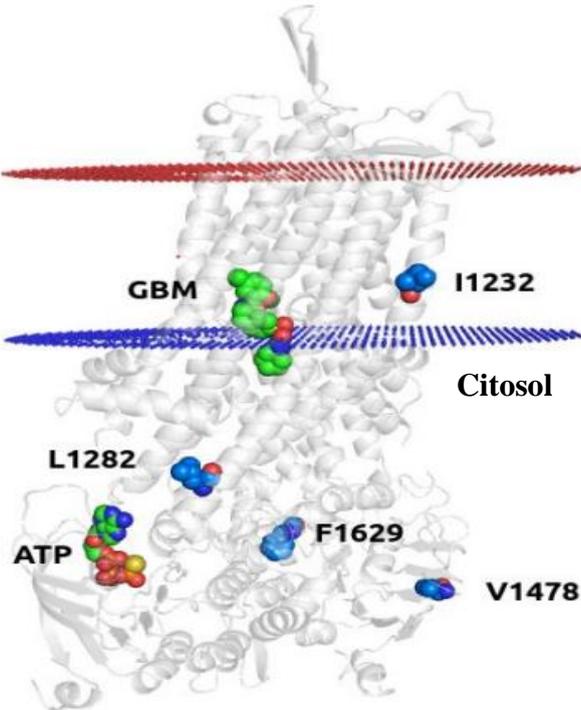
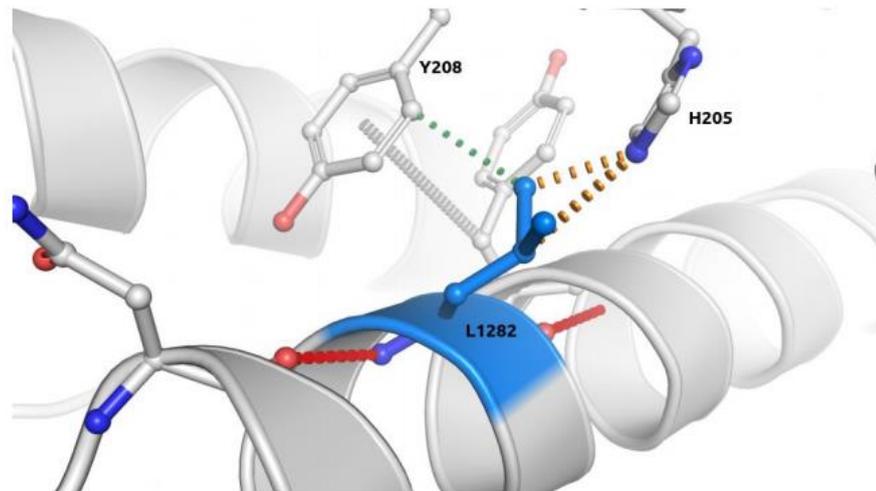


Figura 17 - Interações da mutação L1282I



Estabelece interações polares fracas com H205 e interação hidrofóbica com Y208.

Para MRP2, quatro mutações (S681, L1047, A1106 e Q1419) foram mapeadas na estrutura da proteína (Figura 18). Essas mutações foram selecionadas por apresentarem interações com moléculas como drogas. Três resíduos, S681, L1047 e A1106, estão localizados próximos ao sítio de reconhecimento de drogas e domínio ATP de hidrólise. Prevê-se que mutações nesses resíduos sejam capazes de desestabilizar a estrutura local, abrindo caminho para a droga no bolso de reconhecimento e canal de translocação.

Uma das mutações, Q1419E, é acessível por solvente e localizada perto da dobradiça entre o domínio de ligação ao ATP e o canal transmembranar. A mutação de glutamina para ácido glutâmico pode afetar a conformação e, conseqüentemente, a interação com a membrana, dada a sua proximidade com a região transmembranar. Essas alterações poderiam favorecer a conformação aberta do canal.

Figura 18 - Estrutura da proteína MRP2 com as mutações mateadas

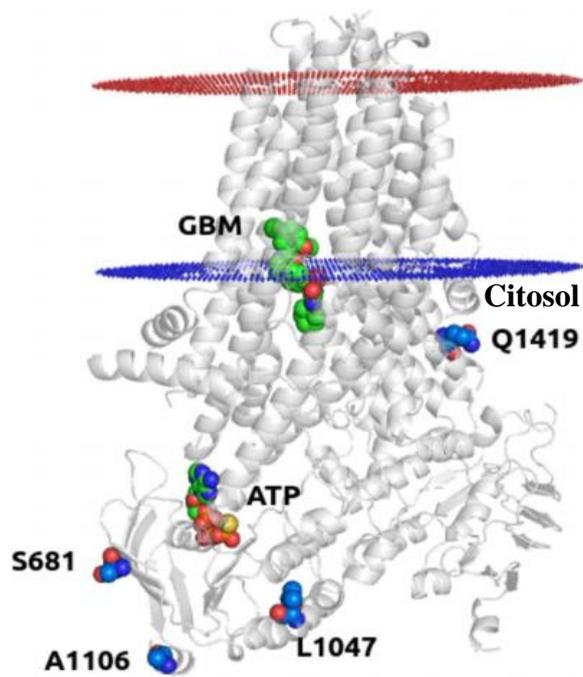
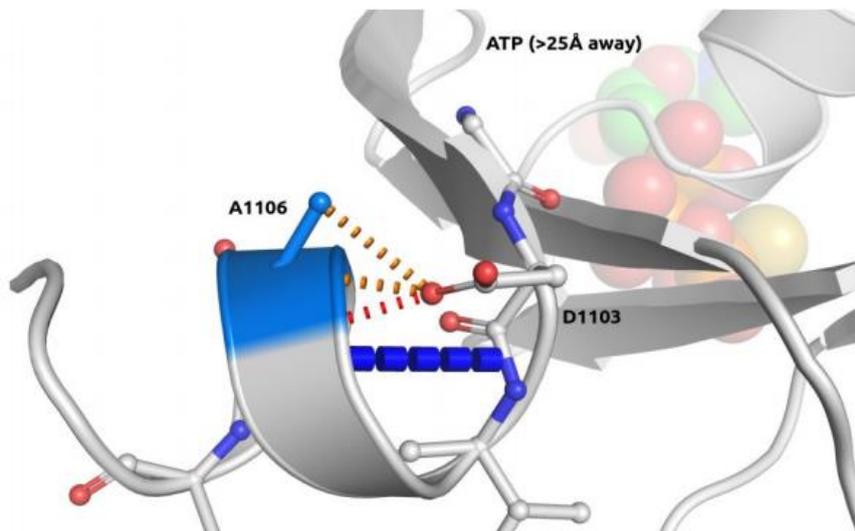


Figura 19- Mutação A1106S indentificana no gene pvmrp2



Perto do sítio de ligação de ATP. Estabelecendo interações polares.

5.5 Frequência de polimorfismos no genes que codificam MRP1 e MRP2 de *P. Vivax*

A partir das mutações mapeadas pela análise in silico e que foram preditas como tendo um efeito sobre o transporte de drogas, sequenciamos a região que flanqueia esses polimorfismos. Foi sequenciado, com alta qualidade, um fragmento de 742 pares de base do gene *pvmrp1* (nucleotídeos 3559 a 4301) de 34 indivíduos que no momento da coleta de sangue estavam positivos para malária por *P. vivax*.

A sequência estudada de MRP1 está localizada na região N-terminal, e compreende os aminoácidos metionina a glicina. Os polimorfismos I1232L (27,4%, n = 17), F1239L (14,5%, n = 9), Y1393D (50,7%, n = 34) e G1419E (11,2%, n = 7) foram identificados nas sequências avaliadas (Tabela 10).

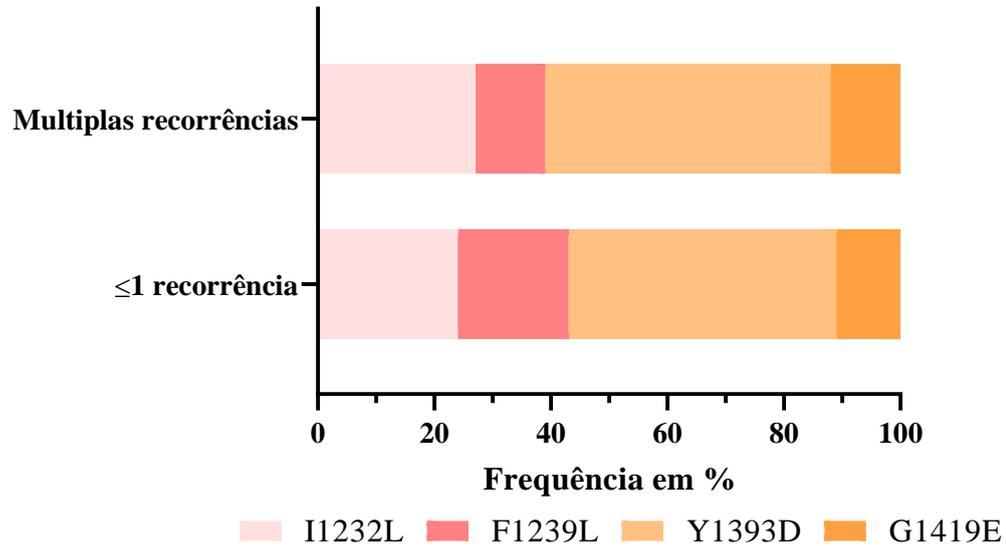
Ao analisarmos os SNPs presentes em MRP1 em relação a quantidade de episódios de recorrência apresentada por cada indivíduo, não foi observada diferença significativa entre os grupos com um ou nenhum episódio e múltiplas recorrências de malária causada por *P. vivax* (Figura 20).

