



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA
DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À
HEMATOLOGIA**



**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA DESIDROGENASE DE
GLICOSE 6-FOSFATO E ANTÍGENOS DUFFY NA MALÁRIA VIVAX E
MUTAÇÕES DE G6PD EM DOADORES DE SANGUE**

NATÁLIA SANTOS FERREIRA

**MANAUS
2019**

NATÁLIA SANTOS FERREIRA

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA DESIDROGENASE DE
GLICOSE 6-FOSFATO E ANTÍGENOS DUFFY NA MALÁRIA VIVAX E
MUTAÇÕES DE G6PD EM DOADORES DE SANGUE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas- HEMOAM, para a obtenção do grau de *Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia*.

Orientador: Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto

**MANAUS
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

f383a Ferreira, Natália Santos
Associação dos polimorfismos genéticos da desidrogenase de glicose-6-fosfato e antígenos duffy na malária vivax e mutações de g6pd em doadores de sangue / Natália Santos Ferreira. Manaus : [s.n], 2019.
99 f.: color.; 8 cm.

Dissertação - PPGH - Mestrado de Ciências Aplicadas a Hematologia - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.
Inclui bibliografia
Orientador: Neto, José Pereira de Moura

1. malária Vivax. 2. Sistema Duffy. 3. G6PD. I. Neto, José Pereira de Moura (Orient.). II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Associação dos polimorfismos genéticos da desidrogenase de glicose-6-fosfato e antígenos duffy na malária vivax e mutações de g6pd em doadores de sangue

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

FOLHA DE JULGAMENTO**AVALIAR ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA
DESIDROGENASE DE GLICOSE-6-FOSFATO E ANTÍGENOS
DUFFY EM PACIENTES COM MALÁRIA VIVAX****NATÁLIA SANTOS FERREIRA**

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.”

Banca Julgadora:

**Prof. Dr. Cristina Motta Ferreira
(Presidente da Banca)**

**Prof. Dr. Cristina Borborema dos Santos
(Membro Titular)**

**Pro^a. Dr. Patrícia Danielle Oliveira Almeida
(Membro Titular)**



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À HEMATOLOGIA – UEA/HEMOAM**



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 09/2019

1
2
3 Aos onze dias do mês de dezembro do ano de 2019, às 14h00, realizou-se na sala de aula 10,
4 Bloco E, 1º andar da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas –
5 HEMOAM, sito Av. Constantino Nery, 4397 – Chapada, a Defesa de Dissertação de
6 Mestrado do (a) aluno (a) **Natália Santos Ferreira**, sob o título “ASSOCIAÇÃO DOS
7 **POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA DESIDROGENASE DE GLICOSE-6-**
8 **FOSFATO E ANTÍGENOS DUFFY NA MALÁRIA VIVAX**”, tendo como orientador (a)
9 o Prof(a) Dr(a) **José Pereira de Moura Neto**, segundo encaminhamento do(a) Prof. (a) Dr(a)
10 Cristina Motta Ferreira, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas
11 a Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade
12 do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que
13 deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído a (o) aluna (o) o conceito
14 discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Profa. Dra. Cristina Motta Ferreira - Presidente	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) ()	Assinatura: <u>Cristina Motta Ferreira</u> CPF: <u>309603552-00</u>
Profa. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos - UFAM	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) ()	Assinatura: <u>Cristina Santos</u> CPF: <u>136.823.992-00</u>
Profª. Dra. Patrícia Danielle Oliveira Almeida - UFAM	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) ()	Assinatura: <u>Patrícia Danielle O. de Almeida</u> CPF: <u>516.759.512-68</u>

15
16 O parecer final da Defesa de Dissertação foi :

17
18 Aprovado

19 Não Aprovado

20
21
22
23 Cristina Motta Ferreira
24 Presidente da Banca Examinadora
25

AGRADECIMENTOS

Durante esses dois anos de crescimento profissional, algumas colaborações foram essenciais para o bom proveito da trajetória, me permitindo compartilhar momentos iguais em diferentes visões daqueles que participaram junto a mim.

Minha maior gratidão é a Deus, quem me conhece profundamente e colocou em meu caminho pessoas comprometidas e dedicadas para me auxiliar nas minhas dificuldades, me confortar nos momentos necessários e proporcionar afeto, carinho e compreensão durante esta etapa, sempre me mostrando o seu extremo cuidado para comigo.

Agradeço a toda minha família, pelas compreensões nas ausências e nos atrasos em compromissos. Em especial, minha mãe, Nunaclely Santos Ferreira, por sempre sonhar cada etapa da minha vida junto comigo sem jamais soltar a minha mão, ainda que eu desacreditasse que eu conseguiria, sem jamais me permitir que eu me conformasse com qualquer etapa aparentemente fracassada. Ao meu pai, Celestino Ferreira Neto, pela constante preocupação e cuidado com meu bem-estar físico, sempre atento as pequenas necessidades. Aos meus irmãos, Natally e Natanael, sempre companheiros e atenciosos.

Agradeço ao meu noivo, Sandro Olavo Ferreira, pelo companheirismo e por prezar pela alegria dos momentos compartilhados, por sempre colaborar em meus desafios, sendo força e conforto.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular da UFAM, por serem parceiros sempre solícitos e que tornam o cotidiano mais leve. Ressalto meus agradecimentos à amiga feita nessa caminhada, Ana Carla Dantas, por sempre ser tão generosa e cuidadosa com todos.

Agradeço à Universidade do Estado do Amazonas, à Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas junto à Coordenação do PPGH, por disponibilizar o Mestrado como ferramenta potencial de ascensão, promoção, fomento e valorização das atividades relacionadas à Hematologia e Hemoterapia no Norte do país.

Agradeço a Fundação de Medicina Tropical e aos participantes desta pesquisa, que, ao aceitarem contribuir com este projeto foram essenciais para o desenvolvimento e conclusão do trabalho.

Agradeço aos colegas e amigos da pós-graduação que compartilharam comigo suas experiências e se tornaram companhias importantes e especiais.

Agradeço ao corpo docente do Programa, professores dispostos e solícitos em agregar conhecimentos, experiências e inúmeras lições de vida. Gratidão pela dedicação em

formarem Mestres conscientes do seu saber científico e da importância da sensibilidade aos cuidados relacionados aos pacientes e participantes da pesquisa.

Por fim, agradeço ao meu orientador, professor Dr. José Pereira de Moura Neto, por sempre mostrar confiança no meu potencial e me encorajar a ultrapassar meus limites. Por sempre ser um orientador disposto a extrair de todos os seus alunos o nosso melhor potencial, respeitando a individualidade de cada personalidade, valorizando nossas opiniões como parte igual da equipe. Repassando valores profissionais sem perder a essência humanitária.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Fundação de amparo à pesquisa do estado do Amazonas – FAPEAM, em parceria com a Coordenação de amparo Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior – CAPES, por meio do Acordo para Cooperação Técnica e Científica, apoiou este projeto de pesquisa,

por meio da concessão de bolsa de estudo, durante 06 meses.

O projeto de pesquisa faz parte de dois projetos: - Um maior intitulado “Caracterização clínica da malária complicada por *Plasmodium vivax*”, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), em junho de 2009, pelo parecer nº343/2009, protocolo de nº 25.000.011.792/2009-15. E outro estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) (número de aprovação 343/2009), intitulado “Estudo dos polimorfismos DUFFY em pacientes infectados com *Plasmodium vivax*” com o parecer como o número de CAAE-0004.0.112.000-11 em 29/12/2011.

RESUMO

A malária é a doença parasitária mais representativa do mundo. No entanto, no Brasil, o *P. vivax* representa a espécie mais prevalente, especialmente na região amazônica, onde várias clínicas têm demonstrado maior gravidade, principalmente nos casos de anemia grave. Alguns estudos relataram uma alta prevalência dos alelos Duffy FYA e FYB entre pacientes com malária *falciparum* e *vivax*, enquanto outros genótipos encontrados foram associados a taxas de infecção diminuídas. A indução de hemólise em face da deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) pelo uso de drogas antimaláricas adicionou estudos em áreas endêmicas correlacionadas com a alta prevalência de deficiência de G6PD. Este estudo tem como objetivo avaliar a associação de sinergismo entre polimorfismos G6PD e antígenos Duffy em pacientes com malária *vivax* no estado do Amazonas. A caracterização da G6PD foi realizada pela técnica de PCR em tempo real, enquanto que para os antígenos Duffy foram genotipados por PCR-RFLP. A genotipagem molecular foi realizada em 225 pacientes com malária *vivax* grave e não grave, e em 1200 doadores de sangue do Amazonas. Foi revelado entre os pacientes de malária, 12,94% portadores para o SNP G202A e 19,19% para A376G. E para Fenótipos Duffy foram identificados: 31,11% (a+b-), 43,55% (a+b+), 24,9% (a-b+) e 0,44% (a-b-). O genótipo FYA/FYB esteve mais frequente entre os pacientes. Além disso, os genótipos G202A/A376G demonstraram frequência mais elevada na malária grave, sendo para a c.202 (RR = 5,57 - p <0,001) e para A376G (RR: 4,49 - p <0,001) fortemente associado a episódios anteriores de malária (p <0,001). Constatamos ainda uma frequência de 8,27% do polimorfismo G6PD entre os doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas em doadores de sangue. Pesquisas adicionais para deficiência de G6PD e antígenos Duffy seriam valiosas, especialmente focadas em áreas de alta densidade populacional. Concluimos que os SNPs G202A e A376G foram fatores de risco para o desenvolvimento de malária grave por *vivax* e que o diagnóstico molecular antes do tratamento pode ser necessário na população amazônica.

Palavras Chaves: Malaria *vivax*; G6PD; Duffy; Manaus

ABSTRACT

Malaria is the most representative parasitic disease in the world. However, in Brazil, *P. vivax* represents the most prevalent species, especially in the Amazon region, where several clinics have shown greater severity, especially in cases of severe anemia. Some studies have reported a high prevalence of the Duffy FYA and FYB alleles among patients with *falciparum* and *vivax* malaria, while other genotypes found have been associated with decreased infection rates. The induction of hemolysis due to glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency by the use of antimalarial drugs has added studies in endemic areas correlated with the high prevalence of G6PD deficiency. This study aims to evaluate the association of synergism between G6PD polymorphisms and Duffy antigens in patients with *vivax* malaria in the state of Amazonas. The characterization of G6PD was performed using the real-time PCR technique, whereas for Duffy antigens they were genotyped by PCR-RFLP. Molecular genotyping was performed in 225 patients with severe and non-severe *vivax* malaria, and in 1,200 blood donors from Amazonas. Among malaria patients, 12.94% had SNP G202A and 19.19% had A376G. And for Duffy Phenotypes, 31.11% (a+b-), 43.55% (a+b+), 24.9% (a-b+) and 0.44% (a-b-) were identified. The FYA / FYB genotype was more frequent among patients. In addition, the G202A / A376G genotypes showed a higher frequency in severe malaria, being for c.202 (RR = 5.57 - p <0.001) and for A376G (RR: 4.49 - p <0.001) strongly associated with previous episodes of malaria (p <0.001). We also found a frequency of 8.27% of the G6PD polymorphism among blood donors from the Hematology and Hemotherapy Foundation of Amazonas in blood donors. Additional research for deficiency of G6PD and Duffy antigens would be valuable, especially focused on areas of high population density. We conclude that SNPs G202A and A376G were risk factors for the development of severe *vivax* malaria and that molecular diagnosis before treatment may be necessary in the Amazonian population.

Keywords: Malaria *vivax*; G6PD; Duffy; Manaus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Atuação da enzima G6PD na via das pentoses-fosfato	14
Figura 2: Representação esquemática da mutação pontual no sítio Gata-1	20
Figura 3: Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2018.....	24
Figura 4: Fluxo Mundial de <i>Plasmodium vivax</i> nos últimos 25 mil anos	26

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação das variantes de G6PD segundo WHO de acordo com o fenótipo e os níveis de atividade enzimática	17
Quadro 2: Ilustração do sistema sanguíneo Duffy e seus alelos	18
Quadro 3: Expressão da glicoproteína Duffy nos diferentes fenótipos e genótipos Duff...	21
Quadro 4: Incidência de malária no ano de 2018 por Estado da Região Amazônica. Ministério da Saúde	24
Quadro 5: Variantes da G6PD, seus éxons e classes	38
Quadro 6: Identificação das sondas para a técnica de PCR em Tempo Real	39

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

AHA	Anemia Hemolítica Aguda
ALT	Aspartato Aminotransferase
AST	Alanina Aminotransferase
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CNS	Conselho Nacional de Segurança
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DBL	DuffyBindingLigand
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido EtilenodiaminoTetracético
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FMTAM	Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
G6P	Glicose 6-fosfato
G6PD	desidrogenase na Glicose 6-fosfato
GSSH	Glutationa Oxidada
Hb	Hemoglobina
HbF	Hemoglobina Fetal
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
Ht	Hematócrito
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Kb	Kilobase –Mil pares de base
LDH	Desidrogenase Láctea
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana em Saúde
PHHF	Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal
RMM	Região Metropolitana de Manaus
TA	Talassemia Alfa
TCLE	Termo de Compromisso Livre e Esclarecido
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
VCM	Volume Corpuscular Médio
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

SUMÁRIO

RESUMO CIENTÍFICO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE QUADROS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Desidrogenase na Glicose 6-Fosfato	14
1.1.1. Bases genéticas da enzima G6PD	15
1.1.2. Distribuição global da deficiência de G6PD	15
1.1.3. Manifestações clínicas da deficiência na G6PD.....	16
1.2. Sistema do Grupo Sanguíneo Duffy	17
1.2.1. Polimorfismos no Grupo Sanguíneo Duffy	20
1.3. Malária	22
1.3.1. Epidemiologia da Malária	23
1.3.2. Malária <i>Vivax</i>	25
1.3.3. Antígeno Duffy e Malária	27
1.4. Doadores de sangue	28
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo Geral	31
2.2. Objetivos Específicos	31
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	32
3.1. Casuística	32
3.2. Obtenção das amostras	35
3.3. Análises Hematológicas	35
3.4. Extração de DNA	35
3.5.1. Genotipagem do Antígeno Duffy	36
3.5.2. Genotipagem da G6PD	37
3.6. Análises Estatísticas	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
Artigo 1	42
Artigo 2	70
5. CONCLUSÃO	83
6. REFERÊNCIAS	84
7. ANEXOS.....	95

1. INTRODUÇÃO

1.1. Desidrogenase da Glicose-6-Fosfato

A deficiência na desidrogenase da Glicose 6-fosfato (G6PD) é uma das mais comuns e importantes eritroenzimopatias. A G6PD é uma enzima citoplasmática cuja função principal na hemácia é a prevenção e diminuição de danos oxidativos pela eliminação de radicais livres ⁽¹⁾.

A sua sintomatologia está relacionada à ruptura da membrana das hemácias, em intensidade variável, na presença de agentes oxidantes como alguns fármacos e alimentos ⁽²⁾.

A atividade enzimática da G6PD é essencial para todas as células do corpo, especialmente nas hemácias, pois é ela quem catalisa o primeiro mecanismo de reação da via hexose monofosfato, sendo importante na manutenção dos níveis de glutathiona reduzida, agindo sobre o substrato glicose-6-fosfato, gerando NADPH, que age como cofator da glutathiona-redutase na geração de glutathiona reduzida, que detoxifica o peróxido de hidrogênio protegendo a hemácia de danos oxidativos (Figura 1) ^(3,4).

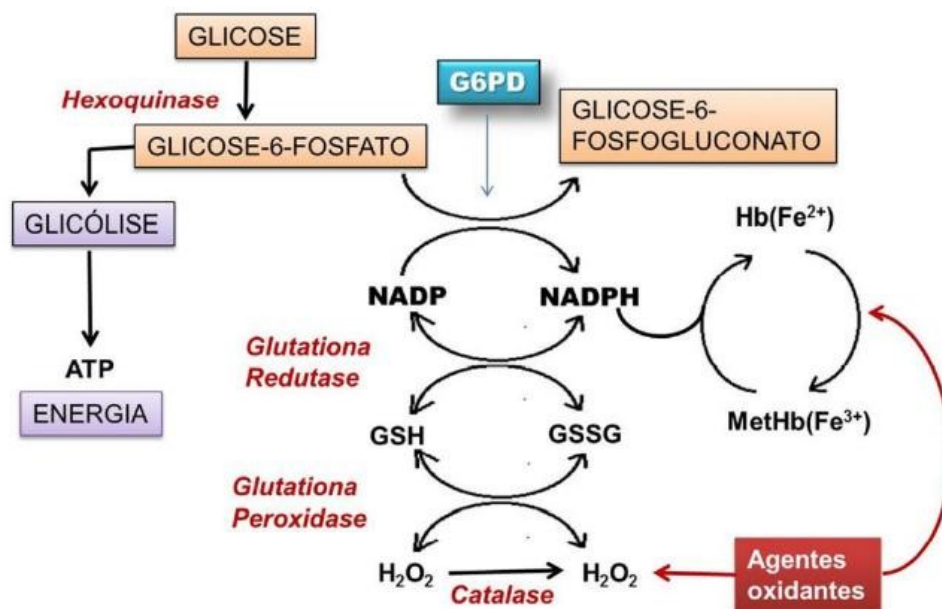


Figura 1: Atuação da enzima G6PD na via das pentoses-fosfato. O NADPH é produzido pela ação da G6PD. Serve como doador de prótons para a regeneração de glutathiona reduzida e como ligante para a catalase. Também serve como doador de elétrons para outras reações relacionadas ao equilíbrio redox. ADAPTADO DE: LUZZATTO, 2009 ⁽⁷⁾.

Na presença de agentes oxidantes ocorre o contato e a formação de radicais livres ou peróxidos, ocasionando queda nos níveis de GSSH, sendo sua restauração dependente de aporte de NADPH. Nessas condições, a única enzima que pode ser ativada para suprir o NADPH é a G6PD. Se as concentrações de NADPH não podem ser mantidas, como na deficiência de G6PD, os níveis de GSSH caem e ocorre maior dano oxidativo na célula, seguido de hemólise ⁽⁵⁾.

1.1.1. Bases genéticas da enzima G6PD

O gene da enzima está localizado na região telomérica do braço longo do cromossomo X (banda q28), formado por 13 éxons e 12 íntrons, tendo tamanho em torno de 20 Kb no total, codificando 515 aminoácidos ⁽⁶⁻⁸⁾.

Mais de 400 mutações diferentes já foram descritas, sendo a maioria de substituição simples. A maioria destas mutações leva a diminuição da estabilidade da enzima, nunca perdendo inteiramente sua atividade enzimática, porque a sua perda completa é incompatível com a vida ⁽⁹⁾.

A deficiência na G6PD é hereditária, transmitida como caráter recessivo ligado ao cromossomo X, portanto, os homens apresentam-se hemizigotos, enquanto que as mulheres podem ser heterozigotas ou homozigotas, manifestando deficiência somente quando em homozigose ⁽⁸⁻¹⁰⁾.

As variantes de G6PD diferem-se em relação à atividade da enzima, mobilidade eletroforética, Km (constante de Michaelis) para seus substratos (G6P e NADP). São elas que determinam diferentes graus de alterações na atividade enzimática ^(11,12).

1.1.2. Distribuição global da deficiência na G6PD

Estima-se que cerca de 400 milhões de pessoas no mundo sejam afetadas pela deficiência na enzima G6PD, e apenas uma parcela desses indivíduos apresentam manifestações clínicas ^(13,14).

Seu padrão de distribuição espacial acompanha a ocorrência de malária, com frequência descritas entre 3 a 28% na África, 6 a 16% na Ásia: até 11% na Índia, e 3 a 29% na Península Arábica ⁽¹⁵⁻²¹⁾.

Entre as variantes da G6PD, as que possuem maior relevância epidemiológica são as variantes Africana ou A- em descendentes do continente africano e a variante Mediterranean, encontrada normalmente entre italianos, gregos, judeus orientais, árabes e persas ⁽²²⁾.

Em Manaus, um estudo realizado por Santana e col. (2013), estimou a prevalência da deficiência na G6PD em 4,5%, sendo 3,8% correspondendo aos indivíduos portadores da variante Africana e 0,7% portadores da variante Mediterranean ⁽²³⁾.

Estudos desenvolvidos entre populações do gênero masculino, de diferentes regiões do Brasil, demonstraram prevalências em torno de 10,4% em negros e 2,5% em caucasianos em Campinas-SP ⁽²⁴⁾ e 10% entre negros; 1 a 3% entre caucasianos em São Paulo e Rio Grande do Sul ⁽²⁵⁾ e. No ano de 2002, em 4.621 doadores de sangue do gênero masculino, foi encontrada deficiência em 1,7% ⁽²⁶⁾.

Estudos envolvendo recém-nascidos nos estados de Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Paraíba e Bahia obtiveram resultados médios de prevalência de 4,75% ⁽²⁷⁻³⁰⁾.

No estado de Rondônia, um estudo observou por técnicas moleculares 12% de portadores de mutações da G6PD em populações susceptíveis à malária ⁽³¹⁾.

Tem sido relatado ao longo dos anos casos de hemólise por administração do antimalárico primaquina, na Fundação de Medicina Tropical (FMTAM). O resultado de um destes estudos demonstrou que dentre 71 indivíduos com diagnóstico clínico de metemoglobinemia pós uso de primaquina, 51,4% apresentaram deficiência da G6PD ⁽³²⁾. Em outro estudo, com indivíduos com malária e tratados com primaquina, através da dosagem qualitativa da enzima encontrou-se 3,5% de deficiência ⁽³³⁾.

1.1.3. Manifestações clínicas da deficiência na G6PD

A G6PD apresenta-se de maneira assintomática para a maioria das pessoas durante toda a sua vida, independente do grau de deficiência. A principal exceção é a de portadores de variantes genotípicas da enzima que conferem hemólise crônica, todavia, são extremamente raras. A doença geralmente se apresenta como hemólise aguda após estresse oxidativo desencadeado por agentes como drogas, infecções ou ingestão de fava (16,18).

A manifestação clínica mais comum na deficiência da G6PD é a anemia hemolítica aguda, estas complicações são geralmente desencadeadas pela ingestão de determinados alimentos, determinadas infecções e uso de medicamentos ^(19,20). A

prevenção das crises hemolíticas induzida por medicamentos é possível selecionando medicamentos alternativos que não apresentem risco ou que apresentem riscos menores de indução das crises (Quadro 1) ⁽³⁴⁾.

Quadro 1: Classificação das variantes de G6PD segundo OMS de acordo com o fenótipo e os níveis de atividade enzimática.

OMS	Atividade Enzimática	Fenótipo
I	Deficiência severa	Anemia hemolítica não esferocítica crônica
II	<10%-deficiência moderada	Risco de anemia hemolítica aguda
III	1-60% Deficiência moderada	Risco de anemia hemolítica aguda
IV	60-150% atividade normal	Sem manifestações clínicas
V	>150% atividade aprimorada	Sem manifestações clínicas

O grau de anemia crônica na anemia hemolítica não esferocítica devido a deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase tem sido variável, alguns pacientes têm hemólise compensada, enquanto outros necessitam de transfusões alternadas ⁽³⁵⁾.

