



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
E BIOLOGIA MOLECULAR

HAIALA SOTER SILVA DE OLIVEIRA

ASPECTOS MOLECULARES DO HOSPEDEIRO HUMANO ASSOCIADOS
À INFECÇÃO E TERAPÊUTICA DA MALÁRIA

Belém, PA

Dezembro/2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará

Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48 Oliveira, Haiala Soter Silva de.

Aspectos moleculares do hospedeiro humano associados à infecção e terapêutica da malária. / Haiala Soter Silva de Oliveira. —2022.

58 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. João Farias Guerreiro

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Belém, 2022.

1. Malária. 2. Amazônia. 3. CYP2D6. 4. G6PD. 5. Duffy.

I. Título.

CDD 576.5809811

HAIALA SOTER SILVA DE OLIVEIRA

ASPECTOS MOLECULARES DO HOSPEDEIRO HUMANO ASSOCIADOS
À INFECÇÃO E TERAPÊUTICA DA MALÁRIA

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular da
Universidade Federal do Pará como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor em
Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. João Farias Guerreiro.

Belém, PA

Dezembro/2022

HAIALA SOTER SILVA DE OLIVEIRA

ASPECTOS MOLECULARES DO HOSPEDEIRO HUMANO ASSOCIADOS
À INFECÇÃO E TERAPÊUTICA DA MALÁRIA

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular da Universidade
Federal do Pará como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Genética e
Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. João Farias Guerreiro.

Belém (PA), 19 de Dezembro de 2022.

Banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. João Farias Guerreiro. ICB-UFPA

Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro dos Santos. NPO-UFPA

Prof^a. Dr^a. Giselle Rachid Viana. IEC

Prof^a. Dr^a. Greice Cardoso de Lemos Costa. ICB-UFPA

Prof^a. Dr^a. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos (suplente). ICB-UFPA

Belém, PA

Dezembro/2022

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Universidade Federal do Pará (UFPA)

Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO

1.1. MALÁRIA.....	1
1.2. FATORES GENÉTICOS RELACIONADOS A RESISTÊNCIA À MALÁRIA.....	3
1.2.1. Sistema sanguíneo Duffy.....	3
1.3. FATORES GENÉTICOS RELACIONADOS AO TRATAMENTO DA MALÁRIA.....	6
1.3.1. Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD).....	6
1.3.2. Citocromo P450 (CYP2D6).....	11
1.4. REMANESCENTES QUILOMBOLAS.....	14

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16

3. METODOLOGIA

3.1. ÁREA DE ESTUDO.....	17
3.1.1. Oriximiná.....	17
3.2. AMOSTRA POPULACIONAL.....	18
3.2.1. Obtenção das amostras.....	18
3.2.2. Extração de DNA.....	18
3.3. GENOTIPAGEM.....	18
3.3.1. Genotipagem do sistema sanguíneo Duffy.....	18
3.3.2. Investigação das variantes G6PDA- e G6PD MED.....	22
3.3.3. Investigação das variantes de CYP2D6.....	23
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23

4. RESULTADOS

4.1. GENÓTIPOS DE DUFFY.....	24
4.2. VARIANTES DE G6PD.....	24

4.3. VARIANTES DE CYP2D6.....	24
4.4. DUFFY x G6PD x CYP2D6.....	26
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÕES	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
8. REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS.....	46
ANEXO TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Índice Parasitário Anual (IPA) de malária no Brasil, 2021.....	2
Figura 2 - Representação do gene FY.....	4
Figura 3 - Estrutura modelo da proteína DARC.....	4
Figura 4 - Frequência global dos alelos Duffy.....	6
Figura 5 - Localização do gene da G6PD.....	7
Figura 6 - Distribuição global de G6PDd.....	11
Figura 7 - Localização e estrutura do gene CYP2D6.....	13
Figura 8 - Terras Quilombolas e Unidades de Conservação em Oriximiná	17
Figura 9 - Esquema do locus gênico FY.....	20
Figura 10 - Representação esquemática da eletroforese.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores e sondas para genotipagem do sistema sanguíneo Duffy.....	19
Tabela 2 - Oligonucleotídeos que serão usados como <i>primers</i> na <i>PCR</i> convencional.....	20
Tabela 3 - Combinações de iniciadores nas <i>PCR</i> de Duffy.....	21
Tabela 4 - Condições da <i>PCR</i> convencional.....	21
Tabela 5 - Polimorfismos presentes nas variantes Africana e Mediterrânea do gene G6PD...22	
Tabela 6 - Genótipos variantes do gene CYP2D6, alelos polimórficos e nível de atividade enzimática	23
Tabela 7 - Frequências dos alelos e genótipos Duffy.....	25
Tabela 8 - Frequências dos alelos de G6PD.....	25
Tabela 9 - Genótipos de G6PD e do sistema sanguíneo Duffy.....	26
Tabela 10 - Alelos, genótipos e atividade enzimática de CYP2D6.....	27
Tabela 11 - Genótipos de G6PD e Duffy classificados por atividade enzimática de CYP2D6.....	28
Tabela 12 - Genótipos de G6PD e atividade enzimática de CYP2D6.....	29
Tabela 13 - Genótipos de Duffy e atividade enzimática de CYP2D6.....	29

RESUMO

A malária é um problema de saúde mundial, que apesar de todo esforço científico e tecnológico para sua erradicação, continua com altos índices de mortalidade e morbidade em áreas endêmicas. A Organização Mundial de Saúde reportou 241.000.000 casos e aproximadamente 627.000 mortes por malária a nível mundial, no ano de 2020. Na Amazônia, em particular, a malária constitui um importante problema de saúde ocasionando perdas econômicas e contribuindo para a precária condição de saúde das populações expostas. A existência de fatores genéticos do hospedeiro humano que conferem resistência para a malária tem sido bastante estudada. Atualmente sabe-se que este mecanismo é evidente em diferentes níveis de análise epidemiológica e muitos determinantes genéticos têm sido identificados. Dentre eles, podem ser destacados: hemoglobina S, talassemia alfa, deficiências da enzima G6PD, sistema sanguíneo Duffy, etc. Diante desse cenário, estamos propondo a investigação em quilombolas de Oriximiná, município paraense que constitui área de risco para malária, fatores genéticos do hospedeiro humano associados a mecanismos de proteção inata e específica na malária, que poderão ajudar a esclarecer aspectos da epidemiologia da transmissão dessa patologia. Além de reforçar a necessidade de monitoramento do tratamento para evitar complicações causadas pelo uso da primaquina nos pacientes portadores de deficiência de G6PD e haplótipos CYP2D6 de atividade reduzida ou nula, que terão impacto importante no controle da malária.

PALAVRAS-CHAVES: malária, Amazônia, CYP2D6, G6PD, Duffy.

ABSTRACT

Malaria is a global health problem, which despite all scientific and technological efforts to eradicate it, continues to have high rates of mortality and morbidity in endemic areas. In 2021, The World Health Organization reported 241,000,000 cases and approximately 627,000 deaths from malaria worldwide. In the Amazon, in particular, malaria constitutes an important health problem causing economic losses and contributing to the precarious health condition exposed populations. The existence of human host genetic factors that offer resistance to malaria has been extensively studied. Currently, it is known that resistance to malaria is evident at different levels of epidemiological analysis and many genetic determinants have been identified. Among them, the following can be highlighted: hemoglobin S, thalassemia alfa, G6PD enzyme related deficiencies, Duffy blood system, etc. All things considered, we are proposing a research to be carry out in quilombolas living in Oriximiná, municipality in Pará that constitutes an area with risk for malaria, genetic factors of the human host that are associate with mechanisms of innate and specific protection in malaria, which may help to clarify aspects of the disease transmission epidemiology. In addition to reforce the need for treatment monitoring to avoid complications caused by the use of primaquine in patients with G6PD deficiency and CYP2D6 haplotypes of reduced or null activity, which will have an important impact on malaria control

KEYWORDS: malaria, Amazon, CYP2D6, G6PD, Duffy.

1. INTRODUÇÃO

1.1. MALÁRIA

A malária é um problema de saúde mundial, que apesar de todo esforço científico e tecnológico para sua erradicação, continua com altos índices de mortalidade e morbidade em áreas endêmicas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) reportou 241.000.000 casos e aproximadamente 627.000 mortes por malária a nível mundial, sendo 77% (482.790) das mortes entre crianças com menos de 5 anos, no ano de 2020. No continente americano foram registrados 602.476 casos, com apenas três países, entre eles o Brasil, sendo responsáveis por 77% deste total. Uma novidade importante é que em 2021, após anos de estudo, a OMS começou a recomendar o uso de uma vacina espécie-específica em regiões onde a taxa de transmissão de malária são altas (WHO, 2021).

Quatro espécies, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*, são reconhecidos como os principais parasitas naturais da malária em humanos (Scopel *et al.*, 2004). Em virtude da sua biologia, *Plasmodium vivax* é mais amplamente transmitido, ocorrendo em latitudes temperadas, regiões áridas, altitudes elevadas e em outros ambientes que são inóspitos para *Plasmodium falciparum*. Na região das Américas o mais prevalente desses parasitas é *P. vivax*, responsável por 68% dos casos (WHO, 2021). Entretanto, na África subsaariana, onde a transmissão da malária é mais intensa do que em qualquer outro lugar no mundo, os casos de *P. vivax* são superados em muito por aqueles devido ao *P. falciparum*, tornando o *P. vivax* quase indetectável em humanos nas populações locais.

No Brasil apesar da queda no número aproximado de casos de 178.652 em 2019 para 167.097 em 2020, houve um aumento de 16,7% nas mortes e aproximadamente 40 milhões de pessoas vivem sob risco de malária (WHO, 2021) (Figura 1). A maior parte das infecções ocorre na região da Bacia Amazônica, mais de 99% dos casos, onde o mosquito *Anopheles darlingi* é o principal vetor da doença (Zimmerman, 1992; Martins-Campos *et al.*, 2012). No país a malária é causada por três espécies de *Plasmodium*: *P. vivax*, que responde por 88,0% dos casos registrados; seguido por *P. falciparum* e *P. malariae* (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010; Siqueira *et al.*, 2016). Deste modo, na Amazônia a malária constitui um importante problema de saúde ocasionando perdas econômicas e contribuindo para a precária condição de saúde das populações expostas (Pereira da Silva e Oliveira, 2002). Nesse cenário, a Amazônia Legal constitui a região onde tradicionalmente se observa o nível de malária bem mais elevado do que no restante do país, atingindo coeficientes 10 vezes mais altos que a média nacional, o que caracteriza a região como área de risco (BRASIL, 2019). No Estado do Pará segundo a

Secretaria de Saúde do Estado em 2021 foram registrados mais de 20 mil casos de malária e o estado ocupa o terceiro lugar com 14,5% dos casos dentro da Amazônia Legal.

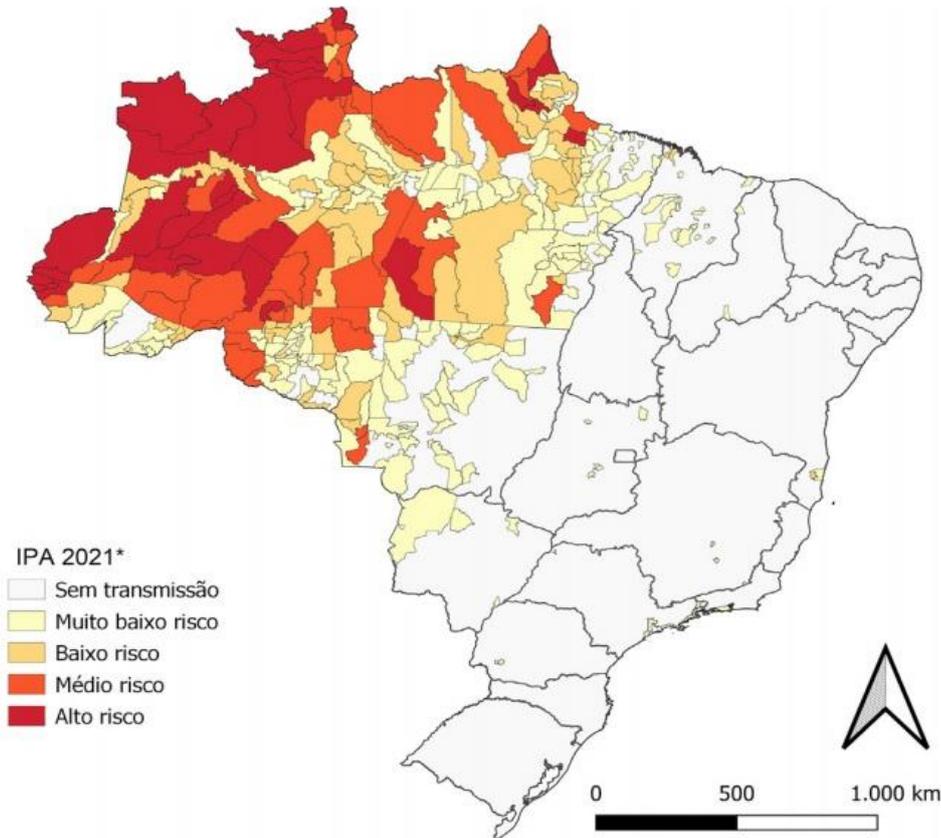


Figura 1- Índice Parasitário Anual (IPA) de malária no Brasil, 2021. Classificação da IPA: Sem transmissão – 0 casos autóctones; Muito baixo risco – IPA <1 caso/1.000 hab.; Baixo risco – IPA <10 casos/1.000 hab.; Médio risco – IPA <50 casos/1.000 hab.; Alto risco – IPA \geq 50 casos/1.000 hab.

Fonte: SISMAL, Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS.

A existência de fatores genéticos do hospedeiro humano que conferem resistência para a malária foi inicialmente sugerida em meados do século passado, com a observação de Haldane (1949), de que a distribuição geográfica de hemoglobinopatias estava relacionada a um processo seletivo em relação à malária severa. Atualmente sabe-se que a resistência à malária é evidente em diferentes níveis de análise epidemiológica e muitos determinantes genéticos têm sido identificados. Dentre eles, podem ser destacados: hemoglobina S, talassemia alfa, alguns haplótipos do sistema de antígenos leucocitários HLA, TNF- α , interferons, interleucinas como a IL10 e IL4, deficiências da enzima G6PD, sistema sanguíneo Duffy, óxido nítrico sintetase (NOS2-G954C), entre outros. As mutações eritrocitárias principais que conferem proteção contra a malária caracterizam-se por aumento

de radicais livres de oxigênio (como nas anemias falciformes, causada pelo alelo HbS em homozigose) ou pelo decréscimo na habilidade em lidar com danos oxidantes, como nas deficiências da enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD) (Nagel, 1990).

1.2. FATORES GENÉTICOS RELACIONADOS A RESISTÊNCIA À MALÁRIA

1.2.1. Sistema sanguíneo Duffy

Há aproximadamente 70 anos atrás o sistema sanguíneo Duffy foi descrito pela primeira vez em um paciente hemofílico politransfundido, ainda que não identificado como um antígeno de grupo sanguíneo. Cutbush *et al.* (1950) observaram a presença de uma aglutinina no soro sanguíneo do paciente hemofílico que deu nome ao grupo, Sr. Duffy. O anticorpo identificado foi denominado anti-Fy(a). Um ano depois o anticorpo anti-Fy(b) que reconhece o antígeno oposto a Fy(a), Fy(b) foi descrito por Ikin *et al.* (1951). A partir de então vários estudos envolvendo aspectos genéticos, antropológicos e relacionados à malária têm sido realizados com esse sistema (Howes *et al.*, 2011).