Em seguida, foram reconstruídos os haplótipos a partir das sequências obtidas de cada amostra, sendo identificados seis haplótipos no total. O haplótipo 3 (H3) foi o mais frequente (32,2%, n = 11), seguido pelo H4 (23,5%, n = 8), H1 e H2 (14,7%, n = 5). Entre os haplótipos menos frequentes estavam o H5(8,8%, n = 3) e H6 (5,8%, n = 2) (Tabela 11). Ao agrupar os haplótipos pelo número de mutações (0, 2 ou 3 mutações), não foi observada diferença significativa entre os grupos definidos de acordo com o número de recorrências (P = 0,71, Teste de Qui-Quadrado) (Figura 12).

Tabela 10 - Frequência das mutações em MRP1 nas 34 amostras de *P. vivax* sequenciadas da Amazônia brasileira.

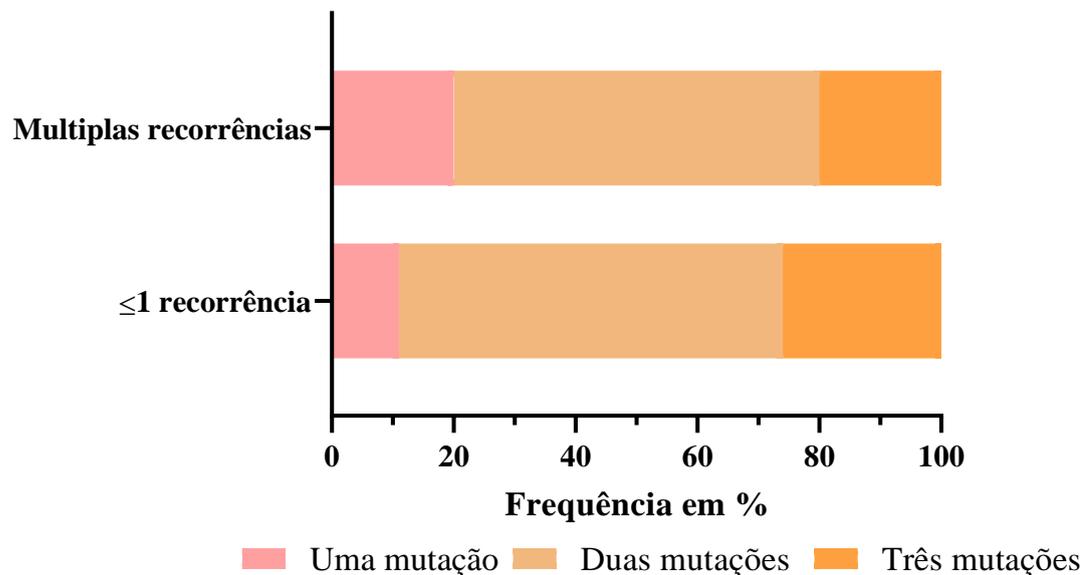
Posição	≤1 episódio de recorrência, (n)	Múltiplas recorrências, (n)	Total, (n)
I1232L	14,5 (9)	12,9 (8)	27,4 (17)
F1239L	0,8 (5)	6,4 (4)	14,5 (9)
Y1393D	24,1 (17)	22,5 (17)	50,7 (34)
G1419E	6,4 (4)	4,8 (3)	11,2 (7)

Figura 20 - Gráfico de frequência dos SNPs em MRP1 nos grupos que apresentaram ≤ 1 episódio de recorrência e múltiplas recorrências.



≤ 1 episódio de recorrência n = 37; Múltiplas recorrências, n = 33.

Figura 21- Frequência dos haplótipos gerados, agrupados por número de mutações do gene pvmp1.



O grupo com uma mutação corresponde ao haplótipo 1 (n = 5), os haplótipos H3, H4 e H6 pertence ao conjunto que possui até duas mutações (n = 21) e os que possuem até três mutações são os haplótipos H2 e H5 (n = 8).

Tabela 11- Frequência dos haplótipos gerados de *pvmrp1*

Polimorfismos	Nucleotídeo	3696	3717	4179	4257	
		<u>A</u> TA <u>C</u> TA	<u>T</u> TT <u>A</u> TT	<u>T</u> AC <u>G</u> AC	<u>G</u> GA <u>G</u> CA	
Haplótipo	Frequência %, (n)	AA I/L	1232 I/L	1239 F/L	1393 Y/D	1419 G/A
1	14,7 (5)			G		
2	14,7 (5)	C		G	_C_	
3	32,3 (11)	C		G		
4	32,5 (8)		A	G		
5	8,8 (3)	C	A	G		
6	5,8 (2)			G	_C_	

5.6 Frequência de polimorfismos no genes *pvmrp2*.

Com a estrutura da proteína MRP2 obtida no estudo *in silico*, foi possível mapear as mutações que poderiam conferir ao parasito resistência ou uma maior tolerância aos antimaláricos. Nesse estudo, sequenciamos um fragmento que flanqueava dois polimorfismos mapeados na estrutura de MRP2 *in silico* (posição 3034 a 3704pb). A sequência compreende as posições 3034 a 3704 do gene *pvmrp2* (671 pares de base). A sequência estudada de MRP2 está localizada na região N-terminal, e compreende os aminoácidos metionina ao ácido glutâmico.

Foram sequenciadas 17 amostras com alta qualidade para o fragmento da MRP2, sendo identificados os polimorfismos V1022M (51,5%, n = 17), A1106S (27,2, n = 9) e P1196S (21,2%, n = 7) (Tabela 12) (Figura 22).

Quando investigamos a relação entre as mutações encontradas no gene *pvmrp2* e o número de episódio de recorrências dos pacientes não obtivemos diferença estatisticamente significativa entre os grupos que apresentaram ≤ 1 episódio e múltiplas recorrências.

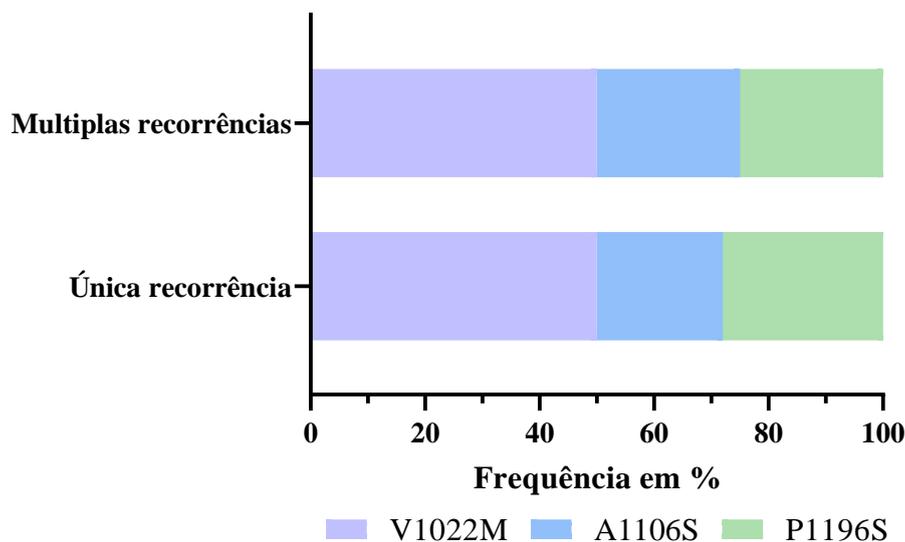
A partir dos dados do sequenciamento da MRP2 foi possível gerar os haplótipos e foram identificados três haplótipos, em que os haplótipos com maior frequência foram o H1 e H2 ambos com frequência de 47% (n = 8) e o H3 com frequência de 5,8% (n = 1) (Figura 23).

Tabela 12- Frequência das mutações em MRP2 nas 17 amostras de *P. vivax* sequenciadas da Amazônia brasileira

Nome do gene	Posição	≤1 episódio de recorrência, (n)	Múltiplas recorrências, (n)	Total, (n)
<i>pvmrp2</i>	V1022 M	28,1 (9)	21,8 (7)	51,5 (17)
<i>pvmrp2</i>	A1106S	15,6 (5)	12,5 (4)	27,2 (9)
<i>pvmrp2</i>	P1196S	09,3 (3)	12,5 (4)	21,2 (7)

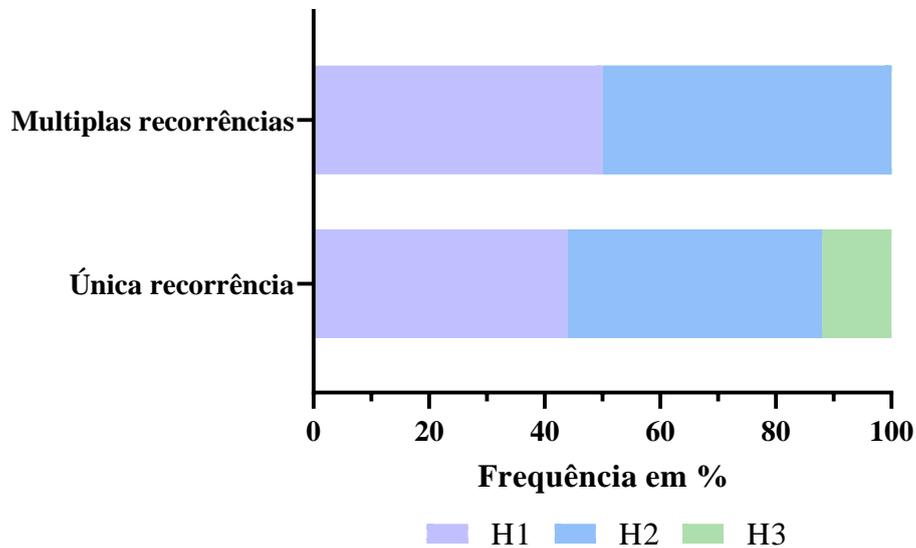
Ao verificar a frequência dos haplótipos agrupados por quantidade de mutação (selvagem versus duas mutações versus três mutações), não houve diferença estatística significativa entre os grupos definidos de acordo com o número de recorrências ($P = 0,62$, Teste de Qui-Quadrado).