Alguns autores sugerem que as hemácias deficientes em G6PD sejam menos resistentes à hipertermia mantida e não suportem o aumento de oxidantes produzidos pelos granulócitos durante a fagocitose ⁽³⁶⁾.

Atualmente, o diagnóstico prévio da deficiência na G6PD é indicado antes da utilização da primaquina. No entanto, devido à escassez de plataformas de testagem rápida validadas permite-se o uso irrestrito da medicação e indivíduos portadores da deficiência são expostos ao risco de desenvolver AHA. Para indivíduos sabidamente portadores de deficiência intermediária, a dosagem de primaquina indicada é de 0,75 mg/kg de peso em doses semanais durante 8 semanas. Para indivíduos com deficiência grave, a primaquina é contraindicada ⁽³⁷⁾.

1.2. Sistema do Grupo Sanguíneo Duffy

O sistema Duffy foi descoberto por Cutbushe (1950) através da detecção de uma aglutinina no soro de um paciente hemofílico politransfundido que ainda não havia sido reconhecida como antígeno de grupo sanguíneo. Esse anticorpo foi chamado anti-Fya,

em homenagem a um senhor de sobrenome Duffy, que reagia com 64,9% das 205 amostras de sangue testadas de indivíduos não aparentados na população inglesa ⁽³⁸⁾. Um ano depois, Ikin. (1951), descreveram o anti-Fyb que definia o par antitético do antígeno Fya. Sanger. (1955) observaram que o fenótipo Fy (a-b-) era o mais comum em afro-americanos e que provavelmente representava um produto de um alelo silencioso, FY nulo ^(39,40).

A glicoproteína Duffy encontra-se em diversos tecidos não eritróides como, pulmão, baço, rim, coração, músculo, cérebro, placenta, duodeno, pâncreas, intestino, glândula tireóide e em células Purkinj e do cerebelo, é mais abundante na superfície de reticulócitos, e pouco expresso em eritrócitos maduros ⁽⁴¹⁻⁴³⁾.

O gene FY possui duas formas alélicas capazes de codificar os antígenos Fya e Fyb. Os alelos FYA (FY *01) e FYB (FY *02) se diferenciam por uma substituição de base no nucleotídeo 125. No alelo FY *01 a base é guanina enquanto que no alelo FY* 02 a base é adenina. Essa troca de bases produz códons diferentes para o aminoácido 42, o alelo FY *01 produz um códon para glicina e o alelo FY *02 produz códon para ácido aspártico. Essa substituição de aminoácidos define os dois antígenos antitéticos. Essa variação leva à identificação dos fenótipos Fy(a+b-), Fy(a-b+) e Fy(a+b+) ⁽⁴⁴⁾.

Wasniowska (2004) realizaram estudos com anticorpos monoclonais e demonstraram que o sítio de maior imunogenicidade para os antígenos Fya/Fyb está localizado entre os aminoácidos 37 e 47 ⁽⁴⁵⁾.

Quadro 2: Ilustração do sistema sanguíneo Duffy e seus alelos

	Nome do alelo	Alteração de nucleotídeos
Fenótipo		
FY: 1 ou Fy (a +)	<i>EF * 01 ou EF * A</i>	c. 125A> G
EF: 2 ou EF (b +)	<i>EF * 02 ou EF * B</i>	
Apenas células eritróides (a - b -)	<i>EF * 01N.01</i>	c.-67T> C
Fy (a - b -)	<i>EF * 01N.02</i>	c.281_295del
Fy (a - b -)	<i>EF * 01N.03</i>	c.408G> A
Fy (a - b -)	<i>EF * 01N.04</i>	c.287G> A
Fy (a - b -)	<i>EF * 01N.05</i>	c.327delC
Fy (a - b -)	<i>EF * 01N.06</i>	c.395G> A
Fy (a - b -)	<i>EF * 01N.07</i>	c.719delG
Fy (a - b -)	<i>EF * 01N.08</i>	c.-69T> C

Fy (a - b -)	<i>EF * 01N.09</i>	c.296_496delinsAGGCCACTG
Apenas células eritróides (a - b -) *	<i>EF * 02N.01</i>	c.-67T> C
Fy (a - b -)	<i>EF * 02N.02</i>	c.407G> A
Fy (a - b -)	<i>EF * 02N.03</i>	c.781G> A
Fy (a - b -)	<i>EF * 02N.04</i>	c.179_180delCT
Fy (a - b -)	<i>EF * 02N.05</i>	c.895G> A
Fy (a - b -)	<i>EF * 02N.06</i>	c.151delT
Fenótipos fracos		
Fy (a + ^w)	<i>EF * 01W.01</i>	c.265C> T
Fy (a + ^w)	<i>EF * 01W.02</i>	c.265C> T; c.298G> A
Fy (a + ^w)	<i>EF * 01W.03</i>	c.680G> A
Fy (b + ^w), Fy ^x *	<i>EF * 02W.01</i>	c.265C> T; c.298G> A
Fy (b + ^w), Fy ^x	<i>EF * 02W.02</i>	c.145G> T; c.265C> T; c.298G> A
Fy (b + ^w)	<i>EF * 02W.03</i>	c.266G> A
Fy (b + ^w)	<i>EF * 02W.04</i>	c.901C> T

ADAPTADO DE:

http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Working_parties/WP_on_Red_Cell_Immunogenetics_and/008_FY_Alleles_v4.1.pdf ⁽⁴⁶⁾.

Howes (2011) compilaram dados de 131.187 indivíduos a fim de gerar um mapa global da distribuição dos alelos Duffy e o fenótipo Duffy negativo utilizando um modelo geoestatístico bayesiano. O aspecto mais marcante foi a presença de um alelo silencioso FYB^{ES} (*FY * 02N.01*) em toda África Subsaariana, enquanto que os alelos FY *01 ou FY *02 na mesma região têm frequência de 0 a 5% ⁽⁴⁷⁾.

As frequências registradas indicam fixação do alelo FYB^{ES} em partes do oeste, leste e centro do continente Africano, o que sugere que a população local seja refratária a infecções por *P. vivax*. Em Madagascar, a frequência encontrada foi de 80% e acima de 50% na Península Arábica. Baixas frequências também foram encontradas espalhadas pelas Américas, notavelmente ao longo da costa Atlântica e no Caribe ⁽⁴⁸⁾.

No continente Americano os três alelos são registrados em maior heterogeneidade, com predominância de alelos únicos em apenas em algumas áreas. O alelo FY *01 encontra-se mais frequentemente no leste da Ásia, com média acima de 80% ao sul e em populações da Mongólia e em partes do Leste da China e Rússia. Esse alelo também foi encontrado com alta frequência (> 90%) no Alasca e noroeste do Canadá ^(49,50).

O alelo FYA permanece relativamente comum com exceção do continente Africano e fora dessas regiões de alta predominância. Já o alelo FY *02 se mostrou o menos prevalente globalmente. Frequências acima de 50% são restritas a Europa e partes pequena das Américas, notavelmente na costa leste dos Estados Unidos. FYB é prevalente em algumas zonas ao redor de regiões onde FYB^{ES} é predominante, como norte, nordeste e sul da África. O alelo silencioso FYB^{ES} não pode ser retratado espacialmente devido a sua raridade ⁽⁵⁰⁾.

1.2.1. Polimorfismos no Grupo Sanguíneo Duffy

O locus Duffy localiza-se no braço longo do cromossomo 1 na posição q22q23, sendo constituído por 2 éxons que se estendem por mais de 1.500 pares de bases do DNA genômico (Figura 2) ⁽³⁹⁾.

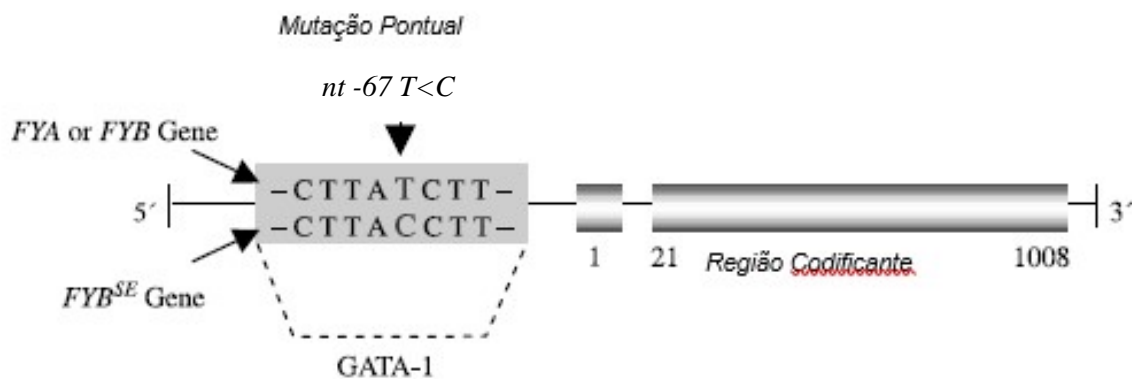


Figura 2: Representação esquemática da mutação pontual no sítio Gata-1, responsável pela não expressão Duffy em eritrócitos - ADAPTADO DE:Tournamille, 1995 ⁽⁵¹⁾.

A expressão dos fenótipos Fy (a+b-), Fy (a+b+) e Fy (a-b+) é determinada pela troca de aminoácidos na posição 125, codificando os antígenos Fya e Fyb. No entanto, outro SNP na posição -67 T>C da região promotora do gene Duffy caracterizado pelo alelo

EF * 01N.01 ou FY^{ES} (ES, do inglês *erythroidsilent*), silenciador da expressão do alelo FYB no tecido eritróide, determina o fenótipo Fy (a-b-), quando em homozigose (FYB^{ES}/FYB^{ES}) ^(52,53).

Estes alelos do sistema sanguíneo Duffy formam os genótipos FYA/FYA, FYA/FYB e FYB/FYB, produzindo os fenótipos Fy (a+b-), Fy (a-b+), Fy (a+b+) e Fy (a-b-). O terceiro alelo, FY0, representa a ausência do antígeno, o que resulta no fenótipo

sorológico negativo Fy (a-b-). A maioria dos africanos ocidentais e 68% dos negros americanos não expressam os antígenos Fya ou Fyb em seus eritrócitos ⁽⁵⁴⁾.

Através de um levantamento dos polimorfismos na região promotora do gene Duffy, foi revelado que o mesmo SNP encontrado em Africanos com alelo *FYB^{ES}* foi observado em habitantes de Papua Nova Guiné, Tunísia e do Estado do Amazonas, no alelo *FYA*, sugerindo a presença do alelo *FYA^{ES}* ^(55, 39).

Outro fenótipo Fy (a+^w), caracterizado pela diminuição da expressão do antígeno Fyb, também conhecido como FyX, é determinado por outro SNP no exon 2, sendo estes, a substituição de uma citosina por uma timina na posição 265 (C265T), determinando uma troca de uma Argenina por uma Cisteína no códon 89 (Arg89Cys) juntamente com a troca de uma guanina por uma adenina na posição 298 (G298A), levando a uma troca de uma Alanina por uma Treonina no códon 100 (Ala100Thr) da proteína caracterizando o alelo *FY * 01W.02* ^(50,56,57).

O polimorfismo *FYX* ocorre intracelular da proteína Duffy, associado à expressão reduzida da mesma na superfície celular, levando a uma detecção enfraquecida do antígeno Fyb no teste de fenotipagem eritrocitária, onde o mesmo foi detectado, neste caso, até no máximo 2 cruces. Sendo a frequência do genótipo *FYB^w / FYB^w* aproximadamente 2% em caucasianos ^(58,59).

Quadro 3: Expressão da glicoproteína Duffy nos diferentes fenótipos e genótipos Duff.

Alelos	Antígeno	Genótipos	Fenótipos	Expressão
FYA	Fy ^a	FYA / FYA	Fy (a + b -)	2 × Fya, 0 × Fyb
FYB	Fy ^b	FYA / FYA ^{ES}	-	1 × Fya, 0 × Fyb
FYX	Fy ^{bweak}	FYA / FYB ^{ES}	-	1 × Fya, 0 × Fyb
FYA ^{ES}	-	FYB / FYB	Fy (a - b +)	0 × Fya, 2 × Fyb
FYB ^{ES}	-	FYB / ^w FYB	-	0 × Fya, 1,1 × Fyb
-	-	FYB / FYA ^{ES}	-	0 × Fya, 1 × Fyb
-	-	FYB / FYB ^{ES}	-	0 × Fya, 1 × Fyb
-	-	FYB ^w / FYB ^w	Fy (a - (b + fraco))	0 × Fya, 0,2 × Fyb
-	-	FYB ^w / FYA ^{ES}	-	0 × Fya, 0,1 × Fyb
-	-	EFY ^w / FYB ^{ES}	-	0 × Fya, 0,1 × Fyb
-	-	FYA / FYB	Fy (a + b +)	1 × Fya, 1 × Fyb

-	-	FYA / FYB ^W	-	1 × Fya, 0,1 × Fyb
-	-	FYA ^{ES} / FYA ^{ES}	Fy (a - b -)	0 × Fya, 0 × Fyb
-	-	ES da EF / ES da EF	-	0 × Fya, 0 × Fyb
-	-	FYB ^{ES} / FYB ^{ES}	-	0 × Fya, 0 × Fyb

ADAPTADE DE: Zimmerman et AL (2013) ⁽⁶⁰⁾.

1.3. Malária

A malária é uma doença causada pelos protozoários do gênero *Plasmodium* transmitidos ao homem através das fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas. Entre as aproximadamente 100 espécies de *Plasmodium* apenas 6 são responsáveis por infectar humanos: *P. falciparum*; *P. vivax*; *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi* e *P. simium*, este último, causador de infecções humanas apenas em experimentos in vitro ⁽⁶¹⁻⁶⁵⁾.

A malária representa um dos mais sérios problemas de saúde pública em nível global, sendo nas regiões tropicais e subtropicais a doença parasitária que mais causa problemas sociais e econômicos ⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾. No Brasil, a etiologia da maior parte dos casos é dada por *P. vivax* com cerca de 90% dos casos ⁽⁶⁹⁾.

A susceptibilidade à infecção malárica abrange até aqueles que já contraíram a doença por diversas vezes. No entanto, a sua gravidade depende da relação entre o hospedeiro, sua vulnerabilidade imunológica, e o *Plasmodium ssp*, espécie infectante e densidade parasitária. As principais alterações observadas nos indivíduos com malária podem ser a anemia grave, os distúrbios da coagulação, a trombocitopenia proeminente e as alterações numéricas ou funcionais de leucócitos com envolvimento do baço ⁽⁷⁰⁾.

Em regiões endêmicas de infecção por *P. vivax* houve a incidência de casos com complicações clínicas e mortalidades, caracterizando a malária por *P. vivax* como doença grave ou mesmo fatal, característica pouco comum dessa infecção em relatos passados ⁽⁷¹⁻⁷⁴⁾.

Essa progressão e agravamento da malária por *P. vivax*, ainda que com a fisiopatologia pouco conhecida, mostram-se associados principalmente ao estabelecimento de uma anemia intensa, ocasionada por episódios recorrentes de hemólise acentuada ⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾. Isso se deve a ruptura dos eritrócitos como consequência da infecção parasitária pois prejudica o transporte de oxigênio, contribuindo para o quadro de hipoxemia, uma das alterações fisiológicas mais significativas no estabelecimento das consequências clínicas no hospedeiro ^(78,79). Outros eventos fisiopatológicos decorridos de

hemólise, como o estresse oxidativo, podem se somar e influenciar significativamente no estabelecimento das condições clínicas ⁽⁸⁰⁻⁸²⁾.

Ao considerar que a gravidade clínica entre os indivíduos de áreas endêmicas podem ser complexa e com influência multifatorial, entre essas a participação de fatores genéticos, hemoglobinopatias herdadas e a deficiência na G6PD ^(34,84), torna-se relevante a investigação dessas comorbidades nas casuísticas de malária por *P. vivax* em áreas endêmicas, uma vez que também podem ser fatores influenciadores na heterogeneidade fenotípica. Principalmente devido a malária causada por *P. vivax* desafiar as estratégias de controle e eliminação, não somente no Brasil, mas no mundo. A biologia única do parasito, que envolve a formação e posterior reativação de formas latentes no fígado, além da habilidade em infectar o vetor antes mesmo do aparecimento dos sintomas, favorece a perpetuação do seu ciclo ⁽⁸⁵⁾. A esse aspecto, acrescenta-se, ainda, a dificuldade no rastreamento dos indivíduos infectados devido a infecções subpatentes ⁽⁸⁶⁾.

1.3.1. Epidemiologia da Malária

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou a ocorrência de 219.000.000 novos casos e 435.000 mortes em todo o mundo no ano de 2017, principalmente em crianças menores de cinco anos e grávidas ⁽⁸⁷⁾. Estima-se que cerca de 3,2 bilhões de pessoas, quase a metade da população mundial, corram risco de serem infectadas pela doença. Nas Américas, considera-se que aproximadamente 128 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de contrair a doença. O *P. vivax* é o parasito predominante na região das Américas, representando 74,1% dos casos ⁽⁸⁸⁾.

Dos conhecidos parasitos da malária humana, somente o *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* são detectados no Brasil ⁽⁸⁹⁾. No ano de 2018, foram notificados em todo o país, 194.271, casos da doença. Enquanto em 2017, o número registrado foi de 194.426 casos ⁽⁹⁰⁾.

Quadro 4: Incidência de malária no ano de 2018 da Região Amazônica por Estado. Ministério da Saúde.

Casos notificados de malária, 2018 - Brasil	
AM	71.729
PA	45.705
AC	26.306
RR	23.265
AP	15.246
RO	9.445
MA	935
MT	878
TO	25
Região Amazônica	193.534
Região Extra-Amazônica	737
Brasil	194.271

ADAPTADO DE: <http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45391-brasil-reduz-em-38-casos-de-malaria-em-relacao-a-2018> ⁽⁹⁰⁾.

A população mais exposta ao risco de contrair a infecção encontra-se na Região Amazônica com um registro de 193. 534 casos de malária em 2018 ⁽⁰¹⁾ (Figura3).

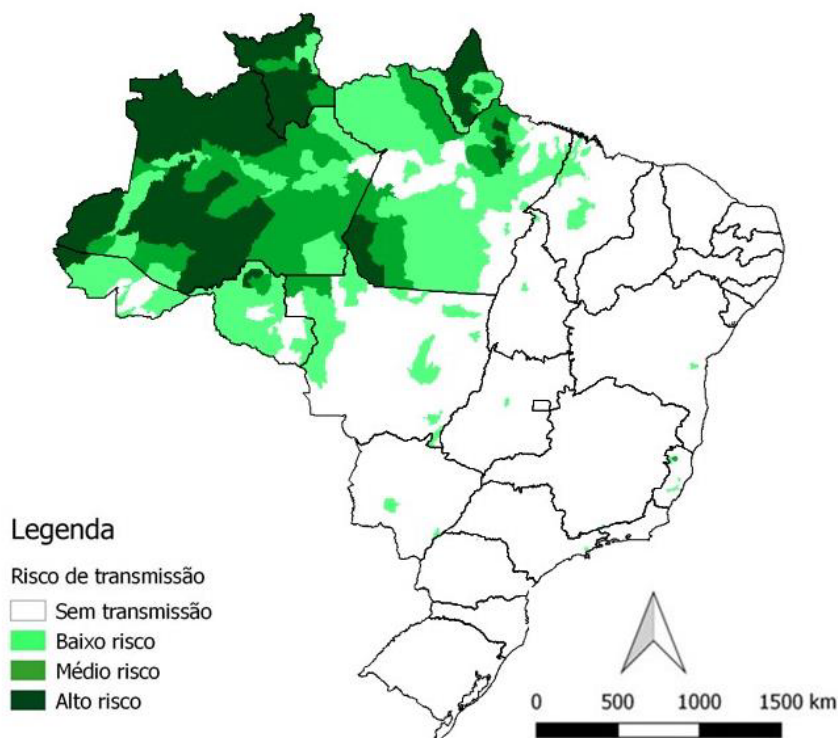


Figura 3: Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2018. – ADAPTADO DE: Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS ⁽⁹²⁾.

O Estado do Amazonas é a unidade federativa mais afetada, com registro de 71.729 casos em 2018. No ano de 2017 foram registradas 74.000 ocorrências da patologia. E aproximadamente 45.000 casos em 2016. Esse elevado número de ocorrência acompanha os registros da malária nas Américas identificada pela OPAS em sua atualização epidemiológica ⁽⁹¹⁻⁹³⁾.

O Amazonas registrou cerca de 23,8 mil casos de malária no primeiro semestre deste ano. No mesmo período de 2018, foram 36,7 mil registros. A maioria dos municípios do Amazonas segue diminuindo a incidência de malária, mas, por outro lado, a malária cresceu de forma considerável em algumas cidades. Pauini registrou um aumento, foram 314 casos, neste ano, contra 110, no mesmo período do ano passado. No estado, é a doença mais notificada ⁽⁹⁴⁾.

No Brasil, o estado do Amazonas é considerado o de maior risco de transmissão da doença, que se concentra principalmente em áreas ribeirinhas e indígenas. Atualmente, o estado do Amazonas possui 10.768 localidades cadastradas no Sistema de Vigilância Epidemiológica da Malária do Ministério da Saúde. Destas, 4.487 têm transmissão ativa da doença ⁽⁹⁵⁾.

A cidade de Manaus tem sido referência na notificação de casos graves entre a população amazonense para a malária, fazendo com que, mesmo no período de suposto silêncio epidemiológico da malária ocorrido no período de 1975 a 1988, fossem registrados casos da doença no município. Esses casos, depois de exaustivas investigações epidemiológicas, foram considerados “casos importados” ⁽⁹⁶⁾.

1.3.2. Malária *Vivax*

Estudos teorizam que o *Plasmodium vivax* foi introduzido na América do Sul com as primeiras migrações humanas, entre vinte mil anos atrás (Figura 4) vindos do sul da Ásia e da Oceania. Esse fluxo migratório permitiu a melhor compreensão da maior diversidade genética do *P. vivax* no Brasil, quando comparada à África, lugar de origem da outra espécie causadora da malária, o *P. falciparum* ^(97,98).

O *Plasmodium vivax* possui ciclo de vida com formas hepáticas em estágio de latência, denominadas hipnozoítos, que permitem a sobrevivência do parasito mesmo naqueles períodos onde o vetor anofelino se encontra ausente, responsável pelo

reaparecimento da doença em áreas endêmicas, dificultando o controle e a eliminação da malária ⁽⁹⁹⁻¹⁰¹⁾.