O gene que codifica o grupo sanguíneo Duffy, atualmente conhecido por *ACKR1* (Atypical chemokine receptor 1), foi inicialmente denominado *FY* e está localizado no cromossomo 1, próximo a região centromérica, na região 1q22-q23, mais especificamente na posição 1q23.2. (Donahue *et al.*, 1968; Chaudhuri *et al.*, 1993; Mathew *et al.*, 1994). Em 1995, foi descrito por Iwamoto *et al.* que esse gene é composto por 2 éxons e 1 intron e não por apenas 1 éxon como se acreditava inicialmente, sendo o segundo éxon, diferente do primeiro, por apresentar sequências codificadoras não traduzidas. Porém, eles podem se unir após *splicing* originando um transcrito denominado maior, de 336 aminoácidos, com expressão predominante frente ao transcrito menor, codificado somente pelo primeiro éxon, nas células eritróides e dos outros órgãos estudados. Entretanto, as duas formas do transcrito de RNAm codificam proteínas que funcionam de forma idêntica (Yazdanbakhsh *et al.*, 2000).

O grupo sanguíneo Duffy é caracterizado por três alelos principais: *FY*A*, *FY*B* e *FY*B^{ES}*. O alelos *FY*A* e *FY*B* se distinguem por uma mutação *missense*, que resulta na diferença de um único aminoácido (G125A>Gly42Asp) (Chaudhuri *et al.*, 1995; Iwamoto *et al.*, 1995; Mallinson *et al.*, 1995; Tournamille *et al.*, 1995a) e origina os fenótipos comuns Fy(a+b-), Fy(a-b+) e Fy(a+b+). O alelo *FY*B^{ES}* que corresponde ao fenótipo sorológico Fy(a-b-), ou seja, a ausência do antígeno Fy, é devido a uma mutação de ponto T-33C (Pogo e Chaudhuri, 2000) na região promotora do gene *FY* que abole a expressão do gene por perturbar um sítio de ligação para o fator de transcrição eritróide GATA-1 e resulta na

eliminação da transcrição de mRNA FY em hemácias, mas não em outros tipos de células (Figura 2) (Tournamille *et al.*, 1995b). A mesma mutação associada ao alelo *FY*A* foi detectada em indivíduos que vivem em uma região onde *P. vivax* é endêmico, Papua-Nova Guiné (*FY*A^{ES}*) com frequência alélica de 0,022 (Zimmerman *et al.*, 1999) e 0,012 (Kasehagen *et al.*, 2007). Atualmente, existem outras variantes descritas que codificam alelos geralmente fracos ou nulos, que podem ser consultados em uma revisão realizada por Höher *et al.*, (2018).

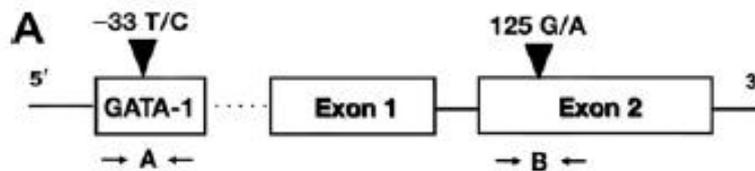


Figura 2- Representação do gene FY.
Fonte: Tanaka *et al.*, 2011.

Os antígenos do sistema sanguíneo Duffy são glicoproteínas transmembrana constituídas por sete hélices hidrofóbicas com dois domínios (Figura 3) (Neote *et al.*, 1994), sendo uma das extremidades extracelular amino-terminal composta por aproximadamente 62 resíduos de aminoácidos e onde se localiza a região polimórfica que define o alelo *FY*A* ou *FY*B*. Ela é essencial, pois é onde ocorre a ligação com as quimiocinas de classe C-C e C-X-C e *Plasmodium vivax*, função que define essas glicoproteínas como DARC (Duffy Antigen/ Receptor for Chemokine) (Hadley & Peiper, 1997).

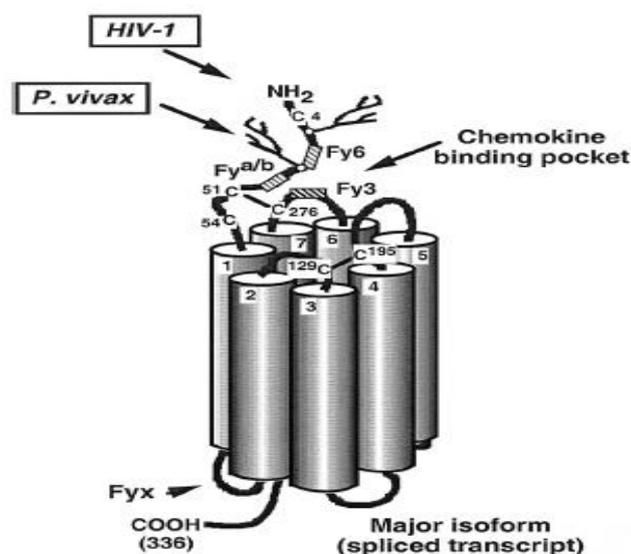


Figura 3- Estrutura modelo da proteína DARC.
Fonte: Cartron e Colin, 2001.

A expressão desta glicoproteína não se restringe a tecidos eritróides, também ocorrendo no rim, coração e outros órgãos (Hadley & Peiper, 1997; Hesselgesser & Houruk, 1999). Nos eritrócitos ela é mais expressa em reticulócitos do que em células maduras, porém a ausência dessa proteína em indivíduos Duffy negativos não resulta em alterações, pois as hemácias se mantêm normais estrutural e funcionalmente (Chaudhuri *et al.*, 1995). A grande importância clínica deste receptor advém não somente de ação em reações inflamatórias, mas também devido a anticorpos do grupo sanguíneo Duffy atuarem em casos de incompatibilidade transfusional e doença hemolítica do recém-nascido (DHRN), como descrito primeiramente por Cook *et al.* (1989). Estudos também já associaram o receptor DARC com a angiogênese do câncer e a infecção pelo vírus HIV (Lachgar *et al.*, 1998).

Além de todas essas funcionalidades clínicas relatadas, a função de receptor de merozoítas de espécies causadoras de malária, *Plasmodium vivax* e *P. knowlesi*, tem um importante destaque entre os estudos, que foi inicialmente evidenciado por Miller *et al.* (1975), onde observaram que eritrócitos Duffy negativos [Fy (a-b-)] apresentavam resistência à invasão de merozoítas de *P. knowlesi* cultiváveis *in vitro*. O mesmo resultado foi obtido em investigação com *P. vivax* por Barnwell *et al.* (1989). Todavia, Miller *et al.* já haviam descrito em 1976 que indivíduos afro-americanos com mesmo fenótipo, eram resistentes a malária vivax.

A diferença na distribuição de *P. vivax* na África em comparação com o resto do mundo é vista como uma consequência da falta de expressão do antígeno Duffy nas células vermelhas (fenótipo Duffy-negativa), que medeia a invasão de reticulócitos por *P. vivax*, e é altamente predominante nas populações africanas. Este cenário, é contrário ao observado em populações europeias, asiáticas e americanas nas quais o fenótipo Duffy positivo é mais comum. O padrão de distribuição do grupo Duffy é atribuído a uma seleção natural positiva, no qual o coeficiente de seleção elevado, o coloca entre os mais fortes existentes no genoma humano (Figura 4) (McManus *et al.*, 2017). Isso porque o *P. vivax* requer a presença de receptor antigênico Duffy para quimiocinas na superfície das hemácias para ser capaz de invadir células e causar doença (revisão em Mercereau-Puijalon e Ménard, 2010; Carter, 2003, Rosenberg, de 2007; Howes *et al.*, 2011).

Recentemente o alelo *FY*B^{ES}* foi associado a baixa densidade parasitária e baixa sintomatologia em pacientes infectados por malária vivax em Manaus no estado do Amazonas (Abou-Ali *et al.*, 2019). Além disso, todos os participantes que possuíam mutações em Duffy, também apresentaram baixa densidade parasitária, o que reforça a possível existência de uma grande quantidade de habitantes servindo de reservatório humano para malária na Amazônia

brasileira, já citada em outros estudos (Albuquerque *et al.*, 2010). A relação de proteção observada em Duffy negativos contra malária também tem sido estudada como um ponto importante para o desenvolvimento de uma vacina contra malária vivax (Sousa *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016).

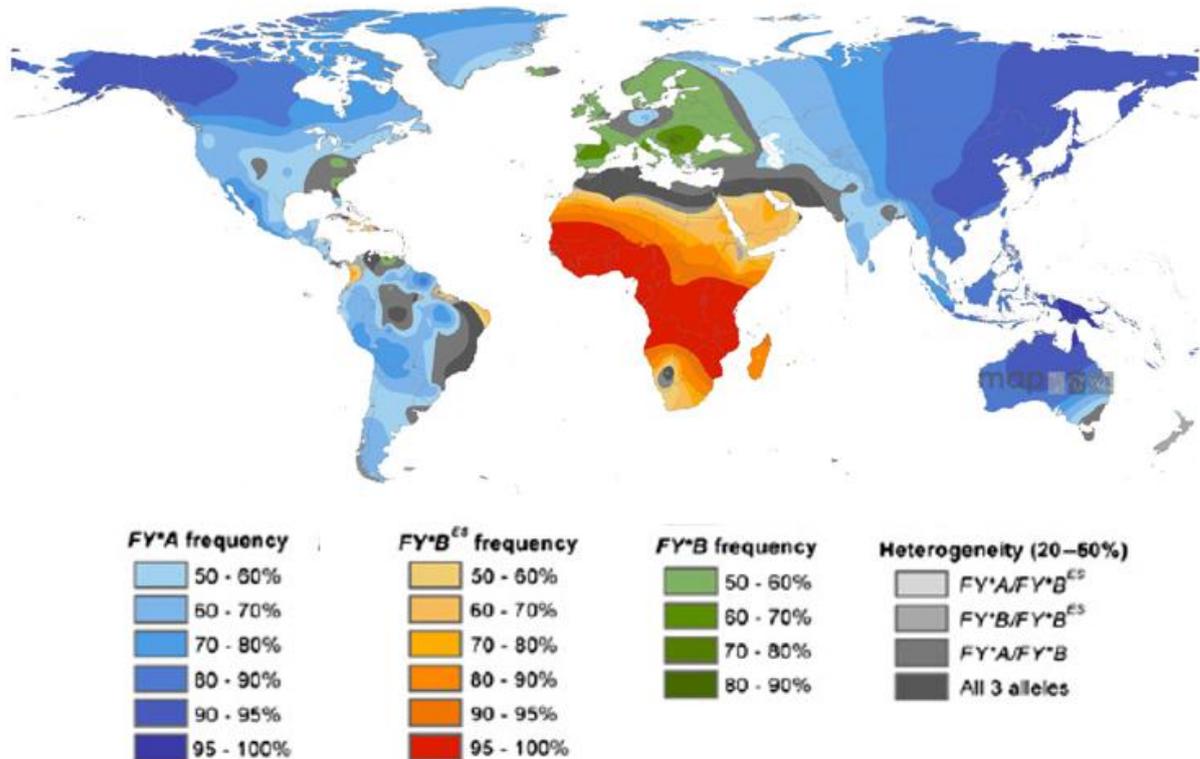


Figura 4 – Frequência global dos alelos Duffy.
Fonte: Zimmerman *et al.*, 2013.

1.3. FATORES GENÉTICOS RELACIONADOS AO TRATAMENTO DA MALÁRIA

1.3.1. Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD)

A manifestação clínica da doença conhecida como favismo foi descrita por vários médicos do Sul da Itália e Sardenha, no início do século XX (Fermi & Martinetti, 1905), relacionada à ingestão de alguns alimentos. Teorias populares que relacionavam a patogenicidade do favismo a efeitos tóxicos ou adversos foram inicialmente relatados em resposta à ingestão do feijão fava (*Phaseolus lunatus L.*) (Luisada, 1941; Sansone *et al.*, 1958). Posteriormente, o mecanismo que originava o favismo foi associado a deficiência da enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD). Paralelamente, Crosby (1956) relatou que a anemia hemolítica grave decorrente do consumo de favas, assemelhava-se a anemia hemolítica induzida pela droga antimalárica primaquina. A possível relação entre os dois casos clínicos também foi observada por Carson *et al.* (1956), quando identificaram indivíduos com a

mesma atividade enzimática de G6PD, em níveis muito baixos nas células sanguíneas, desenvolvendo anemia hemolítica pela utilização da mesma droga.

A G6PD é uma enzima que participa da via das pentoses-fosfato, catalisando a primeira fase das reações. Essa fase resulta na formação de três compostos, um dos quais a NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida), um importante redutor utilizado por todas as células (Luzzatto *et al.*, 1995; 2001; Voet & Voet, 2006). Nos eritrócitos maduros, a presença deste cofator é essencial, pois estas células não possuem núcleo, mitocôndrias e ribossomos, que são fontes de fator redutor nas outras células. Logo, estes eritrócitos não têm capacidade de solucionar problemas de estresse oxidativo, decorrentes da diminuição da atividade da G6PD (Tishkoff *et al.*, 2001). A via das pentoses-fosfato é o único processo de fornecimento deste cofator que além de ser requerido em várias reações enzimática essenciais de biossíntese, atua como agente de defesa contra esses danos oxidativos (Tsai *et al.*, 1998).

A enzima G6PD possui peso molecular de 59 KDa e 515 aminoácidos. O gene da G6PD está localizado no braço longo do cromossomo X (Xq28), na região telomérica, possui 12 introns e 13 éxons com aproximadamente 2Kb e 18Kb, respectivamente. O éxon 1 e parte do 2 formam a região não traduzida do mRNA, logo a síntese da enzima é consequência da tradução de 12 éxons (Figura 5) (Martini *et al.*, 1986). Apresenta herança ligada ao cromossomo X e consequentemente maior incidência no gênero masculino (Cappellini & Fiorelli, 2008).

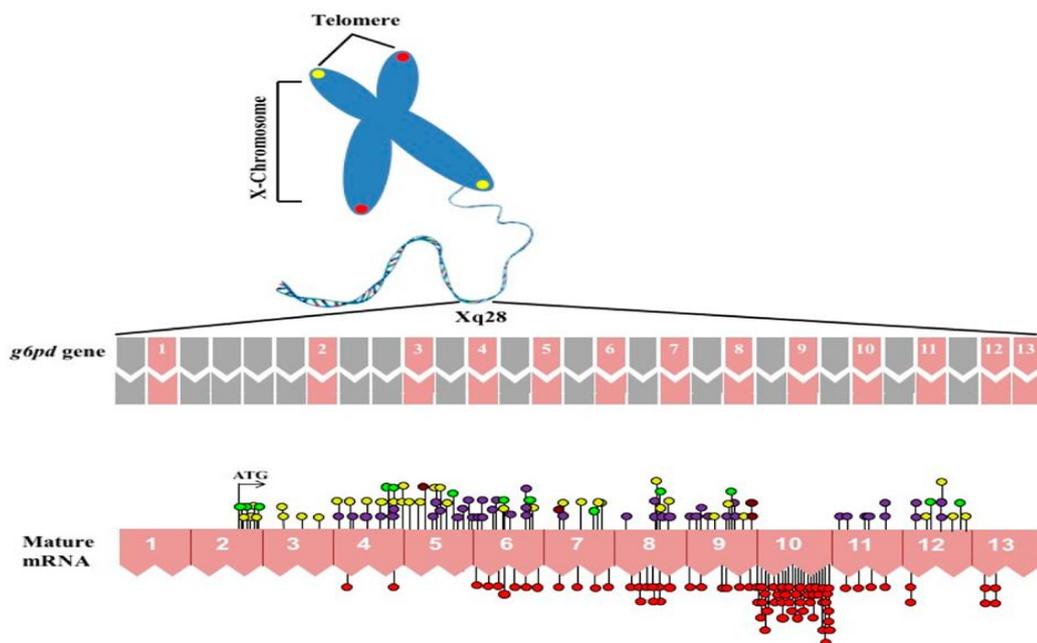


Figura 5- Localização do gene da G6PD demonstrando os éxons e os introns. No mRNA observam-se as substituições de nucleotídeo único (variantes missense) que são representadas por círculos indicando associações diferenciadas: anemia hemolítica não-esferocítica crônica (vermelho). Mutações da classe II, III e IV (roxos, amarelos e marrons respectivamente). Mutações não classificadas estão representadas em verde. Fonte: Gómez-Manzo *et al.*, 2016.