Figura 22- Gráfico de frequência dos SNPs em MRP2 nos grupos que apresentaram ≤1 episódio de recorrência e múltiplas recorrências.



≤1 episódio de recorrência n = 18; Múltiplas recorrências, n = 16.

Figura 23 -Frequência dos haplótipos gerados, agrupados por quantidade de mutação do gene pvmp2.



O haplótipo 1 corresponde ao haplótipo que possui três mutações, o H2 é o haplótipo selvagem e o H3 possui 2 mutações.

Tabela 13- Frequência dos haplótipos gerados de pvmp2

Polimorfismos	Nucleotídeo	3066	3318	3588
		<u>CCG</u> <u>TCG</u>	<u>GTG</u> <u>ATG</u>	<u>GCG</u> <u>TCG</u>
	AA	1022 V/M	1106 A/S	1196 P/S
Haplótipo	Frequência %, (n)			
1	47 (8)	A	T	T
2	47 (8)	A		
3	9 (1)	A		T

6 DISCUSSÃO

A malária continua sendo um grande problema de saúde pública, estando presente em diversos países por todo o globo. Por ser uma doença complexa, existem diversas limitações para o estudo de *P. vivax*, como a falta de um sistema de cultivo do parasito a longo prazo. Por exemplo, o cultivo de *P. vivax* permitiria o estudo mais detalhado a respeito da sensibilidade do parasito aos antimaláricos.

O número elevado de indivíduos que apresentam recorrências devido a falha terapêutica após tratamento com CQ e PQ e a alta prevalência de infecções por *P. vivax* evidencia a importância de se investigar os fatores genéticos tanto do hospedeiro quanto do próprio parasito que possam estar associados ao aumento do número de casos e episódios de recorrências de malária por *P. vivax*.

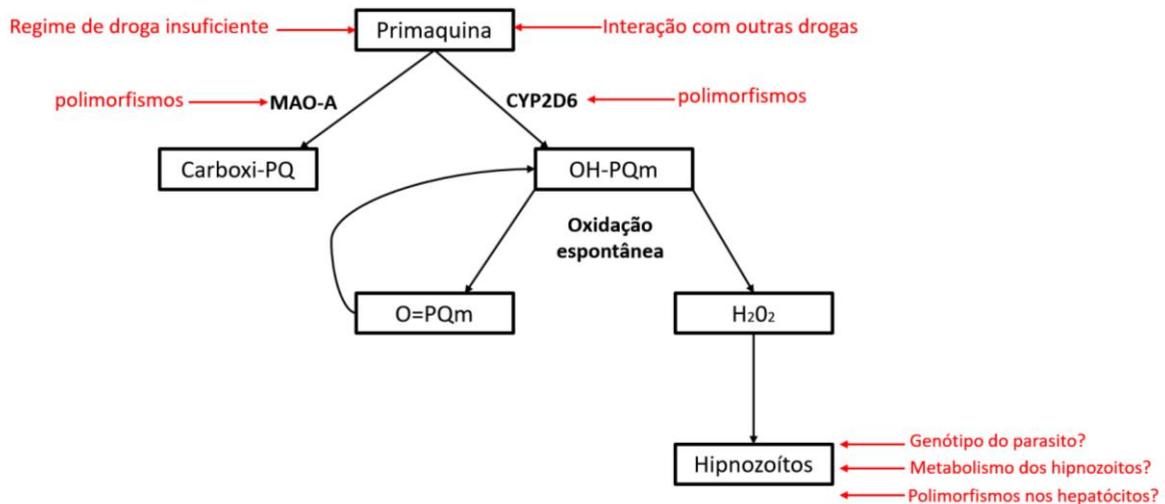
O esquema terapêutico preconizado pelo Ministério da Saúde para o tratamento da malária por *P. vivax* consiste na administração de CQ por três dias (10 mg/kg no dia 1 e 7,5 mg/kg nos dias 2 e 3) e, para o tratamento radical, utiliza-se também PQ, na dose de 0,5 mg/kg/dia, por sete dias (MS, 2020). Esse tratamento é utilizado há muitas décadas, sendo a PQ o único fármaco licenciado e seguro para cura radical da malária causada por *P. vivax*. O número de casos de recorrência de malária tem alarmado a comunidade científica em relação à eficácia do regime terapêutico da malária causada por *P. vivax*. A formação dos hipnozoítos durante a infecção é de extrema importância para a manutenção do ciclo biológico do parasito. Como a PQ é a única droga capaz de eliminar essas formas do parasito, torna-se importante a investigação da farmacocinética da droga em questão, pois a sua eficácia pode ser comprometida por alterações genéticas em enzimas, tais como CYP2D6 e MAO-A.

Estudos a respeito da atividade de CYP2D6 e sua influência no número de recorrências de malária por *P. vivax* já demonstrou que a enzima possui um papel importante na metabolização da PQ e que indivíduos com atividade enzimática reduzida apresentam um maior número de episódios de recorrências (SILVINO et al., 2016;2020). Em relação à MAO-A não se tem dados na literatura sobre uma possível relação da atividade enzimática com as recorrências da doença.

Além dos aspectos genéticos relacionados à metabolização da PQ no hospedeiro, fatores genéticos associados ao parasito também merecem atenção. A resistência de *P. vivax* à CQ vêm sendo relatada ao longo dos anos. Contudo, o conhecimento em relação aos genes do parasito que conferem resistência às drogas ainda é escasso. Estudos recentes abordam a importância da avaliação de genes de *P. vivax* que estão localizados em regiões de forte pressão seletiva.

No presente estudo, foram adotados alguns critérios que nos permitiram caracterizar o perfil de recorrência dos indivíduos incluídos no estudo. Nesse sentido, a classificação das recorrências se baseou no aparecimento de novos episódios de malária por *P. vivax* entre 29 e 180 dias após a infecção inicial, com a finalidade de eliminarmos a possibilidade de uma nova infecção. Sabe-se que no Brasil o intervalo médio estimado entre a infecção inicial e o episódio de recaída é de aproximadamente quatro meses (SIMÕES et al., 2014). A ocorrência de episódios de recrudescência foi considerada improvável, uma vez que devem ocorrer dentro de um período de no máximo 28 dias após o início do tratamento. Isso porque nesse intervalo de tempo os níveis de CQ circulante na corrente sanguínea estão em concentração elevada, capaz de eliminar os parasitos. Diante disso, a persistência do parasito na corrente sanguínea caracteriza um episódio de recrudescência, que ocorre devido a resistência de *P. vivax* à droga (BAIRD et al., 1997; CHU et al., 2018).

Figura 24- Representação esquemática dos diferentes fatores e das questões-chave que poderiam afetar o surgimento e a seleção de *Plasmodium vivax* resistente à primaquina.



A adesão a vários dias de tratamento é um desafio e o curso incompleto (ou regime insuficiente) levará a um tratamento abaixo do ideal. Alguns medicamentos podem inibir o metabolismo adequado da PQ, reduzindo assim a geração de compostos ativos (hidroxi-primaquina: OH-PQm). O metabolismo da PQ em compostos ativos requer o envolvimento da CYP2D6, para a geração de peróxido de hidrogênio e eliminação de hipnozoítos. Polimorfismos humanos em CYP2D6 podem afetar o metabolismo adequado da PQ, resultando em eficácia inadequada. Por outro lado, a PQ pode ser metabolizada pela via de desaminação oxidativa com o envolvimento da MAO-A. Os polimorfismos humanos na enzima MAO-A podem levar a uma diminuição da PQ envolvida na CYP2D6 e resultar em eficácia inadequada? Alguns genótipos de parasitos podem já ser menos suscetíveis à PQ do que outros: os alelos tolerantes poderiam ser selecionados no tratamento com PQ? Existem estágios de desenvolvimento dos hipnozoítos mais propensos a lidar com os danos da PQ ou hepatócitos infectados com metabolismo reduzido da PQ?

Fonte: Adaptado de Popovici et al., 2021.

O presente estudo propôs investigar fatores genéticos tanto do hospedeiro quanto de *P. vivax* que podem influenciar as recorrências da doença, com ênfase no estudo das variantes

enzimáticas de CYP2D6 e MAO-A, bem como de genes de *P. vivax* sob forte pressão seletiva isolados de pacientes com histórico de recorrências por malária.

6.1 Influência de CYP2D6 e MAO-A no metabolismo de PQ nos episódios de recorrência em indivíduos infectados por *Plasmodium vivax*

Um maior entendimento a respeito dos aspectos farmacogenéticos envolvidos na metabolização da PQ, juntamente com estudos da frequência alélica de *CYP2D6* em diversas populações irá auxiliar na escolha do regime terapêutico mais adequado. Além disso, a avaliação do impacto da atividade enzimática na eficácia terapêutica do fármaco deve auxiliar na dosagem da droga, a fim de evitar possíveis efeitos adversos e a ocorrência de episódios de recaída por *P. vivax* em casos de alteração da atividade enzimática (KERB et al., 2009; AVULA et al., 2018; CAMARDA et al., 2019).