Concomitantemente com o reaparecimento da doença, tem-se observado, que algumas infecções pelo *P. vivax* podem evoluir para casos graves, muito semelhantes aos relacionados com o *P. falciparum* como síndrome respiratória aguda, malária cerebral e plaquetopenia em pacientes com malária *vivax*, pois apesar de exibir baixa biomassa parasitária em pessoas infectadas devido a especificidade do parasita em infectar apenas reticulócitos, a infecção por *P. vivax* desencadeia respostas inflamatórias mais elevadas e exacerba os sintomas clínicos ⁽¹⁰²⁻¹⁰⁵⁾.

A resistência do *P. vivax* a cloroquina ou limitação do tratamento por deficiência na desidrogenase da Glicose 6-fosfato também são aspectos desafiantes no estabelecimento da cura parasitológica dessa espécie de malária ⁽¹⁰⁶⁾.

A complicação grave tem proporcionado internação de vários pacientes em unidades de terapia intensiva, com prognóstico ruim, ainda pelo desconhecimento de uma terapia eficaz. A frequência dos casos da malária grave por *P. vivax* em áreas endêmicas do Brasil tem sofrido um aumento nos últimos anos ⁽¹⁰⁷⁾.

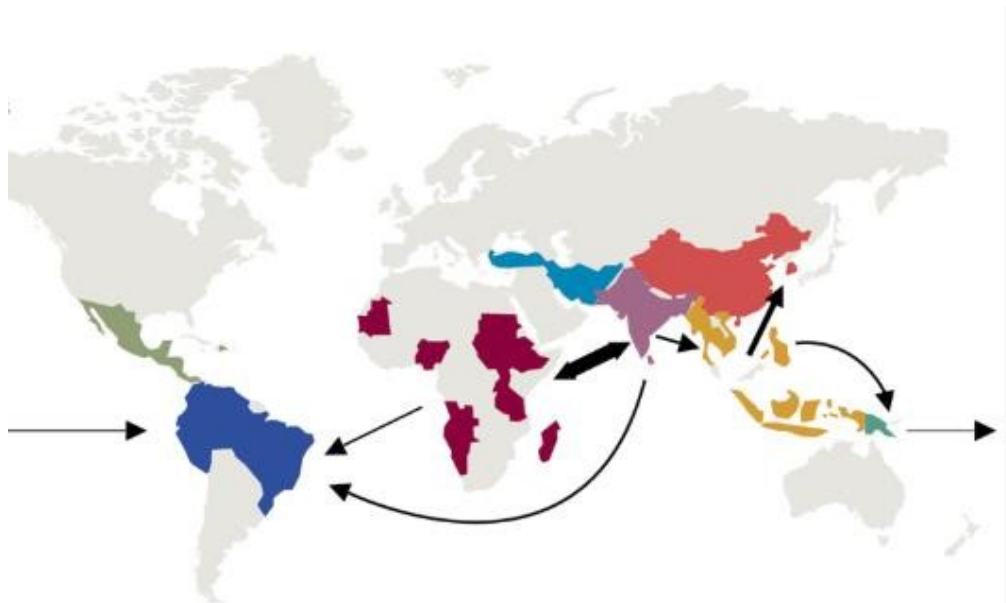


Figura 4: Fluxo Mundial de *Plasmodium vivax* nos últimos 25 mil anos. As espessuras das setas indicam a intensidade do fluxo gênico entre as regiões e a direção das setas o fluxo ao longo dos anos, tendo a África como ponto inicial. - ADAPTADO DE: Rodrigues, Priscila thihara, 2017 ⁽⁹⁸⁾.

1.3.3. Antígeno Duffy e Malária

O perfil da população Africana em relação a alta frequência do antígeno Duffy leva alguns autores a levantarem a hipótese de que apesar da ocorrência, a malária por *P. vivax* se encontra reduzida na região, devido os eritrócitos resistentes a infecção malárica por esta espécie de *Plasmodium* ⁽¹⁾.

Estudos demonstraram que a gpFy, além de se ligar a várias quimiocinas, também pode atuar como facilitador no processo de invasão dos eritrócitos para o *Plasmodium vivax* ⁽¹⁰⁸⁾. Os antígenos do sistema sanguíneo Duffy acabam funcionando como receptores para os ligantes merozoítas do *P. vivax* os quais contém os domínios DBL (*Duffy Binding Ligand*)⁽⁵⁰⁾.

Cavasini e colaboradores (2007) relataram elevada frequência dos alelos FYA e FYB entre pacientes com malária *vivax*, concluindo que os genótipos, FYA/FYB e FYA/FYA estão relacionados a uma elevada frequência de infecção pelo *Plasmodium vivax*, sugerindo que estes indivíduos possuem um risco maior a infecção pelo parasito ⁽¹⁰⁹⁾.

Em um estudo realizado no Estado do Amazonas foi demonstrado que os genótipos FYA/FYB e FYA/FYA estão associados ao aumento da frequência de infecção pelo *P. vivax*. Entre os demais genótipos encontrados, o FYA/FYB^{ES} e FYB/FYB^{ES} estiveram associados à diminuição da taxa de infecção, enquanto o FYA/FYX e FYB/FYX estiveram associados ao baixo nível de densidades Parasitárias ⁽¹¹⁰⁾.

Estudos têm demonstrado um aumento do número de relatos de malária grave causada por *Plasmodium vivax*, que por muito tempo foi um parasita associado à malária benigna. A patogênese dessas complicações não é conhecida, mas pode envolver fatores dependentes do parasita e do hospedeiro, assim como a malária grave por *P. falciparum*; representa um vasto campo de estudo, em nível clínico e molecular, principalmente em regiões endêmicas de malária, para uma melhor investigação dos mecanismos envolvidos na gravidade por *P. vivax*. Estudos desse tipo contribuiriam para estabelecer uma forma de manejo clínico específico e tratamento adequado para a população vítima dessas complicações ^(111, 112).

A hipótese malárica na evolução genética humana propõe que determinados polimorfismos, especialmente os que afetam os eritrócitos, ocorrem em elevada frequência porque protegem contra os efeitos da infecção malárica ⁽¹¹³⁾.

O grande impacto econômico produzido em áreas endêmicas de infecção por *P. vivax*, mostra que o tema não deve ser subestimado visto que os principais desafios dessa espécie de malária relacionam-se ao seu tratamento, também pela escassez de estudos clínicos para a padronização de novos protocolos de antimaláricos análogos à primaquina em seu efeito hipnozoitocida. Mais estudos deveriam ser desenvolvidos a fim de prover maiores esclarecimentos direcionados à sua patogênese e mecanismos de resistência às drogas ⁽¹¹⁴⁾.

A região possui em sua geografia áreas endêmicas de malária, o que constitui fator de risco à essa população, considerando que indivíduos afetados por diferentes condições genéticas podem sofrer hemólise por uso do antimalárico primaquina, tornando assim necessária a realização deste estudo em indivíduos residentes em áreas de risco de transmissão de malária ⁽⁹¹⁾.

1.4. Doadores de Sangue

O sangue é um tecido vivo que tem como principais funções transportar o oxigênio dos pulmões para o corpo, defender o organismo contra infecções e promover a coagulação. Recolhe também todos os resíduos que se formam nos órgãos e os leva até os rins para serem eliminados através da urina. É composto por plasma, hemácias, leucócitos e plaquetas ⁽¹¹⁵⁾.

No Brasil, a demanda crescente por sangue e seus derivados se faz sentir de forma cada vez mais preocupante. A quantidade total de doadores de sangue no Brasil corresponde, a cada ano, a menos de 1% da população ⁽¹¹⁶⁾.

A doação de sangue é voluntário e auxilia pessoas que se submetem a tratamentos e intervenções médicas de grande porte e complexidade, como transfusões, transplantes, procedimentos oncológicos e cirurgias. Além de pessoas que submetem a procedimentos e intervenções médicas, o sangue também é indispensável para que pacientes com doenças crônicas graves. O procedimento para doação de sangue é simples, rápido e totalmente seguro. Não há riscos para o doador, porque nenhum material usado na coleta do sangue é reutilizado, o que elimina qualquer possibilidade de contaminação ⁽¹¹⁷⁾.

No Brasil, pessoas entre 16 e 69 anos podem doar sangue. Além disso, é preciso pesar, no mínimo, 50 quilos e estar em bom estado de saúde. O candidato deve estar descansado, não ter ingerido bebidas alcoólicas nas 12 horas anteriores à doação e não

estar de jejum. A frequência máxima é de quatro doações anuais para o homem e de três doações anuais para a mulher. O intervalo mínimo deve ser de dois meses para os homens e de três meses para as mulheres ⁽¹¹⁸⁾.

Para se obter segurança dos produtos sanguíneos a serem utilizados em transfusões, rígidos parâmetros de qualidade devem ser seguidos. Entende-se por segurança transfusional o conjunto de medidas quantitativas e qualitativas adotadas que vise um menor risco aos doadores e receptores de sangue, além da garantia de estoques estratégicos de sangue capazes de atender à demanda transfusional. Em que pese todo o avanço na busca de segurança transfusional, "não existe transfusão isenta de riscos" ⁽¹¹⁹⁻¹²¹⁾. Nisto está a importância de se cumprir com eficiência o ciclo hemoterápico cujo processo se inicia com a captação e seleção de doadores, seguindo-se a triagem soro-lógica e imunohematológica, processamento e fracionamento das unidades coletadas, dispensação, transfusão e avaliação pós transfusional ⁽¹²²⁻¹²⁴⁾.

No entanto, a transfusão de sangue proveniente de doadores com deficiência de G6PD é menos eficaz, visto que as hemácias destes indivíduos apresentam deficiência nas defesas antioxidantes, sendo mais vulneráveis à hemólise extra e intravasculares na presença de estresse oxidativo, além de poderem sofrer lesões de estocagem exageradas, com diminuição das suas sobrevidas ⁽¹²⁵⁾.

Por ser assintomática e não afetar a diminuição das concentrações de hemoglobina e hematócrito, pessoas com deficiência de G6PD não são incapazes de obter sangue do doador. Esse fato tem sido constantemente debatido em congressos e artigos nacionais e internacionais que levantam observações sobre a propensão de doações de doadores com deficiência, diminuindo a sobrevida devido a uma maior tendência à hemólise durante o armazenamento e que transfusões desses doadores podem piorar o receptor da clínica ^(126,127).

Apesar da gravidade, poucos estudos correlacionam polimorfismos da G6PD concomitantemente as variantes do antígeno Duffy. Acreditamos que esta associação exista e, além disso, ajudarão melhorar e acrescentar maiores informações destes para o tratamento, acompanhamento e epidemiologia da clínica da doença.

A elevada frequência principalmente relacionada à de malária *vivax* grave vem ocorrendo ainda sem o completo conhecimento de suas causas e complicações. Devido a isso acreditamos da necessidade de estudos maiores de fatores de riscos, principalmente porque acreditamos que a genotipagem preditiva de genes pode ser benéfica aos pacientes tratados através de terapia com fármacos, pois pode prevenir

anemias mais severas, sendo a causa direta mais comum correlacionada com a clínica grave nestes indivíduos, através da administração correta para cada indivíduo. Isso certamente poderá vir a melhorar os desfechos terapêuticos em relação à eficácia e a segurança numa fração significativa de pacientes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar as variantes do antígeno Duffy e polimorfismos genéticos da Desidrogenase na Glicose 6-fosfato em pacientes diagnosticados com malária *vivax* grave e não complicada e mutações da G6PD em doadores de sangue.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar os genótipos e fenótipos do antígeno Duffy;
- Determinar os polimorfismos c.202 G>A / c.376 A>G (A-); 680 G>T / 968 T>C (A-); Mediterranean (c.563 C>T); Santamaria (c.542 A>T + c.376 A>G); Santiago de Cuba (c.1339 G>A); Chatham (c.1003G>A) nos genes da enzima da Desidrogenase da Glicose 6-fosfato em doadores de sangue da Fundação HEMOAM;
- Identificar (A-) c.202 G>A / c. 376 A>G em pacientes de malária *vivax* grave e não complicada;
- Associar os fenótipos e genótipos Duffy com os polimorfismos na G6PD, frente a clínica da malária por *P. vivax*.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1. Casuística

No período de março de 2013 a janeiro de 2018 foram coletadas amostras de sangue de indivíduos, de ambos os sexos, que se dirigiram a Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD, identificados com malária por *P. vivax*, bem como doadores de sangue que compareceram à Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas-HEMOAM, na cidade de Manaus, estado Amazonas.

Entre os pacientes de malária foram selecionados, um total de 225 indivíduos participantes, primoinfectados de malárias, sem infecção com outro tipo de plasmódio, sem outra doença associada, de qualquer gênero, idade e cor, diagnosticados com malária grave (internados) e não complicada (ambulatoriais) de ambos os sexos, oriundos da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HDV), atendidos na Enfermaria de Pesquisa Clínica (PESCLIN) deste hospital, com os dados obtidos dos prontuários atendidos no período de março de 2013 a abril de 2016.

No período de agosto de 2017 a janeiro de 2018, este grupo de estudo realizou a coleta de 1222 amostras de doadores de sangue na Fundação HEMOAM. Todos os indivíduos aptos à doação, sem antecedentes de malária foram inclusos no trabalho.

Foram incluídas no estudo as amostras de indivíduos não aparentados, naturais somente da Região do Estado do Amazonas.

As coletas foram realizadas apenas após a concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

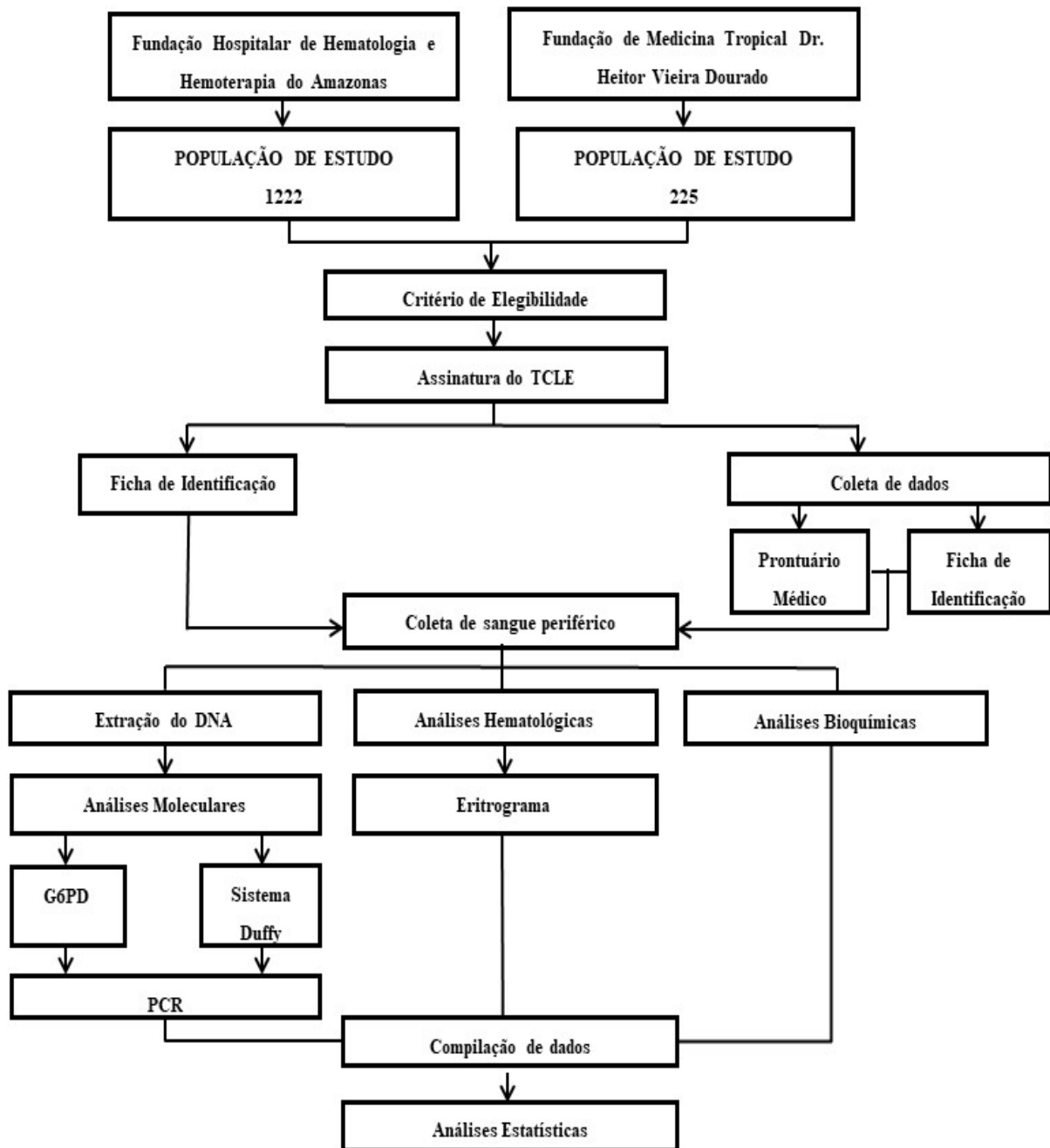
Este projeto enquadra-se subprojeto de dois trabalhos maiores aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), baseando-se na Plataforma Brasil pelos pareceres a seguir supracitados:

- N° 343/2009, protocolo de n° 25.000.011.792/2009-15 - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) - Caracterização clínica da malária complicada por *Plasmodium vivax*.
- N° 343/2009, protocolo de n° CAAE-0004.0.112.000-11 - Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado - Estudo dos polimorfismos DUFFY em pacientes infectados com *Plasmodium vivax*.

Todo o trabalho foi desenvolvido de acordo com os critérios da Regulamentação de Bioética no Brasil, Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e Resolução Complementar ⁽¹²⁸⁾. Os experimentos seguiram as normas de Biossegurança de acordo com a Lei nº. 11.105 de março de 2005, seguindo as normas técnicas existentes no manual de biossegurança da FIOCRUZ (Comissão Técnica de Biossegurança da FIOCRUZ) ⁽¹²⁹⁾.

Durante o período de estudo e coletas, as amostras ficaram sob responsabilidade do Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM, mantidas de acordo com os critérios da resolução CNS 347/2005, devidamente etiquetadas com código numérico garantindo o sigilo e a confidencialidade do doador, bem como a possibilidade de contato com o mesmo.

Todas as informações obtidas através das análises das amostras coletadas permanecem sob sigilo e só possuem acesso às mesmas a equipe clínica e pesquisadores. Quaisquer indivíduos ou responsáveis que não autorizassem sua participação ou de seu relativo no presente estudo, não tiveram sua amostra e dados incorporados ao banco, sendo devidamente excluídos.



Fluxograma das atividades realizadas durante todo o desenvolvimento do projeto.

3.2. Obtenção das amostras

Foram coletados aproximadamente 05 mL de sangue periférico em tubo contendo como anticoagulante o EDTA (sal disódico do ácido etilenodiaminotetracético) na concentração de 1,5 mg/mL para realização do hemograma, onde posteriormente alíquotas foram colocados em tubos de 1,5 mL para realização da extração do DNA nuclear. Outros 06 mL foram coletados em tubo sem aditivo anticoagulante para análises bioquímicas.

3.3. Análises Hematológicas

Imediatamente após a coleta de sangue, as determinações hematológicas foram realizadas em analisado automatizado-Pentra XL/ABX 80 Horiba® (HoribaDiagnostic Montpellier -France) e as dosagens bioquímicas em equipamento também automatizado Bioclin 3000.

No contexto da avaliação hematológica, todos os hemogramas foram realizados através do princípio de impedância e, posteriormente, seguiu-se a extração de DNA nuclear.

3.4. Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada pelo *kit BIOPUR Extração Mini Spin Plus®* (Curitiba, PR), seguindo as recomendações do fabricante. Duzentos microlitros (μL) de sangue total, colhidos previamente em EDTA, foram adicionados com 25 μL de Proteínase K em microtubo de centrifugação (1,5 mL) estéril. Após, foi adicionado o Tampão de Lise e homogeneizado vigorosamente em vórtex, seguindo de incubação da 56°C por 15 minutos. No próximo passo, o processo de lavagem ocorreu adicionando tampão específico contendo etanol. A transferência para os tubos de coleta com filtrado ocorre duas vezes, na primeira com adição da solução de lavagem SI e, após centrifugação, adicionada Solução de Lavagem SII. O tampão de Eluição é previamente aquecido a 56°C e a centrifugação final ocorre durante 1 minuto a 11.000 x g (mini centrífuga KASVI, TecLab). A solução de DNA obtida foi armazenada em -20°C até a realização das análises. Todas as extrações e passos seguintes dos processos de Biologia Molecular foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular

da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas sob os cuidados do Professor José Pereira de Moura Neto.

3.5.1. Genotipagem do Antígeno Duffy

A etapa de amplificação do DNA foi dividida em duas. Primeiro uma PCR convencional, onde a reação foi realizada em tampão 15mM; MgCl₂ (Cloreto de Magnésio) 25mM; 200mM de dCTP + dGTP e 100mM de dATP + dTTP de mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs); 0,25µl de cada primer; 5U da enzima Taq DNA polimerase (*Platinum Taq, Life Technologies, Gaithersburg, MD*) e 5,0 µL de DNA, em volume final de 50 µL. Para a determinação do grupo sanguíneo Duffy e mutação FYX (PCR Duffy) e outra para determinação da mutação do GATA Box (PCR GATA).

Para visualização dos fragmentos amplificados, alíquotas de 15 µL do produto da PCR foram misturadas a 1,0 µL de tampão da amostra (Azul de Bromofenol) e aplicados ao gel de Agarose a 1% (já contendo a solução de brometo de etídeo). Tampão TAE 1x é acrescido e submetido à corrida eletroforética (100V/200A) por 60 minutos. Em cada gel de eletroforese foi aplicado 5µL do padrão de tamanho molecular (*Ladder Ludwig Biotec*), para determinação do tamanho do fragmento amplificado. Em seguida, a exposição à luz UV e foto documentação foram realizados através do ENDURO™ GDS Gel Documentation System.

Após a confirmação da amplificação pela PCR, os produtos foram tratados com a enzima de restrição utilizando 20 µL do produto da PCR, 2,0 µL de tampão e 0,1 µL da enzima de restrição, para um volume final de 25 µl incubados por 37 °C overnight. O produto da digestão enzimática foi observado em gel de agarose em diferentes concentrações de acordo com o tamanho do fragmento.

A genotipagem para os grupos do sistema sanguíneo Duffy (PCR Duffy) foi realizada com os oligonucleotídeos sintéticos FYAB1 (5' TCC CCC TCA ACT GAG AAC TC 3') e FYAB2 (5' AAG GCT GAG CCA TAC CAG AC 3'), apresentando uma banda de 392 pb. Os produtos tratados com enzima de restrição *BanI* e visualizado em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo. Os genótipos FYA/FYB apresentaram duas bandas de 20 e 306 pb, respectivamente. O gene FYA apresenta apenas a banda de 210 pb e o FYB de 306 pb.