Mais de 400 variantes bioquímicas de G6PD já foram relatadas e estão distribuídas por todo o gene (Beutler & Vulliamy, 2002). Estas resultam de aproximadamente 140 mutações já identificadas, sendo a maioria mutações pontuais (substituições de base única), que não alteram a matriz de leitura. Este gene é altamente polimórfico. Em função das baixas frequências observadas de grandes deleções e mutações como as *nonsense*, admite-se que a ausência desta enzima seja incompatível com a vida (Miwa & Fujii, 1996). A ampla variação citada também está presente nas manifestações clínicas, dependendo do grau de deficiência enzimática, por isso em 1967 a Organização Mundial de Saúde (OMS) fez as primeiras recomendações para caracterização da deficiência em classes. Classes I e II são consideradas graves (variante Mediterrânea). Classe III é moderada e está representada principalmente pela variante Africana G6PD*A-. A classe IV apresenta pequena diminuição funcional onde se encontra a variante Africana G6PD*A, enquanto a classe V inclui apenas duas variantes com atividade enzimática aumentada (>150%). A deficiência de G6PD (G6PDd) tem ampla distribuição pelo mundo e a maioria dos portadores são assintomáticos (Howes *et al.*, 2012).

As frequências das variantes são bastante heterogêneas, sendo as variantes Africanas e a Mediterrânea as mais comuns, depois do alelo selvagem (G6PD*B), juntamente com a Seattle, comum na Sardenha, Grécia e sul da Itália, e a Union encontrada também no sul da Itália e em chineses. A variante G6PD*A- é a mais comumente encontrada na África e, conseqüentemente, em populações afrodescendentes, assim como é observada na Espanha e Portugal, entre outros (Beutler, 1991). Inicialmente, a variante G6PD*A- era considerada homogênea quando estudada bioquimicamente, mas com o advento dos métodos de biologia molecular; a investigação em nível de DNA mostrou que essa variante era heterogênea. Todos os tipos de G6PD*A- têm em comum a transição A>G no nt 376, a mutação que caracteriza a variante G6PD*A ou A+, além de uma segunda mutação, mais comum, a transição G>A no nucleotídeo 202; ou alternativamente a transição 680 G>T ; ou a transição 968 T>C. A variante Africana designada G6PD*A ou A+ é devido uma transição A>G no nt 376 que substitui o ácido aspártico carregado negativamente com asparagina, o que resulta numa mobilidade eletroforética semelhante à da variante G6PD*A-, mas com atividade enzimática normal. Esta variante ocorre em 20-30% dos africanos (Beutler, 1996; Luzzatto *et al.*, 1989).

A segunda variante encontrada com maior frequência é a Mediterrânea, comum em italianos, gregos, árabes, judeus orientais, persas e em todos os países em torno do mar Mediterrâneo (Ruwende & Hill, 1998). A mutação responsável por essa variante ocorre no éxon 6, posição 563 substituindo citosina por timina (563 C>T), o que desencadeia a mudança do aminoácido serina para fenilalanina (188 Ser>Phe). Esta mudança reduz a eficiência

catalítica e a estabilidade da enzima. Este alelo representa um dos tipos mais graves da deficiência de G6PD (Kurdi-Haidar *et al.*, 1990).

Mais de 400 milhões de pessoas no mundo são afetadas pela deficiência de G6PD, o que a torna a enzimopatia mais comum nos eritrócitos, causada pela redução da atividade ou da estabilidade enzimática (Luzzatto & Mehta, 1995). Sua distribuição abrange principalmente a África, o sul da Europa, o Oriente Médio, sudeste da Ásia e as ilhas centrais e do sul do Pacífico. Após o advento das grandes migrações humanas, as variantes são encontradas amplamente distribuídas pelas Américas do Norte e do Sul, além de partes da Europa (Frank, 2005). No Brasil, vários estudos realizados concordam que a variante africana G6PD*A- é a mais prevalente no país. Na região Norte, Hamel *et al.* (2002) analisaram 196 indivíduos assintomáticos em Belém e observaram 82,1% portadores de G6PD*A-. No Sul do Brasil, Weimer *et al.* (1993) encontraram aproximadamente 95% de deficientes com essa mesma variante. Revisão realizada por Weimer *et al.*, (1998) sobre a deficiência de G6PD (G6PDd) na América do Sul, incluindo mais de 17.000 indivíduos investigados (descendentes de europeus, miscigenados negro/indíio/branco ou negro/branco e ameríndios), revelou que a variante G6PD*Mediterrânea ou G6PD*B- foi encontrada em apenas 0,1% da amostra estudada, distribuída apenas na região sul do Brasil (20 casos). Porém, essa variante foi encontrada na região sudeste, no estado de São Paulo (Saad *et al.*, 1997). Vários estudos com G6PD têm demonstrado a importância de conhecer o perfil da deficiência em populações da região Amazônica, inclusive a relação da deficiência com outras doenças (Schneider *et al.*, 1987; Miranda-de-Carvalho, 2001; Pereira da Rocha, 2005). A variante Mediterrânea foi encontrada pela primeira vez em Manaus na região Norte por Santana *et al.* (2013), no estado do Amazonas, provavelmente resultante da imigração de árabes e judeus provenientes essencialmente do Marrocos e Oriente Médio, segundo esses autores.

Desde a descoberta da manifestação clínica relacionada a G6PDd, discutiu-se o impacto do emprego de princípios ativos (drogas) para tratamento de diferentes doenças, como a malária, em indivíduos que apresentam variantes neste gene (Beutler, 2007). Um dos exemplos bem caracterizado na literatura é a utilização da droga primaquina no tratamento da malária, em regiões como a Amazônia brasileira, endêmica para malária, principalmente em face da possibilidade da observação de efeitos adversos em pacientes infectados e deficientes para G6PD (Ramos-Junior *et al.*, 2010). Em revisão realizada na América Latina observou-se que o Brasil apresenta 48,9% dos casos de anemia hemolítica aguda induzida por primaquina (Monteiro *et al.*, 2014). Esses resultados entre outros que envolvem a presença de infecções, vem sendo alvo de diversos estudos que mostram a necessidade de uma triagem quanto a

deficiência de G6PD antes do tratamento antimaláricos nessas regiões, de modo a evitar as complicações clínicas e com melhor custo-benefício para saúde pública (Santana *et al.*, 2014; Peixoto *et al.*, 2016).

A introdução do teste de G6PD na triagem neonatal, ao menos em populações com frequências elevadas da deficiência ou sob algum fator de risco, já vem sendo discutida há anos (Kaplan & Hammerman, 2011; Keihanian *et al.*, 2017). Esse procedimento ajudaria principalmente na prevenção do desenvolvimento de hiperbilirrubinemia e icterícia, condições que recém nascidos deficientes de G6PD são mais propensos (Stadem *et al.*, 2017). Apesar da frequência da G6PDd encontrada em recém nascidos no Brasil permanecer em volta de 3%, durante os anos, a incorporação na triagem em neonatos no Programa Nacional de Triagem Neonatal foi rejeita pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS em 2018 (Ministério da Saúde, 2018). Atualmente o teste de triagem neonatal ampliado, com capacidade para detectar mais de 50 doenças, inclui a pesquisa da G6PDd, porém só é ofertado de forma gratuita pelo sistema de saúde pública no Distrito Federal.

Todavia, a relação entre a malária e a deficiência de G6PD não se limita a complicações induzidas pelo uso desta droga. Também tem sido sugerido uma relação de proteção contra a infecção causada pelo *Plasmodium falciparum*. O que justificaria a hipótese de que a distribuição geográfica dessa enzimopatia, apresenta elevadas frequências em áreas onde a malária é endêmica (Figura 6) (Howes *et al.*, 2012). Sugere-se que a variante Africana G6PD*A- confere elevada proteção contra malária falciparum grave (Ruwende *et al.*, 1995), e que a rápida fagocitose de eritrócitos com a deficiência, parasitados por *P. falciparum*, quando comparada as células normais, pode representar uma proteção extra contra malária (Cappadoro *et al.*, 1998). Esta relação de proteção da enzimopatia contra malária causada pelo *Plasmodium vivax* também já foi observada (Louicharoen *et al.*, 2009; Santana *et al.*, 2013).

Do ponto de vista clínico, embora os indivíduos G6PDd sejam geralmente assintomáticos durante toda a sua vida, o ônus clínico desta condição genética inclui uma série de condições hematológicas, incluindo anemia hemolítica aguda (AHA), icterícia neonatal (NNJ) e anemia não esferocítica crônica (CNSA). Na América Latina (LA), a enorme lacuna de conhecimento a respeito da G6PDd está relacionada com a compreensão escassa do ônus da manifestação clínica subjacente aos portadores de G6PDd. Em recente revisão da literatura, Monteiro *et al.* (2014) identificaram que a hemólise em pacientes utilizando primaquina parece ser a principal manifestação clínica da G6PDd na América Latina e contribui para a morbidade dos pacientes com infecção do *P. vivax* neste continente,

embora os baixos números de casos notificados possam estar ligados à subnotificação de complicações. Harcke *et al.* (2019), em recente revisão, reforçam a necessidade de identificação dessa deficiência para evitar gatilhos que levem ao estresse oxidativo, reduzindo assim o risco de manifestações clínicas melhorando a qualidade de vida dos paciente. Estes resultados suportam a necessidade de melhores estratégias para diagnosticar e controlar a G6PDd em nível populacional.

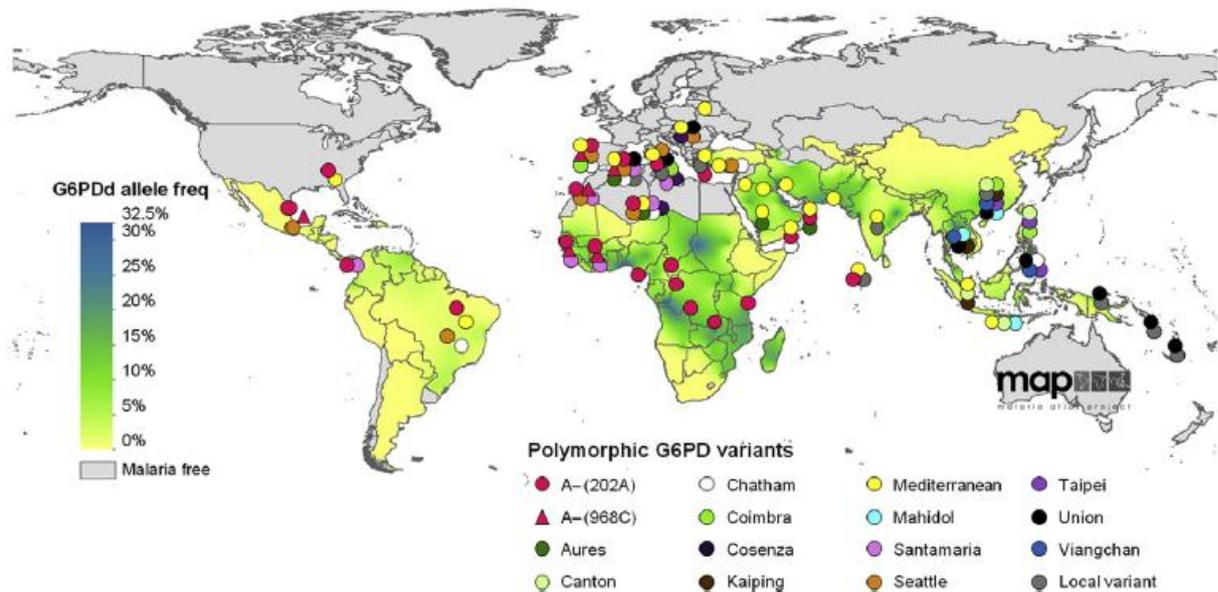


Figura 6- Distribuição global de G6PDd. Mapa elaborado com base na edição e combinação de trabalhos anteriores (WHO, 1989; Luzzatto & Notaro 2001; Howes *et al.*, 2012). A frequência alélica da deficiência é representada pelo gradiente de cores demonstrado em áreas onde a malária é endêmica ou está em fase de eliminação. As variantes observadas em mais de uma população são indicadas por círculos coloridos e variantes locais por círculos cinza.

Fonte: Luzzatto *et al.*, 2016.

1.3.2. Citocromo P450 (CYP2D6)

Em 1884, o médico irlandês Charles Alexander MacMunn descreveu pela primeira vez o pigmento respiratório do sangue, atualmente denominado de citocromo 1. Esses pigmentos são proteínas presentes no sangue, geralmente ligadas a membranas dos eritrócitos, com capacidade para transportar elétrons, que exercem papel fundamental nos processos de oxidação e redução intracelular. A superfamília CYP ou citocromo P450, é composta por proteínas responsáveis pelo metabolismo de vários substratos endógenos e xenobióticos diferentes, como a maioria dos medicamentos, logo apresentam alta expressão no fígado (Nebert e Russel, 2002)

CYPs são as enzimas metabolizadoras dos fármacos de Fase 1 mais importantes. Entre elas, a enzima CYP família 2 subfamília D membro 6 (CYP2D6) é essencial nesta família, pois vários medicamentos de grande importância clínica como antidepressivos (paroxetina), antipsicóticos (risperidona, clozapina, olanzapina, aripiprazol), antiarrítmicos (propafenona), antihipertensivos (debrisoquina), antineoplásicos (tamoxifeno) e β -bloqueadores (carvedilol, metoprolol, timolol) são metabolizados por ela (Zhou, 2009). Portanto, polimorfismos no gene CYP2D6 podem alterar a nível quantitativo e qualitativo a atividade enzimática, resultando em respostas alteradas dos indivíduos ao tratamentos farmacológicos (Bezerra, *et al.*, 2018).

O gene *CYP2D6* está localizado no braço longo do cromossomo 22 (22q13.1), com aproximadamente 4.4 Kb. Altamente polimórfico, com mais de 100 alelos descritos (46 principais), resultado de diferentes tipos de mutações, principalmente polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Os alelos são denominados de alelos estrela e apresentam um asterisco antes do número, por exemplo, alelo *1 (estrela 1). Porém, rearranjos, inserções/deleções (indel), deleção ou duplicações de todo o gene já foram descritas. As isoformas resultantes variam entre a disfunção enzimática completa ao metabolismo ultrarrápido (Gaedigk *et al.*, 2017). Devido essa diferença funcional na proteína codificada, os alelos *CYP2D6* são classificados em três grupos: alelos de atividade nula (*3, *4, *5, *6); alelos de atividade reduzida (*17, *10, *41) e alelos de atividade normal ou aumentada (*1, *2, *35) (Brauch *et al.*, 2009). Os fenótipos decorrentes das combinações genotípicas dos alelos também são classificados de acordo com metabolização farmacológica em: metabolizadores fracos (PM; dois alelos inativos); metabolizadores intermediários (IM; um alelo de atividade reduzida e um inativo ou dois alelos de atividade reduzida); metabolizadores extensos (EM; pelo menos um alelo funcional), e metabolizadores ultrarrápidos (UM; três ou mais cópias funcionais) (Figura 7) (Teh *et al.*, 2012; Gaedigk *et al.*, 2013).

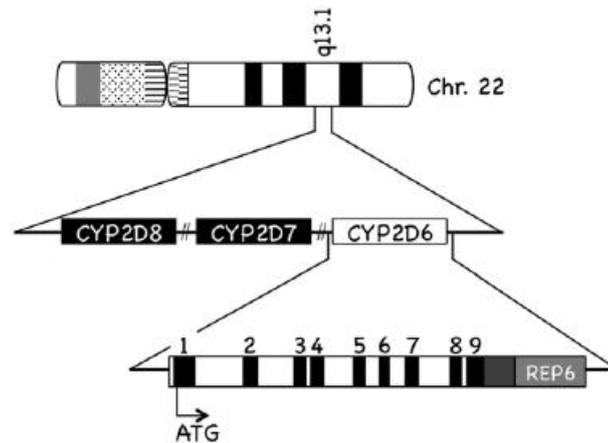


Figura 7- Localização e estrutura do gene CYP2D6.
 Fonte: Scantamburlo *et al.*, 2017.