A população brasileira é altamente heterogênea e miscigenada e esse background genético tem contribuído para as diferenças na composição e frequências alélicas de *CYP2D6* observadas no país (FRIEDRICH et al., 2014). A elucidação da distribuição dos alelos de *CYP2D6* na população constitui um passo importante, principalmente nas áreas endêmicas para malária, para orientação da escolha do regime terapêutico, assim como da dosagem terapêutica mais adequada, sempre com o objetivo de evitar as recidivas e efeitos adversos derivados da metabolização alterada da droga.

Todos os alelos identificados no presente estudo correspondem a variantes de *CYP2D6* já descritos em estudos que avaliaram a população brasileira. Esse estudo utilizou a classificação proposta pelo Consórcio de Implementação Farmacogenética Clínica (CPIC), realizada pelo sistema de pontuação AS, o qual tem sido amplamente utilizado nos estudos que avaliam *CYP2D6* na resposta à PQ na malária (BENNETT et al., 2013; JOAN INGRAM et al., 2014; BRASIL et al., 2018). A segunda opção que seria utilizar categorias fenotípicas (metabolizador extensivo, intermediário, lento e ultrarrápido) deve ser utilizada com cautela, visto que alguns estudos evidenciam uma heterogeneidade na correspondência genótipo-fenótipo entre grupos populacionais, isto é, diferentes fenótipos podem ser inferidos a partir do mesmo genótipo em regiões e grupos étnicos distintos (LLERENA et al., 2014; GAEDIGK et al., 2017; NARANJO et al., 2018).

Dados da literatura demonstraram que no sistema AS o genótipo gNM-S (AS = 1) tem atividade próxima ao gIM, isto é, atividade reduzida. Por isso, no presente estudo os indivíduos com score AS igual a zero (gPM), 0,5 (gIM) e 1 (gNM-S) foram reunidos em um único grupo

(CYP2D6 disfuncional), enquanto os indivíduos com $AS > 1$, ou seja, gNM-F e gUM foram agrupados em um único grupo denominado metabolizadores funcionais.

Os indivíduos incluídos no estudo pertencem a localidades com diferentes perfis de transmissão de malária: uma população caracterizada como primo infectada proveniente de Souza/MG, região não endêmica onde ocorreu um surto de malária em 2003; indivíduos de Cuiabá/MT, área em fase de pré-eliminação de malária e; indivíduos provenientes de Porto Velho/RO, região endêmica para malária. Dessa forma, populações com diferentes perfis de transmissão foram avaliadas nesse estudo. Aproximadamente 70% dos indivíduos apresentaram um ou nenhum episódio de recorrência por malária por *P. vivax*. Nesse grupo, foi observado uma frequência de 19% de indivíduos com CYP2D6 disfuncional. Entre os indivíduos que apresentaram múltiplas recorrências, 58% tinham atividade enzimática nula/reduzida. Esses achados corroboram com os descritos na literatura pelo nosso grupo de pesquisa, além de outros autores, de uma associação significativa entre mutações relacionadas à uma atividade reduzida de CYP2D6 e múltiplas recorrências por malária (BRASIL et al., 2018; LADEIA-ANDRADE et al., 2019; SILVINO et al., 2020).

Quanto aqueles que possuem metabolismo normal de CYP2D6, 81% dos indivíduos pertenciam ao grupo que apresentou ≤ 1 episódio de recorrência. Esse dado reforça que o desfecho da infecção por *P. vivax* depende de multifatores, como a atividade enzimática de CYP2D6, o estado imunológico do indivíduo e a susceptibilidade do parasito aos antimaláricos usado no tratamento (CHU; BRANCO, 2016; COMMONS et al., 2018).

A metabolização da PQ inclui uma via metabólica mediada pela MAO-A, enzima que desempenha um papel importante na catalisação de várias vias biológicas, incluindo drogas como a PQ (BERLIN, ANTHENELLI., 2001). Em estudos *in vitro*, inibidores da MAO-A reduziram os níveis do principal metabólito da PQ, a carboxi-PQ, sugerindo um papel ativo dessa enzima no metabolismo da droga (JIN et al., 2014). No entanto o metabólito produzido durante a metabolização mediada por MAO-A não possui atividade antiparasitária (CONSTANTINO et al., 1999). O conhecimento acerca do papel da MAO-A no curso da biotransformação da PQ ainda é incerto, já que poucos estudos avaliaram as consequências dos polimorfismos de MAO-A no metabolismo da PQ (ARIFFIN et al., 2019; POPOVICI et al., 2021).

O presente estudo avaliou um polimorfismo a nível do promotor (uVNTR) que potencialmente altera a atividade enzimática de MAO-A em indivíduos infectados por *P. vivax*. Na população estudada, a frequência de indivíduos com atividade de MAO-A reduzida foi de 37%. Desses indivíduos, aproximadamente 38% apresentaram múltiplos episódios de

recorrência. Em relação aos metabolizadores funcionais, 34% apresentaram múltiplos episódios de recorrência por *P. vivax*. Nossos resultados não indicam uma associação significativa entre o fenótipo de MAO-A e o número de recorrências. É importante pontuar que atualmente não se tem dados relacionados a influência de polimorfismos em MAO-A no metabolismo da PQ em indivíduos infectados por *P. vivax*. Assim, é importante ressaltar que o presente trabalho é o primeiro a avaliar essa relação.

Recentemente, foi levantada a hipótese de que o aumento da atividade da MAO-A poderia reduzir a quantidade de PQ disponível para a metabolização por CYP2D6 e, portanto, de metabólitos ativos anti-hipnozoítos. Alternativamente, os polimorfismos que reduzem a atividade da MAO-A poderiam aumentar a atividade antiparasitária se a droga for canalizada para a via CPR/CYP2D6 e gerar mais metabólitos ativos (POPOVICI et al., 2021).

No presente estudo foi demonstrado que as diferenças no metabolismo da PQ por CYP2D6 podem contribuir para a incidência de recorrência de *P. vivax*. Já em relação a MAO-A, a frequência de indivíduos com atividade enzimática reduzida no grupo de múltiplas recorrências foi semelhante ao encontrado para os indivíduos com CYP2D6 disfuncional, 45% para MAO-A e 55% em CYP2D6. Esse dado refuta a hipótese levantada por Popovici (2021) de que polimorfismos que conferem redução da atividade de MAO-A poderiam levar a uma maior concentração de PQ livre para ser metabolizada por CYP2D6 e, conseqüentemente, a um menor número de recorrências por malária por *P. vivax*. Ao contrário, nossos resultados sugerem que indivíduos que possuem MAO-A alterada possivelmente apresentam um efeito aditivo ao efeito da CYP2D6 disfuncional.

Em relação ao tempo para a primeira recorrência, não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos de metabolizadores, com todos os pacientes apresentando recidiva anterior a mediana brasileira, que é de 71 dias (DAHER et al., 2019), semelhante a mediana registrada para o município de Porto Velho/RO em 2009, 69,5 dias (SIMÕES et al., 2014).

O impacto da metabolização da PQ na manutenção da malária por *P. vivax* em todo o mundo nos leva a importância, juntamente aos esforços de controle da doença, de avaliar a necessidade de readequação do tratamento. Tal readequação seria por meio de ajuste das doses das drogas administradas com o objetivo de melhorar o manejo de pacientes infectados com *P. vivax* e reduzir o número de falhas terapêuticas na malária.

6.2 Frequência de polimorfismos nos genes *pvmrp1* e *pvmrp2* e sua influência na susceptibilidade de *Plasmodium vivax* a CQ-PQ

Um fator que pode comprometer os esforços para a eliminação da malária causada por *P. vivax* é o surgimento de parasitos resistentes às drogas utilizadas no seu tratamento, o surgimento dessa resistência comprometeria significativamente a erradicação de *P. vivax*.

A busca por marcadores de resistência CQ em *P. vivax* tem se concentrado na investigação de genes ortólogos de *P. falciparum* com papel conhecido na resistência a droga, *pvcr-t-o* e *pvm-dr-1*. A descoberta do gene *pfcr-t* e da mutação única K76T necessária para resistência CQ e falha do tratamento em *P. falciparum* levantou a possibilidade de que um mecanismo de resistência a CQ semelhante existisse para *P. vivax* (FIDOCK et al., 2000) (DJIMDÉ et al., 2001). No entanto, dados disponíveis atualmente, *in vivo* e *ex vivo*, não suportam o uso de substituições de nucleotídeos e variação do número de cópias nos loci de *pvm-dr-1* e *pvcr-t-o* como marcadores robustos da resposta de *P. vivax* a CQ (FERREIRA et al., 2021).

Uma possível tolerância a PQ exigiria que os parasitos fossem capazes de sobreviver ao estresse oxidativo. Tal mecanismo de resistência poderia se assemelhar ao que é observado na resistência de *P. falciparum* à artemisinina, uma droga que também atua gerando ROS, causando danos irreversíveis às proteínas celulares (WANG et al., 2015; ISMAIL et al., 2016). Os mecanismos de resistência à artemisinina não são totalmente compreendidos e envolvem várias vias celulares e metabólicas, incluindo a implicação de respostas de dano a proteína (ROCAMORA et al., 2018 ; MOK et al., 2015) e a entrada em um estágio dormente até que a exposição ao medicamento tenha sido interrompida (Witkowski et al. 2010 , 2013 ; TEUSCHER et al., 2010). Nós não temos conhecimento se os hipnozoítos de *P. vivax* também podem desenvolver tais estratégias para se protegerem da ação dos antimaláricos. O surgimento de resistência a qualquer antimalárico parece ocorrer com menor frequência para *P. vivax* do que *P. falciparum*, possivelmente devido a um maior reservatório de indivíduos assintomáticos e à produção precoce de parasitos sexuais facilitando a transmissão na malária por *P. vivax* (MUELLER et al., 2009). Além disso, a biomassa de hipnozoítos expostos à droga é provavelmente muito menor em comparação com parasitos de estágio sanguíneo, diminuindo a probabilidade de seleção de resistência. No entanto, a pressão seletiva exercida pela PQ sobre os hipnozoítos deve ser muito elevada, pois não há possibilidade de escape para essas formas hepáticas, ou seja, ou elas morrem ou resistem ao tratamento com o fármaco.