Para a verificação do polimorfismo -67 T→C no promotor do GATA Box foram utilizadas as amostras com genótipo FYA/FYB e FYB/FYB. E para a PCR GATA utilizamos os oligonucleotídeos sintéticos FYN1 (5' CAA GGC TGA CCC CCA TA 3') e FYN2 (5' CAT GGC ACC GTT TGG TTC AG 3') seguindo o protocolo, a banda apresentada foi de 189 pb. O produto da PCR GATA foi tratado com a enzima de restrição *SlyI* e seu produto da digestão foi observado em gel de agarose 2,5%. Os genótipos GATA NORMAL apresentaram as bandas com 108 e 81 pb, enquanto os GATA MUTADO apresentaram uma banda extra de 61 pb.

Para a verificação do SNP 265 C→T e 298 G→A na região codificadora do FYB e para FYX foram utilizadas as amostras com genótipo FYA/FYB e FYB/FYB. A PCR foi realizada seguindo o mesmo protocolo. O produto da PCR foi tratado com a enzima de restrição *MspAI* para verificar o SNP 265 C→T e com a enzima de restrição *MWOLL* para o SNP 298 G→A, a visualização em gel de poliacrilamida a 8%. Os genótipos mutados para o SNP 265 C→T apresentaram banda extra de 161pb e os mutados para o SNP 298 G→A apresentaram banda extra de 343pb.

3.5.2. Genotipagem da G6PD

As variantes genéticas da G6PD analisadas neste projeto foram escolhidas com base no conhecimento prévio das frequências observadas mundialmente e sua importância clínica de acordo com a classificação da OMS (Quadro 5).

Para a caracterização dos polimorfismos foi utilizada a técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) com o equipamento *QuantStudio 3 (AppliedBiosystemsThermo Fisher Scientific®)* utilizando sondas TaqMan® específicas para a amplificação (Quadro 6). A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 12uL/reação, contendo 5 uL de 2x TaqMan Universal Master Mix, 0,3 uL de 20x SNP Genotyping Assay, 4,8 uL de água esterilizada e 2,0 uL de DNA (~100ng) da amostra.

Quadro 5: Variantes da G6PD, seus éxons e classes.

Polimorfismos	Localização	Exon	classe
(A-) VAL68MET (202 G/A)	G/A	4	Classe III
(A+) ASN126ASP (376 A/G)	A/G	5	Classe III

(Mediterranean) SER188PHE (563 C/T)	563T/C	6	Classe II
(Santamaria) ASP181VAL (542 A/T)	542T/A	7	Classe III
(Chatham) ALA335THR1003 G>A	1003G/A	9	Classe II
(A-) LEU323PRO (968 T/C)	680C/T	10	Classe III
(Santiago de Cuba) GLY447ARG (1339 G/A)	1339G/A	11	Classe I

Quadro 6: Identificação das sondas para a técnica de PCR em Tempo Real.

Polimorfismos	Identificação
(A-) VAL68MET (202 G/A)	rs1050828
(A+) ASN126ASP (376 A/G)	rs1050829
(Mediterranean) SER188PHE (563 C/T)	rs5030868
(Santamaria) ASP181VAL (542 A/T)	rs5030872
(Chatham) ALA335THR1003 G>A	rs5030869
(A-) LEU323PRO (968 T/C)	rs76723693
(Santiago de Cuba) GLY447ARG (1339 G/A)	rs37852317

3.6. Análises Estatísticas

Os resultados obtidos dos experimentos realizados foram digitados em banco de dados nos Software *GraphpadPrism 5.0* (*Graphpad Software, San Diego, CA-USA*) e *SPSS* versão 19, de acordo com o tipo de variável.

A análise de variáveis qualitativas ou categóricas de três ou mais grupos foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado (χ^2), devidamente corrigido pelos testes de Mantel-Haenszel e Yates. Na análise de apenas dois grupos categóricos, as análises serão realizadas pelo teste exato de Fisher. Os intervalos de confiança em 95% e a razão de prevalência calculados para essas variáveis. As análises de correlação realizadas utilizando os coeficientes de Pearson's para os dados de distribuição contínua

e os coeficientes de Kendall's tau-b e Spearman para os dados com distribuição não normal.

Para a análise estatística do sistema Duffy foram realizadas as regressões necessárias em testes de associações para eliminar variáveis de confundimento com gênero e idade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Successfully received: submission DUFFY BLOOD SYSTEM AND G6PD GENETIC POLYMORPHISMS IN VIVAX MALARIA PATIENTS FROM MANAUS-AM. for Molecular & Biochemical Parasitology

MP Molecular & Biochemical Parasitology <Evisesupport@elsevier.com>
Seg, 02/12/2019 12:07
Você ∨

This message was sent automatically.

Ref: MOLBIO_2019_121

Title: DUFFY BLOOD SYSTEM AND G6PD GENETIC POLYMORPHISMS IN VIVAX MALARIA PATIENTS FROM MANAUS-AM.

Journal: Molecular & Biochemical Parasitology

Dear Professor. Moura Neto,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Molecular & Biochemical Parasitology. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=MOLBIO and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Molecular & Biochemical Parasitology

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

DUFFY BLOOD SYSTEM AND G6PD GENETIC POLYMORPHISMS IN *VIVAX*
MALARIA PATIENTS FROM MANAUS-AM.

Natália Santos Ferreira^{1,2}, Sérgio Roberto Lopes Albuquerque¹; Ana Carla Dantas²;

Fernanda Cozendey Anselmo^{1,2}; Marcus Vinicius Guimarães Lacerda³; Wuelton

Marcelo Monteiro²; José Pereira de Moura Neto^{1,2}.

1 Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

2 Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Manaus, Amazonas, Brasil.

3 Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brasil.

*Address correspondence to: José Pereira de Moura Neto, Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, General Rodrigo Otávio Jordão Ramos Avenue, 6200 - Coroado I, Manaus - AM, CEP: 69067-005, phone + 55-92-3305-1181-R:2007 or jp-mn@hotmail.com

Conflict of interest: None. The sponsors of this study were public or non-profit organizations that support science in general. They had no role in gathering, analyzing or interpreting the data.

Ethical approval: The study was approved by The National Committee of Ethics and Research, Manaus, Amazon, and provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Sponsorships:

- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) – Processo: 1094/2013-FAPEAM.

Abstract

Over a third of the world's population lives at risk of potentially severe *Plasmodium vivax* malaria. Unique aspects of this parasite's biology and interactions with its human host make it harder to control and eliminate. The dehydrogenase deficiency Glucose-6-phosphate and Duffy-negative blood group are two red blood cells variants that confer protection against malaria. Molecular genotyping was performed in 225 patients with severe and non-severe living malaria, revealing 29 (12.94%) carriers of G202A SNP and 43 (19.19%) for A376G. For the Duffy 70 genotype (31.11%) were phenotypes as (a+b-), 98 (43.55%) (a+b+), 56 (24.9%) (a-b+) and 1 (0.44%) (a-b-). The FYA/FYB genotype was more frequent in both non-severe and severe malaria. However, it was more frequent when SNP A376G was also present. In women, the FY*01/FY*02 allele concomitantly with A376G was more present in non-severe malaria, while in men this synergism was more frequent in severe malaria. In addition, G202A/A376G genotypes were more frequent in severe malaria, with c.202 (RR=5.57 - p<.001) and A376G (RR:4.49 - p<.001) strongly associated with the trials. malaria (P.001). Parasite count and density were not observed in the G6PD / Duffy association. However, when the GATA mutation did not have the FYA/FYBES genotype, parasitic density decreased significantly (p=.007). Additional research on G6PD and Duffy antigen deficiency has been valuable, especially focusing on densely populated areas. We conclude that G202A and A376G SNPs were risk factors for the development of severe *vivax* malaria and that molecular diagnosis before treatment may be necessary in the Amazonian population.

Keywords: malaria severe; G6PD; System Duffy; *P. vivax*

INTRODUCTION

Malaria is a disease transmitted by the female *Anopheles* mosquito, and its etiological agent is a protozoan of the genus *Plasmodium*. In Brazil, the species *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium malarie* are found. The other species that cause human malaria are *Plasmodium ovale* and *Plasmodium Knowlesi* ⁽¹⁻⁵⁾.

Malaria is one of the most serious public health problems worldwide, and in tropical and subtropical regions it is the parasitic disease that causes the biggest social and economic problems ⁽⁶⁻⁸⁾. In Brazilian epidemiology, most cases are given by *P. vivax* with about 90% of cases with the year 2018 registering values above 33,000 cases only in the state of Amazonas ⁽⁹⁾.

Susceptibility to malarial infection covers even those who have contracted the disease several times. However, its severity depends on the relationship between the host, its immunological vulnerability and *Plasmodium ssp*, the infecting species and parasitic density. The main changes seen in individuals with malaria may be severe anemia, coagulation disorders, prominent thrombocytopenia, and numerical or functional changes in leukocytes with spleen involvement ⁽¹⁰⁻¹²⁾.

In endemic regions of *P. vivax* infection, there have been cases of clinical complications and mortality, characterizing *P. vivax* malaria as a serious or even fatal disease, uncommon characteristics in past patients ^(13,14).

This progression and aggravation of *P. vivax* malaria, although with little known pathophysiology, is mainly associated with the establishment of anemia, occasionally due

to the occurrence of severe hemolysis⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Other pathophysiological events, such as for example the oxidative stress, may influence the establishment of clinical conditions⁽²⁰⁻²²⁾.

Some studies report Duffy glycoprotein acting as a possible facilitator in the process of invasion of erythrocytes to *P. vivax*. Blood system antigens act as receptors for *P. vivax* merozoite ligands that contain DBL domains across alleles. These Duffy blood group system antigens (Fya, Fyb, Fy3, Fy5, Fy6) are encoded by two co-dominant allelic forms *FY *01* and *FY *02* that differ by an SNP in position 125 of exon⁽²⁷⁾.

The most frequent SNP found in the population is at position 67 T> C in the GATA promoter region, characterized by the allele *FY * 02N.01*, silencer of Fyb expression in erythroid cells, the Fy (a-b-) phenotype when in homozygous *FY * 02N, 01 / FY * 02N.01*⁽²⁸⁾.

Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is an enzyme involved in the pentose monophosphate pathway. Deficiency of this enzyme leads to free radical-mediated oxidative damage to erythrocytes, causing hemolysis. It is linked to the highly prevalent X chromosome, especially in people of African, Asian and Mediterranean descent⁽²⁹⁾. In female, some selective advantages with G6PD A-, characterized by the combination of mutation A376G (c.376) with mutations: G202A (c.202), A542T, G680T or T968C, have been shown to heterozygotes have selective advantage against severe malaria⁽³⁰⁻³³⁾. By selection, this G6PD deficiency becomes prevalent (8%) in populations where malaria is endemic⁽³⁴⁾.

Considering that the clinical severity between endemic areas can be complex and with multifactorial influence, among these participations of genetic factors, inherited hemoglobinopathies and alterations in G6PD⁽²³⁾, becomes relevant in the investigation of these comorbidities of *P. vivax* malaria cases from endemic areas, because also they

may also be factors affecting phenotypic heterogeneity. Mainly because malaria caused by *P. vivax* challenges control strategies and elimination⁽²⁴⁾. The unique parasite biology, which involves the formation and subsequent reactivation of latent forms in the liver, as well as the ability to infect or vector before symptoms occur, favors the perpetuation of its cycle⁽²⁵⁾. In this regard, it is added the difficulty in tracking infected individuals due to sub patent infections⁽²⁶⁾.

The objective of this study was to determine the frequencies of Duffy alleles and G6PD, c.202 and c.376 polymorphisms in malaria patients, relating susceptibility and resistance to acquiring *P. vivax* infection.

METHODOLOGY

This study was based on a cross-sectional model. Using as inclusion criteria patients with diagnosis of severe (hospitalized) and uncomplicated (outpatient) malaria of both sexes, coming from Dr. Heitor Vieira Dourado Tropical Medicine Foundation (FMT-HDV), attended at the Clinical Research Ward (PESCLIN) of this hospital, with data obtained from medical records attended from March 2013 to April 2016 in the City of Manaus, State of Amazonas.

Research was initiated after formal release and acceptance by the institution in question, FMTAM, approved by the Research Ethics Committee (CEP) and after signing the Free and Clarified Commitment Term (FICF) by the individuals who were subject to the research, in view the compliance with CNS Resolutions 196/96, aiming at the patient's welfare.

The samples used in the study were carried out by two projects: - A larger one entitled "Clinical characterization complicated malaria for *Plasmodium vivax*", approved by the National Research Ethics Commission (CONEP), in June 2009, by Opinion No. 343/2009, protocol No.25.000.011.792/2009-15, and another study approved by the Research Ethics Committee of the Heitor Vieira Dourado Tropical Medicine Foundation (FMT-HVD) (study number 343/2009), entitled "Study of DUFFY Polymorphisms in patients infected with *Plasmodium vivax* "with opinion number CAAE-0004.0.112.000-11 on 12/29/2011.

Approximately 05 mL of peripheral blood were collected in the tube containing anticoagulant or EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid sodium salt) at a concentration of 1.5 mg / mL for blood count, where they were aliquots in 1.5 mL tubes for extraction.

of nuclear DNA. Another 06 ml were collected in a tube without additive anticoagulant for biochemical analysis.

Immediately after blood collection, hematological determinations were performed on the automated counter - ABX Pentra 80 (HORIBA DIAGNOSTICS, Montpellier, FR) and biochemists on the BECKMAN COULTER Inc, CA equipment.

DNA ANALYSIS

DNA was extracted from 200 μ L of whole blood according to the QIAamp DNA Mini Kit (QUIAGEN) manufacturer's protocol (Cat No./ID 51304). After extraction, the DNA was quantified in the NanoDrop 2000 equipment, remaining stored at -20°C.

DUFFY GENOTYPING

The DNA amplification step was divided into two. First a conventional PCR for amplification of the sequence of interest followed by restriction enzyme cutting by PCR-RFLP technique, one for Duffy blood group (Duffy PCR) and one for GATA Box mutation (GATA PCR).

Genotyping for Duffy blood system groups was performed with synthetic oligonucleotides *FYAB1* (5 'TCC CCC TCA ACT GAG AAC TC 3') and *FYAB2* (5 'AAG GCT GAG CCA TAC CAG AC 3').

Amplified products were visualized on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. After PCR amplification was confirmed, the products were process with *BanI* restriction enzyme and incubated for at least 4 hours at 37°C.

The enzyme digestion product was observed on 1.5% agarose gel visualized with ethidium bromide.

For the verification of SNP -67 T> C in the GATA Box promoter, samples of the FYA/FYB and FYB/FYB genotypes were used. And for PCR GATA, we used the synthetic oligonucleotides FYN1 (5 'CAA GGC TGA CCC TA 3') and FYN2 (5 'CAT GGC ACC GTT TGG TTC AG 3').

The PCR GATA product was treated with a *StyI* restriction enzyme and incubated for at least 4 hours at 37 °C. The enzyme digestion product was observed on 2.5% agarose gel. GATA NORMAL genotypes were shown as 108 and 81bp bands, while GATA MUTADO showed an extra 61 pb band.

Samples with genotype FYA/FYB and FYB/FYB were used to verify the Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 265 C → T and 298 G → A in the FY *01W.02 coding region and for FYX.

The PCR product was treated with restriction enzyme *MspAI* to verify SNP 265 C → T incubated for 4 hours at 60 °C and *MwoI* restriction enzyme for SNP 298 G → A incubated for 4 hours at 37 ° C, visualization in 8% polyacrylamide gel. The mutated genotypes for SNP 265 C → T had an extra band of 161 bp and the mutated ones for SNP 298 G → A had an extra band of 343 pb.

G6PD GENOTYPING

For the characterization of the polymorphisms, the Real Time PCR (qPCR) technique was used by QuantStudio 3 equipment (*Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific*®) using TaqMan® probes specific for each polymorphism. The amplification reaction was performed for a final volume of 12uL / reaction, containing 5uL of 2x

TaqMan Universal Master Mix, 0.3uL of 20x SNP Genotyping Assay, 4.8uL of sterile water and 2.0uL of DNA (~ 100ng) of the sample.

The G6PD gene variants analyzed in this project were chosen based on prior knowledge of globally observed frequencies and their clinical importance according to the WHO classification.

STATISTICAL ANALYSIS

The data obtained were entered into a database using Graphpad-Prism 5.0 Software (Graphpad Software, San Diego, CA-USA) and SPSS version 19, according to the variable type.

The analysis of qualitative or categorical variables of three or more groups was performed by the non-parametric Chi-square test (χ^2), duly corrected by the Mantel-Haenszel and Yates tests. In the analysis of only two categorical groups, the analyzes were performed by Fisher's exact test. Confidence intervals of 95% and prevalence ratio were calculated for these variables.

RESULTS AND DISCUSSION

P. vivax positive patients attending at Tropical Medicine Foundation of Amazonas, hospital in Manaus, Brazil with confirmed diagnosis for mono-infections were enrolled to study Duffy/G6PD genotypes and its implications in disease pathogenesis. Patients with comorbidities, Hemoglobinopathies, mixed *Plasmodium* infections and virus infection were excluded from this study.

To do classification the patients of malaria in patients into uncomplicated or severe, we used criteria described by World Health Organization (WHO) ⁽³⁵⁾.

A total of 225 patients diagnosed with *P. vivax* malaria were included in the study, of which 52.4% were male.

The genotyping to c.202 showed 29 (12.9%) patients positive, being 4.4% heterozygotes and 0.44% homozygotes for females, while 8% hemizigotes for males. The c.376 polymorphism was identified in 43 (19.1%) patients, being in females 18 (8%) heterozygotes and 2 (0.88%) homozygotes, while 23 (10.22%) hemizygous in males.

Analysis of the Duffy System among the population showed a phenotypic distribution of 70 (31.1% - fy (a+b-), 98 (43.55% - fy (a+b+), 56 (24.9% - fy (a-b+) and 1 (0.44% - fy (a-b-).

The table 1 show the genotypic distribution for the Duffy System, with predominance of genotype FYA/FYB in the population. Our results showed that Manaus-AM has individuals with three more frequently Duffy phenotypes (a+b+), (a+b-) and (a-b+) expressing Fya and Fyb antigens.

The FYA/FYB genotype has been more present in uncomplicated and severe malaria, 45.3% and 39.2%, respectively (Figure 1). Being more expressive and with more severe clinic when c.376 was present. In females, the FY*01/FY*02 allele plus c.376 was more present in cases of uncomplicated malaria, the males this combination was more frequent in severe malaria cases.

Furthermore, when it was compared clinical of malaria with G6PD genotypes c.202/c.376 demonstrated a higher frequency of severe malaria to c.202 (RR = 5.57, 95% CI: 2.25-17.79, p<.001); c.376 (RR: 4.49, 95% CI: 1.99-8.43, p<.001) strongly associated with previous malaria episodes (p<.001) (Table 2).

For c.202, the highest frequency among female was of the phenotype fy (a+b+) and fy (a+b-) in cases of severe malaria. was not the same for the phenotype (a-b+) frequent among cases of uncomplicated malaria. In males, the all phenotypes Duffy were more frequent in severe malaria, with fy (a+b-) the largest representation of cases. For c.376, we observed a higher of cases of polymorphism for the fy (a+b) phenotype in patients with severe malaria, with a record of 47.36% in males (data no showed).

The only allele FY * 02N.0/FY * 02N.01, responsible for the fy (a-b-) phenotype, was found in a patient female with Uncomplicated malaria, negative for c.202 and c.376.

For uncomplicated malaria, the c.202 and c.376 frequency represented a decrease, especially when these polymorphisms were concomitantly present. Severe malaria showed no frequency variations for c.202, but, in the presence of A376G there was a slight decrease. When compiling c.202 and c.376 with the GATA mutation, we observed low frequency in uncomplicated malaria, but not significant, despite a slight decrease in frequency. For severe malaria, the presence of joined polymorphisms showed a moderate frequency variation (Figure 2).

Results showed no statistically significant association for women with *P. vivax* infection, nor the frequency of mutated Duffy alleles. The authors do not speculate about the race of the participants due to the strong regional ancestral mix found in the Amazonian caboclos, which originate with the arrival of Caucasians and blacks in indigenous lands (Data no showed).

When we associate the parasite count and density between the Duffy antigen genotypes and phenotypes, have no significant result. However, they have high levels in the fy (a-b+) phenotype, followed by fy (a+b-) and fy (a+b+) and fy (a-b+) phenotype (Figure 3). Interestingly, when the GATA mutation was present in the FYA/FYBES genotype, parasitic density decreased significantly ($p=.007$) (Figures 3, 4).

The high frequency of the FYA/FYB genotype and the fy (a+ b+) and fy (a+b-) phenotypes recorded in cases of malaria in our study corroborate with Cavasiniet al. (2007) who correlated the high frequency of the FY * 01 and FY * 02 alleles among *vivax* malaria patients, concluding that the FYA/FYB and FYA/FYA genotypes are related to a high frequency of *Plasmodium vivax* infection, suggesting that these individuals present a higher risk of being affected by the disease ⁽³⁶⁾.

A study in Amazonas showed that the FYA/FYB and FYA/FYA genotypes are associated with increased frequency of *P. vivax* infection. while FYA/FYX and FYB/FYX were associated with low parasitic density levels ⁽³⁷⁾

The only case of null Duffy found supports the suggestion of a possible advantageous selection, driven by defense mechanisms against *P. vivax*. in endemic areas, corroborating the literature that advocates Duffy's negative blood group as a protective factor against *P. vivax* malaria ^(38,39)

In a study conducted in São Paulo, the phenotypic frequencies found in blood donors for Duffy blood system antigens were 19.8% for Fy (a+b-) in Caucasians and 14.0% in blacks, the Fy phenotype. (a+b+) in 41.4% of Caucasians and 1.6% of blacks, the phenotype fy (a-b+) in 37.8% of Caucasians and 17.5% of blacks and the fy (a-b-) phenotype in 1.1% of Caucasians and 66.9% of blacks ⁽⁴⁰⁾.

Our results clinical evidences to support the hypothesis that G6PD deficiency don't confers decreased risk of severe malaria infection (Table 3). There are still many controversies in both cases showing no effect on the occurrence of uncomplicated malaria in hemizygous males and heterozygous females. However, our results showed that independent if male or female confirm no protection against severe malaria.

For the process of parasite invasion into red blood cells, Duffy protein is functionally important, and it has been shown that regions where malaria transmission

rates are average, as in the inhabitants of the Amazon, this protein is naturally immunogenic⁽⁴¹⁾.

In a study with *vivax* malaria patients the FY*01 and FY*02 alleles were found to have low, medium and high parasitic density, but in the presence of the GATA mutation, genotypes with alleles FY*02N.01 and FY*02W.01, were found only in patients with low parasitic density and low symptomatology⁽⁴²⁾.