Devido ao seu papel no metabolismo de diversas drogas, a farmacogenética da enzima CYP2D6 tem sido bastante estudada e acredita-se que ela atua no metabolismo de aproximadamente 20% dos medicamentos prescritos (Sistonen *et al.*, 2009). Entre eles, a primaquina, única droga licenciada capaz de eliminar hipnozoítos de *P. vivax* e *P. ovale*, possui metabolismo complexo envolvendo a atividade de CYP2D2, que mesmo em concentrações relativamente baixas, comparada com outros CYP relevantes no tecido de hepatócitos, possui grande importância para geração de metabólitos altamente reativos (redox) (Marcsisin *et al.*, 2016).

Esta função chave exercida pela enzima CYP2D6 para eficácia no tratamento com primaquina, primordialmente contra recaída de *P. vivax*, foi descrita apenas em 2013 por Bennett e colaboradores, onde um ensaio clínico realizado com 33 pessoas saudáveis que foram expostas a esporozoítos de *P. vivax*, através da picada de mosquitos infectados, apresentaram falhas na terapia com primaquina imputáveis aos fenótipos intermediários e nulos resultantes de polimorfismos no gene 2D6. Posteriormente, resultados semelhantes foram obtidos em estudo com camundongos infectados por *Plasmodium berghei* com *knockout* para CYP 2D (Pybus *et al.*, 2013). Após esta descoberta, muitos questionamentos ao uso da primaquina foram levantados, principalmente relacionados a existência de grandes populações polimórficas com fenótipos intermediários ou nulos, vivendo em áreas endêmicas para malária (Kitada, 2003; Bains, 2013; Baird *et al.*, 2018).

As frequências dos alelos e dos fenótipos de CYP2D6 foram investigados nas principais populações étnicas em sua distribuição geográfica global e apresentaram diferenças dentro das populações e entre elas. As variantes de atividade alterada ocorrem globalmente

em todas as regiões geográficas (Sistonen *et al.*, 2007; Teh *et al.*, 2012). No Brasil, 18 alelos e duplicações foram encontradas, dentre eles 11 alelos (*1, *2, *4, *5, *10, *17, *29, *35, *41, *162, *262) estavam presentes em todas as regiões brasileiras. Enquanto outros foram encontrados exclusivamente em uma região, como o *CYP2D6*34* na região Nordeste (Friedrich *et al.*, 2014).

Na região Norte, recente estudo realizado em Manaus demonstrou maior incidência de recaída de *P. vivax* em indivíduos com fenótipos CYP2D6 de atividade reduzida (Brasil *et al.*, 2018). No Pará, investigações de polimorfismos do citocromo P450 em indivíduos com malária vivax, tratados com primaquina, demonstraram a influência de variantes genéticas dos genes *CYP2C8*, *CYP2C9* e *CYP3A4* na depuração da gametocitemia (Sortica *et al.*, 2016).

1.4. REMANESCENTES QUILOMBOLAS

A população negra brasileira apresenta uma especificidade genética que a distingue da "de qualquer outra parte do mundo". Isto se deve à miscigenação, no país, de negros procedentes de diferentes regiões da África, em distintas épocas, com características culturais e genéticas próprias. Os Bantos correspondem a cerca de 50% a 60% e são originários de regiões situadas ao sul do continente. Os procedentes da baía de Benin representam aproximadamente 40%. Percentagem pouco expressiva corresponde aos que são oriundos da região da Senegâmbia. Esta mistura genética e cultural resultou em uma população diferente da população negra de outros países da América e, inclusive, da própria África. Se não bastassem essas considerações sobre a miscigenação dos negros de diferentes grupos étnicos africanos, houve ainda, no Brasil, uma intensa miscigenação com a população branca, de origem portuguesa, e, em menor escala, com a população indígena nativa. A frequência, distribuição e causalidade das doenças mais incidentes na população brasileira afro descendente são influenciadas por estas características de ordem genética e ainda fortemente por fatores socioeconômicos que incluem o regime de escravidão vivido até o final do século XIX e a posterior situação de exclusão social, presente até nossos dias, de grande parcela dessa população (Ministério da Saúde, 2001).

A migração forçada de cerca de quatro milhões de africanos ocorrida no período de 1530 a 1850, complementada com a transferência de tecnologia, cultura, micro-organismos, plantas, animais e estrutura social, tornou o Brasil o mais africanizado dos países americanos, exceto o Haiti. Dados reunidos por Vergolino-Henry & Figueiredo (1990) indicam que de 1775 a 1815 o tráfico de escravos trouxe para a região norte do Brasil cerca de 53.000 escravos importados diretamente da África pela Companhia Geral do Comércio do Grão-Pará

e Maranhão, bem como por particulares, e indiretamente através do tráfico interno a partir de outras regiões brasileiras tais como Maranhão, Bahia, Pernambuco e Rio de Janeiro. Esses dados também sugerem que a maioria dos escravos trazidos para o norte do Brasil foi procedente de Angola, Moçambique, Congo e Tanzânia (povos Banto), enquanto que um menor número deles foi trazido da Guiné-Bissau e Cabo Verde. Além disso, esses autores encontraram evidências de que um pequeno número de escravos procedentes da Guiana Francesa e Suriname foi introduzido na região (Amapá e Arquipélago do Marajó), alguns deles pelo tráfico ilegal e outros como fugitivos.

Seguindo o exemplo de outras regiões brasileiras e países sul-americanos, diversas comunidades chamadas mocambos ou quilombos foram fundados na região Amazônica por escravos fugitivos, particularmente no estado do Pará, ponto de entrada de escravos africanos na região. Muitas dessas comunidades ainda permanecem relativamente isoladas, e muito de sua identidade está preservada. O termo quilombo, que significa “aldeia” tem origem africana na língua Bantu (Munanga *et al.*, 1996).

No Estado do Pará são reconhecidas 240 comunidades quilombolas. As comunidades quilombolas estão distribuídas pelas mais diversas regiões do Pará e em pelo menos 40 dos 143 municípios paraenses existem comunidades remanescentes de quilombos, com distribuição predominante nas mesorregiões do Baixo Amazonas, Marajó, Nordeste e Metropolitana de Belém (CPISP, 2010).

Na região do Pará conhecida como Baixo Amazonas encontra-se cerca de 60 comunidades remanescentes de quilombos localizadas nos municípios de Oriximiná, Óbidos, Santarém, Alenquer e Monte Alegre. Sendo estas Boa Vista e Água Fria. No rio Trombetas são as comunidades de Bacabal, Arancuan de Cima, Arancuan do Meio, Arancuan de Baixo, Serrinha, Terra Preta II e Jarauacá. No rio Erepecuru estão Pancada, Araçá, Espírito Santo, Jauari, Boa Vista do Cuminá, Varre Vento, Jarauacá e Acapu. No Alto Trombetas localizam-se Abuí, Paraná do Abuí, Tapagem, Sagrado Coração e Mãe Cué. Nesta região os maiores mocambos foram construídos nos altos dos rios Trombetas, Erepecuru e Curuá, acima das cachoeiras, em áreas navegáveis, pois esta localização era de captura difícil, porém permitia o plantio e o comércio com cidades da região (Castro & Marin, 2004)

Em relação a região metropolitana, Belém é o centro econômico e político do Pará desde o século XVIII. Em seus arredores existiram inúmeros sítios e fazendas de cana-de-açúcar, algodão, mandioca, tabaco, espalhadas pelos rios Guamá, Acará, Moju, Capim e Bujaru e de onde surgiram inúmeras comunidades quilombolas. As comunidades quilombolas já reconhecidas na mesorregião metropolitana de Belém localizam-se nos municípios de

Ananindeua, Bujaru e Santa Isabel do Pará. Nesta região apenas a comunidade de Abacatal já tem as suas terras tituladas (CPISP, 2010).

Até a década de 1990, a região de Trombetas, onde vivem quilombolas e ribeirinhos, era considerada endêmica de malária, respondendo pela maioria dos casos de malária registrados no município de Oriximiná, sendo responsável pela maioria dos casos de malária registrados no município de Oriximiná. A partir do ano 2000, entretanto, houve uma redução significativa no número de casos na região. Inicialmente, devido à implantação de um projeto de controle da malária na região do rio Trombetas, pela Mineração Rio do Norte SA, em colaboração com o Setor Endêmico do Município de Oriximiná e posteriormente com o apoio do Ministério da Saúde do Brasil, através do Programa Nacional para o Controle da Malária (PNCM), iniciado em 2003. Com essas ações, o município de Oriximiná, que era considerado região de médio risco para malária, passou a ser considerado de baixo risco durante um tempo, porém voltou a ter um aumento com base no índice parasitário anual (IPA) de 2021, segundo dados do Ministério da Saúde. Logo procedimentos para pronto diagnóstico e tratamento da doença serão necessários novamente. Assim, o monitoramento da G6PDd e do metabolismo de CYP2D6 para uso de primaquina deve desempenhar um papel importante na rotina de atendimento das comunidades afro descendentes.

Diante desse cenário, estamos propondo a investigação no Rio Trombetas, localidade paraense que constitui área risco para malária, de fatores genéticos do hospedeiro humano que participam dos mecanismos de proteção inata e específica na malária, que poderão ajudar a esclarecer aspectos da epidemiologia dessa patologia.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

Investigar a prevalência de variantes genéticas nos genes *ACKR1*, *G6PD* e *CYP2D6* associados a infecção e tratamento da malária, visando contribuir para o controle e prevenção da malária em uma região endêmica do Pará: Oriximiná (Rio Trombetas).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar as frequências alélicas e genotípicas das mutações que definem o sistema sanguíneo Duffy;
- Investigar a prevalência da deficiência da enzima G6PD;
- Genotipar duas mutações de G6PD associadas a variante Africana e uma mutação associada a variante Mediterrânea;

- Analisar as frequências alélicas e genótípicas de seis polimorfismos de CYP2D6;
 - Descrever as frequências dos prováveis haplótipos obtidos a partir das combinações genótípicas dos polimorfismos de CYP2D6;
 - Definir os alelos estrela relacionados a esses polimorfismos;
 - Classificar a atividade enzimática de CYP2D6 de acordo com as combinações haplotípicas estabelecidas;
- Associar os haplótipos de CYP2D6 com a deficiência de G6PD e o tipo sanguíneo Duffy nas amostras de quilombos do rio Trombetas para verificar uma possível proteção (Oriximiná, PA).

3. METODOLOGIA

3.1. ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado em populações localizadas ao redor do Rio Trombetas no município de Oriximiná, que está localizado na mesoregião do Baixo Amazonas e possui 37 comunidades rurais afrodescendentes remanescentes de antigos quilombos situadas nas margens dos Rios Trombetas, Erepecuru, Cuminã e Acapu, totalizando cerca de 10.000 quilombolas (CPISP, 2019) (Figura 8). De acordo com o último boletim epidemiológico do Ministério da Saúde o município está classificado como área de médio risco de acordo com seu IPA (6,9).



Figura 8- Terras Quilombolas e Unidades de Conservação em Oriximiná.
Fonte: CPISP, 2016 (com adaptações).

3.2. AMOSTRA POPULACIONAL

A amostra populacional estudada foi constituída por 225 indivíduos divididos entre seis comunidades de remanescentes quilombolas do município de Oriximiná, às margens do rio Trombetas, sendo elas Abuí (51 total, 32 mulheres e 19 homens), Arancuan (15 total, 9 mulheres e 6 homens), Boa Vista (14 total, 7 mulheres e 7 homens), Cachoeira Porteira (89 total, 69 mulheres e 20 homens), Juquirizinho (24 total, 10 mulheres e 14 homens) e Tapagem (32 total, 18 mulheres e 14 homens).

3.2.1. Obtenção das amostras

Foram coletados 5 mL de sangue em sistema de coleta à vácuo, sendo um tubo contendo anticoagulante (EDTA).

3.2.2. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando o Kit Extração *Mini Spin Plus* da BIOPUR com adaptações e algumas amostras foram extraídas utilizando a técnica descrita por Lahiri *et al.* (1991) com adaptações.

3.3. GENOTIPAGEM

3.3.1. Genotipagem do sistema sanguíneo Duffy

A identificação dos três alelos do sistema sanguíneo Duffy (*FY*A*, *FY*B* e *FY*B^{ES}*) foi realizada pela técnica da PCR em tempo real (*Real Time PCR*). As sondas e iniciadores utilizados são desenvolvidas pelo *software File Builder 3.1* da *Applied Biosystems*, antecedidas por identificação das sequências analisadas em consulta prévia ao *genbank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Duas reações foram realizadas, uma para identificar o polimorfismo da região promotora (T>C) e a outra o polimorfismo do sítio que especifica o alelo *FY*A* ou *FY*B* (G>A). As sequências dos iniciadores e das sondas para cada polimorfismo são apresentadas na (Tabela 1).

Para realizar cada reação serão usados 2µL de DNA, 5µL de MasterMix (*Applied Biosystems*), 0,18µL das sondas (40X) e 4,82µL de água, completando um total de 12µL de reagentes. Estes serão colocados na Placa de leitura óptica que foi ao Real Time PCR System da *Applied Biosystems* para realizarem ciclos de 10 minutos à 950C, 15 minutos à 920C (40X) e 1 minuto à 600C (40X).

Tabela 1- Iniciadores e sondas que serão usados para genotipagem do sistema sanguíneo Duffy por PCR em Tempo Real.

Oligonucleotídeos	Sequência
REGIÃO PROMOTORA	
Iniciador Forward	5' CTGATGGCCCTCATTAGTCCTT 3'
Iniciador Reverso	5' GCTGGGACGGCTGTCA 3'
Sonda 1: Gata-ativo	5' TGCTTCCAAGATAAGAGC 3' - VIC
Sonda 2: Gata-inativo	5' CTTCCAAGGTAAGAGC 3' - FAM
<i>FY*A/FY*B</i>	
Iniciador Forward	5' CTATGGTGTGAATGATTCCTTCCC 3'
Iniciador Reverso	5' CAGAGTCATCCAGCAGGTTACAG 3'
Sonda FY*A	5' TGGAGACTATGGTGCCAAC 3'
Sonda FY*B	5' TGGAGACTATGATGCCAAC 3'

Nos casos em que os indivíduos forem heterozigotos para a região promotora e para a região alélica *FY*A/FY*B*, será necessária a realização de PCR convencional para confirmação dos genótipos. Para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em sistema convencional, serão utilizados quatro conjuntos de primers (iniciadores) alelo-específicos distintos, técnica descrita por Olsson *et al* (1998) (Tabela 2). Os iniciadores utilizados são *FY*AB2* e *GATA FY2* que são iniciadores sense da região promotora do gene *FY* que apresenta o polimorfismo T-33C que define qual desses dois iniciadores irá se anelar. Os iniciadores antisense da região polimórfica do *FY*A/FY*B* são denominados de *FY*AREV* e *FY*BREV2* (Figura 9).

Tabela 2- Oligonucleotídeos que serão usados como primers na PCR convencional para genotipagem do Sistema sanguíneo Duffy (Olsson *et al*, 1998).

Primer	Sequência nucleotídica
GATAFY2	5'- CTCATTAGTCCTTGGCTCTTAC -3'
FY*AB2	5'- CTCATTAGTCCTTGGCTCTTAT -3'
FY*AREV	5'- AGCTGCTTCCAGGTTGGCAC -3'
FY*BREV2	5'- AGCTGCTTCCAGGTTGGCAT -3'

Na PCR convencional os *primers* serão combinados para a detecção de quatro possíveis alelos: *FY*A^{ES}*, *FY*B^{ES}*, *FY*A* e *FY*B* (Tabela 3). Isso quer dizer que para cada indivíduo serão feitas quatro reações em cadeia da polimerase (PCR) distintas, ou seja, com quatro combinações de *primers*.