Nesse estudo analisamos genes que já foram identificados em estudos anteriores como

genes que estão localizados em regiões de forte pressão seletiva, com o objetivo de caracterizar geneticamente os isolados de *P. vivax* caracterizados por apresentar múltiplas recorrências (WINTER et al., 2015; BRIGHT et al., 2016; PEARSON et al., 2016; BENAVENTE et al., 2017).

As MRPs estão envolvidas no efluxo de drogas terapêuticas em vários organismos, por exemplo, CQ e quinina em *P. falciparum* (RAJ et al., 2008). Polimorfismos (SNP) em MRP1 e a regulação positiva da expressão de MRP1 e MRP2 alteram os perfis de sensibilidade aos medicamentos, possivelmente pelo aumento da afinidade ao substrato e exportação dos antimaláricos. Além disso a MRP1 foi associado à sensibilidade de *P. falciparum* aos antimaláricos (DAHLSTROM et al., 2009). Um estudo com a cepa W2, resistente à CQ, observou um aumento na sensibilidade de mutantes deficientes em MRP1 à CQ, quinina, artemisinina, piperquina e PQ, resultando em uma redução do IC₅₀ (concentração de droga capaz de eliminar 50% dos parasitos) em comparação com os parasitos WT selvagens (RAJ et al., 2009). Em relação a funcionalidade dessas enzimas, o estudo de Rijpma e colaboradores (2005) mostrou que as proteínas MRP são dispensáveis para o crescimento dentro dos eritrócitos e para o desenvolvimento esporogônico de *P. falciparum* e *P. berghei* no mosquito. Em contraste, MRP2 possui uma função essencial para o desenvolvimento em hepatócitos.

No presente estudo foi mostrado *in silico* que polimorfismos em MRP1 e MRP2 podem levar à exportação facilitada de drogas, o que poderia levar a uma maior tolerabilidade dos parasitos aos antimaláricos. Contudo, nenhum dos SNPs analisados nesse estudo mostrou associação significativa com o perfil de episódios de recorrências. Em uma análise complementar, os haplótipos de *pvmrp1* foram correlacionados com o perfil de metabolização de CYP2D6. Embora os indivíduos com atividade reduzida de CYP2D6 que tiveram múltiplas recorrências apresentaram uma maior frequência dos haplótipos 1 (1 SNP), 2 (3 SNPs), 3 (2 SNPs) e 4 (2SNPs), essa associação não foi significativa. Em relação aos haplótipos de *pvmrp2*, foi observada uma maior frequência dos haplótipos 1 (3 SNPs) e 3 (2 SNPs) no grupo de indivíduos que tiveram múltiplas recorrências, porém essa associação também não foi significativa. É importante ressaltar que esse estudo apresenta limitações, que incluem a falta de um grupo de indivíduos que não apresentaram recorrência de malária e tamanho amostral reduzido. Esses fatores podem ter influenciado nos dados obtidos.

Se as diferenças na suscetibilidade à PQ descritas por estudos anteriores forem verdadeiras, é possível que existam polimorfismos genéticos relacionados à suscetibilidade às drogas na população de parasitos e que poderiam ser mais facilmente selecionados por

tratamento subótimo (seleção natural na variação genética permanente). Além disso, muitos parasitos são provavelmente expostos às doses subterapêuticas de PQ devido ao tratamento de cura radical incompleto associado à baixa adesão, ou ao regime padrão pouco adequado para o metabolismo disfuncional do hospedeiro, o que também poderia facilitar a seleção de alelos de resistência (POPOVICI et al., 2021)

As interações medicamentosas, seja com antimaláricos em estágio sanguíneo (como a lumefantrina) ou outro fármaco metabolizado pelas mesmas enzimas envolvidas no metabolismo da PQ, poderiam levar à exposição subterapêutica dos hipnozoítos. Não se sabe se esses fatores podem levar à resistência, mas dada a posição única da PQ em nosso portfólio de medicamentos antimaláricos e a importância fundamental da recaída na malária causada por *P. vivax*, faz-se necessário uma investigação acerca dessas interações (POPOVICI et al., 2021)

Algumas cepas de *P. vivax* parecem ser tolerantes ou parcialmente resistentes a PQ, já que recaídas foram repetidamente observadas em infecções naturais ou experimentais tratadas com regimes CQ-PQ padrão em ambientes livres de malária (FERNANDO et al., 2011 ; THOMAS et al., 2016). Dois exemplos são a cepa Brasil-1 (infecção original adquirida na Amazônia brasileira em 1994; NAYAR et al., 1997) e a cepa Chesson (infecção original adquirida em Papua Nova Guiné em 1944 (ALVING et al., 1960).

Regimes de alta dose de PQ são atualmente recomendados para a cura radical da malária vivax no sudeste da Ásia e Oceania (HILL et al., 2006 ; WHO, 2015 ; CHU e WHITE, 2016), mas a distribuição global da possível tolerância à PQ permanece desconhecida (GOLLER et al., 2007 ; THOMAS et al., 2016). Na verdade, a recomendação de alta dose da PQ parece ser apoiada por evidências clínicas surpreendentemente limitadas (JOHN et al., 2012 ; MILLIGAN et al., 2020). Os estudos clínicos de eficácia de PQ em regiões endêmicas de malária são frequentemente confundidos pela conformidade reduzida com regimes terapêuticos longos, metabolização reduzida de PQ e reinfecções frequentes de *P. vivax* (e às vezes recrudescências tardias) que não podem ser facilmente distinguidas das recaídas (FERNANDO et al., 2011).

Embora a dose de PQ para o bloqueio da transmissão seja muito baixa (1/14 a 1/28 das doses usadas para a cura radical) para eliminar até mesmo os hipnozoítos totalmente suscetíveis, ela poderia, em teoria, desencadear uma resposta dos hipnozoítos contra o estresse oxidativo e talvez predispor os parasitos a resistir a doses hipnozoitocidas de PQ (POPOVICI et al., 2021).

Diante do exposto, faz-se necessária uma abordagem com um maior número de indivíduos para a realização do mapeamento dessas mutações em grupos amostrais que incluam indivíduos sem recorrência por malária para avaliar se algum SNP nas MRPs está associado ao número de recorrências de malária por *P. vivax*. Dados gerados a partir de estudos genéticos

relacionados a uma menor sensibilidade do parasito a PQ irá nos auxiliar no manejo adequado, bem como ajuste do regime terapêutico afim de ajudar no controle e erradicação da malária.

7 CONCLUSÃO

Os principais achados deste estudo reforçam a hipótese de que a variabilidade genética, determinante de um metabolismo nulo/reduzido da PQ pela isoenzima CYP2D6, aumenta o risco de recorrência da infecção por *P. vivax*. Os dados achados em relação a influência da MAO-A no metabolismo de PQ em indivíduos infectados por *P. vivax* mostrou uma possível potencialização o efeito da CYP2D6 em indivíduos com ambas as enzimas mutadas.

Este estudo mostrou genes do *P. vivax* que estão sob forte pressão seletiva, como o *pvmrp1* e *pvmrp2*, podem levar a exportação de moléculas como fármacos antimaláricos para fora do vacúolo parasitóforo do parasito. Esse achado reforça a necessidade de estudos futuros acerca de SNPs localizados nesses genes.

Desta forma as principais contribuições desse estudo foram:

- Descrição de uma frequência significativa de fenótipos preditos nulo/reduzido ($AS \leq 1,0$) (34%);
- Maior risco de recorrências das infecções por *P. vivax* para indivíduos com função nula/reduzida de CYP2D6, sugestivo de falha terapêutica da PQ;
- A enzima MAO-A apresentou um efeito quando analisamos juntamente com a CYP2D6, a MAO-A parece ter um efeito aditivo a CYP2D6 em indivíduos que possuíam ambas as enzimas disfuncionais.
- Os SNPs identificados *in silico* podem estar relacionados a maior tolerância do *P. vivax* a PQ.
- Nenhum SNP do parasito analisado foi associado ao número de episódios de recorrências apresentada pelos indivíduos, no entanto é necessário um estudo com um n amostral maior para melhor avaliação dessa associação.

8 REFERÊNCIAS

ALECRIM, M.dG; ALECRIM, W; MACEDO, V. Plasmodium vivax resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n.1, p. 67-68, jan-fev, 1999.

ALVING, A.S.; JOHNSON, C.F.; TARLOV, A.R.; BREWER, G.J.; KELLERMEYER, R.W.; CARSON, P.E. Mitigation of the haemolytic effect of primaquine and enhancement of its action against exoerythrocytic forms of the Chesson strain of Plasmodium vivax by intermittent regimens of drug administration: a preliminary report. **Bull World Health Organ**, v.22, n.6, p.621-31, 1960. PMID: 13793053; PMCID: PMC2555355.

AÑEZ, A. et al. Resistance of infection by Plasmodium vivax to chloroquine in Bolivia. **Malaria jornal**, v.14, p.261, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0774-414:261>. 2015.