In the state of Pará, a study with an African descent population, the presence of c.202 was 0.060, with the Duffy blood group revealing 24.3% of people as Duffy negative and 41.3% heterozygous for EF * B^{ES}. The frequency of the AF * B^{ES} allele was 41.0%. Concluding a need to monitor G6PD deficiency for the use of primaquine in the routine care of Afro-descendant communities of the Trombetas, Erepecuru and Cumná rivers, assessing the risks of hemolytic crisis in case of recurrence of malaria in the region⁽⁴³⁾.

In recent decades, studies have revealed the complexity of the Duffy system at its levels phenotypic and genotypic and mutations of G6PD (A-) with a significant impact on the distribution of human populations in areas where malaria is endemic. The Duffy system and the G6PD are, therefore, a polymorphic system that offers great challenges to researchers not only for their academic importance, but also for their potential applications in the treatment involving *vivax* malaria, where there is a natural selection population and that natural adaptation in an endemic malaria area can lead to mechanisms partial defense against *P. vivax*.⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾

CONCLUSION

This study reports the frequency of G202A and A376G mutations and Duffy alleles in patients with severe and uncomplicated malaria in Manaus-Amazonas;

Mutations G202A and A376G were a risk factor for the development of severe *vivax* malaria;

Molecular diagnosis of G202A and A376G in patients diagnosed with malaria before treatment may be necessary in the Amazonian population;

Genotypes with heterozygous GATA mutations were not a protective factor against malaria;

Uncomplicated malaria showed greater frequency variation with the presence and absence of the GATA and G6PD mutations than severe malaria.

REFERENCES

1. Ministério Da Saúde (BR). Secretaria De Vigilância Em Saúde. Departamento De Vigilância Epidemiológica. Ações De Controle Da Malária: Manual Para Profissionais De Saúde Na Atenção Básica. Brasília: Ministério Da Saúde; 2006. 52 P. (Série A. Normas E Manuais Técnicos).
2. Cox-Singh J, Davis TME, Lee K-S, Shamsul SSG, Matusop A, Ratnam S, Et Al. *Plasmodium Knowlesi* Malaria In Humans Is Widely Distributed And Potentially Life Threatening. Clin Infect Dis. 2008 Jan;46(2):165-71.
3. Crawley J, Chu C, Mtove G, Nosten F. Malaria In Children. Lancet. 2010 Apr;375(9724):1468-81.
4. Moyes, C. Et Al. Defining The Geographical Range Of The *Plasmodium Knowlesi* Reservoir. Plos Neglected Tropical Disease, V. 8, N. 3, P. E2780, 2014.
5. Brasil, P. Et Al. Outbreak Of Human Malaria Caused By *Plasmodium Simium* In The Atlantic Forest In Rio De Janeiro: A Molecular Epidemiological Investigation. The Lancet. Global Health, V. 5, N. 10, P. E1038-E1046, 2017.
6. Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SHI, Alonso PL, Collins FH, Et Al. Malaria: Progress, Perils, And Prospects For Eradication. J Clin Invest. 2008 Apr;118(4):1266-76.
7. World Health Organization. World Malaria Report. Geneva: WHO; 2015.
8. Parise EV. Malária Grave Em Palmas, Estado Do Tocantins: Relato De Caso. RevsocbrasmedTroP. 2009 Jul-Ago;42(4):463-8.
9. Ministério Da Saúde. Secretaria De Vigilância Em Saúde. Departamento De Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral Dos Programas Nacionais De Controle E Prevenção. Dados De 2018. Sivep malária/Svs.

10. Akinosoglou KS, Solomou EE, Gogos CA. Malaria: A Haematological disease. *Hematology*. 2012 Mar;17(2):106-14.
11. Kochar, D.K. Et Al. Severe *Plasmodium Vivax* Malaria: A Report On Serial Cases From Bikaner In Northwestern India. *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, V. 80, N. 2, P. 194-8, 2009.
12. Oliveira-ferreira, J. Et Al. Malaria In Brazil: An Overview. *Malaria Journal*, V. 30, N. 9, P.115, 2010.
13. Lacerda, M.V. Et Al. Understanding The Clinical Spectrum Of Complicated *Plasmodium Vivax* Malaria: A Systematic Review On The Contributions Of The Brazilian Literature. *Malar Journal*, V. 11, P. 12, 2012.
14. Baird, J.K. Evidence And Implications Of Mortality Associated With Acute *Plasmodium Vivax* Malaria. *ClinicalmicrobiologyReviews*, V. 26, N. 1, P. 36-57. 2013.
15. Alexandre, M.A. Et Al. Severe *Plasmodium Vivax* malaria, Brazilianamazon. *Emerging Infectious Disease*, V. 16, N. 10, P. 1611-4, 2010.
16. Quintero, J.P. Et Al. Malaria-Related anaemia: A Latin American Perspective. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, V. 106, P. 91-104, 2011.
17. DOUGLAS, N.M. Et Al. The Anaemia of *Plasmodium Vivax* malaria. *Malariajournal*, V. 11, N. 135, P. 135, 2012.
18. Haldar, K. Transport Mechanisms In *Plasmodium*-Infected Erythrocytes: Lipid Rafts And A Tubovesicular Network. *InternationaljournalFor Parasitology*, V. 31, N. 12, P. 1393-1401. 2007.
19. Fendel, R. Et Al. Hemolysis Is Associated With Low Reticulocyte Production Index And Predicts Blood Transfusion In Severe Malarial Anemia. *PlosOne*, V. 5, N. 4, E10038, 2010.

20. Carvalho, B.O. Et Al. On The Cytoadhesion Of *Plasmodium Vivax*-Infected Erythrocytes. The Journal Of Infectious Disease, V. 202, N. 4, P. 638-47, 2010
21. Yeo, T.W. Et Al. Greater Endothelial Activation, Weibel-Palade Body Release And Host Inflammatory Response To *Plasmodium Vivax*, Compared With *Plasmodium Falciparum*: A Prospective Study In Papua, Indonesia. The Journal Of Infectious Disease, V. 202, N. 1, P. 109–112, 2010.
22. AKIONSOGLU, K.S.; SOLOMOU, E.E.; GOGOS. C.A. Malaria: A Haematological disease. Hematology (Amsterdam, Netherlands), V. 17, N. 2, P. 106-114, 2012.
23. Ramos-júnior, W.M. et al. Clinical Aspects Of Hemolysis In Patients With *P. Vivax* Malaria Treated With Primaquine, In The Brazilian Amazon. The Brazilian Journal Of Infectious Diseases, V. 14, N. 4, P. 410-2, 2010.
24. Hedrick, P.W. Population Genetics Of Malaria Resistance In Humans. Heredity (Edinb), V. 107, N. 4, P. 283-304, 2011.
25. Adams, J. H.; mueller, I. The Biology Of *Plasmodium Vivax*. Cold Spring HarbperspectMed, V. 7, N. 9, Sep 1 2017. ISSN 2157-1422 (Electronic)
26. Adapa, S. R. et al. *Plasmodium Vivax* Readiness To Transmit: Implication For Malaria Eradication. BMC Syst Biol, V. 13, N. 1, P. 5, Jan 11 2019. ISSN 1752-0509 (Electronic).
27. Miller L, Mason S, Clyde D, McginnissM. The Resistance Factor To *Plasmodium Vivax* In Blacks The Duffy-Blood-Group Genotype. Fyfy. N Engl J Med. 1976;295:302–304. Doi: 10.1056/NEJM197608052950602.
28. Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim C. Disruption Of A GATA Motif In The Duffy Gene Promoter Abolishes Erythroid Gene Expression In Duffy–Negative Individuals. Nat Genet. 1995;10:224–228. Doi: 10.1038/Ng0695-224

29. Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, Hall SA, Beutler E. The Global Prevalence Of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency: A Systematic Review And Meta-Analysis. *BloodCells Mol Dis*. 2009;42:267–278. Doi: 10.1016/J.Bcmd.2008.12.005.
30. Luzzatto L. G6PD Deficiency And Malaria Selection. *Heredity(Edinb)*. 2012;108:456. Doi: 10.1038/Hdy.2011.90.
31. Sirugo G, Predazzi IM, Bartlett J, Tacconelli A, Walther M, Williams SM. G6PD A-Deficiency And Severe Malaria In The Gambia: Heterozygote Advantage And Possible Homozygote Disadvantage. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90:856–859. Doi: 10.4269/Ajtmh.13-0622.
32. Manjurano A, Sepulveda N, Nadjm B, Mtove G, Wangai H, Maxwell C, Et Al. African Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Alleles Associated With Protection From Severe Malaria In Heterozygous Females In Tanzania. *PlosGenet*. 2015;11:E1004960. Doi: 10.1371/Journal.Pgen.1004960.
33. Nafa K, Reghis A, Osmani N, Baghli L, Ait-Abbes H, Benabadji M, Et Al. At Least Five Polymorphic Variants Account For The Prevalence Of Glucose 6-Phosphate Deficiency In Algeria. *Hum Genet*1994;94:513–517.
34. Howes RE, Piel FB, Patil AP, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, Et Al. G6PD Deficiency Prevalence And Estimates Of Affected Populations In Malaria Endemic Countries: A Geostatistical Model-Based MaP. *PlosMed*. 2012;9:E1001339. Doi: 10.1371/Journal.Pmed.1001339.
35. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Second Edition ed: World Health Organization; 2010.
36. Cavasini, Carlos Eugênio Et Al. *Plasmodium Vivax* Infection Among Duffy Antigen-Negative Individuals From The Brazilian Amazon Region: An Exception?. *Transactions*

- Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene, V. 101, N. 10, P. 1042-1044, 2007.
37. Albuquerque, Sérgio Roberto Lopes Et Al. Fy Polymorphisms And *Vivax* Malaria In Inhabitants Of Amazonas State, Brazil. *Parasitologyresearch*, V. 106, N. 5, P. 1049-1053, 2010.
38. Alexandre, Márcia A. Et Al. Severe *Plasmodium Vivax* Malaria, Brazilian Lacerda, Marcus Vinícius Guimarães Et Al. Thrombocytopenia In Malaria: Who Cares. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, V. 106, P. 52-63, 2011.
39. Howes RE, Patil AP, Piel FB Et Al. The Global Distribution Of The Duffy Blood Group. *Nat. Commun.* 2, 266 (2011). 10.1038/Ncomms1265
40. Novaretti MC, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DA. Estudo De Grupos Sanguíneos Em Doadores De Sangue Caucasoídes E Negróides Na Cidade De São Paulo. *Revbrashematohemoter.* 2000; 22 (1): 23-32.
41. Ceravolo IP, Bruña-Romero O, Braga EM, Fontes CJ, Brito CF, Souza JM, Et Al. Anticorpos De Proteínas De Ligação Duffy *01nti-*Plasmodiumvivax* Medem A Exposição À Malária Na Amazônia Brasileira. *Am J Tropmedhyg.* 2005; 72 (6): 675-81.
42. Abou-Ali RK, Dhyani A, Terço AL, Toro DM, Gomes KS, Tezza LC, Negreiros MA, Batista CS, Souza MKS, Sanguino ECB, Albuquerque SRL. Impacto dos polimorfismos de Duffy na densidade parasitária em pacientes amazônicos brasileiros infectados por *Plasmodium vivax*. *Malar J.* 2019 27 de agosto; 18 (1): 289. doi: 10.1186 / s12936-019-2918-4.
43. Oliveira HSS, Silva ANLMD, Andrade GB, Gaia KC, Costa GLC, Santos ÂKCRD, Guerreiro JF. Molecular genotyping of G6PD mutations and Duffy blood group in Afro-descendant communities from Brazilian Amazon. *Genet Mol Biol.* 2018 Oct-Dec;41(4):758-765. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2017-0253. Epub 2018 Nov 29.

44. Tran TM, Oliveira-Ferreira J, Moreno A, Santos F, Yazdani SS, Chitnis CE, Et Al. Comparação De Reatividade De Igg A Antígenos De Invasão De Merozoíto De *Plasmodium Vivax* Em Uma População Da Amazônia Brasileira. Am J Tropmedhyg. 2005; 73 (2): 244-55.
45. Azevedo ES, Silva KM, Da Silva MC, Lima AM, Fortuna CM, Santos MG. Estudos Genéticos E Antropológicos Na Ilha De Itaparica, Bahia, Brasil. Hum Hered. 1981; 31 (6): 353-7.
46. Zago MA, Costa FF, Tom LG, Bottura C. Distúrbios Hereditários Da Hemoglobina Em Uma População Brasileira. Hum Hered. 1983; 33 (2): 125-9.
47. Cavasini CE, De Mattos LC, Couto AA, Couto VS, Gollino Y, Moretti LJ, Et Al. Polimorfismos Genéticos De Grupos Sanguíneos Duffy Em Pacientes Com Malária *Vivax* Em Quatro Áreas Da Amazônia Brasileira. Malar J. 2007; 6: 167.

Table 1. Allele frequency of the Duffy blood group from *vivax* malaria patients.

Phenotypes	Alleles	Percentage (%)
<i>Fy (a+b-)</i>	<i>FY * 01/ FY * 01- (FYA/FYA)</i>	15,11
<i>Fy (a+b+)</i>	<i>FY * 01/FY * 02- (FYA/FYB)</i>	42,66
<i>Fy (a+b-)</i>	<i>FY * 01/FY * 02N.01 -(FYA/FYB^{ES-})</i>	16
Fy (a+ ^w)	<i>FY * 01W.02 - (FYA / FYA^{ES})</i>	0,88
<i>Fy (a-b+)</i>	<i>FY * 02/ FY * 02 -(FYB/FYB)</i>	16
<i>Fy (a-b+)</i>	<i>FY * 02/FY * 01N.01 -(FYB/FYB^{ES})</i>	8,88
<i>Fy (a-b-)</i>	<i>FY * 01N.01/ FY * 01N.01 - (FYB^{ES}/ FYB^{ES})</i>	0,44

Table 1 shows the phenotypes, the respective alleles and their distribution in% among *vivax* malaria patients. More frequently for the FYA / FYB genotype and less frequently for the null expression genotype.

Table 2. Genotypic Frequency of G6PD among uncomplicated and severe from *vivax* malaria patients.

G6PD Genotypes	MALARIA		RR (CI)	p-value	PREVIOUS MALARIA EPISODES		RR (CI)	p-value
	Severe	Uncomplicated			yes	no		
	N (%)	N (%)			N (%)	N (%)		
202 (GA/AA)	22 (26.2)	07 (6.0)	5.57	<.001*	17 (25.8)	08 (6.3)	5.11	<.001*
Wild Type	62 (73.8)	110 (94,0)	(2.25-17.79)		49 (74.2)	118 (93.7)	(2.02-12.63)	
376 (AG/GG)	30 (32.6)	13 (10,6)	4.09	<.001	25 (33.8)	17 (12.6)	3.54	.<.001*
Wild Type	62 (67.4)	110 (89.4)	(1.99-8.43)		49 (66.2)	118 (87.4)	(1.75-7.13)	
G202A / A376G	17 (21,5)	03 (2,7)	10.54	<.001**	13 (21.0)	07 (5.6)	4.47	<.001*
Wild Type	62 (78,5)	110 (97,3)	(2.83-35.66)		49 (79.0)	118 (94.4)	(1.68-11.88)	

RR: relative Risk (CI): Interval of Confidence * χ^2 test (Yates's corrected) ** Fisher's exact test N: cases

Table 2 shows the association of G6PD mutations 202 and 376 with severe and uncomplicated malaria. The 376 mutation was associated with an increased risk of the disease while the mutation with malaria episodes. These Relative Risk values increased when the mutations appeared together.

Table 3. Genotypic Frequency distribution of G6PD among uncomplicated and severe *vivax* malaria by GATA FY*ES Normal and Mutated from *vivax* malaria patients.

Malaria	GATA (FY*ES)	G202A		p-value	A376G		p-value	G202A / A376G		p-value
		Normal	Mutated		Normal	Mutated		Normal	Mutated	
Uncomplicated	Normal	86 (94.5%)	05 (5.5%)	.487**	86 (88.7%)	11 (11.3%)	.452**	86 (97.7%)	02 (2.3%)	.531**
	Mutated	24 (92.3%)	02 (7.7%)		24 (92.3%)	02 (7.7%)		24 (96.0%)	01 (4.0%)	
Severe	Normal	45 (77.6%)	13 (22.4%)	.181*	45 (70.3%)	19 (29.7%)	.252*	45 (83.3%)	09 (16.7%)	.107*
	Mutated	17 (65.4%)	09 (34.6%)		17 (60.7%)	11 (39.3%)		17 (68.0%)	08 (32.0%)	
Total	Normal	131 (87.9%)	18 (12.1%)	.087*	131 (81.4%)	30 (18.6%)	.249*	131 (92.3%)	11 (7.7%)	.043*
	Mutated	41 (78.8%)	11 (21.2%)		41 (75.9%)	13 (24.1%)		41 (82.0%)	09 (18.0%)	

* χ^2 test (Yates's corrected) ** Fisher's exact test N: cases

Table 3 is associated with the presence of the GATA FYBES mutation and the G202A and A376G mutation in patients with severe and uncomplicated *vivax* malaria. Demonstrating, although without statistical significance, that the GATA mutation together with the G6PD mutation was more present in severe malaria, representing a possible association with the severity of the disease ($p > 0.043$). Contradicting studies that relate these mutations to protection against *vivax* malaria.

Figure 1. Genotypic and phenotypic distribution of Duffy Antigens among uncomplicated and severe *vivax* malaria patients.

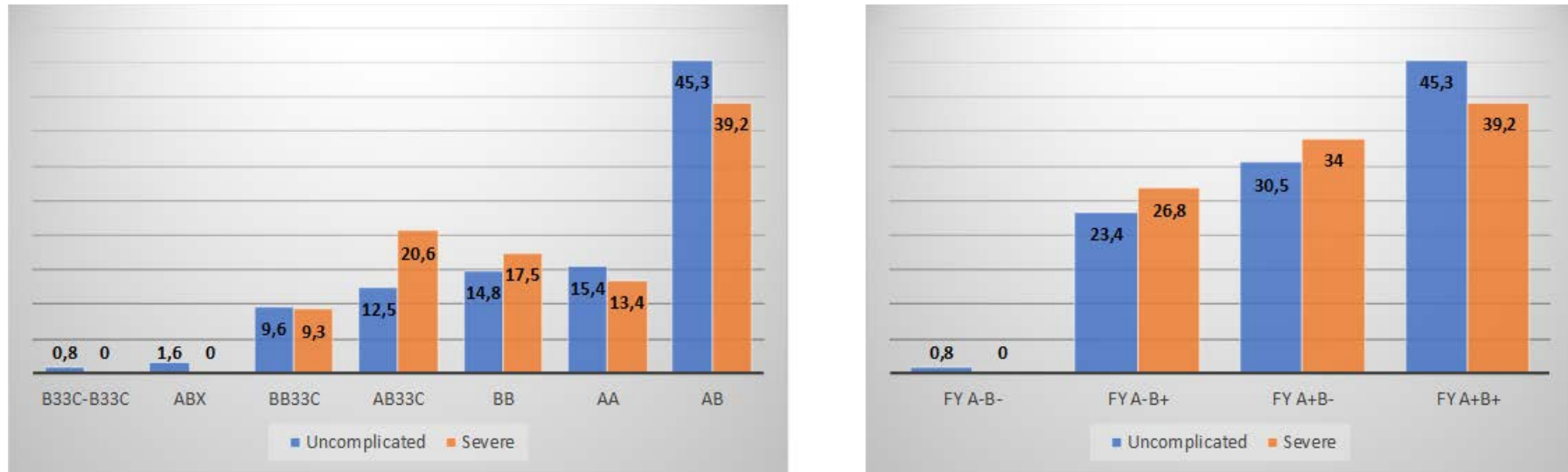


Figure 1 demonstrates that the genotypes with null and weak expression were registered in patients with uncomplicated malaria and the FYAFYBES genotype demonstrated greater registration in cases of severe malaria. The phenotype (a + b +) was the only one with the highest record of uncomplicated malaria cases.

Figure 2. Distribution of c.202 and c.376 in the presence and absence of the GATA mutation among malaria patients.

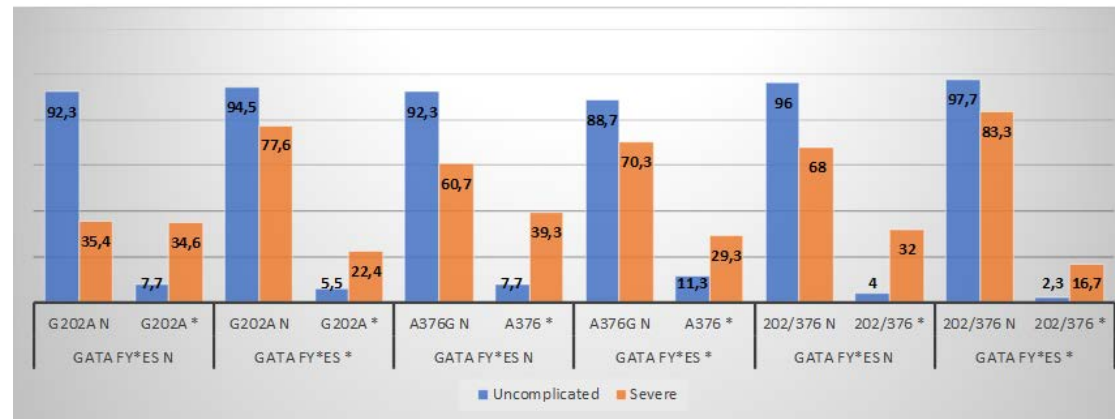
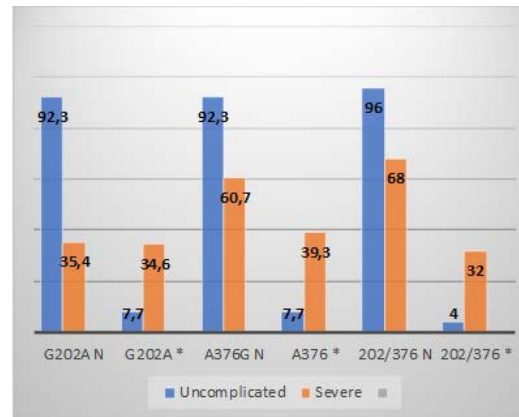


Figure 2 at the top shows that the presence of G202A and A376G mutations were more frequent in cases of severe malaria, with the lowest frequency of uncomplicated malaria cases as the concomitant presence of mutations. At the bottom, the GATA mutation has been associated with virtually all records of GATA / G6PD mutations in cases of severe malaria.

Figure 3. Level of parasite and densities count by Duffy phenotypes found in the studied patients.

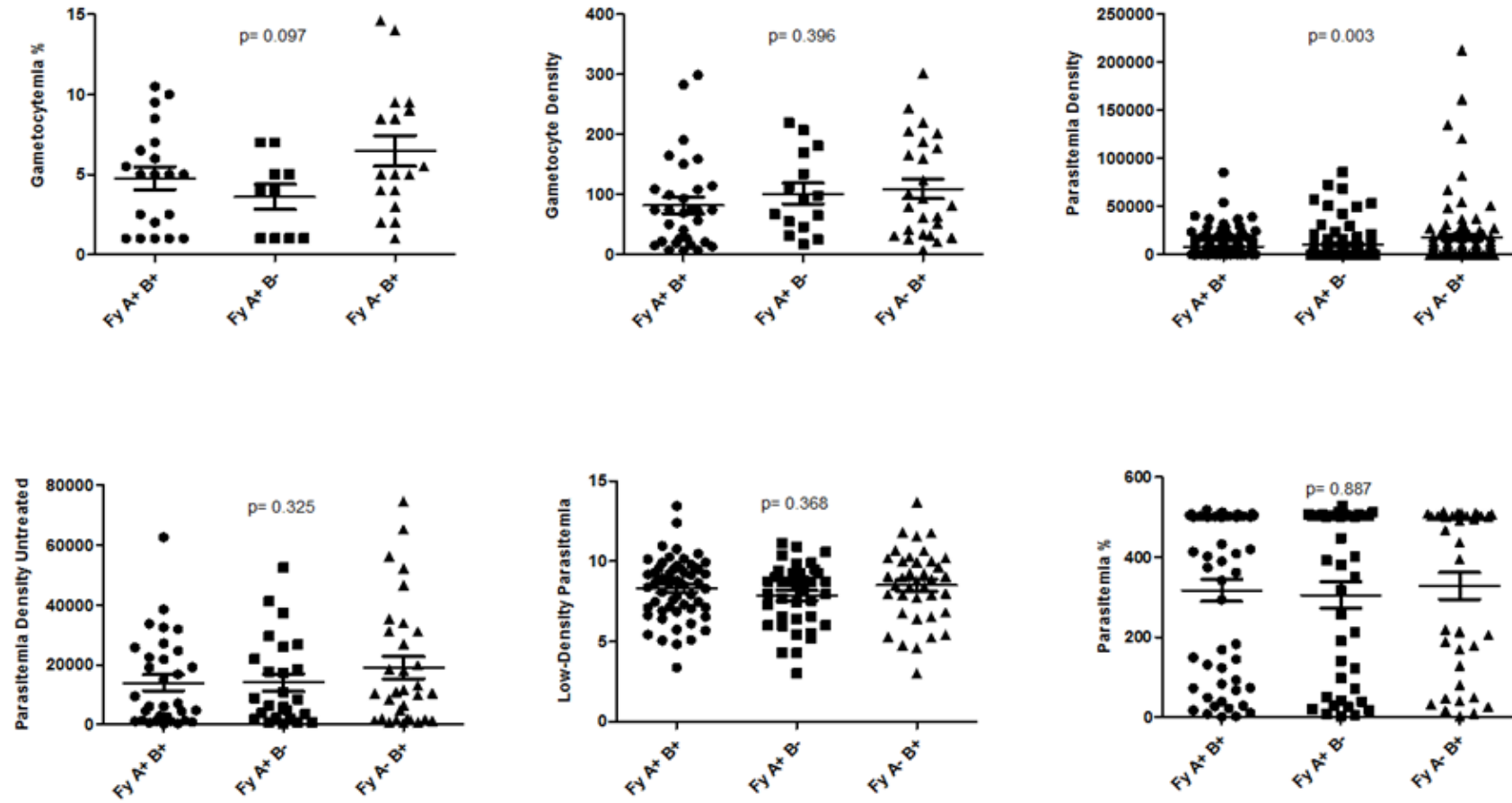


Figure 3 demonstrated statistical significance ($p = 0.003$) for the parasitic density, mainly in the fy phenotype (a-b +).

Figure 4. Level of parasite and densities count by Duffy Genotypes found in the studied patients.

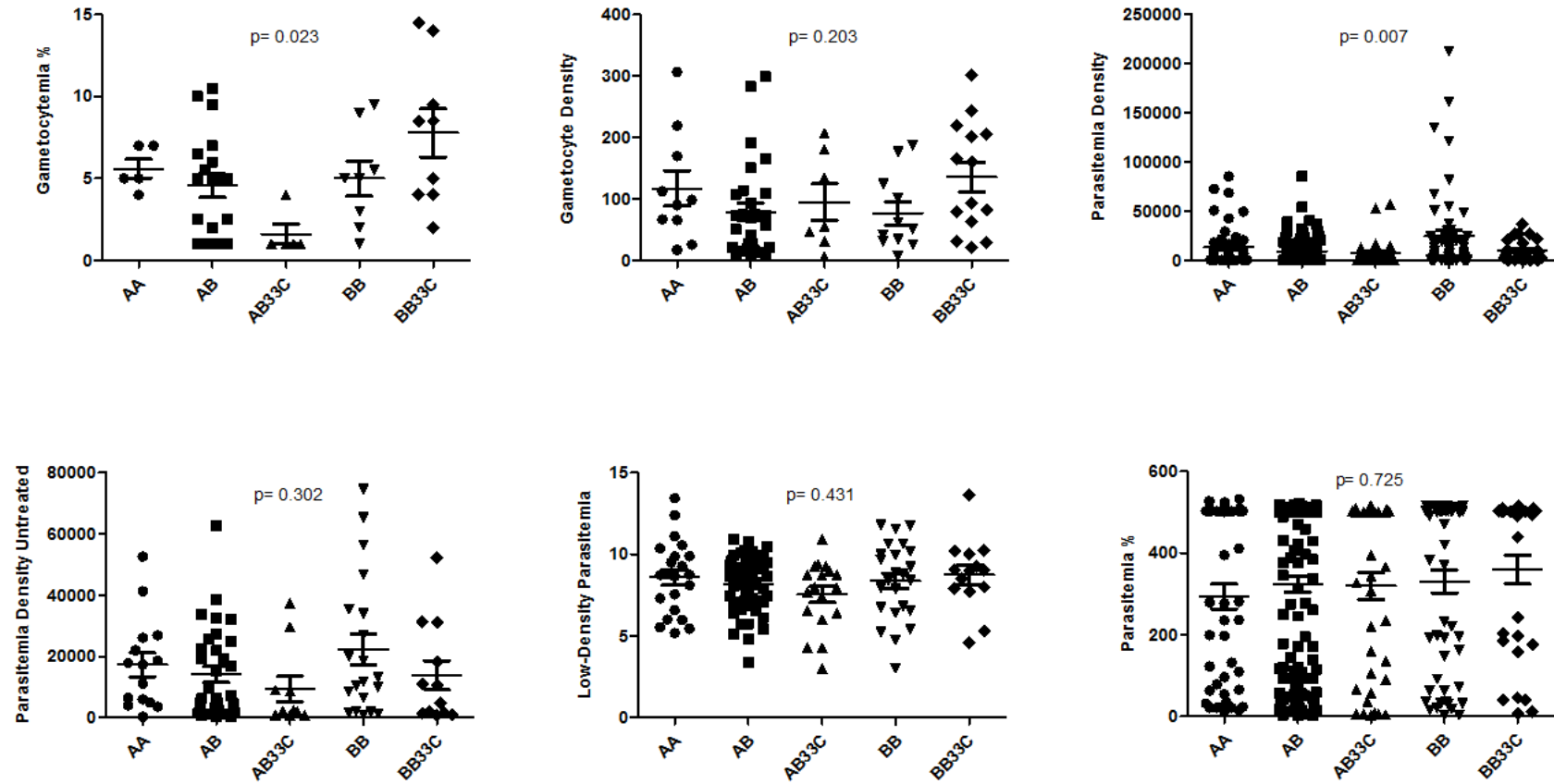


Figure 4 shows the BB genotype with the highest parasitic values, and when an FYB allele was present and expressed, these values were high. The parasitic density was lower in the presence of the GATA mutation.

b

PREVALENCE OF POLYMORPHISMS IN THE GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE IN BLOOD DONORS IN AMAZONAS

Journal:	<i>Vox Sanguinis</i>
Manuscript ID:	VOX-19-0272
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	02-Dec-2019
Complete List of Authors:	Ferreira, Natália; Universidade do Estado do Amazonas, programa de Pós Graduação em Hematologia; Universidade Federal do Amazonas, Ciências Farmacêuticas Anselmo, Fernanda; Universidade do Estado do Amazonas, programa de Pós Graduação em Hematologia Albuquerque, Sérgio; Fundação HEMOAM, Immunohematology Fraiji, Nelson; Fundação HEMOAM, Immunohematology Neto, José; Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Keywords:	Donor health, Donors, Genetics

**PREVALENCE OF POLYMORPHISMS IN THE GLUCOSE-6-PHOSPHATE
DEHYDROGENASE IN BLOOD DONORS IN AMAZONAS**

Natália Santos Ferreira^{1,3}, Fernanda Cozendey Anselmo^{1,2}, Sérgio Roberto Lopes
Albuquerque¹, Nelson Abrahim Fraiji¹, José Pereira de Moura Neto^{1,2,3}

1 Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus,
Amazonas, Brasil.

2 Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Manaus,
Amazonas, Brasil.

*Address correspondence to: José Pereira de Moura Neto, Universidade Federal do
Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, General Rodrigo Otávio Jordão Ramos
Avenue, 6200 - Coroado I, Manaus - AM, CEP: 69067-005, phone + 55-92-3305-1181-
R:2007 or jp-mn@hotmail.com

Conflict of interest: None. The sponsors of this study were public or non-profit
organizations that support science in general. They had no role in gathering, analyzing or
interpreting the data.

Ethical approval: The study was approved by The National Committee of Ethics and
Research, Manaus, Amazon, and provided written informed consent in accordance with
the Declaration of Helsinki.

Sponsorships:

- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) – Processo:
1094/2013-FAPEAM.

Abstract

Background and Objectives: The Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) has the main function of protecting red blood cells against oxidizing agents. Carriers of mutations in the G6PD gene are asymptomatic. However, in the presence of oxidative agents, such as some drugs, they may undergo hemolysis. There is limited knowledge of the frequency of mutations in the Amazon Region and the aim of this study was to know the prevalence of G6PD mutations and to characterize them among blood donors in the state of Amazonas.

Materials and Methods: For the methodology, 1222 blood donors from the Amazonas Hematology and Hemotherapy Foundation, 806 men and 416 women were selected, and the characterization of G6PD was performed by the quantitative Real Time Polymerase Chain technique for seven enzyme polymorphisms.

Results: 101 G6PD mutated blood donors were identified, corresponding to a total frequency of 8.27%, leading to the characterization of the polymorphisms: A- c.202 G>A / c.376 A>G (A-) in 95 cases (7.7%) and 680 G>T / 968 T>C (A-) two cases (0.17%), for the Mediterranean variant (c.563 C>T) three cases (0.25%) and for Chatham variant (c.1003G> A) one case (0.08%). No carriers were found, Santamaria (c.542 A>T + c.376 A>G) and Santiago de Cuba (c.1339 G>A), a value found predominantly in heterozygous women. Of the seven polymorphisms found, only two were not identified in the population.

Conclusion: In the state of Amazonas, the prevalence of G6PD deficient blood donors is not rare. Consideration should be given to routine screening for G6PD activity in blood donors, as in addition to identifying deficient individuals, we can also try to prevent red blood cell transfusion with enzymopathy in patients at risk of a hemolytic crisis.

Keywords: donors, G6PD, red blood cells, polymorphism; prevalence

Introduction

Glucose-6-phosphate dehydrogenase is an enzyme present in the cytoplasm of all cells in the human body, and its purpose is to assist in the production of substances that protect them from being destroyed. Red blood cells depend exclusively on this enzyme as the only source of NADPH production available and the main protection against oxidative stress [1-3].

When its function is deficient, there is not enough NADPH production to detoxify when production of reactive oxygen species (ROS) increases, which leads to oxidative damage and early hemolysis. Moreover, the transformation of hemoglobin from reduced form to oxidized form causes obstacles in oxygen circulation and transport, as well as facilitating cell fragmentation in this process [4].

The heritability of G6PD deficiency is linked to the X chromosome, where men are always affected and women only when in the homozygous deficiency state [5].

The G6PD coding gene has 13 exons and 12 introns, spread over about 20Kb of genomic DNA, encoding 515 amino acids, in addition to the promoter region [6-9].

More than 400 different mutations have been described, most of which are simple substitutions, causing many of them to decrease enzymatic activity, but never the total loss of its activity, since it becomes incompatible with life [10].

Heterozygous women have two erythrocyte populations, half of which are normal and the other deficient, and may, in some cases, present the majority with deficiency or the majority with normal activity [11,12].

G6PD variants differ in Michaelis enzyme activity, electrophoretic mobility, and constant for their substrates, glucose-6-phosphate (G6P) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) [13]. G6PD variants determine different degrees of changes in enzyme activity and can be grouped into five classes based on their activity [14].

Because it is asymptomatic and does not affect the decrease in hemoglobin and hematocrit concentrations, people with G6PD deficiency are not unable to donors' blood. This fact has been constantly debated in national and international congresses and articles that raise observations about the propensity of grants from donors with disabilities decreased survival due to a greater tendency to hemolysis during storage and that transfusions from these donors can worsen the clinic recipient. [15, 16].

Based on these observations, associated with the unknown population frequency for G6PD deficiency in Manaus city and even Amazonas state, our objective was to determine the prevalence of the most frequent mutations in the Brazilian population correlated with G6PD deficiency in blood donors from Manaus-Amazonas described below: c.202/c.376 (A-); c.680/c.968 (A-); Mediterranean (c.563); Santamaria (c.542+c.376); Santiago de Cuba (c.1339; Chatham (c.1003).

Methodology

This study was based on a cross-sectional observational model. Blood donors attended at the Amazonas State Hematology and Hemotherapy Foundation (HEMOAM) from August 2017 to January 2018 were randomly selected. A total of 1222 individuals participated in the study, 806 (66%) males and 416 (34%) females.

This study was approved by the Research Ethics Committee (REC) with the number of CAEE: 01193312.4.0000.0009. All participants were informed of the objectives and importance of the work to be developed. All those who agreed to participate were asked to sign a free informed consent form (ICF) and approximately 03 mL of peripheral blood were collected in an EDTA anticoagulant tube (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt) and the hematological determinations were immediately performed. automated counter - ABX Pentra 80 (HORIBA DIAGNOSTICS, Montpellier, FR).

Molecular Analysis

DNA was extracted from 200 μ L whole blood using the QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit (Cat No./ID 51304) according to the manufacturer's protocol and quantified on NanoDrop 2000 equipment and stored at -20°C until analysis was performed. molecular.

For the characterization of the polymorphisms, the Real Time PCR (qPCR) technique was used by QuantStudio 3 equipment (Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific®) using TaqMan® probes specific for each polymorphism (Table 1). The amplification reaction was performed for a final volume of 12 μ L / reaction, containing 5 μ L of 2x TaqMan Universal Master Mix, 0.3 μ L of 20x SNP Genotyping Assay, 4.8 μ L of sterile water and 2.0 μ L of DNA (~ 100ng) of the. sample.

The G6PD gene variants analyzed in this project were chosen based on prior knowledge of globally observed frequencies and their clinical importance according to the WHO classification.

Table 1: Probe Identification for Real-Time PCR Technique

Polimorphism	Identification
(A-) VAL68MET (202 G/A)	rs1050828
(A+) ASN126ASP (376 A/G)	rs1050829
(Mediterranean) SER188PHE (563 C/T)	rs5030868
(Santamaria) ASP181VAL (542 A/T)	rs5030872
(Chatham) ALA335THR 1003 G>A	rs5030869
(A-) LEU323PRO (968 T/C)	rs76723693
(Santiago de Cuba) GLY447ARG (1339 G/A)	rs37852317

Statistical analysis

The data obtained were entered into a database using GraphpadPrism 5.0 Software (Graphpad Software, San Diego, CA-USA) and SPSS version 19, according to the variable type.

The analysis of qualitative or categorical variables of three or more groups was performed by the non-parametric Chi-square test (χ^2), duly corrected by the Mantel-Haenszel and Yates tests. In the analysis of only two categorical groups, the analyzes were performed by Fisher's exact test. Confidence intervals of 95% and prevalence ratio were calculated for these variables.

Results

Molecular analysis showed the presence of mutations in 101 (8.27%) donors, 35 (2.86%) males and 66 (5.40%) females. Identification of variants A- c.202/c.376 was confirmed in 95 of the cases (7.7%); c.680/968 in two cases (0.17%); Mediterranean variant c.563 in three cases (0.25%) and Chatham variant c.1003 in one case (0.08%). No carriers of the Santamaria c.542/c.376 and Santiago de Cuba c.1339 variants were found.

The variants found in this study belong to Class II, Mediterranean (c.563) and Chatham (c.1003), and the class III, A- c.202/c.376 and c.680/968. Class II variants include activities with enzymatic activity of less than 10% and carriers of this range generally associated with hemolytic anemia. Therefore, this class is more severe than class III, which has enzymatic activity ranging from 10 to 60% and is only susceptible to hemolytic anemia when under strong induced oxidative stress. Class III is the most commonly found in Brazil [14-16].

The c.202 and c.376 polymorphisms characterize the G6PD (A-) phenotype, described as African G6PD. This genotype is the result of several overlapping points, being found mutations 376, characteristic of the phenotype G6PD A+, and c.202 [17].

Hematological values between blood donors identified with G6PD mutations and normal donors without G6PD mutations were verified, and our results when combined with G6PD hematological values and genotypes demonstrate significance in the differences between the two groups. It has been shown that for male blood donors the mean values were reduced in red blood cells, hemoglobin and hematocrit in the c.202 and c.376 mutation carriers with significant differences from normal donors, ($P < .001$), ($P = 0.04$) respectively.

These results demonstrate that hematological values are lower in those carriers in both mutations, c.202 and c.376. However, males, when carriers have lower rates, with statistical significance, different from females, that were statistically significant when carrying the c.202 mutation and not for c.376.

Discussion

The prevalence value found in our study agrees with the Brazilian average. Studies involving newborns in the states of Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Paraíba and Bahia obtained an average prevalence of 4.75% of people with disabilities in the G6PD [17-20]. Other studies have evaluated the prevalence of G6PD in Brazil among children and adults and obtained an average of 3.59%, ranging from 1 to 7% of G6PD mutation carriers [21-29].

The results of this and other studies corroborate a hypothesis of high prevalence of the G6PD model in Brazilian territory is using the processes of colonization and use of people of African origin as labor in the colonial period, causing high miscegenation and, consequently, high propagation of their genetic characteristics. The mutation patterns found are within the pattern found for the Brazilian territory [30-32].

The literature has evidence of decreased viability of G6PD-deficient red blood cells during blood storage [33]. There are cases of post transfusion hemolysis in red blood cell receptors with G6PD mutations [34-36] as well as post-transfusion hemolysis in pediatric patients with G6PD mutations [37]. Some patients are transfusion dependent and may be in a higher risk group to receive blood from donors with G6PD mutations as these red blood cells are severely impaired by oxidative damage [38].

G6PD mutation-bearing blood pockets with a history of hemolysis are unsuitable for transfusion. Although carriers of a G6PD mutation or other hereditary erythrocyte membrane defects with no history of hemolysis may be donated by blood, your blood is not suitable for intrauterine transfusion, neonatal transfusion or G6PD deficient lesions [39].

Our results demonstrate lower rates of hematological values, especially in males, who are most blood donors in the state of Amazonas and worldwide. Making this study very relevant because in addition to the values considered lower in carriers, studies have already shown that red blood cells with these mutations have a higher level of oxidative stress due to enzymatic insufficiency. This leads to the understanding that red blood cell donor concentrate has shorter survival during storage [40].

This study made it possible to point out, for the first time, in Amazonas, that the presence of blood donors carrying G6PD is not a rare event, being the first molecular study to describe which are the most frequent variants in the population. We believe the frequency of 8.27% is important to consider screening for G6PD mutations in blood

donors. These blood pockets need to reach their receptors faster than blood pockets without the mutation. because the longer storage period can lead to hemolysis, leading to loss of blood bag, or even the recipient to suffer a post transfusion hemolytic crisis.

Among the population studied, the (A +) 376 A / G mutation was the most frequent followed by the (A-) 202 G/A mutation. This is first description of the (A-) 968 T/C mutation. Hematological values for both men and women were significant to 202 G/A mutation. For a 376 A/G mutation only men were statistically significant.

References

1. BEUTLER, Ernest. G6PD deficiency. *Blood*, v. 84, n. 11, P. 3613-3636, 1994.
2. COMPRI, M.B., Saad, T.O., Ramalho, A.S. Investigação genético-epidemiológica e molecular da deficiência de G-6-PD em uma comunidade brasileira. *Cad. Saúde Pública*, v.16, n.2, P.335-342, 2000
3. Van den broek, l., heylen, e., & van den akker, m. (2016). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: not exclusively in males. *Clinical case reports*, 4(12), 1135-1137
4. SILVA, Viviane da Conceição et al. Bases moleculares da deficiência de G6PD e sua relação com o tratamento da hanseníase. 2017. Tese de Doutorado
5. LUZZATTO, Lucio. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: from genotype to phenotype. 2006.
6. CAPPELLINI, Maria Domenica; FIORELLI, GEMINO. Glucose-6-phosphatedehydrogenasedeficiency. *The lancet*, v. 371, n. 9606, P. 64-74, 2008.
7. Soares, I. F., leal, a., moura, j., do nascimento vieira, j. F. P., barros, v. C., & de oliveira, e. H. (2013). Atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase (g6pd) em membros de povos de terreiros de umbanda na cidade de teresina, piauí. *Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada*, 34(3).
8. Zuffardi o, fraccaro m. Gene mapping and serendipity. The locus for torticollis, keloids, cryptorchidism and renal dysplasia (31430, mckusick) is at xq28, distal to the g6pd locus. *Hum genet.* 1982;62(3):280-1.
9. Pai, g. S., sprenkle, j. A., do, t. T., mareni, c. E., migeon, b. R. Localization of loci for hypoxanthine phosphoribosyltransferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase and biochemical evidence of nonrandom x chromosome expression from studies of a human x-autosome translocation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77: 2810-2813, 1980.
10. Galappaththy GN, Tharyan P, Kirubakaran R. Primaquine for preventing relapse in people with *Plasmodium vivax* malaria treated with chloroquine. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;(10):CD004389. Review
11. Dreyfus jc, ressis m, kaplanjc. The existence of 2 populations of erythrocytes in women heterozygotic for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Demonstration by spectrophotometry on individually examined erythrocytes. *C r hebdsancesacad sci.* 1964

12. Vivescorronsjl, garcía am, sosa am, pujades a, colomer d, linares m. Heterozygous pyruvate kinase deficiency and severe hemolytic anemia in a pregnant woman with concomitant, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Ann hematol*. 1991
13. Saha s & samuelapw. Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in the sudan – including gdkhartoum, a hyperactive slow variante. *Hum hered* 41:17-21, 1991.
14. Luzzatto, L. & Mehta, A. (1995). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (eds C. R. Scriver, A. L. Beaudet and W. S. Sly), pP. 3367–3398. McGraw-Hill, New York.
15. Monteiro WM1, Val FF1, Siqueira AM1 et al. G6PD deficiency in Latin America: systematic review on prevalence and variants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014 Aug;109(5):553-68.
16. Stanton R C. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and Cell Survival. *IUBMB Life*. 2012; 64(5): 362–369
17. 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.
18. Ferreira MF. Triagem neonatal de deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase e prevalência das mutações G202A (G6PD A-) e C563T (G6PD Mediterrâneo) em Mato Grosso/Brasil [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2014.
19. Castro S, Weber R, Dadalt V, Tavares V, Giugliani R. Prevalence of G6PD deficiency in newborns in the south of Brazil. *J Med Screen*. 2006;13(2):85-6.
20. Silva KM. Deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase em recém-nascidos em uma maternidade pública na cidade de Campina Grande – PB [tese]. Campina Grande: Universidade Estadual da Paraíba; 2016.
21. Barraviera B, Meira DA, Machado PE, Curi PR. Malária no município de Humaitá, Estado do Amazonas. XXI. Prevalência da deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em amostra da população e em doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1987;29(6):374-80.
22. Compri MB, Saad ST, Ramalho AS. Investigação genético-epidemiológica e molecular da deficiência de G-6-PD em uma comunidade brasileira. *Cad Saúde Pública*. 2000;16(2):335-42.
23. Katsuragawa TH, Gil LH, Stabile RG, Pires MG, Bonini-Domingos CR. Avaliação da incidência da deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD) e

perfil hematológico em indivíduos de uma região de Rondônia. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2004;26(4):268-73.