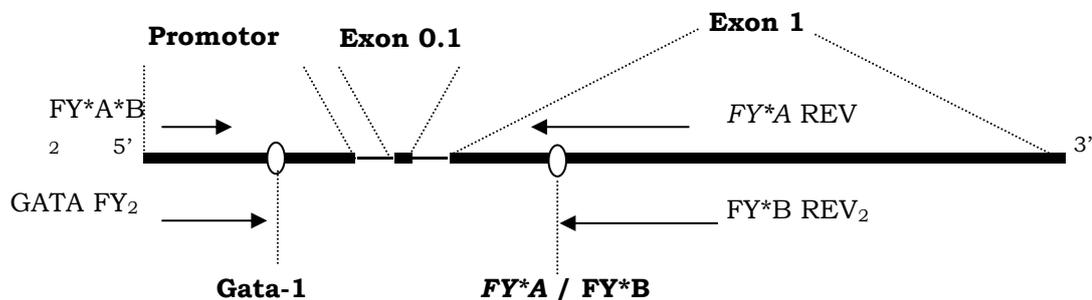


Figura 9- Esquema do locus gênico *FY** e a posição dos iniciadores (primers) para a genotipagem do gene. Os círculos indicados como GATA-1 e *FY*A/FY*B* representam os polimorfismos na região promotora e codificadora do *FY*, respectivamente (Olsson *et al*, 1998).

As misturas da PCR incluíram 100 ng DNA genômico, 0,2μ de cada primer, 100μ de dNTP, 1,5μ MgCl₂ e 0,5μ AmpliTaq Gold polimerase (Perkin Elmer, EUA) no buffer de AmpliTaq Gold fornecido pela Perkin Elmer em um volume de reação de 25 μL. As misturas foram incubadas durante 8 min a 95° C, seguido por 10 ciclos de 94° C por 1 min e 69° C por 1 min, 25 ciclos de 94° C por 1 min, 64° C por 1 min e 72° C por 1 min e uma incubação final a 72° C por 10 min (Tabela 4).

Tabela 3 - Combinações de iniciadores nas PCR para identificar os alelos do Sistema sanguíneo Duffy (Olsson *et al*, 1998).

Combinações de primers	Primer sense	Primer antisense	Alelo detectado
A	GATA FY2	FY*A REV	<i>FY*A^{ES}</i>
B	GATA FY2	FY*B REV2	<i>FY*B^{ES}</i>
C	FY*AB2	FY*A REV	<i>FY*A</i>
D	FY*AB2	FY*B REV2	<i>FY*B</i>

Tabela 4 - Condições da PCR convencional.

Ciclo	Repetições	Temperatura (OC)	Tempo	Função
1	1	95	8 minutos	Ativação da AmpliTaqGold
2	10	94	1 minuto	Desnaturação
3	10	69	1 minuto	Hibridização
4	25	94	1 minuto	Desnaturação
5	25	64	1 minuto	Hibridização
6	25	72	1 minuto	Extensão
7	1	72	10 minutos	Extensão

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados eletroforéticamente por 60 minutos sob uma corrente elétrica de 110 volts em gel de agarose a 2% com tampão TAE 1X acrescido de brometo de etídio (10 mg/mL), e visualizados em transiluminador com fonte de luz ultravioleta. A identificação dos genótipos é feita de acordo com o esquema apresentado na (Figura 10).

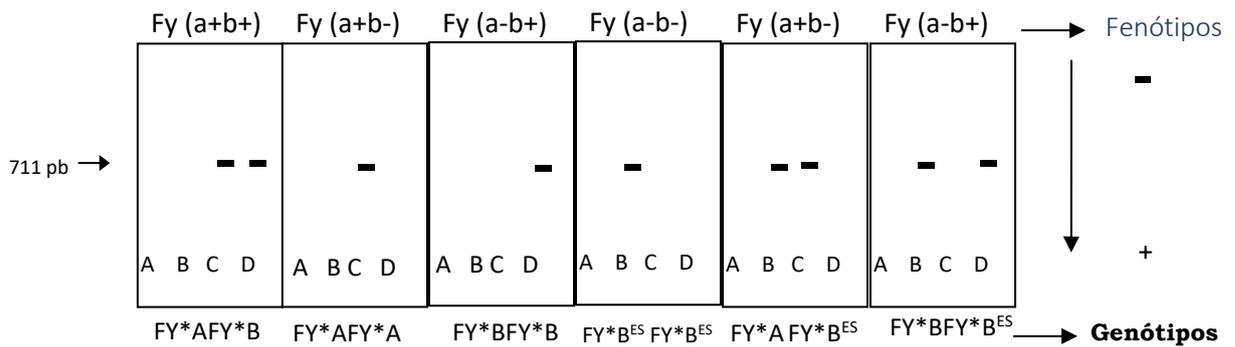


Figura 10- Representação esquemática da eletroforese em gel de agarose para detecção dos seis mais frequentes genótipos na determinação fenotípica. Os elementos gráficos A, B, C e D representam as combinações de iniciadores descritas na tabela 1. Os fragmentos de 711 pb representam a amplificação dos alelos do Sistema Duffy.

3.3.2. Investigação das variantes G6PD A e G6PD MED

Para genotipagem de G6PD Africana foram analisadas as duas principais mutações no gene que codificam a enzima e que reduzem a expressão da mesma. A primeira mutação constitui um polimorfismo, identificado pelo rs1050829 (376A>G), que resulta na substituição de asparagina por ácido aspártico na posição 126 do peptídeo (ASN126ASP). A segunda mutação também constitui um polimorfismo, identificado pelo rs1050828 (202G>A), que resulta na substituição de valina por metionina na posição 68 da enzima (VAL68MET). Para genotipagem de G6PD MED a mutação analisada foi identificada pelo rs5030868 (563C>T), que resulta na substituição do aminoácido serina por fenilalanina na posição 188 (SER188PHE) (Tabela 5). Os ensaios com os iniciadores e as sondas para genotipagem em Tempo Real foram obtidos junto à *Applied Biosystems*.

Tabela 5 - Polimorfismos presentes nas variantes Africana e Mediterrânea do gene G6PD.

Variantes G6PD		Ponto de mutação	Alelos	Posição enzimática	Aminoácidos	SNP referência
	A	376	A > G	126	ASN > ASP	rs1050829
Africana	A-	202	G > A	68	VAL > MET	rs1050828
	(376 +)					
Mediterrânea	MED	563	C > T	188	SER > PHE	rs5030868

3.3.3. Investigação das variantes de CYP2D6

Para genotipagem do CYP2D6 analisaram-se seis polimorfismos que codificam determinados alelos estrelas descritos com maior frequência na região Norte do Brasil. Estes alelos estão subdivididos de acordo com a funcionalidade enzimática da isoforma gerada: alelos afuncionais (*4), função reduzida (*10, *17, *41), função normal (*1,*2) (Hutz *et al.*, 2014) (Tabela 5). Utilizaram-se ensaios *TaqMan* de acordo com os protocolos do fabricante para a discriminação de alelos em seis *loci* polimórficos CYP2D6, sendo eles: -1584C>G (1080985), 31G>A (rs769258), 100C>T (rs1065852), 1023C>T (rs28371706), 1846G>A (rs3892097) e 2988G>A (rs28371725). A combinação genotípica dos polimorfismos foi gerada utilizando *software Arlequin* versão 3.11 e os haplótipos resultantes foram caracterizados a partir de pesquisa no repositório *Pharmacogene Variation Consortium (PharmVar)* (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>).

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências genotípicas e alélicas serão estimadas por simples contagem. Os dados serão processados em planilhas do *Microsoft Excel* gerando-se bancos de dados. As comparações entre as frequências alélicas e genotípicas entre diferentes genes serão feitas utilizando-se a análise χ^2 usando o programa *Bio-Stat 5.0* e *SPSS (Statistical Package for Social Sciences)*.

Tabela 6 - Genótipos variantes do gene CYP2D6, alelos polimórficos e nível de atividade enzimática.

Alelos do CYP2D6	Polimorfismos						Atividade enzimática
	-1584 C > G	31 G > A	100 C > T	1023 C > T	1846 G > A	2988 G > A	
*1	C	G	C	C	G	G	Normal
*2	G	G	C	C	G	G	Normal
*4	C	G	T	C	A	G	Nula
*10	C	G	T	C	G	G	Reduzida
*17	C	G	C	T	G	G	Reduzida
*35	G	A	C	C	G	G	Normal
*41	G	G	C	C	G	A	Reduzida

Fonte: Friedrich *et al.*, 2014 (com adaptações).

4. RESULTADOS

4.1. GENÓTIPOS DE DUFFY

Nos 225 indivíduos estudados foram encontrados seis genótipos. O alelo mais frequente foi o $FY*B^{ES}$, 51,8% (233/450). Do total 29,7% (67/225) dos indivíduos eram homocigotos para $FY*B^{ES}$ (Duffy negativos) e 44,0% (99/225) eram heterocigotos para esse alelo (27,1% $FY*A/FY*B^{ES}$ e 16,9% $FY*B^{ES}/FY*B^{ES}$) (Tabela 7). As frequências alélicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

4.2. VARIANTES DE G6PD

Na população estudada a prevalência da deficiência de G6PD foi de 2,2% (5/225), todos homens hemizigóticos. As frequências das variantes encontradas foram: G6PD*A- (376G/202A), 5 (2,2%) homens hemizogotos e, 19 (8,4%) mulheres (2 homocigotas para o polimorfismo 376 e heterocigotas para 202 e 17 heterocigotas nos dois pontos). A variante G6PD*A (376G) foi encontrada em 3 (1,3%) homens hemizigotos, 22 (9,8%) mulheres (18 heterocigotas e 4 homocigotas) (Tabela 8).

A variante Mediterrânea (G6PD c.563C>T) não foi encontrada na amostra. As frequências globais dos alelos G6PD*B, G6PD*A- e G6PD*A foram 81,1%, 6,5% e 12,4%, respectivamente. A amostra encontra-se em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e a análise da distribuição das variantes revela que a variante G6PD*A mesmo sendo mais comum que a G6PD*A-, apresenta frequência bastante aproximada, 11,1% e 10,7% respectivamente. A associação entre os genótipos de G6PD e Duffy não foram estatisticamente significativos ($p=0,165$) (Tabela 9).

4.3. VARIANTES DE CYP2D6

Dos seis polimorfismos investigados o 31G>A foi o único não encontrado na população. A predição genotípica demonstrou a existência de um total de 22 haplótipos, sete que identificam alelos estereótipos diferentes e 15 que caracterizam variações desses alelos. Os alelos mais frequentes foram *1 com 20,2% (91/450) (Tabela 10). As combinações genotípicas dos alelos para cada indivíduo foram selecionadas baseadas na maior frequência observada, quando havia mais de uma possibilidade. O que resultou em 53 combinações diferentes ou 35 quando os haplótipos variantes de um mesmo alelo foram agrupados, classificados em três fenótipos de metabolização farmacológica. No total 63,1% (142) dos indivíduos são metabolizadores extensos (EM), 30,7% (69) são metabolizadores

intermediários (IM) e 6,2% (14) metabolizadores fracos (PM). As combinações haplotípicas mais comuns foram *4/*1 presente em 21,8% (49/225) da amostra e *10/*4var em 15,1% (34/225).

Tabela 7. Frequências dos alelos e genótipos Duffy.

Alelos N (%)		Genótipos N (%)					
		<i>FY*A/FY*A</i>	<i>FY*A/FY*B</i>	<i>FY*A/FY*B^{ES}</i>	<i>FY*B/FY*B</i>	<i>FY*B/FY*B^{ES}</i>	<i>FY*B^{ES}/FY*B^{ES}</i>
<i>FY*A</i>	121 (26,9)						
<i>FY*B</i>	96 (21,3)	17 (7,6)	26 (11,6)	61 (27,1)	16 (7,1)	38 (16,9)	67 (29,8)
<i>FY*B^{ES}</i>	233 (51,8)						

Tabela 8. Frequências dos alelos de G6PD.

Gênero	N (%)	Alelos N (%)		
		<i>G6PD*B</i>	<i>G6PD*A-</i>	<i>G6PD*A</i>
Masculino	80 (35,6)	72 (90,0)	5 (6,2)	3 (3,8)
Feminino	145 (64,4)	228 (78,6)	19 (6,6)	43 (14,8)
Total	225 (100,0)	300 (81,1)	24 (6,5)	46 (12,4)

Tabela 9 - Genótipos de G6PD e do sistema sanguíneo Duffy.

Genótipos G6PD	Genótipos Duffy						Total
	<i>FY*A</i> / <i>FY*A</i>	<i>FY*A</i> / <i>FY*B</i>	<i>FY*A</i> / <i>FY*B^{ES}</i>	<i>FY*B</i> / <i>FY*B^{ES}</i>	<i>FY*B</i> / <i>FY*B</i>	<i>FY*B^{ES}</i> / <i>FY*B^{ES}</i>	
AA/GG (B)	10 (5,7)	23 (13,1)	49 (27,8)	52 (29,5)	11 (6,3)	31 (17,6)	176 (100)
AG/GA (A-)	3 (17,6)	1 (5,9)	6 (35,3)	4 (23,5)	1 (5,9)	2 (11,8)	17 (100)
AG/GG (A)	3 (16,7)	0 (0,0)	1 (5,6)	7 (38,9)	4 (22,2)	3 (16,7)	18 (100)
GG/AA (A-)	0 (0,0)	2 (40,0)	2 (40,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (20,0)	5 (100)
GG/GA (A-)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100)
GG/GG (A)	1 (14,3)	0 (0,0)	3 (42,9)	2 (28,6)	0 (0,0)	1 (14,3)	7 (100)
Total	17 (7,6)	26 (11,6)	61 (27,1)	67 (29,8)	16 (7,1)	38 (16,9)	225 (100)

4.4. DUFFY x G6PD x CYP2D6

A tabela 11 mostra uma análise de associação dos fatores genéticos do sistema sanguíneo Duffy, variantes de G6PD e atividade metabólica de CYP2D6, onde não foi encontrado resultado estatisticamente significativo, porém é importante ressaltar que todos os indivíduos com a variante Africana A- (GG/AA), encontram-se no grupo de metabolizadores extensos com frequência de 3,5% (5/142) e desses 60% (3/5) apresentam pelo menos um alelo *FY*B^{ES}*.

A seguir foram realizadas comparações isoladas em relação ao metabolismo do CYP com a deficiência de G6PD e posteriormente com sistema sanguíneo Duffy. Resultados estatisticamente significativos foram observados na tabela 12 (CYP e G6PD) ($p=0,000$), o que já era esperado visto que 100% dos deficientes de G6PD encontram-se no mesmo fenótipo de metabolização extensa (EM) para o CYP2D6. A associação dos genótipos Duffy e metabolismo de CYP2D6 não apresentou resultado estatisticamente significativo, entretanto 70% (100/142) dos indivíduos EM para CYP2D6 expressam ao menos um alelo *FY*B^{ES}* (Tabela 13).

Tabela 10. Alelos, genótipos e atividade enzimática de CYP2D6.