AUBURN, S.; BENAVENTE, E.D.; MIOTTO, O. *et al.* Genomic analysis of a pre-elimination Malaysian *Plasmodium vivax* population reveals selective pressures and changing transmission dynamics. **Nat Commun**, v.9, p.2585, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04965-4>

ARIFFIN, N.M.; ISLAHUDIN, F.; KUMOLOSASI, E.; MAK MOR-BAKRY, M. Effects of MAO-A and CYP450 on primaquine metabolism in healthy volunteers. **Parasitology research**, v. 118, n.10, p. 1011–1018, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06210-3>

AVULA, B.; KHAN, S.I.; TEKWANI, B.L.; NANAYAKKARA, N.P.; MCCHESENEY, J.D.; WALKER, L.A.; KHAN, I.A. Analysis of primaquine and its metabolite carboxyprimaquine in biological samples: enantiomeric separation, method validation and quantification. **Biomedical chromatography: BMC**, v.25, n.9, p.1010–1017, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/bmc.1557>

AVULA, B.; TEKWANI, B. L.; CHAURASIYA, N. D.; FASINU, P.; DHAMMIKA NANAYAKKARA, N. P.; BHANDARA HERATH, H.; WANG, Y. H.; BAE, J. Y.; KHAN, S. I.; ELSOHLY, M. A.; MCCHESENEY, J. D.; ZIMMERMAN, P. A.; KHAN, I. A.; WALKER, L.A. 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 jornal**, v.17, n.1, p. 294, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2433-z>

BAIRD, J.K. et al. Resistance to chloroquine by Plasmodium vivax in Irian Jaya, Indonesia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.44, n.5, p.547-52, 1991. DOI: 10.4269/ajtmh.1991.44.547. PMID: 1676566.

BAIRD, J.K. et al. Diagnosis of resistance to chloroquine by Plasmodium vivax: timing of recurrence and whole blood chloroquine levels. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.56, n.6, p.621-6, 1997.

BAIRD, J. K.; RIECKMANN, K. H. Can primaquine therapy for vivax malaria be improved? **Trends in parasitology**, v.19, n.3, p.115–120, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1016/s1471->

4922(03)00005-9

BAIRD, J.K. Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. **Clinical microbiology reviews**, v.22, n. 3, p. 508-34, 2009.

BENAVENTE, E.D.; GOMES, A.R.; DE SILVA, J.R.; GRIGG, M.; WALKER, H.; BARBER, B.E.; WILLIAM, T.; YEO, T.W. ; DE SESSIONS, P.F.; RAMAPRASAD, A.; IBRAHIM, A.; CHARLESTON, J.; HIBBERD, M.L.; PAIN, A.; MOON, R.W.; AUBURN, S.; LING, L.Y.; ANSTEY, N.M.; CLARK, T.G.; CAMPINO, S. Whole genome sequencing of amplified *Plasmodium knowlesi* DNA from unprocessed blood reveals genetic exchange events between Malaysian Peninsular and Borneo subpopulations. **Scientific reports**, v.9, n.1, p.9873, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46398-z>

BENNETT, J.W. Primaquine Failure and Cytochrome P-450 2D6 in *Plasmodium vivax* Malaria. **New England Journal of Medicine**, v.369, n.14, p.1381–1382, out. 2013.

BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, n.2, p.377–410, 2011.

BERECZKY, S.; DOLO, A.; MAIGA, B.; HAYANO, M.; GRANATH, F.; MONTGOMERY, S.M.; DAOU, M.; ARAMA, C.; TROYE-BLOMBERG, M.; DOUMBO, O. K.; FÄRNERT, A. Spleen enlargement and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* infection in two ethnic groups with different malaria susceptibility in Mali, West Africa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.100, n.3, p.248–257, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.03.011>

BERLIN, I.; ANTHENELLI, R.M. Monoamine oxidases and tobacco smoking. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 4, n. 1, p. 33–42, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1461145701002188>

BREGA, S.; MESLIN, B.; DE MONBRISON, F.; SEVERINI, C.; GRADONI, L.; UDOMSANGPETCH, R.; SUTANTO, I.; PEYRON, F.; PICOT, S. Identification of the *Plasmodium vivax* mdr-like gene (pvmdr1) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity. **The Journal of infectious diseases**, v.191, n.2, p.272–277, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1086/426830>

BRASIL, L.W.; SOARES-RODRIGUES, F.; SANTORO, A. B., et al. CYP2D6 activity and the risk of recurrence of *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: a prospective cohort study. **Malaria journal**, v.17, n.1, p.57, 2018.

BRIGHT, T. et al. Genetic analysis of primaquine tolerance in a patient with relapsing vivax malaria. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, n.5, p.802–805, 2013.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12a. ed. Porto Alegre: AMGH Editora LTDA, 2012.

BOUSEMA, T.; GRIFFIN, J.T.; SAUERWEIN, R.W.; SMITH, D.L.; CHURCHER, T.S.; TAKKEN, W.; GHANI, A.; DRAKELEY, C.; GOSLING, R. Hitting hotspots: spatial targeting

of malaria for control and elimination. **PLoS medicine**, v.9, n.1, p.e1001165, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001165>

BOZDECH, Z.; GINSBURG, H. Antioxidant defense in Plasmodium falciparum--data mining of the transcriptome. **Malaria journal**, v.3,p.23, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-3-23>

CAMARDA, G.; JIRAWATCHARADECH, P.; PRIESTLEY, R.S.; SAIF, A.; MARCH, S.; WONG, M.; LEUNG, S.; MILLER, A.B.; BAKER, D.A.; ALANO, P.; PAINE, M.; BHATIA, S.N.; O'NEILL, P.M.; WARD, S.A.; BIAGINI, G.A. Antimalarial activity of primaquine operates via a two-step biochemical relay. **Nature communications**, v.10, n.1, p.3226, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11239-0>

CERBINO, V.D.A.; ZUMPARO, J.F.; LEOPOLDO, F.L.; OLIVEIRA, V.M.R.; HENEIDE, R.A.D.; CHAVES, K.M.; ROCHA, M.O.C.; DAYRELL, M.; NOBI, R.C.A. Evolução e controle do surto de malária por P. vivax em Rio Manso, Minas Gerais - 2003. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v.37, p.269, 2004.

CHEHUAN, Y.F. et al. In vitro chloroquine resistance for Plasmodium vivax isolates from the Western Brazilian Amazon. **Malaria journal**, v.12, p.226, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-226>

CHU, C.S.; WHITE, N.J. Management of relapsing Plasmodium vivax malaria. **Expert review of anti-infective therapy**, v.14, n.10, p.885–900, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/14787210.2016.1220304>

CHU, C.S.; PHYO, A.P.; LWIN, K.M.; WIN, H.H.; SAN, T.; AUNG, A.A.; RAKSAPRAIDEE, R.; CARRARA, V.I.; BANCONE, G ; WATSON, J.; MOORE, K.A.; WILADPHAINGERN, J.; PROUX, S.; SRIPRAWAT, K.; WINTERBERG, M.; CHEAH, P. Y.; CHUE, A.L.; TARNING, J.; IMWONG, M.; NOSTEN, F.; WHITE, N. J. Comparison of the Cumulative Efficacy and Safety of Chloroquine, Artesunate, and Chloroquine-Primaquine in Plasmodium vivax Malaria. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v.67, n.10, p.1543–1549, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciy319>

COMMONS, R.J.; SIMPSON, J.A.; THRIEMER, K.; HOSSAIN, M. S.; DOUGLAS, N.M.; HUMPHREYS, G.S.; SIBLEY, C.H.; GUERIN, P.J.; PRICE, R.N. Risk of Plasmodium vivax parasitaemia after Plasmodium falciparum infection: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet. Infectious diseases**, v.19, n.1, p.91–101,2019. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30596-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30596-6)

CONSTANTINO, L.; PAIXÃO, P.; MOREIRA, R.; PORTELA, M.J.; DO ROSARIO, V.E.; ILEY, J. Metabolism of primaquine by liver homogenate fractions. Evidence for monoamine oxidase and cytochrome P450 involvement in the oxidative deamination of primaquine to carboxyprimaquine. **Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie**, v.51, n.4-5, p.299–303, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0940-2993\(99\)80010-4](https://doi.org/10.1016/S0940-2993(99)80010-4)

COX-SINGH, J.; DAVIS, T.M.; LEE, K.S.; SHAMSUL, S.S.; MATUSOP, A ; RATNAM, S.;

RAHMAN, H.A.; CONWAY, D. J.; SINGH, B. Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v.46, n.2, p.165–171, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1086/524888>

DAHER, A.; SILVA, J.; STEVENS, A.; MARCHESINI, P.; FONTES, C.J.; TER KUILE, F.O.; LALLOO, D.G. Evaluation of Plasmodium vivax malaria recurrence in Brazil. **Malaria journal**, v.18, n.1, p.18, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2644-y>

DAHLSTRÖM, S.; FERREIRA, P. E.; VEIGA, M. I.; SEDIGHI, N.; WIKLUND, L.; MÅRTENSSON, A.; FÄRNERT, A.; SISOWATH, C.; OSÓRIO, L.; DARBAN, H.; ANDERSSON, B.; KANEKO, A.; CONSEIL, G.; BJÖRKMAN, A.; GIL, J.P. Plasmodium falciparum multidrug resistance protein 1 and artemisinin-based combination therapy in Africa. **The Journal of infectious diseases**, v.200, n.9, p.1456–1464, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1086/606009>

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

DE SANTANA FILHO, F.S. et al. Chloroquine-resistant Plasmodium vivax, Brazilian Amazon. **Emerging infectious diseases**, v.13, n.7, p.1125-6, 2007.

DJIMDÉ, A.; DOUMBO, O.K.; CORTESE, J.F.; KAYENTAO, K.; DOUMBO, S.; DIOURTÉ, Y.; COULIBALY, D.; DICKO, A.; SU, X. Z.; NOMURA, T.; FIDOCK, D.A.; WELLEMS, T.E.; PLOWE, C.V. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. **The New England journal of medicine**, v.344,n.4,p.257–263,2001. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJM200101253440403>

DUNCAN, J.; JOHNSON, S.; OU, X.M. Monoamine oxidases in major depressive disorder and alcoholism. **Drug discoveries & therapeutics**, v.6, n.3, p.112–122, 2012.

EDWARDS, A.C.; DODGE, K.A.; LATENDRESSE, S.J.; LANSFORD, J.E.; BATES, J.E.; PETTIT, G.S.; BUDDE, J.P.; GOATE, A.M.; DICK, D.M. MAOA-uVNTR and early physical discipline interact to influence delinquent behavior. **Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines**, v.51,n.6,p.679–687,2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2009.02196.x>

ELEWA, H.; WILBY, K. J. A Review of Pharmacogenetics of Antimalarials and Associated Clinical Implications. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v.42, n.5, p.745–756, 2017.

FERNANDO, D.; RODRIGO, C.; RAJAPAKSE, S. Primaquine in vivax malaria: an update and review on management issues. **Malaria journal**, v.10,p.351,2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-351>

FERREIRA, M.U.; CASTRO, M.C. Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malaria journal**, v.15, n.1, p.284, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1335-1>

FERREIRA, M.U.; CASTRO, M.C. Malaria Situation in Latin America and the Caribbean:

Residual and Resurgent Transmission and Challenges for Control and Elimination. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), p.57–70, 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9550-9_4

FIDOCK, D.A.; NOMURA, T.; TALLEY, A.K.; COOPER, R.A.; DZEKUNOV, S.M.; FERDIG, M.T.; URSOS, L.M.; SIDHU, A.B.; NAUDÉ, B.; DEITSCH, K.W.; SU, X.Z.; WOOTTON, J.C.; ROEPE, P.D.; WELLEMS, T.E. 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, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(05\)00077-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(05)00077-8)

FRIEDRICH, D.C.; GENRO, J.P.; SORTICA, V.A., et al. Distribution of CYP2D6 alleles and phenotypes in the Brazilian population. **PLoS One**, v.9, n.10, p. e110691, 2014.

GAMA, B.E. et al. Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites in Brazil: consequences on disease morbidity and control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, Suppl 1, p.159-66. 2011.

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

GAEDIGK, A.; SANGKUHL, K.; WHIRL-CARRILLO, M.; KLEIN, T.; STEVEN LEEDER, J. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. **Genetics in Medicine**, v.19, n.1, p.69–76, 2017.

GAEDIGK, A.; DINH, J.C.; JEONG, H.; PRASAD, B.; LEEDER, J.S. Ten years' experience with the CYP2D6 activity score: A perspective on future investigations to improve clinical predictions for precision therapeutics. **Journal of Personalized Medicine**, v.8, n.2, p. 1–15, 2018. a.

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

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

HAIMEUR, A.; CONSEIL, G.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P. Mutations of charged amino acids in or near the transmembrane helices of the second membrane spanning domain differentially affect the substrate specificity and transport activity of the multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1). **Molecular pharmacology**, v.65, n.6, p.1375–1385, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1124/mol.65.6.1375>

HASTINGS I.M. The origins of antimalarial drug resistance. **Trends in parasitology**, v.20, n.11, p. 512–518, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.006>

HILL A.V. Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. **Nature reviews. Immunology**, v.6 n.1, p.21–32, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri1746>

IMWONG, M.; PUKRITTAKAYAMEE, S.; LOOAREESUWAN, S.; PASVOL, G.; POIRREIZ, J.; WHITE, N. J.; SNOUNOU, G. Association of genetic mutations in *Plasmodium vivax* dhfr with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine: geographical and clinical correlates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.45, n.11, p.3122–3127, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.45.11.3122-3127.2001>

JOAN INGRAM, R. H.; CRENNAN-DARUSALLAM, C.; SOEBIANTO, S.; NOVIYANTI, R.; KEVIN BAIRD, J. The clinical and public health problem of relapse despite primaquine therapy: Case review of repeated relapses of *Plasmodium vivax* acquired in Papua New Guinea. **Malaria Journal**, v.13, n.1, p. 1–7, 2014.

JOHN, G. K.; DOUGLAS, N. M.; VON SEIDLEIN, L.; NOSTEN, F.; BAIRD, J. K.; WHITE, N. J.; PRICE, R. N. Primaquine radical cure of *Plasmodium vivax*: a critical review of the literature. **Malaria journal**, v.11, p.280, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-280>

KARIUKI, S.N.; MARIN-MENENDEZ, A.; INTROINI, V.; RAVENHILL, B. J.; LIN, Y.C.; MACHARIA, A.; MAKALE, J.; TENDWA, M.; NYAMU, W.; KOTAR, J.; CARRASQUILLA, M.; ROWE, J.A.; ROCKETT, K.; KWIATKOWSKI, D.; WEEKES, M. P.; CICUTA, P.; WILLIAMS, T.N.; RAYNER, J.C. Red blood cell tension protects against severe malaria in the Dantu blood group. **Nature**, v.585, n.7826, p.579–583, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2726-6>

KAVISHE, R.A. ; VAN DEN HEUVEL, J.M. ; VAN DE VEGTE-BOLMER, M.; LUTY, A. J.; RUSSEL, F. G.; KOENDERINK, J.B. Localization of the ATP-binding cassette (ABC) transport proteins PfMRP1, PfMRP2, and PfMDR5 at the *Plasmodium falciparum* plasma membrane. **Malaria journal**, v.8,p.205, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-205>

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

KIM K. Malaria var gene expression: keeping up with the neighbors. **Cell host & microbe**, v.11, n.1, p.1–2, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.01.002>

KLAASSEN, C.D.; ALEKSUNES, L.M. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. **Pharmacological reviews**, v.62, n.1, p.1–96, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1124/pr.109.002014>

KLOKOUZAS, A.; TIFFERT, T.; VAN SCHALKWYK, D.; WU, C. P.; VAN VEEN, H.W.; BARRAND, M. A.; HLADKY, S. B. *Plasmodium falciparum* expresses a multidrug resistance-associated protein. **Biochemical and biophysical research communications**, v.321,n.1,p.197–201,2004.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.135>

KROTOSKI W.A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.79, n.1, p.1–11, 1985.

LADEIA-ANDRADE, S.; MENEZES, M. J.; SOUSA, T.N.; SILVINO, A.C.R.; JUNIOR,J.F.

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

LEIER, I.; JEDLITSCHKY, G.; BUCHHOLZ, U.; CENTER, M.; COLE, S. P.; DEELEY, R. G.; KEPLER, D. ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. **The Biochemical journal**, v.314 (Pt 2)(Pt 2), p. 433–437, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj3140433>

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

LUZZATTO L. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: from genotype to phenotype. **Haematologica**, v.91, n.10, p.1303–1306, 2006.

MARCSISIN, S.R.; REICHARD, G.; PYBUS, B.S. Primaquine pharmacology in the context of *CYP 2D6* pharmacogenomics: Current state of the art. **Pharmacology & therapeutics**, v.161, p.1–10, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.011>

MARQUES, M.M. et al. *Plasmodium vivax* chloroquine resistance and anemia in the western Brazilian Amazon. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.58, n.1, p.342-7, 2014.

MATSUSUE, A.; KUBO, S. I.; IKEDA, T.; TANI, N.; MAEDA, T.; KASHIWAGI, M.; HARA, K.; WATERS, B.; TAKAYAMA, M.; IKEMATSU, N.; ISHIKAWA, T. VNTR polymorphism in the monoamine oxidase A promoter region and cerebrospinal fluid catecholamine concentrations in forensic autopsy cases. **Neuroscience letters**, v.701, p.71–76, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.02.029>

MILLIGAN, R.; DAHER, A.; VILLANUEVA, G.; BERGMAN, H.; GRAVES, P.M. Primaquine alternative dosing schedules for preventing malaria relapse in people with *Plasmodium vivax*. **The Cochrane database of systematic reviews**, v.8, 2020. CD012656. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012656.pub3>

MIHALY, G.W.; WARD, S.A.; EDWARDS, G.; NICHOLL, D.D.; ORME, M.L.; BRECKENRIDGE, A.M. Pharmacokinetics of primaquine in man. I. Studies of the absolute bioavailability and effects of dose size. **British journal of clinical pharmacology**, v.19, n.6, p.745–750, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1985.tb02709.x>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica (SIVEP-MALÁRIA)**. Secretaria de vigilância em saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico**. Secretaria de vigilância em saúde. – Brasília: Ministério da Saúde. Número Especial | Nov. 2020 ISSN 9352-7864

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

MOK, S.; ASHLEY, E.A.; FERREIRA, P.E.; ZHU, L.; LIN, Z.; YEO, T.; CHOTIVANICH, K.; IMWONG, M.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; DHORDA, M.; NGUON, C.; LIM, P.; AMARATUNGA, C.; SUON, S.; HIEN, T. T.; HTUT, Y.; FAIZ, M.A.; ONYAMBOKO, M. A.; MAYXAY, M.; NEWTON, P. N.; BOZDECH, Z. Drug resistance. Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance. **Science (New York, N.Y.)**, v.347, n.6220, p.431–435, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1260403>

MUELLER, I.; GALINSKI, M.R.; BAIRD, J.K.; CARLTON, J.M.; KOCHAR, D.K.; ALONSO, P.L.; DEL PORTILLO, H.A. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **The Lancet. Infectious diseases**, v.9, n.9, p.555–566, 2009. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X)

MYAT PHONE, K et al. Emergence of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in Myanmar (Burma). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.87, n.6, p.687, 1993.

NARANJO, M.-E. G.; RODRIGUES-SOARES, F.; PEÑAS-LLEDÓ, E.M.; TARAZONA-SANTOS, E.; FARIÑAS, H.; RODEIRO, I.; TERÁN, E.; GRAZINA, M.; MOYA, G.E.; LÓPEZ-LÓPEZ, M.; SARMIENTO, A.P.; CALZADILLA, L.R.; RAMÍREZ-ROA, R.; NAYAR, J.K., BAKER, R.H., KNIGHT, J.W., SULLIVAN, J.S., MORRIS, C.L., RICHARDSON, B.B., GALLAND, G.G.; COLLINS, W.E. Studies on a primaquine-tolerant strain of *Plasmodium vivax* from Brazil in *Aotus* and *Saimiri* monkeys. **The Journal of parasitology**, v.83, n.4, p.739–745, 1997.

PAN, X.; NING, M.; JEONG, H. Transcriptional regulation of CYP2D6 expression. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 45, n.1, p. 42–48, 2016.

PAGE, K.R.; DOOCY, S.; REYNA GANTEAUME, F.; CASTRO, J.S.; SPIEGEL, P.; BEYRER, C. Venezuela's public health crisis: a regional emergency. **Lancet (London, England)**, v.393, n.10177, p.1254–1260, 2019. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30344-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30344-7)

PHAN G.T., et al. Artemisinin or chloroquine for blood stage *Plasmodium vivax* malaria in Vietnam. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, v.7, n.10, p.858-64. 2002.

PHILLIPS, E.J; KEYSTONE, J.S; KAIN, K.C. Failure of combined chloroquine and high-dose primaquine therapy for *Plasmodium vivax* malaria acquired in Guyana, South America. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v.23, n.5, p.1171-3, 1996.

POPOVICI, J.; TEBBEN, K.; WITKOWSKI, B.; SERRE, D. Primaquine for *Plasmodium vivax* radical cure: What we do not know and why it matters. **International journal for parasitology. Drugs and drug resistance**, v.15, p.36–42, abr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.12.004>

PRICE, R.N. et al. Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious diseases**, v.14, n.10, p.982-91, 2014.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; VANIJANONTA, S.; CHANTRA, A.; CLEMENS, R.; WHITE, N.J. Blood stage antimalarial efficacy of primaquine in *Plasmodium vivax* malaria. **The Journal of infectious diseases**, v.169,n.4,p.932–935,1994. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/169.4.932>

PYBUS, B.S.; SOUSA, J.C.; JIN, X.; FERGUSON, J.A.; CHRISTIAN, R.E.; BARNHART, R.; VUONG, C.; SCIOTTI, R.J.; REICHARD, G.A.; KOZAR, M.P.; WALKER, L.A.; OHRT, C.; MELENDEZ, V. CYP450 phenotyping and accurate mass identification of metabolites of the 8-aminoquinoline, anti-malarial drug primaquine. **Malaria journal**, v.11, p.259, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-259>

PYBUS, B.S.; MARCSISIN, S.R., JIN; XIANNU, et al. The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP 2D6. **Malaria journal**, v.12, n.1, p.212, 2013.

RAJ, D. K.; MU, J.; JIANG, H.; KABAT, J.; SINGH, S.; SULLIVAN, M.; FAY, M.P.; MCCUTCHAN, T.F.; SU, X.Z. Disruption of a *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-associated protein (PfMRP) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione. **The Journal of biological chemistry**, v.284, n.12, p.7687–7696, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M806944200>

RAMAMOORTHY, A.; SKAAR, T.C. Gene copy number variations: It is important to determine which allele is affected. **Pharmacogenomics**, v.12, n.3, p.299–301, 2011.

RECHT, J.; SIQUEIRA, A.M.; MONTEIRO, W.M.; HERRERA, S.M.; HERRERA, S.; LACERDA, M. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. **Malaria journal**, v. 16, n. 1, p. 273,2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1925-6>

RIECKMANN, K.H; DAVIS, D.R; HUTTON, D.C. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? **Lancet (London, England)**, v. 2, n.8 673, p.1183-4,1989.

ROCAMORA, F.; ZHU, L.; LIONG, K.Y.; DONDORP, A.; MIOTTO, O.; MOK, S.; BOZDECH, Z. Oxidative stress and protein damage responses mediate artemisinin resistance in malaria parasites. **PLoS pathogens**, v.14, n.3, p.e1006930,2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006930>

SABOL, S.Z.; HU, S.; HAMER, D. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. **Human genetics**, v. 103, n. 3, p. 273–279,1998. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004390050816>

SHIH,J.C.; THOMPSON,R.F. Monoamine oxidase in neuropsychiatry and behavior. **American journal of human genetics**, v.65, n.3, p.593–598,1999. DOI: <https://doi.org/10.1086/302562>

SILVINO, A.C.R; COSTA, G.L.; ARAÚJO, F.C., 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. e0160172, 2016.

SILVINO, A.C.R. et al. Novel insights into *Plasmodium vivax* therapeutic failure: CYP2D6

activity and time of exposure to malaria modulate the risk of recurrence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.64, n.5, p.1–14, 2020.

SIMÕES, L.R et al. Fatores associados às recidivas de malária causada por *Plasmodium vivax* no Município de Porto Velho, Rondônia, Brasil, 2009. **Cadernos de Saúde Pública**, v.30, n.7, p.1-15,2014.

SINGH, B.; KIM SUNG, L.; MATUSOP, A.; RADHAKRISHNAN, A.; SHAMSUL, S.S.; COX-SINGH, J.; THOMAS, A.; CONWAY, D.J. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **Lancet (London, England)**, v.363, n.9414, p.1017–1024, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15836-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15836-4)

SISOWATH, C.; FERREIRA, P.E.; BUSTAMANTE, L.Y.; DAHLSTRÖM, S.; MÅRTENSSON, A.; BJÖRKMAN, A.; KRISHNA, S.; GIL, J.P. The role of *pfm-dr1* in *Plasmodium falciparum* tolerance to artemether-lumefantrine in Africa. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, v.12, n.6, p.736–742, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01843.x>

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

SUWANARUSK, R.; RUSSELL, B.; CHAVCHICH, M.; CHALFEIN, F.; KENANGALEM, E.; KOSAISAVEE, V.; PRASETYORINI, B.; PIERA, K.A.; BARENDIS, M.; BROCKMAN, A.; LEK-UTHAI, U.; ANSTEY, N.M.; TJITRA, E.; NOSTEN, F.; CHENG, Q.; PRICE, R. N. Chloroquine resistant *Plasmodium vivax*: in vitro characterisation and association with molecular polymorphisms. **PloS one**, v. 2, n.10, p.e1089,2007. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001089>

TEKWANI, B.L.; AVULA, B.; SAHU, R.; CHAURASIYA, N.D.; KHAN, S.I.; JAIN, S.; FASINU, P.S.; HERATH, H.M.; STANFORD, D.; NANAYAKKARA, N.P.; MCCHESENEY, J.D.; YATES, T.W.; ELSOHLY, M.A.; KHAN, I.A.; WALKER, L.A. Enantioselective pharmacokinetics of primaquine in healthy human volunteers. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v.43, n.4, p.571–577, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.114.061127>

TEH, L.K.; BERTILSSON, L. Pharmacogenomics of CYP2D6: Molecular genetics, interethnic differences and clinical importance. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v.27, n.1, p.55–67, 2012.

TEUSCHER, F.; GATTON, M.L.; CHEN, N.; PETERS, J.; KYLE, D.E.; CHENG, Q. Artemisinin-induced dormancy in *plasmodium falciparum*: duration, recovery rates, and implications in treatment failure. **The Journal of infectious diseases**, v. 202, n. 9, p.1362–1368, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1086/656476>

THOMAS, T.; DE, T.D.; SHARMA, P.; LATA, S.; SARASWAT, P.; PANDEY, K.C.; DIXIT, R. Hemocytome: deep sequencing analysis of mosquito blood cells in Indian malarial vector *Anopheles stephensi*. **Gene**, v. 585, n. 2, p. 177–190, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.02.031>

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Quimioterapia da malária um século no desenvolvimento de antimaláricos. **QUÍMICA**, sII, n.99, p.57– 69, 2005.

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

VEZMAR, M.; GEORGES, E. Direct binding of chloroquine to the multidrug resistance protein (MRP): possible role for MRP in chloroquine drug transport and resistance in tumor cells. **Biochemical pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 733–742, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00217-2](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00217-2)

WHITE N.J. Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria. **Malaria journal**, v.10, p.297, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-297>

WU, J. B.; SHIH, J. C. Valproic acid induces monoamine oxidase A via Akt/forkhead box O1 activation. **Molecular pharmacology**, v. 80, n. 4, p.714–723, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1124/mol.111.072744>

WHO. **World Malaria Report**. Geneva, Swiss, 2011.

WHO. **World malaria report**. World Health Organization, 2018.

WHO. **World malaria report**. World Health Organization, 2020.

WITKOWSKI, B.; LELIÈVRE, J.; BARRAGÁN, M.J.; LAURENT, V.; SU, X.Z.; BERRY, A.; BENOIT-VICAL, F. Increased tolerance to artemisinin in Plasmodium falciparum is mediated by a quiescence mechanism. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.54, n.5, p.1872–1877, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01636-09>

ZUMPANO, J.F.; ROCHA, M.O.C.; CHAVES, K.M.; SILVA, R.B.; FREITAS, R.C.; BETTI, M.H.; HENEINE, R.A.D.; CERBINO, V.D.A. Estudo das recaídas no surto de malária por Plasmodium vivax no distrito de Sousa, município de Rio Manso, Minas Gerais, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.37, suppl. I, p.267, 2004.