24. Kühn VL, Lisbôa V, de Cerqueira LP. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em doadores de sangue de um hospital geral de Salvador, Bahia, Brasil. *Rev Paul Med.* 1983;101(5):175-7.

25. Maia UM, Batista DC, Pereira WO, Fernandes TA. Prevalência da deficiência da glicose- 6-fosfato desidrogenase em doadores de sangue de Mossoró, Rio Grande do Norte. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32(5):422-3.

26. Mauricio CR, Maia RD, Queiroz SM, Araújo MG, Miranda RG, Medeiros TM. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase: dados de prevalência em pacientes atendidos no Hospital Universitário Onofre Lopes, Natal – RN. *Rev Bras Anal Clin.* 2006;38(1):57-9.

27. Nicolielo DB, Ferreira RL, Leite AA. Atividade da 6-fosfogliconato desidrogenase em deficientes de glicose-6-fosfato desidrogenase. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2006;28(2):135-8.

28. Soares LF, Leal JM, Vieira JF, Barros VC, Oliveira EH. Atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em membros de povos de terreiros de umbanda na cidade de Teresina, Piauí. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2013;34(3):363-7.

29. Perinoto A, Costa CR, Duarte GS, Paula RA, Paula FB, Duarte SM. Prevalência da deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase em uma população adulta. *Rev Univ Vale Rio Verde.* 2013;11(1):127-34.

30. Castro SM. Aspectos laboratoriais do diagnóstico da deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.

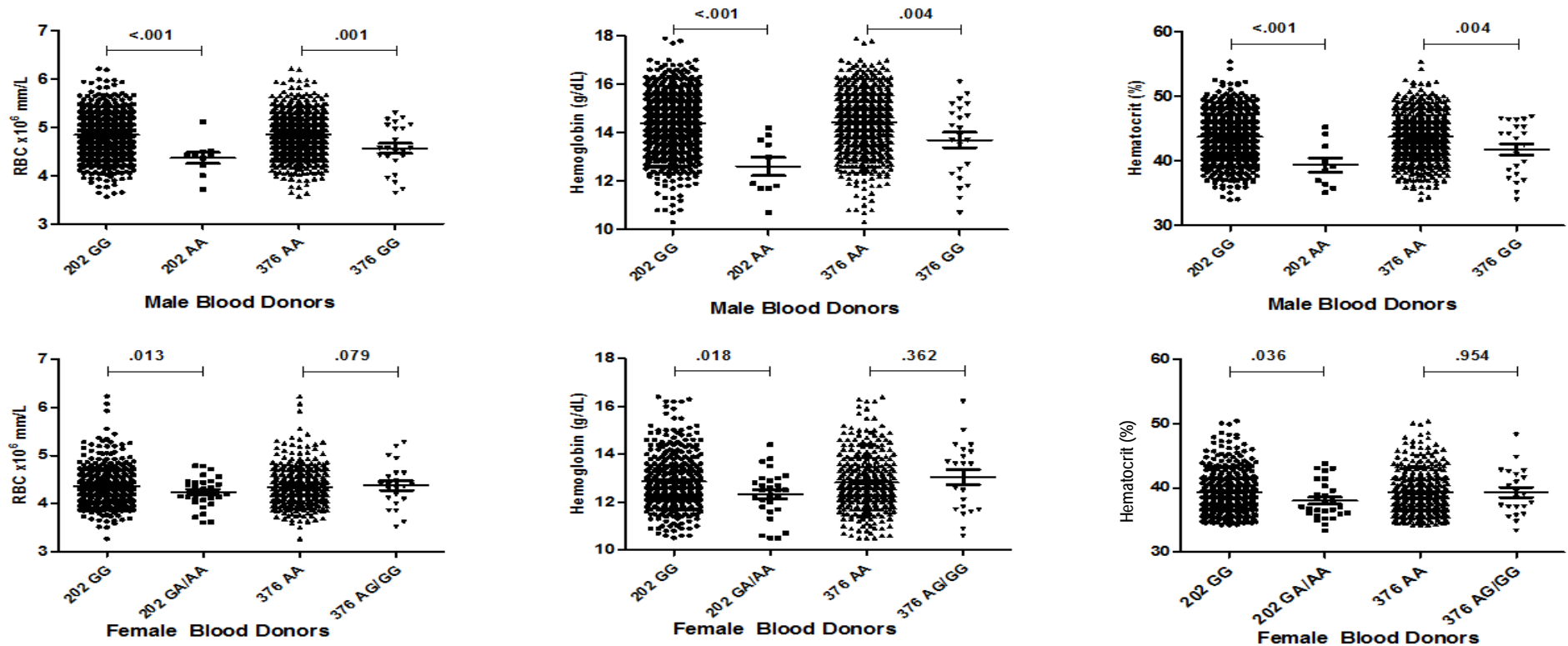
31. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. *Triagem Neonatal Biológica: manual técnico* [Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2016 [citado 2018 Mar 12]. Disponível em:

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/triagem_neonatal_biologica_manual_tecnico.pdf

32. Weimer TA, Salzano FM, Westwood B, Beutler E. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants from Brazil. *Hum Biol.* 1993; 65(1):41-7.

33. Kanias T, Gladwin MT: Nitric oxide, hemolysis, and the red blood cell storage lesion: interactions between transfusion, donor and recipient. *Transfusion* 2012; 52:1388–1392
34. Shanthala Devi AM, Helen R, Vanamala A, et al.: Screening for G6PD deficiency in blood donor population. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2010; 26:122–123
35. Shalev O, Manny N, Sharon R: Posttransfusional hemolysis in recipients of glucose-6-phosphate dehydrogenase- deficient erythrocytes. *Vox Sang* 1993; 64:94–98
36. Nabavizadeh SH, Anushiravani A: The prevalence of G6PD deficiency in blood transfusion recipients. *Hematology* 2007; 12:85–88
37. Kumar P, Sarkar S, Narang A: Acute intravascular haemolysis following exchange transfusion with G6PD deficient blood. *Eur J Pediatr* 1994;153:98–99
38. Johnson RM, Ravindranath Y, el-Alfy M, et al.: Oxidant damage to erythrocyte membrane in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: correlation with in vivo reduced glutathione concentration and membrane protein oxidation. *Blood* 1994;83:1117–1123
39. Kriebardis A, Antonelou M, Stamoulis K, et al.: Cell-derived microparticles in stored blood products: innocent bystander or effective mediators of post-transfusion reactions? *Blood Transfus* 2012; 10:s21–s34
40. RAMALHO, A.S., Beiguelman, B. Deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6-PD) em doadores de sangue brasileiros. *F. Méd.*, v.73, P.281, 1976.

Figure 1: Levels of hematological values between blood donors, male and female, with the genotypes G6PD c.202 G> A and c.376 A> G and without mutation. Comparison of donor hematological values between the mutation carriers and without the mutation. For males, the values were significant, showing lower values. In the female gender there was a decrease, but not significant as in men. The 202 mutation showed lower values.



7. CONCLUSÕES

ARTIGO 1 (G6PD e Duffy)

- Este estudo relata a frequência das mutações G202A e A376G e alelos Duffy em pacientes com malária grave e sem complicações em Manaus-Amazonas;
- As mutações G202A e A376G foram um fator de risco para o desenvolvimento de malária grave por *P. vivax*;
- O diagnóstico molecular de G202A e A376G em pacientes diagnosticados com malária antes do tratamento pode ser necessário na população amazônica;
- Os genótipos com mutações GATA heterozigotas não foram um fator protetor contra a malária;
- A malária não complicada mostrou maior variação de frequência com a presença e ausência das mutações GATA e G6PD do que a malária grave.

ARTIGO 2 (G6PD em Doadores)

- Pela primeira vez é descrita que no Amazonas, a presença de doadores de sangue portadores de G6PD não é um evento raro, sendo o primeiro estudo molecular a descrever quais são as variantes mais frequentes na população.
- A Elevada frequência de mutações na G6PD é importante ser considerada no rastreamento de mutações no G6PD em doadores de sangue.
- A mutação (A+) 376 A/G foi a mais frequente, seguida pela mutação (A-) 202 G/A.
- Primeira descrição da mutação (A-) 968 T/C.
- Valores hematológicos diminuídos para homens e mulheres foram significativos para a mutação 202G/A. Para uma mutação 376 A/G, apenas os homens foram estatisticamente significativos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mathias, j. L. D. S. (2013). Caracterização molecular da desidrogenase da glicose 6-fosfato e hemoglobinopatias em pacientes com malária por *Plasmodiumvivax*.
2. Brito, m. A. M. Avaliação de acurácia do teste rápido carestart™ g6pd para a detecção de indivíduos deficientes de glicose-6-fosfato desidrogenase em uma área endêmica de malária por *Plasmodium vivax*. 2015.
3. Ho hy, cheng ml, cheng pf, chiudt. Low oxygen tension alleviates oxidative damage and delays cellular senescence in g6pd-deficient cells. *Freeradic res.* 2007 may;41(5):571-9.
4. Verdugo, P., calvanese, m., rodríguez, d., &cárcamo, c. (2014). Deficiencia de glucosa6 fosfato deshidrogenasaen niños: caso clínico. *Revista chilena de pediatría*, 85(1), 74-79.
5. Van den broek, l., heylen, e., & van den akker, m. (2016). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: not exclusively in males. *Clinical case reports*, 4(12), 1135-1137.
6. Cappellini, m. D., &fiorelli, g. E. M. I. N. O. (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *The lancet*, 371(9606), 64-74.
7. Luzzatto, L. & Poggi, V.E. (2009) Glucose 6 -phosphate dehydrogenase deficiency. In: *Hematology of Infancy and Childhood* (eds by S.H. Orkin, D.G.
8. Soares, l. F., leal, a., moura, j., do nascimento vieira, j. F. P., barros, v. C., & de oliveira, e. H. (2013). Atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase (g6pd) em membros de povos de terreiros de umbanda na cidade de teresina, piauí. *Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada*, 34(3).
9. Zuffardi o, fraccaro m. Gene mapping and serendipity. The locus for torticollis, keloids, cryptorchidism and renal dysplasia (31430, mckusick) is at xq28, distal to the g6pd locus. *Hum genet.* 1982;62(3):280-1.
10. Pai, g. S., sprenkle, j. A., do, t. T., marení, c. E., migeon, b. R. Localization of loci for hypoxanthine phosphoribosyltransferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase and biochemical evidence of nonrandom x chromosome expression from studies of a human x-autosome translocation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77: 28102813, 1980.

11. Luzzatto, L. & Mehta, A. (1995). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (eds C. R. Scriver, A. L. Beaudet and W. S. Sly), pp. 3367–3398. McGraw-Hill, New York.
12. Luzzatto, L., Nannelli, C., & Notaro, R. (2016). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Hematology/Oncology Clinics*, 30(2), 373-393.
13. Sansone G, Rasore-Quartino A, Veneziano G. Demonstration on blood smears of a double erythrocyte population in women heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Pathologica*. 1963 sep-oct;55:371-5.
14. Dreyfus JC, Rassis M, Kaplan JC. The existence of 2 populations of erythrocytes in women heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Demonstration by spectrophotometry on individually examined erythrocytes. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1964
15. Saha S & Samuel APW. Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in the Sudan – including GdKhartoum, a hyperactive slow variant. *Hum Hered* 41:17-21, 1991.
16. Lee J, Kim TI, Kang JM, Jun H, Lê HG et al., prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency among malaria patients in upper Myanmar. *BMC Infect Dis*. 2018 Mar 16;18(1):131
17. Louicharoen, C., & Nuchprayoon, I. (2005). G6PD Viangchan (871G>A) is the most common G6PD-deficient variant in the Cambodian population. *Journal of Human Genetics*.
18. Usanga, E. A., & Ameen, R. (2000). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Kuwait, Syria, Egypt, Iran, Jordan and Lebanon. *Human Heredity*, 50(3), 158-161.
19. Nkhoma, E. T., Poole, C., Vannappagari, V., Hall, S. A., & Beutler, E. (2009). The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 42(3), 267-278.
20. Belfield, K. D., & Tichy, E. M. (2018). Review and Drug Therapy Implications of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *American Journal of Health System Pharmacy*, 160961.
21. Oliveira, D. A. (2017). Prevalência da Deficiência da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase em Recém-Nascidos do Estado de Sergipe.
22. Carson, P. E., Flanagan, C. L., Ickes, C. E., & Alving, A. S. (1956). Enzymatic Deficiency in Primaquine-Sensitive Erythrocytes. *Science*, 124(3220), 484-485.

22. Compri, m. B., saad, s. T., ramalho, a. S., 2000. Genetico-epidemiological and molecular investigation of g-6-pd deficiency in a brazilian community. *Cad. Saude publica* 16, 335-342.
23. Santana, m. S., monteiro, w. M., siqueira, a. M., costa, m. F., sampaio, v., lacerda, m. V., & alecrim, m. G. (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.
24. RAMALHO, A. S. & BEIGUELMAN, B., 1976. Deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6-PD) em doadores de sangue brasileiros. *Folha Médica*, 73:281-282.
25. Dos santos, s. L. F., da silva prado, r. M., oliveira, c. P. A., pessoa, c. V., borges, r. N., & barros, k. B. N. T. (2016). Associação da deficiência da glicose-6fosfato desidrogenase (g6pd) em população brasileira afrodescendente. *Boletim informativo geum*, 7(1), 106.
26. Souza-Santos, R. (2002). Distribuição Sazonal De Vetores Da Malária Em Machadinho D' oeste, Rondônia, Região Amazônica, Brasil. *Cadernos De Saúde Pública*, 18, 1813-1818.
27. Moura-Neto JP, Dourado MV, Reis MG, Gonçalves MS 2008. A novel c.197T - > A variant among Brazilian neonates with glucose-6-phosphatedehydrogenase deficiency. *Genet Mol Biol* 31: 33-35.
28. Ferreira MF. Triagem neonatal de deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase e prevalência das mutações G202A (G6PD A-) e C563T (G6PD Mediterrâneo) em Mato Grosso/Brasil [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2014.
29. Castro S, Weber R, Dadalt V, Tavares V, Giugliani R. Prevalence of G6PD deficiency in newborns in the south of Brazil. *J MedScreen*. 2006;13(2):85-6.
30. Silva KM. Deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase em recém-nascidos em uma maternidade pública na cidade de Campina Grande – PB [tese]. Campina Grande: Universidade Estadual da Paraíba; 2016.
31. Katsuragawa, T. H., Gil, L. H. S., Stábile, R. G., Pires, M. G., & Bonini-Domingos, C. R. (2004). Avaliação Da Incidência Da Deficiência De Glicose-6Fosfato Desidrogenase (G6pd) E Perfil Hematológico Em Indivíduos De Uma Região De Rondônia. *Revista Brasileira De Hematologia E Hemoterapia*, 268-273.
32. De oliveira paula, r. A., da silveiraduarte, s. M., duarte, g. S., perinoto, a., costa, c. R. D. O. B., & de araujopaula, f. B. (2013). Prevalência da deficiência de glicose-6-

- fosfato desidrogenase em uma população adulta doi: [http://dx. Doi. Org/10.5892/ruvrv.2013.111.127134](http://dx.doi.org/10.5892/ruvrv.2013.111.127134). Revista da universidade vale do rio verde, 11(1), 127-134.
33. Santana Ms, Alecrim Wd, Rocha Maf, Arcanjo Arl, Sardinha Jfj, Silva Jt. Associação De Metemoglobinemia E Deficiência De Desidrogenase De Glicose-6Fosfato Em Pacientes Com Malária Tratados Com Primaquina. RevSocBrasMedTrop(2007), 40(5): 533-36.
 34. Sardinha Jfj. Prevalência Da Deficiência De Desidrogenase De Glicose-6Fosfato E Metemoglobinemia Em Pacientes Com Malária Tratados Com Primaquina [Dissertação]. Amazonas (Br): Universidade Do Estado Do Amazonas; 2006.
 35. Bogari, N. M. Next Generation Sequencing (Ngs) In Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6pd) Deficiency Studies. BiomedicalInformaticsViews, V. 12, N. 2, P. 41-43, 2016.
 36. Llanos, C., Flórez, M. H., Herrera, M. A., & Herrera, S. (2004). Mecanismos De Generación De Anemia Em Malaria. Colombia Médica, 35(4), 205-214.
 37. Minucci, A., Et Al., Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Laboratory Assay: How, When, And Why? Iubmb Life, 2009. 61(1): P. 27-34
 38. Cutbush, M., & Mollison, P. L. (1950). The Duffy Blood Group System. Heredity, 4(3), 383.
 39. Ikin, E. W. (1951). Discovery Of The Expected Haemagglutinin, AntiFyb. Nature, 168, 1077.
 40. Sanger, R., Race, R. R., & Jack, J. (1955). The Duffy Blood Groups Of New York Negroes: The Phenotype Fy (A- B-). British JournalOfHaematology, 1(4), 370-374.
 41. Acosta, o., solano, l., escobar, j., fernandez, m., solano, c., & fujita, r. (2014). Frequencies of blood group systems mns, diego, and duffy and clinical phases of carrion's disease in amazonas, peru. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases, 2014.
 42. Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Pogo A. 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. 1995;85(3):615-21. 44
 43. Hadley Tj & Peiper Sc 1997. From Malaria To Chemokine Receptor: The Emerging Physiologic Role Of The Duffy Blood Group Antigen. Blood 89(9):3077-3091.
 44. Rios M, Chaudhuri A, Mallinson G, et al. New genotypes in Fy(a-b-) individuals: nonsense mutations (Trp to stop) in the coding sequence of either FY A or FY B. Br J Haematol 2000; 108(2):448-54

45. Wasniowska K, Lisowska E, Halverson GR, et al. The Fya, Fy6 and Fy3 epitopes of the Duffy blood group system recognized by new monoclonal antibodies: identification of a linear Fy3 epitope. *Br J Haematol* 2004;124(1):118-22.
46. http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Working_parties/WP_on_Red_Cell_Immunogenetics_and/008_FY_Alleles_v4.1.pdf.
47. Howes, Rosalind E. Et Al. The Global Distribution Of The Duffy Blood Group. *Nature Communications*, V. 2, P. 266, 2011.
48. Mcmanus, K. F., Taravella, A. M., Henn, B. M., Bustamante, C. D., Sikora, M., & Cornejo, O. E. (2017). Population Genetic Analysis Of The Darc Locus (Duffy) Reveals Adaptation From Standing Variation Associated With Malaria Resistance In Humans. *PlosGenetics*, 13(3), E1006560.
49. Lima, Paulo Roberto Ribeiro de. Estudo da prevalência do sistema sanguíneo duffy em duas localidades endêmicas para malária *vivax* na amazônia ocidental brasileira. / Paulo Roberto Ribeiro de Lima; orientador Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda. - Manaus: [s. n.], 2011.
50. Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Pogo A. 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*. 1995;85(3):615-21.
51. Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, et al. Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/Fyb blood group polymorphism. *Hum Genet* 1995;95:407-10.
52. Zimmerman Pa, Woolley I, Masinde Gl, Miller Sm, Mcnamara Dt, Hazlett F, Et Al. Emergence Of Fy* Anull In A *Plasmodium Vivax*-Endemic Region Of Papua New Guinea. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*. 1999;96(24):13973-7.
53. Castilho L, Rios M, Pellegrino J, Saad S, Costa F, Reid M. A Novel Fy Allele In Brazilians. *Vox Sanguinis*. 2004;87(3):190-5.
54. Oscar Pogo A, Chaudhuri A, Editors. The Duffy Protein: A Malarial And Chemokine Receptor. *Seminars In Hematology*; 2000: Elsevier.
55. Chown B, Lewis M, Kaita H. The Duffy Blood Group System In Caucasians: Evidence For A New Allele. *American Journal Of Human Genetics*. 1965;17(5):384.
56. Olsson MI, Smythe Js, Hansson C, Poole J, Mallinson G, Jones J, Et Al. The Fyx Phenotype Is Associated With A Missense Mutation In The Fyb Allele Predicting Arg89cys In The Duffy Glycoprotein. *British Journal Of Haematology*. 1998;103(4):1184-91

57. King, C. L., Adams, J. H., Xianli, J., Grimberg, B. T., Mchenry, A. M., Greenberg, L. J., ... & Zimmerman, P. A. (2011). Fya/Fyb Antigen Polymorphism In Human Erythrocyte Duffy Antigen Affects Susceptibility To *Plasmodium Vivax* Malaria. *ProceedingsOf The NationalAcademyOfSciences*, 108(50), 2011320118.
58. Neote, Kuldeep Et Al. Functional And Biochemical Analysis Of The Cloned Duffy Antigen: Identity With The Red Blood Cell Chemokine Receptor. *Blood*, V. 84, N. 1, P. 44-52, 1994.
59. Barnwell, John W.; Nichols, Margaret E.; Rubinstein, P. In Vitro Evaluation Of The Role Of The Duffy Blood Group In Erythrocyte Invasion By *Plasmodium Vivax*. *JournalOf Experimental Medicine*, V. 169, N. 5, P. 1795-1802, 1989.
60. Zimmerman PA, Ferreira MU, Howes RE, Mercereau-Puijalon O. Polimorfismo de glóbulos vermelhos e suscetibilidade ao *Plasmodium vivax* . *Adv Parasitol*. 2013; 81 : 27–76. doi: 10.1016 / B978-0-12-407826-0.00002-3.
61. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ações de controle da Malária: manual para profissionais de Saúde na Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. 52 P. (Série A. Normas e manuais técnicos).
62. Cox-Singh J, Davis TME, Lee K-S, Shamsul SSG, Matusop A, Ratnam S, et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*. 2008 Jan;46(2):165-71.
63. Crawley J, Chu C, Mtove G, Nosten F. Malaria in children. *Lancet*. 2010 Apr;375(9724):1468-81.
64. MOYES, C. et al. Defining the Geographical Range of the *Plasmodium knowlesi* Reservoir. *PLoS neglected tropical disease*, v. 8, n. 3, P. e2780, 2014.
65. BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *The Lancet. Global Health*, v. 5, n. 10, P. e1038-e1046, 2017.
66. Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SHI, Alonso PL, Collins FH, et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest*. 2008 Apr;118(4):1266-76.
67. World Health Organization. *World Malaria Report*. Geneva: WHO; 2015.
68. Parise EV. Malária grave em Palmas, Estado do Tocantins: relato de caso. *RevSocBrasMed TroP*. 2009 jul-ago;42(4):463-8.

69. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 36 P. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf.
70. Akinosoglou KS, Solomou EE, Gogos CA. Malaria: a haematological disease. *Hematology*. 2012 Mar;17(2):106-14.
71. KOCHAR, D.K. et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 80, n. 2, P. 194-8, 2009.
72. OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria journal*, v. 30, n. 9, P.115, 2010.
73. LACERDA, M.V. et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar Journal*, v. 11, P. 12, 2012.
74. BAIRD, J.K. Evidence and implications of mortality associated with acute *Plasmodium vivax* malaria. *Clinical microbiology reviews*, v. 26, n. 1, P. 36-57. 2013.
75. ALEXANDRE, M.A. et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Disease*, v. 16, n. 10, P. 1611-4, 2010.
76. QUINTERO, J.P. et al. Malaria-related anaemia: a Latin American perspective. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, P. 91-104, 2011.
77. DOUGLAS, N.M. et al. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria journal*, v. 11, n. 135, P. 135, 2012.
78. HALDAR, K. Transport mechanisms in *Plasmodium*-infected erythrocytes: lipid rafts and a tubovesicular network. *International journal for parasitology*, v. 31, n. 12, P. 1393-1401. 2007.
79. FENDEL, R. et al. Hemolysis is associated with low reticulocyte production index and predicts blood transfusion in severe malarial anemia. *PLoS One*, v. 5, n. 4, e10038, 2010.
80. CARVALHO, B.O. et al. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *The Journal of Infectious Disease*, v. 202, n. 4, P. 638-47, 2010.
81. YEO, T.W. et al. Greater endothelial activation, Weibel-Palade body release and host inflammatory response to *Plasmodium vivax*, compared with *Plasmodium falciparum*: a prospective study in Papua, Indonesia. *The Journal of Infectious Disease*, v. 202, n. 1, P. 109-112, 2010.

82. AKIONSOGLU, K.S.; SOLOMOU, E.E.; GOGOS. C.A. Malaria: a haematological disease. *Hematology* (Amsterdam. Netherlands), v. 17, n. 2, P. 106-114, 2012.
83. RAMOS-JÚNIOR, W.M. et al. Clinical aspects of hemolysis in patients with *P. vivax* malaria treated with primaquine, in the Brazilian Amazon. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 14, n. 4, P. 410-2, 2010.
84. HEDRICK, P.W. Population genetics of malaria resistance in humans. *Heredity* (Edinb), v. 107, n. 4, P. 283-304, 2011.
85. ADAMS, J. H.; MUELLER, I. The Biology of *Plasmodium vivax*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. 7, n. 9, Sep 1 2017. ISSN 2157-1422 (Electronic)
86. ADAPA, S. R. et al. *Plasmodium vivax* readiness to transmit: implication for malaria eradication. *BMC Syst Biol*, v. 13, n. 1, P. 5, Jan 11 2019. ISSN 1752-0509 (Electronic).
87. World Health Organization. Malaria report 2018 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2018. 812 P. Available from: apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275867/9789241565653-eng.pdf?ua=1.
88. OPAS - Organização Pan-americana da Saúde-Folha informativa-Malária- 2019, disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5682:folha-informativa-malaria&Itemid=812, acesso em 09/2019.
89. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de teste para diagnóstico rápido da malária – 2017 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. 812P. Disponível em: www.saude.gov.br/malaria.
90. Ministério da Saúde - Brasil reduz em 38% casos de malária em relação a 2018, disponível em: <http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45391-brasil-reduz-em-38-casos-de-malaria-em-relacao-a-2018>, acesso em 09/2019
91. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de doenças transmissíveis. Coordenação geral dos programas nacionais de controle e prevenção. Dados de 2018. Sivepmalária/svs.
92. OPAS - Organização Panamericana da Saúde-Casos de malária aumentam na região das Américas- 2018, disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5591:casos-de-malaria-aumentam-na-regiao-das-americas&Itemid=812 - acesso em 09/2019.

93. Ministério da saúde. A malária. O que é. Campanha nacional contra a malária disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/campanhas/malaria/>. 2015
94. Fundação de Vigilância em Saúde do Estado - Casos de malária no AM têm redução de 35,16% no primeiro semestre de 2019, disponível em: <http://www.fvs.am.gov.br/index.php/noticias/871-casos-de-malaria-no-am-tem-reducao-de-35-16-no-primeiro-semester-de-2019-aponta-fvs> – acesso em: 09/2019
95. Deodato, francisco, governo intensifica ações de combate à malária e decreta situação de emergência no alto rio negro, disponível em: <http://www.saude.am.gov.br/visualizar-noticia.php Id=3312> acesso em 09/2019.
96. Saraiva, m. D. G. G., amorim, r. D. S., moura, m. A. S., martinez-espinosa, f. E., & barboza, m. D. G. V. (2009). Expansão urbana e distribuição espacial da malária no município de manaus, estado do Amazonas.
97. Dayananda kk, achurnn, gowda dc. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. J vector borne dis. 2018 janmar;55(1):1-8
98. Rodrigues, Priscila thihara. Origem e rotas de introdução de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* nas Américas. 2017. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo.
99. Oliveira-ferreira, j., lacerda, m. V., Brasil, P., Ladislau, j. L., Tauil, P. L., & Danielribeiro, c. T. (2010). Malaria in Brazil: an overview. *Malaria Journal*, 9(1), 115.
100. Magalhães, b. M., Siqueira, a. M., Alexandre, m. A., Souza, m. S., Gimaque, j. B., Bastos, m. S., & Mourão, m. P. (2014). *P. Vivax* malaria and dengue fever coinfection: a cross-sectional study in the Brazilian Amazon. *PloS neglected tropical diseases*, 8(10), e3239.
101. Sampaio, v. S., Siqueira, a. M., Alecrim, m. D. G. C., Mourão, m. P. G., Marchesini, P. B., Albuquerque, b. C., & Lacerda, m. V. G. (2015). Malaria in the state of Amazonas: a typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48, 411.
102. Antonelli, l. R., Leoratti, f. M., Costa, P. A., Rocha, b. C., Diniz, s. Q., Tada, m. S., ... & Gazzinelli, r. T. (2014). The CD14⁺ CD16⁺ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute *Plasmodium vivax* malaria. *PloS pathogens*, 10(9), e1004393.

103. Llanos-cuentas, a., lacerda, m. V., rueangweerayut, r., krudsood, s., gupta, s. K., kochar, s. K., & ugwuegbulam, c. (2014). Tafenoquine plus chloroquine for the treatment and relapse prevention of *Plasmodium vivax* malaria (detective): a multicentre, double-blind, randomised, phase 2b dose-selection study. *The lancet*, 383(9922), 1049-1058.
104. Alexandre, Márcia A. Et Al. Severe *Plasmodium Vivax* Malaria, Brazilian Lacerda, Marcus Vinícius Guimarães Et Al. Thrombocytopenia In Malaria: Who Cares?. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, V. 106, P. 52-63, 2011.
105. Costa, A. G. D., Tarragô, A. M., Garcia, N. P., Pimentel, J. P. D., Neves, W. L. L., Melo, G. Z. D. S., & Malheiro, A. (2017). Influência Da Infecção Por *Plasmodium Vivax* Nos Marcadores Hematológicos E Hepáticos Em Pacientes De Um Município Da Região Amazônica Brasileira. *Revista Pan-Amazônica De Saúde*, 8(2), 11-19.
106. Manual De Diagnóstico Laboratorial Da Malária / Ministério Da Saúde, Secretaria De Vigilância Em Saúde. – Brasília : Ministério Da Saúde, 2005.
107. Lacerda Mvg, Zackiewicz C, Alecrim Wd, Alecrim Mgc. O *Plasmodium Vivax* Negligenciado: Os Pesquisadores De Áreas Endêmicas Estão Mesmo Preocupados Com Novas Opções De Tratamento? *RevSocBrasMedTrop* 2007; 40: 489-490. 110. Benchimol S. Amazônia: Formação Social E Cultural. Ed. Valer. Manaus (Am); 1999.
108. Rodriguez-Morales, Alfonso J. Et Al. Imported Cases Of Malaria Admitted To Two Hospitals Of Margarita Island, Venezuela, 1998–2005. *Travel Medicine And Infectious Disease*, V. 7, N. 1, P. 44-48, 2009.
109. Cavasini, Carlos Eugênio Et Al. *Plasmodium Vivax* Infection Among Duffy Antigen-Negative Individuals From The Brazilian Amazon Region: An Exception?. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene*, V. 101, N. 10, P. 1042-1044, 2007.
110. Albuquerque, Sérgio Roberto Lopes Et Al. Fy Polymorphisms And *Vivax* Malaria In Inhabitants Of Amazonas State, Brazil. *Parasitology Research*, V. 106, N. 5, P. 1049-1053, 2010.
111. Santana, M.S., Et Al., Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency In An Endemic Area For Malaria In Manaus: A Cross-Sectional Survey In The Brazilian Amazon. *PlosOne*, 2009. 4(4): P. E5259.
112. Alexandre, Márcia A. Et Al. Severe *Plasmodium Vivax* Malaria, Brazilian Lacerda, Marcus Vinícius Guimarães Et Al. Thrombocytopenia In Malaria: Who Cares?. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, V. 106, P. 52-63, 2011.

113. Leslie, T., Et Al., The Impact Of Phenotypic And Genotypic G6pd Deficiency On Risk Of *Plasmodium Vivax* Infection: A Case-Control Study Amongst Afghan Refugees In Pakistan. PlosMed, 2010. 7(5): P. E1000283.
114. Louicharoen, C., Et Al., Positively Selected G6pd-Mahidol Mutation Reduces *Plasmodium Vivax* Density In Southeast Asians. Science, 2009. 326(5959): P. 15469.
115. Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - O que é sangue?, Disponível em: http://hemoam.am.gov.br/?secao=sobre_sangue#anc_1, acesso em 01/2020.
116. Ministério da Saúde (BR). Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 343, de 13 de dezembro de 2002. Brasília, 2002. Acesso 01/2020.
117. Ministério da Saúde – Doação de sangue: como doar, quem pode doar, impedimentos, disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doacao-de-sangue>, acesso em: 01/2020.
118. Verdélio, Andreia. Doação de Sangue: 1,8% da população brasileira doa sangue; meta da OMS é 3%. Agência Brasila, 2017. Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2017-06/doacao-de-sangue-18-da-populacao-brasileira-doa-sangue-meta-da-oms-e-3>, acesso em: 01/2020.
119. Jullien AM, Courouce AM, Richard D, et al. Transmission of HIV by blood from seronegative donors. Lancet 1998; 26:1.248-1.249.
120. Mcfarland W, Mvere D, Shamu R, et al. Risk factors for HIV seropositivity among first-time blood donors in Zimbabwe. Transfusion 1998; 38:279-284.
121. Chamone DAF, Sáez-Alquézar A, Salles NA, et al Triagem Sorológica em Bancos de Sangue. In: Manual de Transfusão Sangüínea. Editores: Chamone DAF, Dorlhiac-Llacer PE, Novaretti M. Editora ROCA, 1ª Edição, 2001; p 227-256.
122. Moore A, Herrera G, Nyamongo J, et al. Estimated risk of HIV transmission by blood transfusion in Kenya. The Lancet 2001; 358:657-660.
123. Tynell E, Norda R, Shanwell A, et al. Long-term survival in transfusion recipients in Sweden, 1993. Transfusion 2001; 41:251-255.
124. Jusot JF, Colin C. Cost-effectiveness analysis of strategies for hepatitis C screening in French blood recipients. Eur J Pub Health 2001; 11:373-379.
125. Samanta S, Kumar P, Kishore SS, Garewal G, Narang A. Donor blood glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency reduces the efficacy of exchange transfusion in neonatal hyperbilirrubinemia. Pediatrics. 2009;123(1):96-100.


126. Monteiro WM1, Val FF1, Siqueira AM1 et al. G6PD deficiency in Latin America: systematic review on prevalence and variants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014 Aug;109(5):553-68.
127. Stanton R C. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and Cell Survival. *IUBMB Life*. 2012; 64(5): 362–369.
128. Ministério da Saúde Conselho Nacional de Saúde. Conselho Nacional de Saúde (Brasil). Resolução n o 466, de 12 de dezembro de 2012. Availablefrom: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html (Acesso em 15/01/2019).
129. Brasil. LEI No 11.105, DE 24 DE MARÇO DE 2005. Availablefrom: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111105.html (Acesso em 23/07/2018).

Colaboradores

Nome	Carga Horária	Função	Atividade
Dr. José Pereira de Moura Neto	10	Orientador	Coordenador
Natália Santos Ferreira	20	Mestranda	Desenvolvimento de todo projeto
Marilda de Souza Gonçalves	05	Colaboradora	Colaborador e Coordenador Externo
Sérgio Lopes Albuquerque	05	Colaborador	Colaborador
Aline Sampaio Jamel	05	Mestre	Análises Práticas e Moleculares
Fernanda Cozendey Anselmo	05	Mestre	Análises Práticas e Moleculares
Abdou Gafar Soumanou	05	Mestrando Farmácia/UFAM	Análises Práticas e laboratoriais
Ana Carla Dantas Ferreira	05	Mestranda Farmácia/UFAM	Análises Práticas e laboratoriais

Anexo 1: Documento de Aprovação do Projeto em Comitê de Ética (CONEP)

16/06/09 15:41	MS	33153701	P. 1
----------------	----	----------	------


MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 343/2009

Registro CONEP 15243 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE 0054.1.114.000-08 **Processo nº 25.000.011.792/2009-15**
Projeto de Pesquisa: "Caracterização clínica da malária complicada por *Plasmodium vivax*". Protocolo versão final de 25/07/2008. TCLE versão final de 16/06/08 com Emenda 1 de 30/03/09.
Pesquisador Responsável: Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda
Instituição: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMT/MT/AM
CEP de origem: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMT/MT/AM
Área Temática Especial: Pesquisa com cooperação estrangeira
Patrocinador: Centro Internacional de Pesquisa em Saúde de Barcelona - *Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB)*

Sumário geral do protocolo

A malária é endêmica em 92 países e possui foco de transmissão em um adicional de 8 países.

Em documento recente da OMS, há uma afirmação de que a malária vivax, embora seja considerada uma doença benigna, com baixa letalidade, pode provocar doença febril grave e debilitante. Ocasionalmente, resulta em graves doenças, como a malária falciparum. Várias manifestações graves de malária vivax vêm sendo relatadas, a saber: malária cerebral, anemia severa, plaquetopenia severa, pancitopenia, icterícia, ruptura esplênica, insuficiência renal aguda e síndrome da angústia respiratória aguda. Os mecanismos das manifestações graves não são bem compreendidos.

Um grande número de casos de malária vivax grave é relatado no continente africano, porém, todos foram diagnosticados por exame de gota espessa de sangue, o que pode ter associado uma infecção por *P. falciparum*. Estudos demonstram que outros exames são necessários para definição de monoinfecção por *P. vivax*, tais como teste de detecção de antígeno *P. falciparum/P. vivax* e teste de PCR.

Neste estudo, serão realizados teste de lâmina de gota espessa de sangue, extração de DNA e PCR em tempo real para diagnóstico de *P. falciparum* e *P. vivax* com utilização de primers específicos, exames laboratoriais para acompanhamento do quadro clínico dos pacientes e autópsias nos casos de óbito.

O objetivo do estudo é "descrever o espectro clínico de malária vivax em pacientes internados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Manaus, Brasil", tendo como objetivos secundários: estimar a frequência de hospitalizações devido à malária por *P. vivax* na FMT – AM; descrever as apresentações clínicas dos pacientes com infecção por *P. vivax* que precisam de UTI e evoluem para a morte; verificar a frequência de pacientes com monoinfecção confirmada para *P. vivax* que preenchem os critérios da OMS para malária grave; descrever causas incomuns de internação em pacientes com malária vivax; descrever outras doenças infecciosas agudas concomitantes que podem alterar a apresentação clínica benigna da malária vivax; avaliar os fatores de risco de hospitalização em pacientes com infecção pelo *P. vivax* exclusivo; e descrever a patologia associada com infecção letal por *P. vivax* através de autópsias.

Trata-se de estudo epidemiológico, multicêntrico, prospectivo descritivo, desenvolvido em dois centros de referência para atendimento e tratamento de malária: um no Brasil e outro na Índia.

1/3 JF

Cont. Parecer CONEP nº 343/09

No Brasil, os pacientes serão recrutados dentre os assistidos no ambulatório/emergência da Faculdade de Medicina Tropical do Amazonas – FMT/AM. Participarão do estudo pacientes que necessitarem de internação e que cumprirem os critérios da OMS para malária grave. Os critérios de inclusão e de exclusão estão bem claros no protocolo, na folha 12 verso.

Os pacientes do estudo serão admitidos no hospital e avaliados diariamente por um médico até a alta. Será utilizado um questionário padronizado para anotações de sinais, sintomas, evolução clínica, resultados de exames complementares, tratamento e resultado para cada paciente. O manejo clínico e tratamento serão realizados de acordo com os protocolos nacionais. Aqueles que apresentarem malária vivax grave serão tratados segundo protocolo de tratamento para infecção grave por *P. falciparum*.

No Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (folha 22 do protocolo) se lê: "Nós gostaríamos de sua permissão para fazer testes com as parasitas de malária na amostras de sangue coletadas e para guardar o restante do sangue para ser usado em estudos sobre malária no futuro. Isto pode exigir armazenamento mais prolongado de seu sangue em laboratórios da FMT-AM. Para isso seu sangue será guardado com um código e não deverá identificar seu nome." Ainda, na folha 44 do protocolo, consta um termo de compromisso do patrocinador de não utilização de materiais e dados para outros estudos e de não efetuar armazenamento de material biológico. Já na folha 52, consta termo de compromisso do pesquisador para armazenamento de material biológico e na folhas 51 e 53 constam diretrizes normativas do banco de materiais biológicos da FMT-AM e formulário para armazenamento de material biológico, respectivamente.

Local de realização

A pesquisa será realizada nos centros de referência em tratamento de malária Fundação de Medicina Tropical em Manaus-AM – Brasil e Faculdade de Medicina Sarder Patel em Bikaner - Índia, com patrocínio do Centre de Recerca de Salut Internacional de Barcelona

Apresentação do protocolo

O *currículo vitae* do pesquisador responsável o qualifica para a realização deste estudo.

O orçamento financeiro foi apresentado de forma detalhada.

O cronograma de realização da pesquisa prevê sua conclusão em 3 anos.

Foi apresentado contrato com patrocinador onde fica estabelecido o compartilhamento dos dados e resultados da pesquisa entre os pesquisadores e patrocinador.

O TCLE apresenta-se conciso e objetivo, formulado em linguagem apropriada ao público e objetivo a que se destina. Os procedimentos estão bem claros, riscos e desconfortos a que o paciente possa estar submetido, garantias de acordo com a Resolução CNS 196/96.

Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP N.º.074/2009, relativo ao projeto de pesquisa em questão:

1. Durante a leitura do protocolo não fica clara a criação de banco de materiais biológicos a partir deste estudo, uma vez que na folha de rosto consta a não criação de banco. No projeto de pesquisa não há qualquer citação sobre coleta de material biológico para armazenamento ou criação de banco de materiais biológicos, no entanto, os documentos: TCLE, Portaria da FMT-AM com diretrizes para banco de material biológico, Termo de Compromisso do pesquisador para armazenamento de material biológico e formulário para armazenamento de material biológico apresentam fortes indícios de formação de banco. Solicita-se esclarecimento sobre o armazenamento de material biológico e, caso esteja prevista esta atividade, que todos os documentos

Cont. Parecer CONEP nº 343/08

sejam apresentadas de forma coerente, inclusive adequando-se às exigências previstas na Resolução CNS 347/2005.

RESPOSTA: o pesquisador esclarece que haverá formação de banco de materiais biológicos e inclui este dado no corpo do projeto. Foram apresentadas as normas de funcionamento do Banco de Matérias Biológicas, formulários para armazenamento de material, justificativa para formação de banco a partir do estudo em tela. Não foi apresentado o acordo entre as instituições brasileira e estrangeira para uso destes materiais armazenados, porém, segundo informações constantes no protocolo, o banco será brasileiro e armazenado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, considera-se a pendência atendida.

2. No Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE não consta campo para assinatura do pesquisador responsável, somente do entrevistador. Solicita-se a inclusão deste campo.

RESPOSTA: foi incluído o campo para aposição de assinaturas, porém o mesmo ficou fora do corpo de texto, incorporar ao TCLE a página de assinaturas. Se por questões de configuração tal página continuar constituindo-se uma folha em separado, solicita-se o cuidado de obter a rubrica do sujeito de pesquisa nas demais folhas do TCLE, considerando-se a proteção do sujeito bem como do pesquisador. Pendência atendida parcialmente.

3. Solicita-se acrescentar, no TCLE, os contatos do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP que irá acompanhar a pesquisa (telefone e endereço).

RESPOSTA: foram incluídos os dados solicitados no TCLE. Pendência atendida.

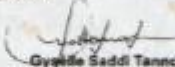
4. A Folha de Rosto encontra-se preenchida e assinada, deixando, porém, dúvida sobre a formação de banco de material biológico. Tendo em vista que é solicitada autorização do sujeito de pesquisa para armazenamento de material biológico (no TCLE), presume-se que esse campo, na Folha de Rosto, está incorretamente assinalado, pois indica a "não" formação de banco. Solicita-se adequação do documento.

RESPOSTA: a folha de rosto foi alterada incluindo a informação de formação de banco de materiais biológicos. Pendência atendida.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposta, devendo o CEP verificar o cumprimento da questão 2 acima, antes do início do estudo.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

Brasília, 04 de junho de 2009.


Gyglia Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNSMS

*As coordenadoras
do projeto para
atender o cumprimento
da questão 2.*

Em 17/06/09

Luzia Maria de Lima Pinheiro
Coordenadora de Atividades Pesquisas
197.102

30

JTB

Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
Direto. de Pesquisa / Comitê de Ética em Pesquisa

PROCOLO
Data: 16/06/09 Hora: 14h42

Resp: 