Alelos	Polimorfismos						N (%)	Atividade enzimática
	-1584 C > G	31 G > A	100 C > T	1023 C > T	1846 G > A	2988 G > A		
*1	C	G	C	C	G	G	91 (20,2)	Normal
*2	G	G	C	C	G	G	63 (14,0)	Normal
*4	C	G	T	C	A	G	20 (4,5)	Nula
*4var	C	G	C	C	A	G	4 (0,9)	Nula
*4var	C	G	C	T	A	G	86 (19,1)	Nula
*4var	C	G	C	T	A	A	15 (3,3)	Nula
*4var	C	G	T	T	A	G	6 (1,3)	Nula
*4var	C	G	T	T	A	A	1 (0,2)	Nula
*4var	G	G	C	C	A	G	6 (1,3)	Nula
*4var	G	G	C	C	A	A	2 (0,4)	Nula
*4var	G	G	C	T	A	G	29 (6,5)	Nula
*4var	G	G	T	C	A	G	3 (0,7)	Nula
*4var	G	G	T	T	A	G	1 (0,2)	Nula
*4var	G	G	T	T	A	A	0 (0,0)	Nula
*10	C	G	T	C	G	G	56 (12,5)	Reduzida
*17	C	G	C	T	G	G	39 (8,7)	Reduzida
*17var	G	G	C	T	G	G	1 (0,2)	Reduzida
*41	C	G	C	C	G	A	7 (1,6)	Reduzida
*41var	G	G	C	C	G	A	1 (0,2)	Reduzida
*41var	G	G	C	T	G	A	5 (1,1)	Reduzida
*41var	G	G	T	C	G	A	3 (0,7)	Reduzida
*64	C	G	T	T	G	G	11 (2,4)	Reduzida

Tabela 11. Genótipos de G6PD e Duffy classificados por atividade enzimática de CYP2D6.

Atividade de CYP		Genótipo Duffy N (%)						Total	
		<i>FY*A/FY*A</i>	<i>FY*A/FY*B</i>	<i>FY*A/FY*B^{ES}</i>	<i>FY*B/FY*B^{ES}</i>	<i>FY*B/FY*B</i>	<i>FY*B^{ES}/FY*B^{ES}</i>		
EM	Genótipo	AA/GG (B)	8 (7,1)	19 (16,8)	26 (23)	32 (28,3)	6 (5,3)	22 (19,5)	113 (100,0)
		AG/GA (A-)	1 (11,1)	0 (0,0)	4 (44,4)	3 (33,3)	0 (0,0)	1 (11,1)	9 (100,0)
		AG/GG (A)	3 (30,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (20,0)	2 (20,0)	3 (30,0)	10 (100,0)
	G6PD	GG/AA (A-)	0 (0,0)	2 (40,0)	2 (40,0)	0 (0,0)	0 (0,0%)	1 (20,0)	5 (100,0)
		GG/GG (A)	1 (20,0)	0 (0,0)	3 (60,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (100,0)
		Total	13 (9,2)	21 (14,8)	35 (24,6)	38 (26,8)	8 (5,6)	27 (19,0)	142 (100,0)
IM	Genótipo	AA/GG (B)	1 (1,9)	4 (7,4)	20 (37,0)	16 (29,6)	5 (9,3)	8 (14,8)	54 (100,0)
		AG/GA (A-)	2 (25,0)	1 (12,5)	2 (25,0)	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	8 (100,0)
	G6PD	AG/GG (A)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (16,7)	3 (50,0)	2 (33,3)	0 (0,0)	6 (100,0)
		GG/GG (A)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)
		Total	3 (4,3)	5 (7,2)	23 (33,3)	20 (29,0)	8 (11,6)	10 (14,5)	69 (100,0)
PM	Genótipo	AA/GG (B)	1 (11,1)	0 (0,0)	3 (33,3)	4 (44,4)	0 (0,0)	1 (11,1)	9 (100,0)
		AG/GG (A)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100,0)
	G6PD	GG/AG (A-)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100,0)
		GG/GG (A)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)
		Total	1 (7,1)	0 (0,0)	3 (21,4)	9 (64,3)	0 (0,0)	1 (7,1)	14 (100,0)
Total Geral		17 (7,5)	26 (11,6)	61 (27,1)	67 (29,8)	16 (7,1)	38 (16,9)	225 (100,0)	

Tabela 12. Genótipos de G6PD e atividade enzimática de CYP2D6.

Atividade de CYP	Genótipo G6PD N (%)						Total
	AA/GG (B)	AG/GA (A-)	AG/GG (A)	GG/AA (A-)	GG/GA (A-)	GG/GG (A)	
EM	113 (79,6)	9 (6,3)	10 (7,0)	5 (3,5)	0 (0,0)	5 (3,5)	142 (100)
IM	54 (78,3)	8 (11,6)	6 (8,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,4)	69 (100)
PM	9 (64,3)	0 (0,0)	2 (14,3)	0 (0,0)	2 (14,3)	1 (7,1)	14 (100)
Total	176 (78,2)	17 (7,6)	18 (8,0)	5 (2,2)	2 (0,9)	7 (3,1)	225 (100)

Tabela 13. Genótipos de Duffy e atividade enzimática de CYP2D6.

Atividade de CYP	Genótipo Duffy N (%)						Total
	FY^*A/FY^*A	FY^*A/FY^*B	FY^*A/FY^*B^{ES}	FY^*B/FY^*B^{ES}	FY^*B/FY^*B	FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES}	
EM	13 (9,2)	21 (14,8)	35 (24,6)	38 (26,8)	8 (5,6)	27 (19,0)	142 (100)
IM	3 (4,3)	5 (7,2)	23 (33,3)	20 (29,0)	8 (11,6)	10 (14,5)	69 (100)
PM	1 (7,1)	0 (0,0)	3 (21,4)	9 (64,3)	0 (0,0)	1 (7,1)	14 (100)
Total	17 (7,6)	26 (11,6)	61 (27,1)	67 (29,8)	16 (7,1)	38 (16,9)	225 (100)

5. DISCUSSÃO

O alelo mais comum no sistema sanguíneo Duffy foi FY^*B^{ES} com frequência de 51,8%, o que concorda com estudo realizado por Perna *et al.* (2007) em populações afro-brasileiras na região Amazônica (Trombetas, Magazão Velho, Pitimandeuca e Curiaú) onde a frequência encontrada foi de 63,7%. Assim como os dois genótipos mais frequentes FY^*B^{ES}/FY^*B^{ES} (29,8%) e FY^*A/FY^*B^{ES} (27,8%), foram também os mais encontrados por Perna *et al.* (2007) com frequências de 44,2% e 26,3% respectivamente. O efeito protetor do fenótipo Duffy negativo em relação a malária vivax já está descrito na literatura a algum tempo, demonstrado por mecanismos de infecção e pela distribuição geográfica da patologia. Em uma análise de distribuição global do sistema sanguíneo Duffy realizada por Howes *et al.*

(2011), foi observado que na região Norte do Brasil e por todo o litoral brasileiro o alelo $FY*B^{ES}$ é o mais encontrado, com frequências que variam de 30 a mais de 50%, o que corrobora os resultados encontrados nesta análise.

A frequência elevada do genótipo $FY*A/FY*B^{ES}$ pode sugerir uma possível relação de proteção desse genótipo também, como em uma comparação entre pacientes infectados por *P. vivax* e doadores de sangue saudáveis realizada por Cavasini *et al.*, (2007), onde demonstrou-se que o genótipo $FY*A/FY*B^{ES}$ era menos frequente nos infectados. King *et al.* (2011) sugeriram que este aumento do alelo $FY*A$ assim como do alelo $FY*B^{ES}$ (atingindo fixação genética em muitas populações) é uma forma de melhorar a resistência humana contra a malária *P. vivax*.

As relações de proteção entre Duffy negativos e deficientes de G6PD na malária vivax estão descritas na literatura (Leslie *et al.*, 2010; Louicharoen *et al.*, 2009; Santana *et al.*, 2013), desse modo é possível considerar que a ocorrência do alelo $FY*B^{ES}$ e de uma G6PD variante em frequências polimórficas, pode gerar melhor proteção contra malária na população estudada, esta ocorrência foi observada em 37 indivíduos (16.4%) no presente estudo.

Em relação as variantes de G6PD, os resultados do presente estudo mostram que as variantes africanas são amplamente identificadas na população, diferentemente da variante Mediterrânea, o que é esperado de acordo com a literatura, pois estas variantes foram descritas como mais detectadas na África e em afro descendentes, por isso carregam o nome de origem (Beutler, 1991). Apesar da grande miscigenação observada no Brasil gerar diferenças de frequências em relação a populações com características mais preservadas, a variante Africana G6PD*A- é a mais prevalente no país, mesmo entre populações com ascendência mais distintas como a região Norte e a região Sul (Santos *et al.*, 1987; Weimer *et al.*, 1993; Hamel *et al.*, 2002). E principalmente entre os afro descendentes de várias regiões do país (Saad *et al.*, 1997; Compri *et al.*, 2000). As frequências das variantes Africanas G6PD*A- (376 A>G e 202 G>A) e G6PD*A (376 A>G) encontradas no presente estudo foram 10.7% e 11,1%, respectivamente. Essas frequências são elevadas quando comparadas a outros estudos em populações da África subsaariana (Carter *et al.*, 2011; Howes *et al.*, 2013), e se assemelham às encontradas no oeste da África e República da Guiné, por Millimono *et al.* (2012) onde a variante G6PD*A também apresentou maior frequência (17,6%) do que a G6PD*A- (5,7%).

Quando analisamos a frequência aqui obtida para a variante G6PD*A- entre os indivíduos do sexo masculino (6,3%), foi superior às frequências observadas na região Norte

em homens da cidade de Manaus, Amazonas (3.8%), por Santana *et al.* (2013) e em homens do vale do Juruá, Acre, por Dombrowski *et al.* (2017). A frequência observada entre os afro descendentes de maneira geral é mais elevada do que as descritas na região Sudeste, em Campinas (6.1%) e São Paulo (5.8%) por Mezzacappa *et al.* (2010) e Oliveira *et al.* (2009), respectivamente. E até mesmo da observada na região Nordeste, em Salvador (8.2%), Bahia, por Moura-Neto *et al.* (2008), uma população com origem predominantemente africana (Santos *et al.*, 2016). Porém, é mais baixa do que as encontradas em populações afro descendentes da região Norte (14.4%), por Miranda-de-Carvalho (2001).

Em relação a variante G6PD*A, a elevada frequência encontrada (11,1%), supera bastante as observadas em Salvador, Bahia (3.1%), por Moura Neto *et al.* (2008). Essa frequência elevada observada no presente estudo pode ser uma característica da população afro descendente que originou as comunidades no estado do Pará. Além disso, as baixas frequências observadas em outros estudos podem ser decorrentes da forma de amostragem utilizada na maioria destes, que é iniciada por triagem bioquímica para posterior análise molecular, o que pode eliminar uma grande quantidade de indivíduos G6PD*A, devido a atividade da enzima nesta variante ser muito próxima ao normal.

A variante Mediterrânea não foi encontrada no presente estudo, o que é esperado devido a amostra não apresentar evidências de descendência italiana, grega, árabe e de judeus orientais que são as populações onde essa variante é mais comum (Ruwende & Hill, 1998). Esse resultado também está de acordo com descritos em revisão realizada por Weimer *et al.* (1998), em populações da América do Sul na qual a variante Mediterrânea totalizou apenas 0,1% dos 17.000 investigados, estando presente apenas no Sul do Brasil, em 20 casos. Essa variante foi encontrada com frequência de 3.0% no sudeste do Brasil, no estado de São Paulo, (Saad *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2014), e em caucasianos do Rio grande do Sul (8.0%) (Weimer *et al.*, 1981). Na região Norte foi observada apenas em Manaus, Amazonas, com frequência de 1% (Santana *et al.*, 2013), provavelmente relacionada à contribuição de árabes e judeus presentes na população.

Em comparação com populações de outros países da América Latina a frequência da variante G6PD*A- (10,7%) é aproximada da encontrada na Colômbia e em Honduras (9%), já na Venezuela é bem mais baixa (1.7%). A variante G6PD*A também apresenta frequências mais baixas nesses países: Colômbia (2.0%), Hondura (3.0%) e menor que 1% na Venezuela (Valencia *et al.*, 2016, Zuñiga *et al.*, 2015, Vizzi *et al.*, 2016). Porém, em um estudo realizado na Guiana Francesa, por Petit *et al.* (2016), frequências elevadas também foram observadas para variante G6PD*A (10%), o que é similar a descrita aqui (11,1%).

Os alelos estrelas de CYP2D6 encontrados na nossa população geram haplótipos de metabolização extensa, intermediária e lenta, com frequências de 63,1%, 30,7% e 6,3% respectivamente, esses dados são corroborados por Kohlrausch *et al.* (2009) que encontraram frequências de 73,6% EM, 19,5% IM e 3,5% PM, em afro brasileiros.

Na análise da frequência dos polimorfismos de CYP2D6 observa-se que entre os alelos de atividade nula/reduzida, o alelo *4 quando somado aos seus variantes, é o mais encontrado, com frequência de 38,5%, o que está de acordo com trabalho realizado por Naranjo *et al.* (2018), onde populações de 12 países ibero e nativo americanos foram estudadas, incluindo o Brasil, e o alelo *4 foi o mais comum na população em geral. Um recente estudo realizado por Salles *et al.* (2021) em cinco áreas endêmicas de malária vivax na Amazônia Brasileira, incluindo dois municípios do Pará, também demonstrou o alelo *4 como o mais comum, com frequências variando de 31 a 35%. Estes dados são importantes principalmente devido aos problemas de metabolização da primaquina associados a recidivas de malária vivax em indivíduos com variantes de metabolização lenta de CYP2D6 (De Pina-Costa *et al.*, 2021; Suares-Kurtz, 2021; Potter *et al.*, 2015).

O alelo *64 de CYP2D6 encontrado na amostra com frequência de 2,4% foi descrito pela primeira vez em 2008 por Gaedigk e Coetsee, em indivíduos que apresentavam o polimorfismo 1023C>T que caracteriza o alelo *17, formando um novo haplótipo com o polimorfismo 100C>T, o que o torna um novo alelo e não apenas uma variante do alelo existente. Esses dados foram observados em estudo com caucasianos, afro americanos e mestiços da África do Sul, onde apenas a população mestiça possuía este novo alelo. A ancestralidade dos mestiços sul africanos é conhecida por ser bastante heterogênea, com contribuição de vários países da África subsaariana, desde de países da África Ocidental até Madagascar e as Ilhas Maurícias na África Oriental, mas também apresenta contribuição Europeia substancial, além de outros países. A presença desse alelo raro que ainda não havia sido encontrado no Brasil, pode sugerir a forte contribuição do povo Bantu nos quilombos de Oriximiná. Cardoso e Guerreiro (2006) mostraram essa forte contribuição dessa região da África como sendo o haplótipo mais comum para o gene HbS entre os pacientes com anemia falciforme do estado do Pará. Pante-De-Sousa *et al.* (1999) também já haviam descrito resultados semelhantes em populações de afro descendentes de comunidades quilombolas as margens do rio Trombetas.

Quando associamos a deficiência de G6PD com o metabolismo de CYP2D6 uma observação importante é gerada, pois todos os deficientes (hemizigotos G6PD A-) estão classificados dentro de metabolizadores extensos, o que levanta suspeita sobre um possível

abrandamento dos efeitos hematotóxicos da deficiência de G6PD quando o indivíduo é exposto a medicamentos gatilhos, como a primaquina. Um estudo *in vitro* utilizando primaquina e isoformas CYP recombinantes em eritrócitos humanos, foi realizado por Ganesan *et al.* (2009), onde marcadores de estresse oxidativo ROS e a formação de metemoglobina foram monitorados, os resultados indicaram que várias enzimas de CYP tem papel importante em reduzir o estresse oxidativo gerado pela primaquina *in vitro*.

Apesar de todo esforço para diminuição da malária em nível mundial, após anos em que os casos de infecção apresentavam baixas significativas, no estado do Pará, os casos aumentaram significativamente entre os anos de 2016 e 2018, atingindo Índices Parasitários Anuais (IPA) bastante elevados. Desse modo o conhecimento do perfil genético dessas populações, principalmente de comunidades afro descendentes, permite não apenas a identificação de mecanismos de proteção, mas também a prevenção de riscos em tratamentos antimaláricos, um problema de saúde pública.

6. CONCLUSÕES

- As variantes Africanas G6PD*A- e G6PD*A apresentam altas frequências nas comunidades afro descendentes estudadas. As variantes, como esperado, foram mais comuns em homens, porém uma grande quantidade de mulheres heterozigotas foi identificada.
- A variante Mediterrânea não foi encontrada no presente estudo, o que é caracterizado pela origem da população composta predominantemente por descendentes de escravos africanos, fazendo com que as comunidades carreguem até os dias atuais um grande componente genético africano.
- No sistema sanguíneo Duffy o alelo $FY*B^{ES}$ foi o mais prevalente e os genótipos $FY*B^{ES}/*B^{ES}$ e $FY*A/FY*B^{ES}$ foram os mais frequentes.
- No presente estudo, 21.7% dos indivíduos apresentaram ao menos uma variante de G6PD (3,6% hemizigotos, 1,8% homozigoto e 16,4% heterozigotos) e 73,8% apresentaram o alelo $FY*B^{ES}$ (44,0% heterozigotos e 29,8% homozigotos). A co-ocorrência da variante de G6PD e ao menos um alelo $FY*B^{ES}$ foi observada em 37 indivíduos (16,4%), o que pode conferir uma melhor proteção contra malária vivax.
- Apesar da maioria dos indivíduos apresentarem metabolismo extenso para CYP2D6, as altas frequências do alelo de atividade nula *4, ressaltam a necessidade de

caracterização desses polimorfismos em populações expostas à malária e consequentemente à primaquina.

- O alelo *64 de CYP2D6 foi encontrado pela primeira vez no Brasil, o que suporta a ancestralidade dessa população.
- A investigação de fatores genéticos do hospedeiro humano, que estão associados a mecanismos de proteção contra malária, pode resultar em novas estratégias para tratamento e prevenção da malária, sobretudo pelo fato de que as populações da Amazônia apresentam um alto nível de suscetibilidade à infecção malárica, transmissão e endemicidade de baixa e média intensidade, e grau de imunidade adquirida bastante variável.

7. REFERÊNCIAS

- Abou-Ali, R. K., Dhyani, A., Terço, A. L., Toro, D. M., Gomes, K. S., Tezza, L. C., ... & Albuquerque, S. R. (2019). Impact of Duffy polymorphisms on parasite density in Brazilian Amazonian patients infected by *Plasmodium vivax*. *Malaria journal*, 18(1), 289.
- Albuquerque, S.R.L., de Oliveira Cavalcante, F., Sanguino, E.C. et al. FY polymorphisms and vivax malaria in inhabitants of Amazonas State, Brazil. *Parasitol Res* 106, 1049–1053 (2010).
- Bains, R.K. African variation at cytochrome P450 genes: Evolutionary aspects and the implications for the treatment of infectious diseases. *Evol Med Public Health* 2013, 118–134.
- Baird, J. K., Battle, K. E., & Howes, R. E. (2018). Primaquine ineligibility in anti-relapse therapy of *Plasmodium vivax* malaria: the problem of G6PD deficiency and cytochrome P-450 2D6 polymorphisms. *Malaria Journal*, 17(1), 1-6.
- Barnwell JW, Nichols ME, Rubinstein P (1989). In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. *J Exp Med* 1;169(5):1795-802.
- Bennett, J. W., Pybus, B. S., Yadava, A., Tosh, D., Sousa, J. C., McCarthy, W. F., ... & Ockenhouse, C. F. (2013). Primaquine failure and cytochrome P-450 2D6 in *Plasmodium vivax* malaria. *New England Journal of Medicine*, 369(14), 1381-1382.
- Beutler E (1991). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *N. Engl. J. Med.*, 324 (3): 169-174.
- Beutler, E (1996) G6PD: population genetics and clinical manifestations. *Blood Reviews* 10:45-52.
- Beutler, E, & Duparc, S (2007). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and antimalarial drug development. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 77(4), 779-789.
- Bezerra L.S., Santos-Veloso M.A.O., Bezerra Junior N.D.S, Fonseca L.C. Da, Sales W.L.A. Impacts of Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) Genetic Polymorphism in Tamoxifen Therapy for Breast Cancer. *Rev Bras Ginecol e Obstet*. 2018;40(12):794–9.
- Beutler E, Vulliamy TJ (2002). Hematologically important mutations: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood Cells Mol Dis* 28:93–103.
- Brasil, L.W., Rodrigues-Soares, F., Santoro, A.B., Almeida, A.C., Kühn, A., Ramasawmy, R., ... & Suarez-Kurtz, G. (2018). CYP2D6 activity and the risk of recurrence of *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: a prospective cohort study. *Malaria journal*, 17(1), 1-6.
- Brauch H, Mürdter T.E., Eichelbaum M, Schwab M. Pharmacogenomics of tamoxifen therapy. *Clin Chem* 2009;55:1770–82.
- Cappadoro, M., Giribaldi, G., O'Brien, E., Turrini, F., Mannu, F., Ulliers, D., ... & Arese, P. (1998). Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 92(7), 2527-2534.

- Cappellini MD, Fiorelli G (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 371:64–74.
- Cardoso, G.L., & Farias Guerreiro, J.F. (2006). African gene flow to north Brazil as revealed by HBB* S gene haplotype analysis. *American Journal of Human Biology*, 18(1), 93-98.
- Carson PE, Alving AS, Flanagan CL, Ickes CE (1956). Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* 124:484–485.
- Carter R. (2003). Speculations on the origins of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends in parasitology*, 19(5), 214-219.
- Carter N, Pamba A, Duparc S and Waitumbi JN (2011). Frequency of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in malaria patients from six African countries enrolled in two randomized anti-malarial clinical trials. *Malaria journal*, 10(1), 241.
- Cartron, J.P., & Colin, Y (2001). Structural and functional diversity of blood group antigens. *Transfusion clinique et biologique*, 8(3), 163-199.
- Castro E. & Marin R.A. No caminho de pedras de Abacatal - experiência social de grupos negros no Pará . NAEA/UFPA, Belém, 2004.
- Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, *et al.* Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the *Plasmodium vivax* malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10793-7.
- Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Pogo AO (1995). The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy-negative individuals. *Blood* 85:615–621.
- Chen, E, Salinas, ND, Huang, Y, Ntumngia, F, Plasencia, MD, Gross, ML, Adams JH, Tolia, NH (2016). Broadly neutralizing epitopes in the *Plasmodium vivax* vaccine candidate Duffy Binding Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(22), 6277-6282.
- Compri M B, Saad S T O, Ramalho A S (2000). Investigação genético-epidemiológica e molecular da deficiência de G6PD em uma comunidade brasileira. *Cad. Saúde Pública*. Rio de Janeiro, 16 (2): 335-342.
- Cook SG, Baker JW, Weaver EW (1989). Intrauterine transfusion for anti-Duffy(Fya) haemolytic disease. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 29:263-4.
- Crosby, WH (1956). Favism in Sardinia (newsletter). *Blood* 11: 91–92.
- Cutbush M, Mollison PL, Parkin DM (1950). A new human blood group. *Nature*: 165, p. 188. Fermi C. Martinetti P. Studio sul favismo. *Annali di Igiene Sperimentale*. 1905;15:76–112.

de Pina-Costa, A., Silvino, A. C. R., Dos Santos, E. M., Pedro, R. S., Moreira, J., Umãna, G. L., ... & Siqueira, A. M. (2021). Increased primaquine total dose prevents *Plasmodium vivax* relapses in patients with impaired CYP2D6 activity: report of three cases. *Malaria Journal*, 20(1), 1-6.

Dombrowski JG, Souza ST, Curry J, Hinton L, Silva NRM, Grignard L, Gonçalves LA, Gomes AR, Epiphany S, Drakeley C et al. (2017) G6PD deficiency alleles in a malaria-endemic region in the Western Brazilian Amazon. *Malaria Journal* 16:253-262.

Donahue RP, Bias WB, Renwick JH, Mc Kusick VA (1968). Probable assignment of the duffy blood group locus to chromosome 1 in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61: 949-955.

Fermi C. Martinetti P (1905). Studio sul favismo. *Annali di Igiene Sperimentale* 15:76–112.

Ferreira PI, Leite F, Leite A. Polimorfismo genético da glicose-6-fosfato desidrogenase na população da região de Araraquara, Estado de São Paulo. *Rev Ciências Farm Básica e Apl J Basic Appl Pharm Sci Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2014; 35:469–72.

Frank JE (2005). Diagnosis and management of G6PD deficiency. *Am Fam Physician* 72: 1277–82.

Friedrich D.C., Genro J.P., Sortica V.A., Suarez-Kurtz G., de Moraes M.E., Pena S. D.,...& Hutz, M. H. (2014). Distribution of CYP2D6 alleles and phenotypes in the Brazilian population. *PLoS One*, 9(10), e110691.

Gaedigk, A. (2013). Complexities of CYP2D6 gene analysis and interpretation. *International review of psychiatry*, 25(5), 534-553.

Gaedigk, A., & Coetsee, C. (2008). The CYP2D6 gene locus in South African Coloureds: unique allele distributions, novel alleles and gene arrangements. *European journal of clinical pharmacology*, 64(5), 465-475.

Gaedigk A, Ingelman-Sundberg M, Miller N.A., Leeder J.S., Whirl-Carrillo M, Klein T.E., et al. The Pharmacogene Variation (PharmVar) Consortium: incorporation of the human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature database. *Clin Pharmacol Ther*. 2017.

Ganesan, S., Tekwani, B. L., Sahu, R., Tripathi, L. M., & Walker, L. A. (2009). Cytochrome P450-dependent toxic effects of primaquine on human erythrocytes. *Toxicology and applied pharmacology*, 241(1), 14-22.

Gómez-Manzo S, Marcial-Quino J, Vanoye-Carlo A, Serrano-Posada H, Ortega-Cuellar D, González-Valdez A, Castillo-Rodríguez RA, Hernández-Ochoa B, Sierra-Palacios E, Rodríguez-Bustamante E et al. (2016) Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Update and Analysis of New Mutations around the World. *Int J Mol Sci* 17:2069.

Hadley T J, Peiper S C (1997). From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the blood group antigen. *Blood*: 89, p. 3084.

Haldane, J.B.S. Disease and Evolution. *Ricerc. Scient. Suppl.* 19 (1949), 68-75.

Hamel AR, Cabral IR, Sales TS et al. (2002). Molecular heterogeneity of G6PD deficiency in an Amazonian population and description of four new variants. *Blood Cell Mol Dis* 28:399–406.

Harcke S.J., Rizzolo D., Harcke H.T. G6PD deficiency: An update. *JAAPA*. 2019 Nov;32(11):21-26.

Hesselgesser J, Horuk R (1995). Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *J Neurovirol* 5(1):13-26.

Höher, G., Fiegenbaum, M., & Almeida, S. (2018). Molecular basis of the Duffy blood group system. *Blood Transfusion*, 16(1), 93.

Howes RE, Patil AP, Piel FB, Nyangiri OA, Kabaria CW, Gething PW, Zimmerman PA, Barnadas C, Beall CM, Gebremedhin A et al. (2011) The global distribution of the Duffy blood group. *Nat Commun* 2:266.

Howes R.E., Piel F.B., Patil A.P., *et al.* G6PD deficiency prevalence and estimates of affected populations in malaria endemic countries: a geostatistical model-based map. *PLoS Med* 2012;9:e1001339.

Ikin EW, Mourant AE, Pettenkoffer JH, Blumenthal G (1951). Discovery of the expected hemagglutinin anti-FY*B. *Nature*: 168, p. 1077.

Iwamoto S, Omi T, Kajii E, Ikemoto S. Genomic organization of the glycoprotein D gene: Duffy blood group Fya/Fyb alloantigen system is associated with a polymorphism at the 44-amino acid residue. *Blood* 1995, 85:622–626.

Kaplan, M, & Hammerman, C (2011). Neonatal screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: biochemical versus genetic technologies. In *Seminars in perinatology* (Vol. 35, No. 3, pp. 155-161). Elsevier.

Kasehagen LJ, Mueller I, Kiniboro B, Bockarie MJ, Reeder JC, Kazura JW, Kastens W, McNamara DT, King CH, Whalen CC et al. (2007) Reduced *Plasmodium vivax* erythrocyte infection in PNG Duffy-negative heterozygotes. *PLoS One* 2:e336.

Keihanian, F, Basirjafari, S, Darbandi, B, Saeidinia, A, Jafroodi, M, Sharafi, R, & Shakiba, M (2017). Comparison of quantitative and qualitative tests for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the neonatal period. *International journal of laboratory hematology*, 39(3), 251-260.

King CL, Adams JH, Xianli J, Grimberg BT, McHenry AM, Greenberg LJ, Siddiqui A, Howes RE, da Silva-Nunes M, Ferreira MU, Zimmerman PA: Fy(a)/ Fy(b) antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, 108:20113–20118.

Kitada, M. Genetic polymorphism of cytochrome P450 enzymes in Asian populations: Focus on CYP2D6. *Int J Clin Pharmacol Res* 2003;23, 31–35.

Kohlrausch, F. B., Gama, C. S., Lobato, M. I., Belmonte-de-Abreu, P., Gesteira, A., Barros, F., ... & Hutz, M. H. (2009). Molecular diversity at the CYP2D6 locus in healthy and schizophrenic southern Brazilians. *Pharmacogenomics*, 10(9), 1457-1466.

Kurdi-Haidar B, Mason PJ, Berrebi A et al (1990). Origin and spread of the glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD-Mediterranean) in the Middle East. *Am J Hum Genet* 47:1013–9.

Lachgar A, Jaureguiberry G, Le Buenac H, et al (1998). Binding of HIV-1 to RBCs involves the Duffy antigen receptors for chemokines (DARC). *Biomed Pharmacother* 52(10):436-9.

Leslie T, Briceño M, Mayan I, Mohammed N, Klinkenberg E, Sibley CH, Whitty CJM Rowland M et al. (2010) The impact of phenotypic and genotypic G6PD deficiency on risk of *Plasmodium vivax* infection: A case–control study amongst Afghan refugees in Pakistan. *PLoS Med* 7:e1000283.

Louicharoen C, Patin E, Paul R, Nuchprayoon I, Witoonpanich B, Peerapit-tayamongkol C, Casademont I, Sura T, Laird NM, Singhasivanon P et al. (2009). Positively selected G6PD-Mahidol mutation reduces *Plasmodium vivax* density in Southeast Asians. *Science* 326:1546–1549.

Luisada L (1941). Favism: a singular disease affecting chiefly red blood cells. *Medicine* 20:229–250.

Luzzatto L, Mehta A (1989) Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic basis of inherited disease*, 6th edn. McGraw-Hill, New York: 2237-2265.

Luzzatto L. & Mehta A (1995). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* (C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly & D. Valle, eds.), pp. 3367-3398, New York: McGraw-Hill.

Luzzatto L, Mehta A, Vulliamy T (2001). Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. eds. *The metabolic e molecular bases of inherited diseases*. 8. ed. New York: McGraw-Hill, 2001. v.III.

Luzzatto, L, Nannelli, C, & Notaro, R (2016). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Hematology/Oncology Clinics*, 30(2), 373-393.

Luzzatto L, Notaro R (2001). Malaria. Protecting against bad air. *Science* 293(5529):442–3.

Martini G, Toniolo D, Vulliamy T, et al. (1986). Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *The EMBO Journal* 5(8):1849-1855.

Mallinson G, Soo KS, Schall TJ, Pisacka M, Anstee DJ (1995). Mutation in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of na apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype. *Brit J Hematol* 90:823–829.

Marcisin S.R., Reichard G, Pybus B.S. Primaquine pharmacology in the context of CYP 2D6 pharmacogenomics: current state of the art. *Pharmacol Ther.* 2016;161:1-10.

Martins-Campos K.M., Pinheiro W.D., Vitor-Silva S, Siqueira A.M., Melo G.C., Rodrigues I.C., et al. Integrated vector management targeting *Anopheles darlingi* populations decreases malaria incidence in an unstable transmission area, in the rural Brazilian Amazon. *Malar J.* 2012;11:351.

Mathew S, Chaudhuri A, Murty V.V., Pogo A.O. Confirmation of Duffy blood group antigen locus (FY) at 1q22-- > q23 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1994;67(1):68.

McManus, KF, Taravella, AM, Henn, BM, Bustamante, CD, Sikora, M, & Cornejo, OE (2017). Population genetic analysis of the DARC locus (Duffy) reveals adaptation from standing variation associated with malaria resistance in humans. *PLoS genetics*, 13(3), e1006560.

Mercereau-Puijalon O, & Ménard D (2010). *Plasmodium vivax* and the Duffy antigen: a paradigm revisited. *Transfusion clinique et biologique*, 17(3), 176-183.

Mezzacappa MA, Facchini FP, Pinto AC, Cassone AEL, Souza DS, Bezerra MAC, Albuquerque DM, Saad STO and Costa FF (2010) Clinical and genetic risk factors for moderate hyperbilirubinemia in Brazilian newborn infants. *J Perinatol* 30:819-826.

Miller LH, Mason SJ, Dvorar JA, Mc Ginnis MH, Rothman IK (1975). Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: duffy blood group determinants. *Science*: 189, p. 561.

Miller LH, Mason SJ, Clyde DF and McGinniss MH (1976) The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks: the Duffy-blood-group genotype, FyFy. *New England Journal of Medicine* 295:302-304.

Millimono TS, Loua KM, Rath SL, Relvas L, Bento C, Diakite M, Jarvis M, Daries N, Ribeiro LM, Manco L, Kaeda JS (2012). High prevalence of hemoglobin disorders and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in the Republic of Guinea (West Africa). *Hemoglobin* 36(1): 25-37.

Ministério da Saúde, 2018. CONITEC. Triagem neonatal para deficiência de enzima desidrogenase de glicose hepática (glicose-6- fosfato desidrogenase, G-6-PD). Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Esplanada dos Ministérios, Bloco G, Edifício Sede, 8º andar.

Ministério da Saúde, 2022. Secretaria de Vigilância em Saúde SRTVN. Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil. *Boletim Epidemiológico*. Volume 32, n17.

Miranda-De-Carvalho (2001). Caracterização molecular das principais variantes do gene da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em seis populações da Amazônia Legal. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. 80p.

Miwa, S and Fujii, H (1996). Molecular basis of erythroenzymopathies associated with hereditary hemolytic anemia: tabulation of mutant enzymes. *Am J Hematol* 51: 122-132.

Monteiro, W.M., Franca, G.P., Melo, G.C., Queiroz, A.L., Brito, M., Peixoto, H. M., ... & Lacerda, M.V. Clinical complications of G6PD deficiency in Latin American and Caribbean populations: systematic review and implications for malaria elimination programmes. *Malaria journal* 2014;13(1), 70.

Moura-Neto JP, Dourado MV, Reis MG, Gonçalves MS (2008) A novel c.197T®A variant among Brazilian neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Genet Mol Biol* 31:33-35.

Munanga K. Origem e historico do quilombo na Africa. *Rev USP*. 1996;28(6):56–63.

Nagel, R.L. & Ranney, H.M. Genetic epidemiology of structural mutations of the β -globin gene. *Seminars in hematology*, 27: 342-59,1990.

Naranjo, M. E. G., Rodrigues-Soares, F., Penas-Lledo, E. M., Tarazona-Santos, E., Farinas, H., Rodeiro, I., ... & Llerena, A. (2018). Interethnic variability in CYP2D6, CYP2C9, and CYP2C19 genes and predicted drug metabolism phenotypes among 6060 Ibero-and Native Americans: RIBEF-CEIBA Consortium Report on Population Pharmacogenomics. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 22(9), 575-588.

Nebert D.W., Russell D.W. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 360(9340), 1155–1162 (2002).

Neote K, Mak J Y, Kolskowski L F, Schall T J (1994). Functional and biochemical analysis of the cloned duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. *Blood*: 84, p. 44.

Oliveira RAG, Oshiro M, Hirata MH, Hirata RD, Ribeiro GS, Medeiros T and Barretto OCDO (2009) A novel point mutation in a class IV glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD São Paulo) and polymorphic G6PD variants in São Paulo State, Brazil. *Genet Mol Biol* 32:251-254.

Oliveira-Ferreira J, Lacerda M.V., Brasil P, Ladislau J.L., Tauil P.L., & Daniel-Ribeiro C.T. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria journal* 2010, 9(1), 115.

Olsson ML, Hansson C, Avent ND, Akesson IE, Green CA and Daniels GL (1998) A clinically applicable method for determining the Duffy (Fy) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion* 38:168-173.

Pante-De-Sousa, G., Mousinho-Ribeiro, R. D. C., Dos Santos, E. M., & Guerreiro, J. F. (1999). beta-globin haplotypes analysis in Afro-Brazilians from the Amazon region: evidence for a significant gene flow from Atlantic West Africa. *Annals of human biology*, 26(4), 365-373.

Peixoto, H.M., Brito, M.A., Romero, G.A., Monteiro, W.M., Lacerda, M.V., & Oliveira, M.R. Cost-effectiveness analysis of rapid diagnostic tests for G6PD deficiency in patients with *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon. *Malaria journal* 2016;15(1), 82.

Pereira da Rocha, A (2005). Caracterização Molecular Da Enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase Em Populações Humanas Da Amazônia. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. 2005. 105p.

Pereira da Silva, L.H; Oliveira, V.E.G. O desafio da malária: o caso brasileiro e o que se pode esperar dos progressos da era genômica. *Ciência & Saúde Coletiva* 2002;7(1):49-63.

Perna SJQ, Cardoso GL, Guerreiro JF (2007) Duffy blood group genotypes among African-Brazilian communities of the Amazon region. *Genetics and Molecular Research* 6:166–172.

Petit F, Bailly P, Chiaroni J and Mazières S (2016) Sub-Saharan red cell antigen phenotypes and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency variants in French Guiana. *Malaria journal*, 15:310.

Pogo A.O, Chaudhuri A: The Duffy protein: a malarial and chemokine receptor. *Semin Hematol* 2000, 37:122–129.

Potter, B. M., Xie, L. H., Vuong, C., Zhang, J., Zhang, P., Duan, D., ... & Marcsisin, S. R. (2015). Differential CYP 2D6 metabolism alters primaquine pharmacokinetics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(4), 2380-2387.

Pybus B.S., Marcsisin S.R., Jin X., Deye G., Sousa J. C., Li Q., et al. The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP 2D6. *Malar J* 2013;12, 212.

Ramos-Junior WM, Sardinha JF, Costa MR et al (2010). Clinical aspects of hemolysis in patients with *P. vivax* malaria treated with primaquine, in the Brazilian Amazon. *Braz J Infect Dis* 14:410–2.

Rosenberg, Ronald (2007). "Plasmodium vivax in Africa: hidden in plain sight?" *Trends in parasitology* 23.5 193-196.

Ruwende C and Hill H (1998). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *Journal of Molecular Medicine*, 76:581–588.

Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, Yates SNR, Kwiatkowski D, Gupta A, Warn P, Allsopp C EM, Gilbert SC, Peschu N, Newbold CI, Greenwood B M, Marsh K, Hill A V S (1995). Natural protection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* 376:246–249.

Saad ST, Salles TS, Carvalho MH, Costa FF (1997). Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase in Brazil. *Hum. Hered*, 47 (1): 17-21.

Salles, P. F., Perce-da-Silva, D. S., Rossi, A. D., Raposo, L. R., Ramirez Ramirez, A. D., Pereira Bastos, O. M., ... & Machado, R. L. D. (2021). CYP 2D6 Allele Frequency in Five Malaria Vivax Endemic Areas From Brazilian Amazon Region. *Frontiers in pharmacology*, 12, 542342.

Sansone, G and Segni, G (1958). [New aspects of the biochemical alterations in the erythrocytes of patients with favism: almost complete absence of glucose-6-phosphate dehydrogenase.]. *Boll Soc Ital Biol Sper* 34: 327–329.

Santana, MS, Monteiro, WM, Siqueira, AM, Costa, MF, Sampaio, V, Lacerda, MV, & Alecrim, MG (2013). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient variants are associated with reduced susceptibility to malaria in the Brazilian Amazon. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107(5), 301-306.

Santana, MS, Monteiro, WM, Costa, MR, Sampaio, VS, Brito, MA, Lacerda, MV, & Alecrim, MG (2014). High frequency of diabetes and impaired fasting glucose in patients with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Western Brazilian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 91(1), 74-76.

Santos HC, Horimoto AV, Tarazona-Santos E, Rodrigues-Soares F, Barreto ML, Horta BL, Lima-Costa MF, Gouveia MH, Machado M, Silva TM et al. (2016) A minimum set of ancestry informative markers for determining admixture proportions in a mixed American population: the Brazilian set. 1. *Eur J Hum Genet* 24:725-731.

Santos, SEB; Guerreiro, JF; Salzano, FM; Weimer, TA; Hutz, MH; Franco, MHL (1987). Mobility, blood genetic traits and race mixture in the Amazonian population of Oriximina. *Rev. Brasil. Genetic*, 1987, 10: 745–59.

Scantamburlo G., Tziolia K., Zopf M., Bernardinelli E., Soyak S. M., Civello D. A., ... & Paulmichl, M. (2017). Allele drop out conferred by a frequent CYP2D6 genetic variation for commonly used CYP2D6*3 genotyping assays. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(6), 2297-2309.

Schneider H, Guerreiro JF, Santos SEB, Weimer TA, Schneider MPC, Salzano FM (1987). Isolate breakdown in Amazonia - The blacks of the Trombetas river, 10:565–74.

Scopel KKG, Fontes CJF, Nunes AC, Horta MF, Braga TA (2004) High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacas-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Trop* 90:61-64.

Siqueira A.M., Mesones-Lapouble O, Marchesini P, Sampaio V.S., Brasil P, Tauil P.L., et al. *Plasmodium vivax* landscape in Brazil: scenario and challenges. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95:87–96.

Sistonen J, Fuselli S, Palo J.U., Chauhan N, Padh H, Sajantila A. Pharmacogenetic variation at CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 at global and microgeographic scales. *Pharmacogen Genom*. 2009;19:170–9.

Sistonen, J., Sajantila, A., Lao, O., Corander, J., Barbujani, G., & Fuselli, S. (2007). CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. *Pharmacogenetics and genomics*, 17(2), 93-101.

Sortica V.A., Lindenau J.D., Cunha M.G., Ohnishi, M.D., Ventura, A.M.R., Ribeiro-dos-Santos, A.K.,... & Hutz, M. H. (2016). The effect of SNPs in CYP450 in

- chloroquine/primaquine *Plasmodium vivax* malaria treatment. *Pharmacogenomics*, 17(17), 1903-1911.
- Sousa, TND, Kano, FS, Brito, CFAD, & Carvalho, LH (2014). The Duffy binding protein as a key target for a *Plasmodium vivax* vaccine: lessons from the Brazilian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(5), 608-617.
- Stadem, PS, Hilgers, MV, Bengo, D, Cusick, SE, Ndidde, S, Slusher, TM, & Lund, TC (2017). Markers of oxidative stress in umbilical cord blood from G6PD deficient African newborns. *PloS one*, 12(2), e0172980.
- Suarez-Kurtz, G. (2021). Impact of CYP2D6 Genetic Variation on Radical Cure of *Plasmodium vivax* Malaria. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 110(3), 595-598.
- Tanaka, M, Takahahi, J, Hirayama, F, & Tani, Y (2011). High-resolution melting analysis for genotyping Duffy, Kidd and Diego blood group antigens. *Legal Medicine*, 13(1), 1-6.
- Teh, L. K., & Bertilsson, L. (2011). Pharmacogenomics of CYP2D6: molecular genetics, interethnic differences and clinical importance. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 1112190300-1112190300.
- Tishkoff SA, Varkonyi R, Cahinhinan N, Abbes S, Argyropoulos G, Stro-Bisol G, Drousiotou A, et al (2001). Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human G6PD: recent origin of alleles that confer malarial resistance. *Science* 293:455–462.
- Tournamille C, Colin Y, Cartron JP and Kim CLV (1995b) Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individual. *Nat Genet* 10:224–228.
- Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Cartón P J and Colin Y (1995a) Molecular basis and PCR- typing of the FY*A/FY*B blood group polymorphism. *Human Genetic* 95:407-410.
- Tsai, KJ, Hung, IJ, Chow, CK, Stern, A, Chao, SS, & Chiu, DTY (1998). Impaired production of nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide in glucose 6-phosphate-dehydrogenase-deficient granulocytes. *FEBS letters*, 436(3), 411-414.
- Valencia SH, Ocampo ID, Arce-Plata MI, Recht J and Arévalo-Herrera M (2016) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency prevalence and genetic variants in malaria endemic areas of Colombia. *Malaria journal* 15:291.
- Vergolino-Henry, A e Figueiredo, N (1990). A presença africana na Amazônia colonial: uma notícia histórica. *Arq. Público do Pará* 1: 27-66.
- Vizzi E, Bastidas G, Hidalgo M, Colman L and Pérez HA (2016) Prevalence and molecular characterization of G6PD deficiency in two *Plasmodium vivax* endemic areas in Venezuela: predominance of the African A-202A/376G variant. *Malaria journal* 15:19.
- Voet D, Voet J G (2006). *Bioquímica*. Porto Alegre: Artmed.
- Weimer T.A., Salzano F.M., Westwood B., Beutler E. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants from Brazil. *Hum Biol.* 1993;65:41–47.

Weimer TA, Salzano FM, Westwood B et al. (1998) G6PD variants in three South American ethnic groups: population distribution and description of two new mutations. *Hum Hered* 48:92–6.

World Health Organization Working Group. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bull World Health Organ* 1989;67:601–11.

World Malaria Report. France: World Health Organization; 2021. ISBN 978-92-4-004049-6.

Yazdanbakhsh, K, Rios, M, Storry, JR, Kosower, N, Parasol, N, Chaudhuri, A, & Reid, ME (2000). Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. *Transfusion*, 40(3), 310-320.

Zhou S.F. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: part I. *Clin Pharmacokinet* 2009;48:689–23.

Zimmerman R.H. Ecology of malaria vectors in the Americas and future direction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87:371–83.

Zimmerman, P.A., Ferreira, M. U., Howes, R. E., & Mercereau-Puijalon, O. (2013). Red Blood Cell Polymorphism and Susceptibility to *Plasmodium vivax*. *The Epidemiology of Plasmodium Vivax*, 27–76.

Zimmerman P.A., Woolley I, Masinde G.L., Miller S.M., McNamara D.T., Hazlett F, Mgone C.S., Alpers M.P., Genton B and Kazura J.W. (1999) Emergence of FY*A (null) in a *Plasmodium vivax*-endemic region of Papua New Guinea. *Proc Natl Acad Sci* 96:13973–13977.

Zúñiga, MA, Mejía, RE, Sánchez AL, Sosa-Ochoa WH and Fontecha GA (2015) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency among malaria patients of Honduras: a descriptive study of archival blood samples. *Malaria Journal* 14:308.

8. REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS

BRASIL. Ministério da Saúde. SIVEP-Malária: Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica: notificação de casos. Disponível em: http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/. Acesso em: 13 dez. 2019.

CPISP, Comissão Pró-Índio São Paulo. Disponível em <<http://www.cpisp.org.br/>> Acesso em: 20/05/2020.

Equipe de Conservação da Amazônia (Ecam), 2020. Disponível em: <http://ecam.org.br/> Acesso em: 20/05/2020.

Instituto EcoBrasil. Disponível em: [/http://ecobrasil.eco.br/ecobrasil/o-que-e-ecobrasil](http://ecobrasil.eco.br/ecobrasil/o-que-e-ecobrasil) Acesso em: 20/05/2020.

The Pharmacogene Variation (PharmVar) Consortium. Disponível em: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6> Acesso em: 01/11/2022.

ANEXO TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA