

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

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NA G6PD E INFECÇÕES
FÚNGICAS EM PORTADORES DE LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA
ACOMPANHADOS NO HEMOCENTRO DO AMAZONAS**

NOEME HENRIQUES FREITAS

MANAUS

2020

NOEME HENRIQUES FREITAS

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NA G6PD E INFECÇÕES
FÚNGICAS EM PORTADORES DE LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA
ACOMPANHADOS NO HEMOCENTRO DO AMAZONAS**

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

Orientador: José Pereira de Moura Neto

Co-orientador: Sérgio Roberto Lopes Albuquerque

MANAUS

2020

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade do Amazonas

F862e Freitas, Noeme Henriques
2020

Estudo da associação entre polimorfismos na G6PD e infecções fúngicas em portadores de leucemia mielóide aguda acompanhados no Hemocentro do Amazonas / Noeme Henriques Freitas. - Manaus:Hemoam,2020. 73 f. 30cm

Orientador: José Pereira de Moura Neto
Co-orientador: Sérgio Roberto Lopes Albuquerque

Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia da Universidade Estadual do Estado do Amazonas),2020.

1. Leucemia mielóide aguda. 2. G6PD. 3. Infecção Fúngica.
I.Moura Neto, José Pereira. II.Albuquerque, Sérgio Roberto Lopes
III. Título. CDU:615.38

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 04/2020

2 Aos dezessete dias do mês de março do ano de 2020, às 14h00, realizou-se no Auditório,
3 Bloco A, 2º andar da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas –
4 HEMOAM, sito Av. Constantino Nery, 4397 – Chapada, a Defesa de Dissertação de
5 Mestrado da aluna **Noeme Henriques Freitas**, sob o título “ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO
6 ENTRE POLIMORFISMOS NA G6PD E INFECÇÕES FÚNGICAS EM
7 PORTADORES DE LEUCEMIA MIELOÍDE AGUDA ACOMPANHADOS NO
8 HEMOCENTRO DO AMAZONAS”, tendo como orientador o Prof. Dr. **José Pereira de
9 Moura Neto**, segundo encaminhamento do Prof. Dr. Nelson Abrahim Fraiji, Coordenador do
10 Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia e de acordo com os
11 registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca
12 julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a
13 Defesa, tendo sido atribuído a aluna o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Prof. Dra. Cristina Motta Ferreira – Presidente	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: <i>Cristina Motta Ferreira</i> CPF: 30960955200
Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa – HEMOAM	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: <i>Allyson G. da Costa</i> CPF: 827.15.02-9711
Prof. Dra. Leny Nascimento da Mota Passos – HEMOAM	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: <i>Leny N. da Mota</i> CPF: 034.842.462.00

14 O parecer final da Defesa de Dissertação foi :

15 Aprovado Não Aprovado

16

17

Cristina Motta Ferreira

Presidente da Banca Examinadora

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a quem permitiu que eu entrasse nesse mestrado e me deu forças para continuar, pois só nele posso todas as coisas, DEUS a ele toda minha adoração e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS, criador da vida e de todas as coisas.

À meu querido esposo Jean Carlos de Oliveira Freitas, companheiro, amigo, seu apoio foi fundamental desde o início sempre contribuindo com paciência, ajudando todas às vezes que precisei.

Aos meus filhos amados Thiago Henriques Freitas e Enzo Henriques Freitas que mesmo crianças, procuravam entender às muitas vezes que eu precisei me ausentar.

Ao meu pai, Fernando Severiano Henriques Filho, que sempre me inspirou em buscar conhecimento, não importasse o tempo.

À minha mãe Maria Zilma dos Santos Henriques, pelo exemplo de mulher guerreira, batalhadora e honesta.

À minha irmã Ruth de Oliveira Henriques que me ajudou, dividindo seu tempo entre seus afazeres e cuidando do meu lar às vezes que precisei.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto, que decidiu me ajudar no momento que mais precisei, se propondo a me orientar com paciência e firmeza, partilhando seu precioso conhecimento de maneira profissional, sensata, rígida e ao mesmo tempo demonstrando o grande ser humano que é, muito obrigada por sua generosidade e por fazer parte desse momento tão importante da minha vida, uma honra dizer que fui orientada por você.

Ao Prof. Dr. Sérgio Roberto Lopes Albuquerque por abrir “as portas” no início de tudo.

Aos amigos queridos do mestrado, Dra. Myuk Crispim, Maria Ivaldete S de Souza, Cinthia X. Albuquerque, Fernanda C. Anselmo, Jean M. Silva, Natália S. Ferreira, Ana Carla, Karinna Juliana, Lucyane M. Silva, Rosa Belota, Alexsander Leonardo, Evilásio C. Cardoso, Keila Taís, Giselle Sampaio, Regiane e Enzo Miranda.

Aos colaboradores da Fundação HEMOAM Lívio, Wilmara R.B Silva, Mônica, Alexandre, Priscila, Wally Victória, Flávia, Greyce, Rilda e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização desse projeto.

Aos pacientes da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, todo meu respeito e gratidão.

Aos órgãos, os quais sou vinculada:

Ao Corpo de Bombeiros Militar do Estado do Amazonas na pessoa do Cel. BM Danísio Valente, Cel. BM Elenildo Farias e Cel BM João Batista

A Secretaria Municipal de Saúde na pessoa da Senhora Rosângela Maria Castro da Silva, das amigas Mie Muroya, Rose Ordones, Ada Lúcia e Nirwana

À Universidade Estadual do Amazonas, à Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas junto à Coordenação do PPGH, por oferecer o Mestrado como fomento e valorização das atividades na área de Hematologia e Hemoterapia no Estado do Amazonas.

À Universidade Federal do Amazonas pelo apoio institucional, mais especificamente pelo espaço do Laboratório de Biologia Molecular para execução das análises moleculares.

RESUMO

Introdução: Pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) estão sob maior risco para diversas infecções, incluindo às fúngicas, sendo esta, uma das principais causas de morbimortalidade. A glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD) é uma enzima localizada em todas as células, com função primordial nos eritrócitos para proteger contra o estresse oxidativo, porém, muito necessária nos leucócitos para produção de suas proteases básicas e ácidas para destruição de microorganismos invasores. **Objetivo:** Avaliar se os polimorfismos no gene da G6PD concomitantemente com infecções fúngicas (IF) estão associadas a clínica e morbidade em pacientes diagnosticados com LMA acompanhados no Hemocentro do Amazonas. **Metodologia:** Foi realizada busca ativa dos pacientes com entrevista e revisão de prontuários. A determinação das mutações na G6PD foi realizada pela técnica de qPCR e posterior sequenciamento gênico para confirmação das mutações. **Resultados:** Um total de 157 pacientes foram envolvidos no estudo, sendo 91(58%) homens e 66(42%) mulheres. O subtipo de LMA mais prevalente no grupo estudado foi a M3 em 63 pacientes (40,12%), seguido por M5 em 33 pacientes (21,02%), M2 em 21 pacientes (13,37%) e M4 em 15 pacientes (9,55%), contendo prevalências próximas entre os gêneros. A prevalência de infecções fúngicas foi idêntica entre os gêneros, porém, equimoses ($P=0.004$), vômito ($p=0.016$) e alterações cardíacas ($P<0.001$) foram maiores no sexo feminino, enquanto tosse persistente ($p=0.049$) e Diarréia ($p<0.001$) no masculino. Dezoito pacientes foram diagnosticados portadores de duas mutações, sendo 08 (5.1%) para c.202G/A, 18 (11,5%) para c.376A/G e 04 (2,5%) para ambas mutações concomitantemente (c.202G/A/c.376A/G). Apesar dos portadores das mutações terem sido acometidos mais frequentemente com infecções fúngicas, 9,8% nos portadores para c202G/A vs 3,4% nos normais, 12,2% para c376G/A vs 11,2% nos normais e 7,3% para ambas c202G/A/c.376^a/G vs 0,7%, esta incidência não foi significativa, embora entendamos que com um número amostral maior de portadores de mutações e infecções fúngicas, este dado seria significativo. De outra forma, a prevalência de óbito nos portadores das mutações encontradas foi bem maior quando acometidos por IF ($P<0,001$). Acreditamos que a determinação de polimorfismos da G6PD permitirá traçar estratégias de monitoramento, diagnóstico precoce e terapêutica adequada e direcionada à LMA, bem como avaliar sua atividade poderá ajudar a identificar pacientes com LMA em maior risco de IF, permitindo projetar estratégias terapêuticas e de vigilância mais intensivas.

Palavras-chave: Leucemia mielóide aguda, G6PD , Infecção Fúngica, Manaus.

ABSTRACT

Introduction: Patients with acute myeloid leukemia (AML) show at higher risk for several infections, including fungal infections, which is one of the main causes of morbidity and mortality. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD is an enzyme located in all cells, with primordial function to protect against oxidative stress in erythrocytes, however, very necessary in leukocytes for the production of its basic and acid proteases used to destruction of invading microorganisms. **Objective:** To evaluate whether polymorphisms in the G6PD gene concomitantly with fungal infections (IF) are associated with clinical and morbidity in patients diagnosed with AML followed up at the blood foundation from Amazon(FHEMOAM). **Methodology:** We performed an active search for patients and review of medical records. G6PD mutations was determination of was performed using the qPCR technique and subsequent genetic sequencing to confirm the mutations. **Results:** A total of 157 patients were involved in the study, being 91 (58%) men and 66 (42%) women. The most prevalent AML subtype in the studied group was M3 in 63 patients (40.12%), followed by M5 in 33 patients (21.02%), M2 in 21 patients (13.37%) and M4 in 15 patients (9.55%), with similar prevalence between genders. The prevalence of fungal infections was identical between genders, however, bruising ($P = 0.004$), vomiting ($p = 0.016$) and cardiac changes ($P < 0.001$) was higher in females, while persistent cough ($p = 0.049$) and Diarrhea ($p < 0.001$) in males. Eighteen patients were diagnosed with two G6PD mutations, with 08 (5.1%) for c.202G/A, 18 (11.5%) for c.376A/G and 04 (2.5%) for both mutations concomitantly (c. 202G/A / c.376A/G). Although the carriers of the mutations were more frequently affected with fungal infections, 9.8% in carriers for c202G/A vs 3.4% in normal, 12.2% for c376G/A vs 11.2% in normal and 7, 3% for both c202G/A / c.376A/G vs 0.7%, this incidence was not significant, although we believe that with a larger sample number of carriers of mutations and fungal infections, this data would be significant. Otherwise, the prevalence of death in patients with the mutations found was much higher when affected by FI ($P < 0.001$). We believe that the determination of G6PD polymorphisms will allow the development of monitoring strategies, early diagnosis and appropriate and targeted treatment for AML, as well as evaluating its activity may help to identify AML patients at higher risk for FI, allowing the design of more therapeutic and surveillance strategies intensive.

Keywords: Acute myeloid leukemia, G6PD, Fungal infection, Manaus.

LISTA DE ABREVIATURAS

BCR/ABL	Fusão entre os genes BCR e ABL
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGIL	<i>European Group for Immunophenotyping Leukemias</i>
FAB	Franco Americano Britânico
FHEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
G6PD	Glicose 6 Fosfato Desidrogenase
GSH	Glutathiona Reduzida
GSSG	Glutathiona Oxidada
HDA	História da Doença Atual
IFI	Infecção Fúngica Invasiva
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LA	Leucemia Aguda
LC	Leucemia Crônica
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LLC	Leucemia Linfóide Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LBA	Leucemia Aguda Bifenotípica
MIC	Morfológico Imunológico Citogenético
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
SNPs	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SNC	Sistema Nervoso Central
SMD	Síndrome Mielodisplásica
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
RFPL	Polimorfismo de Fragmento de Tamanho Restrito
WHO	Organização Mundial da Saúde - do inglês <i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do Ciclo das pentoses.....	10
Figura 2. Mapa da distribuição mundial da deficiência da G6PD.....	13
Figura 3. Localização do gene da G6PD no cromossomo X.....	15

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Classificação morfológica FAB para LMA segundo OMS.....	03
Tabela 2. Classificação das Leucemias segundo FAB.....	05
Quadro 1: Classificação OMS 2016 para LMA e neoplasias relacionadas.....	06
Quadro 2: Identificação das sondas para a técnica de PCR Real Timer de acordo com o Thermofisher.....	23

SUMÁRIO

RESUMO CIENTÍFICO.....	VI
ABSTRAT.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE QUADROS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.2 A Leucemia Mielóide Aguda.....	02
1.2.1 Epidemiologia LMA.....	04
1.2.2 Dados Clínicos.....	04
1.2.3 Fatores de risco.....	04
1.2.4 Classificação LMA	05
1.2.5 Fisiopatologia	07
1.2.6 Alterações Citogenéticas.....	07
1.3 Diagnóstico das Leucemias realizados na Fundação Hemoam.....	08
1.4 Leucemia Mielóide Aguda e Infecção Fúngica.....	08
1.5 A Desidrogenase da Glicose-6-fostato (G6PD).....	09
1.5.1 Fisiopatologia (Papel da enzima G6PD nos Eritrócitos).....	10
1.5.3 Papel da enzima G6PD nos Leucócitos.....	13
1.5.4 Deficiência da Desidrogenase Glicose-6-Fosfato.....	13
1.5.5 Prevalência no Mundo, Brasil e Amazonas.....	14
1.5.6 Dados Clínicos.....	14
1.5.7 Bases Genéticas da G6PD.....	15
1.5.8 Mutações e Variantes da G6PD.....	16
2. OBJETIVOS	21
2.1 Geral	21
2.2 Específicos.....	21
3. MÉTODOS E CASUÍSTICA	22
3.1 Tipo de Estudo.....	22
3.2 CASUÍSTICA	22
3.3 Considerações Éticas	23
3.4 Coleta de dados clínicos	23
3.5 Coleta de dados laboratoriais e inclusão de amostras.....	23
3.6 Extração de DNA.....	24
3.7 Genotipagem da G6PD.....	24

3.8 Análise Estatística	25
4. RESULTADO	
4.1 Artigo	26
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
6. ANEXOS	47

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias hematológicas são caracterizadas como grupo de doenças clonais que se originam de uma única célula precursora hematopoiética. Essas alterações geralmente decorrem de uma alteração genética, estimulando a produção de seu clone neoplásico, proliferando desordenadamente e comprometendo a medula óssea no caso das leucemias (KAMPEN KR 2012; OLIVEIRA 2018).

As Leucemias são doenças de relevância mundial representando cerca de 2,4% de todos os cânceres ocupando a 11ª posição no mundo e quanto a mortalidade cerca de 3,2% ocupando a 10ª posição. Esses dados refletem um mau prognóstico da doença principalmente em populações de baixo nível sócio econômico (GLOBOCAN 2018; MIRANDA-FILHO et al. 2018).

Atualmente, as maiores taxas de incidência foram estimadas na Austrália e Nova Zelândia (18,5 por 100.000 hab), na América do Norte (17,7) e na Europa ocidental (2,6) numa frequência de aproximadamente de 260mil novos casos por ano, dos quais 60% acometem homens, e vem elevando sua frequência em pessoas acima dos 60 anos de idade (STEWART & WILD 2014; MIRANDA-FILHO et al. 2018). Já no Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as estimativas do ano de 2018 foram cerca de 11mil novos casos, acometendo 60% os homens e com 70% de mortalidade.

As leucemias são caracterizadas pela produção descontrolada de células anormais na medula óssea comprometendo a produção das células sanguíneas normais. Em muitos casos, estas células displásicas culminam com a insuficiência da medula óssea, originando as principais manifestações clínicas desses pacientes, que geralmente são: anemia, leucopenia e trombocitopenia, ocorrendo em muitas situações, infiltração de outros órgãos como: fígado, baço, linfonodos cérebro e pele (HOFFBRAND & PETTIT 2013).

Atualmente, a classificação das leucemias depende dos marcadores celulares (CDs) e da avaliação das características morfológicas da linhagem celular comprometida. Ao passo que são identificadas e associadas a clínica do paciente, as leucemias podem ser divididas em dois grandes grupos, agudas ou crônicas.

As Leucemias Agudas (LA) tendem a ser mais agressivas promovendo o bloqueio maturativo na hematopoese, bem como o acúmulo de células jovens (blastos) na medula óssea e/ou sangue periférico, levando a insuficiência medular. Comumente as LAs possuem curso mais rápido, com proliferação celular intensa e diminuição da apoptose, sendo seu diagnóstico definido pela presença de blastos acima de 20% na medula óssea e sangue periférico. Já as

Leucemias Crônicas (LC) normalmente apresentam produção exacerbada de células maduras, apresentam-se de forma insidiosa e se estendem por um período mais prolongado. (HOFFBRAND & PETTIT, 2013; LAGO & PETRONI, 2017).

As leucemias agudas e crônicas acometem tanto as linhagens linfóides como também as mielóides. Em alguns casos, podem acometer ambas linhagens denominando-se bifenotípicas (LBA) (MALLICK et al., 2016; OLIVEIRA 2018).

Segundo a Revisão da OMS (2016), as neoplasias mielóides e leucemias agudas são classificadas e descritas a seguir:

- Neoplasias Mieloproliferativas (NMP)

Nesse grupo estão a Leucemia Mielóide Crônica (LMC) Afetando progenitores mielóides, apresenta estágio de maturação e desenvolvimento mais lento, comum em adultos. Além da LMC também estão incluídas a Trombocitopenia Essencial (TE), Policitemia Vera (PV) Mielofibrose Primária (MFP)

- Neoplasias Mielodisplásicas/Mieloproliferativas
- Síndromes Mielodisplásicas (SMD)
- Neoplasia de Progenitores Mielóides

Nesse grupo estão as Leucemias Mielóides Agudas e neoplasias relacionadas, a Leucemia Mielóide Aguda (LMA) afeta progenitores mielóides com bloqueio maturativo, geralmente de curso mais rápido, apresentando no mínimo 20% de blastos na medula óssea e sangue periférico, acometendo tanto adultos como em crianças.

- Neoplasias de Progenitores Linfóides

Nesse grupo está a Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é o tipo mais comum em crianças, podendo ocorrer em menor frequência 30% em adultos

- Linfoproliferações

Nesse grupo está a Leucemia Linfoblástica Crônica (LLC) que é uma das Neoplasias de Células B maduras. Adaptado de (OMS 2016; OLIVEIRA, 2018).

1.2 A LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

A leucemia mielóide aguda (LMA) ocorre pela proliferação clonal de mieloblastos que se acumulam na medula óssea, sangue periférico ou outro tecido, e, conseqüentemente inibem a atividade hematopoética normal, em razão da exacerbada produção anômala dos precursores

granulocíticos imaturos e pelo bloqueio da diferenciação e parada da maturação (KAMPEN KR 2012; MERINOL et al., 2018; OLIVEIRA 2018).

Nos Estados Unidos segundo a Sociedade Americana do Câncer, estimam-se que 60.530 novos casos de leucemia serão diagnosticados em 2020 e 23.100 mortes para todos os tipos de leucemia. Para a LMA as estimativas são de 19.940 novos casos e 11.180 mortes, maioria em adultos. Já a média de idade é de aproximadamente 67 anos com 54% dos pacientes diagnosticados (Carvalho et al., 2011). Ainda não se conhece sua etiologia, porém algumas alterações genéticas estão implicadas no seu desenvolvimento, assim como outros tipos de câncer a leucemia pode resultar de um processo cumulativo de mutações nos genes de células progenitoras na medula óssea (PELLOSO et al., 2003; ALBERTS et al., 2004; VELLOSO et al., 2011).

No Brasil estimam-se novos casos para 2020 de 10.810, sendo 5.920 homens e 4.890 mulheres, esses valores correspondem a um risco relativo de 5,63 casos novos para cada 100 mil homens e 4,38 para cada 100 mil mulheres. (2020 - INCA).

Anteriormente considerada sem cura, atualmente vem apresentando um melhor prognóstico desde quando surgiram os primeiros quimioterápicos seguido da poliquimioterapia, e nos últimos 20 anos com o avanço de novos estudos, possibilitando alcançar um potencial de cura de aproximadamente 35% a 40% dos pacientes com menos de 60 anos de idade, e, para pacientes com mais de 60 anos o prognóstico vem melhorando pontualmente (MARTIN PJ et al., 2010; PELOQUIN; CHEN; FATHI, 2013; SAULTZ & GARZON 2016). Estudos recentes revelam que esse distúrbio surge de uma série de alterações genéticas de células tronco hematopoiéticas recorrentes com a idade, também, são evidenciados vários fatores de riscos, como exposição à radiação ionizante, medicamentos utilizados em quimioterapias, infecções, obesidade, fumo, álcool e exposição ocupacional ao benzeno (SILVA et al., 2006; Carvalho et al., 2011; INCA 2018).

A classificação da LMA se baseia nos conceitos de duas entidades: Organização Mundial de Saúde (OMS) e Grupo Franco-Americano-Britânico (FAB).

A LMA considerada heterogênea, compreende uma variedade de subtipos celulares que podem ser observadas no sangue periférico e medula óssea. Segundo o Sistema de classificação Franco-Americano-Britânico (FAB) são subdivididas a partir de M0 a M7 (HAMERSCHLAK, 2008). Como descrito na **Tabela 1**.

Além de utilizar a classificação da OMS mais atual, a Fundação HEMOAM continua utilizando a classificação FAB para subdivisão das LMAs.

Tabela 1. Classificação morfológica FAB - LMA adaptada para a classificação OMS adaptado de (LANDINES-CASTRO et al., 2015; OLIVEIRA, 2018).

Tipo	Nomenclatura FAB	Morfologia	Marcadores Imunofenotípicos
M0	Leucemia mieloblástica aguda com o mínimo de diferenciação	Blastos de tamanho médio, núcleo arredondado, cromatina fina, citoplasma não granular basofílico, nucléolos proeminentes	•13 + •33 + •11b + •11c + •14 + •15+
M1	Leucemia mieloblástica aguda sem maturação	Os blastos de tamanho médio com alta relação N/C, nucléolos arredondados com cromatina imatura e dispersa com um ou mais nucléolos proeminentes. Os blastos podem a granulação azurofílica fina ou bastões de Auer no citoplasma em 5 a 10% dos casos.	•MPO + •13 + •33 + •117 + •34+
M2	Leucemia mielóide aguda com maturação	Pequenos e médios blastos com alta relação N/C e núcleos arredondados por vezes localizados em um canto do citoplasma. O núcleo apresenta cromatina dispersa e imatura com um ou mais nucléolos. O citoplasma é basofílico e pode conter traços de granulação azurofílica primária ou bastões de Auer isolados	•MPO + •34 •13 + •15 + •HLA-DR+ •Sudan black + •117+ Immunophenotype
M3	Leucemia promielocítica	Granulação abundante, intensamente azurofílica. O núcleo é geralmente monocítico irregular ou bilobado com uma fenda profunda. Citoplasma pouco basofílico devido à proliferação da granulação azurofílica. Alguns promielócitos atípicos também contêm inclusões citoplasmáticas cristalinas alongadas específicas. Elas geralmente formam aglomerados, mas diferem dos bastões de Auer por mostrarem uma subestrutura tubular na microscopia eletrônica.	•13 + •33 + •HLA-DR •34
M4	Leucemia mielomonocítica aguda	Grandes blastos moderada relação N/C e basofilia variável. O núcleo pode ser arredondado, em forma de rim ou irregular	•13 + •15 + •33 + •11b + •11c + •14 + •64 + •4+
M5	Leucemia monocítica aguda	M5a: Blastos grandes com núcleo arredondado e cromatina imatura dispersa e citoplasma moderadamente grande e intensamente basofílico. O citoplasma pode mostrar alguns bastões de Auer e/ou prolongamentos e granulações. M5b: Leucemia monocítica aguda, os promonócitos tem um núcleo arredondado ou forma de rim, com citoplasma menos basofílico que é mais granulado que os monoblastos e contém alguns vacúolos. Achados de eritrofagocitose com blastos monocíticos sugerem uma t(8:16)	•14 + •68 + •4 + •11c + •HLA-DR + •64 +
M6	Leucemia eritróide aguda	M6a leucemia eritróide com proliferação de blastos mistos: mais de 50% de precursores eritróides e cerca de 30% de mieloblastos. A morfologia dos eritrócitos no sangue periférico é bastante alterada, com esquizócitos, equinócitos, acantócitos. Leucemia eritróide pura M6b: os eritróides constituem 80% das células da MO, com menos de 3% das células mielóides. Os eritrócitos no sangue periférico consistem em macrócitos, pontilhado basofílico, corpos de Howell-Jolly ou anéis de Cabot.	•13 + •33 + •15 + •GlicoforinaA+•Glicoforina C+
M7	Leucemia megacariocítica aguda	Com explosões polimórficas, altamente imaturas. O núcleo é excêntrico com cromatina reticulada dispersa nucléolos proeminentes. O citoplasma não é granular, basofílico e de aparência muito semelhante às plaquetas. Micromegacariócitos e fragmentos de megacarioblastos são vistos no sangue periférico (plaquetas gigantes, algumas altamente degranuladas).	•41 + •61 + •42 + •13 + •33 + •34 +

1.2.1 Epidemiologia LMA

A incidência anual de LMA somente nos Estados Unidos está estimada em 3,5 casos para cada 100mil habitantes e aumenta com a idade, no Brasil se estimou 1,1mil novos casos para 2018/2019 (INCA 2018), outro estudo registrou no período de 2007 a 2011 um total de 7807 casos de leucemia em grupos ocupacionais, e os Estados que apresentaram maior prevalência foram: no Estado de Minas Gerais (1350), no Rio grande do Sul (1082) e no Rio de Janeiro (1047) (ZAGO & PASQUINI, 2014; MORAES et al., 2017). Já no Estado do Amazonas segundo registro da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), no período de 2009 a 2019 foram registrados 367casos de LMA.

1.2.2 Dados Clínicos

Os sintomas mais frequentes da LMA decorrem da falência da medula óssea e do comprometimento com baixa concentração das respectivas linhagens. Assim, alterações relacionadas aos glóbulos vermelhos cursam com fadiga, palidez e fraqueza decorrentes da anemia, além disso, indivíduos neutropênicos tendem a apresentar infecções recorrentes e de repetição, dando espaço, inclusive às doenças oportunistas, por fim, casos que interferem nas coagulações primárias (e secundárias) podem provocar hemorragias, relacionadas à trombocitopenia.

Considera-se também o acometimento extra-medular em outros tecidos e órgãos, como pele, gengiva, sistema nervoso central (SNC), coagulopatia, leucostase e distúrbios metabólicos (ZAGO & PASQUINI, 2014; MERINOL 2018).

A melhoria do prognóstico da LMA foi possível pela estratificação da doença em grupos de risco, com base na citogenética; e pela identificação de falhas de indução quimioterápica. Atualmente a probabilidade de cura da LMA nos países desenvolvidos chega em torno de 60%, já nos países em desenvolvimento está em torno de 40% (SAULTZ & GARZON 2016).

1.2.3 Fatores de risco

Em geral, os fatores de risco estão associados ao sexo masculino, infecções, idade, fumo, exposição a certos produtos químicos como o benzeno, exposição à radiação, tratamento anterior com quimioterapia ou radioterapia, obesidade, distúrbios hereditários e genéticos com história familiar de leucemia (SILVA et al., 2006; CARVALHO et al., 2011; INCA 2018).

Estudos mostram que distúrbios relacionados à LMA surgem de uma série de alterações genéticas de células tronco hematopoiéticas recorrentes com a idade, com translocações e mutações de genes responsáveis por correções de erros genéticos herdados, além dos fatores extrínsecos já citados (ACHARYA et al., 2018).

1.2.4 Classificação LMA

Ao longo dos anos foram atualizados vários sistemas de classificação para LMA baseado em etiologia, morfologia, fenótipo, sistema imune e genética. Na década de 1970, a LMA foi classificada de acordo com o sistema de classificação Franco-Americano-Britânico (FAB), usando principalmente morfologia e critérios imuno-fenotípicos / citoquímicos para definir oito subtipos principais de LMA (FAB M0 a M7) (SILVA et al., 2006).

Tabela 2. Classificação das Leucemias segundo sistema de classificação Franco-Americano-Britânico. Adaptado(Silva et al., 2006).

Grupos	FAB*	MIC**	EGIL***	WHO****
Ano de proposição	1976	1986	1995	1997
Critérios de classificação	Morfológico Citoquímico	Morfológico Imunológico Citogenético	Imunológico	Clínico Morfológico Imunológico Citogenético Recorrente

**French-American-British*

***Morphological-Immunological-Cytogenetic*

****European Group for the Immunological characterization of Leukemias*

*****World Health Organization*

A Classificação da LMA segundo a OMS substituiu o sistema de classificação da FAB para se tornar a modalidade essencial para classificação das leucemias agudas atualmente (WHO 2016). Em colaboração com a *Society for Hematopathology e a European Association for Haematopathology*, a OMS publicou a terceira e quarta edições da Classificação de tumores de tecidos hematopoiéticos e linfóides, em 2001 e 2008, respectivamente, como parte de uma série de Classificação da OMS, sendo atualizada até 2008 (ARBERET al., 2016; OLIVEIRA, 2018).

Desde então, há inúmeros avanços na identificação de biomarcadores únicos associados a algumas neoplasias mielóides e leucemias agudas, em grande parte derivadas da expressão gênica, análise e sequenciamento da próxima geração. A adoção desses novos critérios são responsáveis por melhorar significativamente diagnósticos realizados, bem como a relevância prognóstica embasadas na classificação da OMS.

A classificação atual endossada por hematologistas, hematopalogistas, oncologistas e geneticistas, representa um aprimoramento da classificação anterior, incorporando novos dados clínicos, prognósticos, morfológicos, imunofenotípicos e genéticos que surgiram desde a última edição (ARBERET al., 2016). As principais mudanças na classificação e suas razões são apresentadas no Quadro 1 abaixo:

Quadro 1-Classificação OMS 2016 para as leucemias mielóides agudas e neoplasias relacionadas. Adaptado de (OLIVEIRA 2018).

1) Leucemia mielóide aguda(LMA) com anormalidades genéticas recorrentes:

LMA com t(8,21) (q22;q22); oncogene RUNX1 – RUNX1T1

LMA com inv(16) (p13.1;q22) ou t(16;6) (p13.1;q22); oncogene CBF β – MYH11

Leuc. Promielocítica aguda (LPA): t(15;17), oncogene PML-RAR α

LMA com t(9;11)(p21.3;q23.3): oncogene MLLT3-KMT2A

LMA com t(6;9) (p23;34.1): oncogene DEK-NUP214

LMA com inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2): GATA2, MECOM

LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13.3;q13.3):RBM15-MKL1

Entidade provisória: LMA com BCR-ABL1+

LMA com mutação *NPM1*

LMA com mutação bialélica em CEBPA

Entidade provisória: LMA com mutação RUNX1

2) LMA com mudanças displásicas relacionadas

- Para uma LMA (>20% blastos), a presença de displasia multilinhagem isoladamente não classifica uma LMA como LMA com mudanças displásicas relacionadas quando houver as mutações *NPM1* e mutação bialélica em CEBPA.

- Em casos não associados a essas referiadas mutações (*NPM1* e CEBPA), a detecção morfológica de displasia multilinhagem definida pela presença de >50% de células displásicas

em pelo menos duas linhagens é um fator de mau prognóstico para uma LMA e é suficiente para o diagnóstico de uma LMA com mudanças displásicas relacionadas.

- A história prévia de SMD é um critério de inclusão para uma LMA com mudanças displásicas relacionadas, exceção feita para del (9q).
- Há inúmeras alterações citogenéticas que definem uma LMA (todas devem possuir >20% blastos e sem terapia prévia associada) como LMA com mudanças displásicas relacionadas: Cariótipo complexo (mais de três alterações)

3) Neoplasias mielóides associadas a terapias (t-SMD e t-LMA)

Enquadra-se neste grupo, os pacientes que desenvolveram SMD ou LMA em consequência a tratamentos quimioterápicos. Esses pacientes parecem possuir suscetibilidade ao câncer por alterações linha germinativa. As alterações citogenéticas nesses casos também são importantes para determinação da terapia e prognóstico e devem ser identificadas somente ao final do diagnóstico que caracterize história clínica prévia bem associada a tratamentos.

4) LMA- não anteriormente especificadas (devem seguir a classificação)

Para as leucemias não especificadas anteriormente, e sem uma relação prognóstica definida, o critério morfológico FAB deve ser mantido, com exceção da leucemia eritróide aguda pura e a leucemia eritróide/mielóide (esta última definida por: 50% de precursores eritróides e na medula e >20% mieloblastos dentre o TCN (mas não das CNE). As entidades com 50% de precursores eritróides e na medula e > 20% mieloblastos das CNE, serão classificadas como mielodisplasias (SMD) com excesso de blastos.

LMA minimamente diferenciada (LMA M0 da FAB)

LMA sem maturação (LMA M1 da FAB)

LMA com maturação (LMA M2 da FAB)

Leucemia mielomonocítica aguda (LMA M4 da FAB)

Leucemia monoblástica/monocítica aguda (LMA M5 da FAB)

Leucemia eritróide pura (LMA M6b da FAB)

Leucemia megacarioblástica aguda (LMA M7 da FAB)

Leucemia basofílica aguda

Panmielose aguda com mielofibrose

5) Sarcoma Mielóide

6) Proliferações Mielóides relacionadas à Síndrome de Down

Mielopoesse anormal transitória

Leucemia Mielóide associada à Síndrome de Down

1.2.5 Fisiopatologia

Além dos fatores de risco relacionados, sabe-se que a LMA pode resultar de alterações genéticas cumulativas, geralmente agrupadas em duas classes:

- Alterações que afetam fatores de transcrição mielóides que controlam a diferenciação hematopoética.
- Mutações em genes que resultam na ativação anormal da função de proteínas que atuam na transdução de sinais intracelulares (ZAGO & PASQUINI, 2014).

1.2.6 Alterações Citogenéticas

Anormalidades cromossômicas não aleatórias como deleções e translocações são identificadas em aproximadamente 52% de todos os pacientes adultos diagnosticados com LMA primária, há muito tempo reconhecidos como eventos que causam e promovem esta doença (DOHNERET al., 2015).

Certas anormalidades citogenéticas, como t(8:21), observada na LMA M2 oncogene RUNX1-RUN1T1-presente na LMA M1 (q22; q22), LMA M3 ou M3V com t(15; 17), oncogene PML RaRa(q22; q21); LMA M4 com t(16;16) ou inversão do (16),(p13.1; q22) são alterações associadas a maior remissão e sobrevivência, enquanto alterações dos cromossomos 5, 7, cariótipo complexo e 11q23 estão associados com uma resposta fraca à terapia e menor sobrevida global (DOHNERET al., 2015; Oliveira 2018).

Testes de rastreio classificados como padrão ouro para diagnóstico da LMA ainda não estão disponíveis, triagem molecular para categoria de LMA sendo crítica para categorização prognóstica e estratégia de tratamento (SAULTZ & GARZON 2016).

1.3. DIAGNÓSTICO DAS LEUCEMIAS REALIZADOS NA FUNDAÇÃO HEMOAM

A Fundação HEMOAM, ao receber pacientes com suspeita de doenças oncohematológica, ou direcionados de outros ambulatorios, realiza diversas análises que possibilitem um *screening*, capaz de direcionar e identificar a patologia relacionada, a realização do estadiamento e consequente tratamento. Os exames são:

- Hemograma e citomorfologia
- Mielograma
- Citoquímicas
- Imunofenotipagem: marcação de antígenos intracitoplasmáticos e antígenos de superfície celular através da citometria de fluxo

- Cariótipo, análise numérica presença de translocações, deleções ou outras anomalias
 - Estudos moleculares: rearranjos estruturais, quimerismo, citogenéticos, translocações cromossômicas, mutações gênicas e polimorfismos
- Fonte: Fundação HEMOAM (CAVALCANTI, 2006).

1.4 LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA E INFECÇÃO FÚNGICA

Infecções fúngicas ainda são consideradas um problema de saúde pública no mundo, com mais de 25 milhões de pessoas com risco emitente de sofrer com esse problema. No Brasil as infecções fúngicas são predominantes com mais de 3,8 milhões de indivíduos são afetados e variam de acordo com a condição sócio econômica, regional e cultural, além de indivíduos em condições de risco como: pacientes com câncer, imunossuprimidos e transplantados (GIACOMAZZI et al., 2016).

Pacientes com doenças hematológicas fazem parte de um grupo de mais de um milhão de pessoas acometidas no mundo por infecções incluindo as fúngicas.

Giacomazzi (2016) demonstrou mostrou em seu estudo que pacientes com leucemia mielóide aguda apresentaram maior prevalência de casos de infecções fúngicas, principalmente por aspergillosis e candidíase.

No grupo das neoplasias hematológicas, pacientes com LMA apresentam maior suscetibilidade a infecções (incluindo às fúngicas) principalmente após serem submetidos à terapia de indução ou consolidação e/ou que tenham sido transplantados, apresentando neutropenia prolongada e mucosite induzida pela quimioterapia. Estes estão sob maior risco dessas doenças oportunistas e inclusive invasivas, representando uma das principais causas de morbidade e mortalidade (PAGANO et al., 2004; NUCCI et al., 2010; SANNA et al., 2017).

Um estudo realizado nos continentes Americano, Europeu, Asiático e Africano detectaram casos de pacientes com doenças hematológicas e associações com infecções fúngicas, apresentando a Leucemia Linfoblástica Aguda, Leucemia Mielóide Aguda e Linfoma não-Hodgkin como doenças de maior prevalência observadas nessa interação (COLOMBO et al., 2017).

Recentemente foi feito um levantamento epidemiológico na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), referente a dados de diagnóstico micológico no período de Novembro de 2017 a Agosto de 2018, onde se detectou que 25 dos pacientes internados com neoplasia hematológica apresentaram algum tipo de infecção fúngica oito (08) com LLA, quatro (04) com LMA, três (03) com Linfoma não Hodgkin, três (03) com Leucemia

não especificada, dois (02) com anemia falciforme, dois (02) com anemia Aplástica, um (01) com Mieloma Múltiplo, um (01) com Síndrome mielodisplásica e um (01) com Leucemia Mielóide Crônica

1.5 A DESIDROGENASE DA GLICOSE-6-FOSTATO (G6PD)

A Desidrogenase da Glicose-6-Fostato é uma enzima citoplasmática amplamente distribuída na maioria dos organismos e tecidos, em humanos, apesar da ampla distribuição é no metabolismo das hemácias que a G6PD exerce a sua função mais importante, atuando na via das pentoses para obtenção de energia e na redução de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADPH), substância redutora essencial à proteção das hemácias contra a ação de agentes oxidantes de origem endógena (peróxido orgânico) e exógena (drogas, alimentos e elementos atmosférico) (COMPRI et al., 2000; LUZZATO et al., 2001).

É uma enzima chave na via pentose-fosfato não somente com a produção de energia e fornecimento de (NADPH) contra o estresse oxidativo para manter estabilidade das hemácias, contudo também promove respostas de explosão oxidativa à neutrófilos contra microorganismos (LUZZATO et al., 2001; SANNA et al., 2017).

Sua ausência em glóbulos vermelhos pode levar tradicionalmente à anemia hemolítica aguda, induzida por agentes oxidativos exógenos como infecções, drogas, feijão fava, icterícia neonatal, entre outros. A desordem genética da G6PD pode ter como causa mutações que alteram a estrutura da proteína, reduzindo, portanto, sua atividade ou a quantidade de enzima produzida (PAGANO et al., 2004; SANNA et al., 2017).

1.5.1 Fisiopatologia (Papel da enzima G6PD nos eritrócitos)

A G6PD é o catalisador no primeiro passo limitante da velocidade da via das pentoses fosfato, que utiliza glicose-6-fosfato para converter o fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADP) na sua forma reduzida, NADPH.

Nos eritrócitos o NADPH é fundamental na prevenção de danos às estruturas celulares causadas pelos radicais livres de oxigênio e serve como um substrato para a enzima glutatona redutase. A glutatona reduzida pode ser usada para converter o peróxido de hidrogênio em água e prevenir danos às estruturas celulares, particularmente à parede celular dos glóbulos vermelhos, evitando assim o estresse oxidativo uma vez que eles têm capacidade limitada de

reparo quando amadurecidos. A figura 1 ilustra a sequência de eventos oriundos do Ciclo das Pentoses (SANNA et al., 2017; RHICHARDSON et al., 2017).

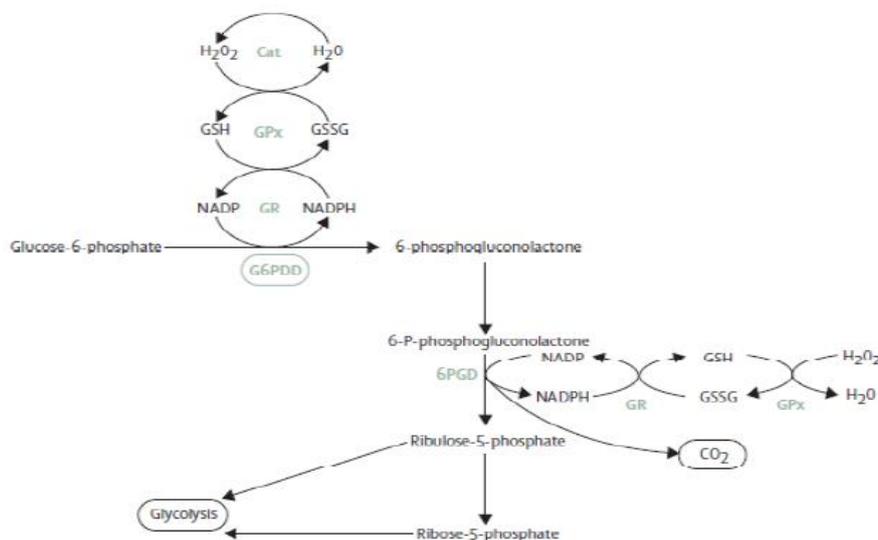


Figura 1 Ciclo das pentoses. Nesta via ocorre a produção de NADPH pela ação da G6PD, o NADPH servirá de doador de elétrons para a regeneração da glutathione reduzida que é responsável em proteger a célula do estresse oxidativo. Fonte: Cappellini & Fiorelli, 2008.

A G6PD catalisa o primeiro passo da via das pentoses, levando a glicose-6-fosfato a 6-fosfo-gluconodelta-lactona permitindo a regeneração de nicotinamida adenina dinucleotídeo a nicotinamida adenina fosfato (NADPH) e vai permitir a regeneração de glutathione reduzida (GSH) a partir de sua forma oxidada de dissulfeto de glutathione (GSSG).

A GSH é um importante agente redutor para neutralizar espécies reativas de oxigênio via redução de doação equivalente. A exposição de indivíduos com deficiência de G6PD a pró-oxidantes, como medicações antimaláricas, favas ou infecções, pode induzir anemia hemolítica aguda e, potencialmente, progressão para o choque (STADEM et al., 2017).

Nos eritrócitos, a via pentose fosfato confere proteção contra agentes oxidantes pela provisão de NADPH de glutathione reduzida, a maioria das células possui um Sistema de backup de outras vias metabólicas que podem gerar o NADPH intracelular. Como eritrócitos são anucleados e não possuem mitocôndria, também não realizam o ciclo de Krebs, ficando a G6PD com o papel fundamental no ciclo das pentoses para regeneração do NADPH e obtenção de energia. Sua deficiência pode comprometer a obtenção do mesmo causando danos especialmente letais nos glóbulos vermelhos, como estresse oxidativo que levam a desnaturação das moléculas de globina que formam a hemoglobina resultando em anemia hemolítica (CAPPELLINI & FIORELLI 2008; RHICHARDSON, 2017).

1.5.3 Papel da enzima G6PD nos Leucócitos

Entre as células de defesa do organismo os neutrófilos representam a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos invasores e constituem aproximadamente com 40 a 60% da população de glóbulos brancos (ZAGO & PASQUINI, 2014).

Os neutrófilos empregam várias estratégias antimicrobianas, incluindo a fagocitose, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), desgranulação de peptídeos e enzimas antimicrobianas como as proteases ácidas e básicas (CHENG et al., 2013).

O processo de fagocitose por neutrófilos é acompanhada por uma explosão de consumo de oxigênio decorrente da ativação do sistema NADPH oxidase através da redução de oxigênio molecular por elétrons provenientes, predominantemente da NADPH acarretando a produção de ânion superóxido (O_2^-) (CAPPELLINI & FIORELLI 2008).

Assim a atividade microbicida de células fagocíticas dependem principalmente desses radicais livres de oxigênio liberados pela ativação da NADPH oxidase quando são estimulados por microorganismos. A enzima G6PD catalisa a primeira reação na via fosfato pentose, proporcionando um potencial redutor às células em forma de NADPH que é essencial para a enzima NADPH oxidase em fagócitos. A nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato gerado na derivação de hexose monofosfato, promove redução obrigatória para a produção de ânion superóxido e óxido nítrico, sendo necessária para a função da heme oxigenase, especialmente em fagócitos. A deficiência da G6PD está associada à diminuição de NADPH, aumentando a suscetibilidade à infecções recorrentes por reduzir a atividade de neutrófilos no combate à essas infecções (ARDATI et al., 1997; SPOLARICS et al., 2001; SANNA et al., 2017).

Anormalidades fagocitárias geralmente se manifestam com infecções recorrentes, até mesmo graves, podendo iniciar ainda na infância. Quando os fagócitos são ativados, eles aumentam o consumo de oxigênio e reduzem o oxigênio ao superóxido catalisado pela NADPH oxidase, que doa elétrons para reduzir oxigênio molecular ao superóxido (AGUDELO-FLÓREZ et al., 2004).

Em infecções fúngicas, o principal mecanismo de defesa é desenvolvido pelos fagócitos, que os destroem por meio da produção de NO e de outros componentes secretados por essas células. Adicionalmente, há participação de IFN- γ , aumentando a função de neutrófilos e macrófagos. Portanto, pacientes que apresentam neutropenia com menos de 500 neutrófilos/mm³ ou que tenham deficiência da imunidade celular cursam com frequência com infecções fúngicas recorrentes e ocasionalmente desenvolvem formas graves e profundas (ROMANI, 2004).

1.5.4 Deficiência da desidrogenase glicose-6-fosfato

A deficiência da G6PD é uma das anormalidades enzimáticas hereditárias mais comuns em seres humanos, é uma desordem genética comum que afeta aproximadamente 400 milhões de pessoas no mundo, especialmente nas regiões do mediterrâneo, regiões africanas e asiáticas (RHICHARDSON et al., 2017). Mundialmente, cerca de 7,5% da população carrega um ou mais gene dessa condição, sendo considerada um problema de saúde global (GIOVELLI et al., 2007).

1.5.5 Prevalência no mundo, Brasil e Amazonas

De acordo com um relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), a maior prevalência da deficiência de G6PD descrita é na África Subsaariana onde há predominância da população negra, cerca de 10 a 25% dos indivíduos apresentam alteração, seguido da Europa meridional, sudeste da Ásia, Sul das ilhas do pacífico e nas Américas do Norte e Sul, devido à migração relativamente recente. Abaixo **Figura 2** demonstra os diferentes locais do mundo com predominante presença da G6PD, bem como sua frequência nesses locais. (GIOVELLI et al., 2007; RHICHARDSON et al., 2017; STANDEM et al., 2017).

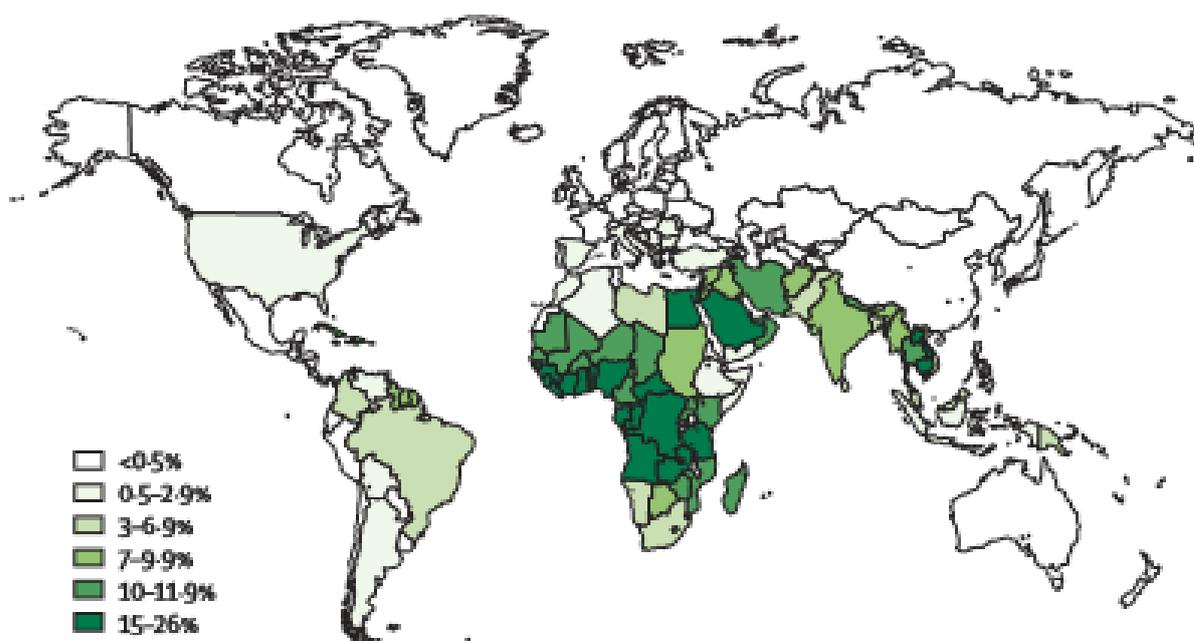


Figura 2. Distribuição mundial da deficiência da G6PD. Fonte: CAPPELLI & FIORELLI 2008.

No Brasil a frequência da deficiência da G6PD está entre 3% e 9%, sendo 95% e 98% casos da variantes africanas –A G202A e a A376G. Além dessas, foram descritas outras variantes como a Mediterrânea, Seattle, Santamaria e Chatam, que, por sua versão mais raras.(MAURÍCIO et al., 2006)

Na cidade de Manaus-AM, Santana e col (2013) estimaram a prevalência total da G6PD em 4,5% da população, sendo 3,8% correspondente à indivíduos portadores da variante Africana e 0,7% portadores da variante Mediterrânea. E esses indivíduos faziam tratamento para malária durante esse período, já Moura-Neto (2004) estimou aproximadamente 8,5% de deficiência da G6PD em doadores de sangue também da mesma cidade.

1.5.6 Dados Clínicos

Muitos indivíduos com deficiência da G6PD podem permanecer assintomáticos por toda a vida. A deficiência da G6PD geralmente se manifesta através de anemia hemolítica desencadeada por diversos fatores como: infecções incluindo as fúngicas, exposição a certas drogas oxidantes como sulfonamidas, nitrofuranos, antimaláricos, alguns analgésicos, antipiréticos, alimentos alcalóides de fava (favismo), icterícia neonatal e anemia hemolítica não esferocítica crônica que podem levar à manifestações clínicas como: fadiga, dores nas costas, anemia, icterícia e colúria (LUZZATTO et al., 2001; MASON et al., 2007; COMPRIET al., 2000).

Pacientes com deficiência grave de G6PD podem apresentar síndromes parecidas a doenças granulomatosas crônicas devido à explosão oxidativa não funcional em seus fagócitos (SPOLARISSET al., 2001).

Deficiências moderadas, como as variantes mediterrânea e africana, afetam os glóbulos vermelhos incapacitando-os de realizar síntese proteica e tornam-se sensíveis ao estresse oxidativo à medida que envelhecem (SPOLARISSET al., 2001).

Em termos laboratoriais mudanças estruturais decorrentes do estresse oxidativo nos eritrócitos deficientes de G6PD geram bissulfetos e causam a desnaturação e a precipitação da hemoglobina, formando corpúsculos de Heinz que se integram à membrana do eritrócito, alterando sua carga, elasticidade e permeabilidade, tornando susceptível a remoção pelo sistema retículo monocitário do baço, fígado e medula, iniciando assim o processo hemolítico. A presença de hemácias “mordidas” em uma anisopoiquilocitose também podem ser observadas no esfregaço de sangue devido à presença dos corpos de Heinz que foram fagocitados, além de hemoglobinúria e reticulocitose (MOURA NETO et al., 2008; ZAGO & PASQUINI2014).

1.5.7 Bases Genéticas da G6PD

O gene G6PD de cópia única é expresso em todas as células; entretanto, sua expressão basal varia entre os tecidos, a expressão de G6PD é regulada em uma célula (ZAGO & PASQUINI, 2014).

O gene da G6PD está localizado na região telomérica do braço longo do cromossomo X (q28), possui 13 éxons que codificam um total de 515 aminoácidos e 12 introns, distribuídos por cerca de 20kb de DNA genômico (CAPPELLINI & FIORELLI 2008), estando próximo aos genes responsáveis por heranças ligadas ao cromossomo X como: hemofilia, disceratose congênica e daltonismo. Todas as mutações do gene da G6PD que levam a alguma deficiência enzimática afetam sua sequência codificadora (ZAGO & PASQUINI, 2014).

Esta condição é herdada em um padrão recessivo ligado ao X, ilustrado na figura 3, o gene associado a esta condição está localizado no cromossomo X. Nos homens uma cópia alterada do gene em cada célula é o suficiente para causar a condição, já nas mulheres uma mutação teria que ocorrer em ambas cópias do gene para causar o transtorno; uma característica da herança ligada ao X é que o pai não pode passar os traços ligados ao X para o seu descendente se for do sexo masculino (MANGANELLI et al., 2013). Nenhum dos padrões de mutação observados em humanos causa a inativação completa da G6PD, já que isso seria letal para um embrião em desenvolvimento (RHICHARDSON et al., 2017).

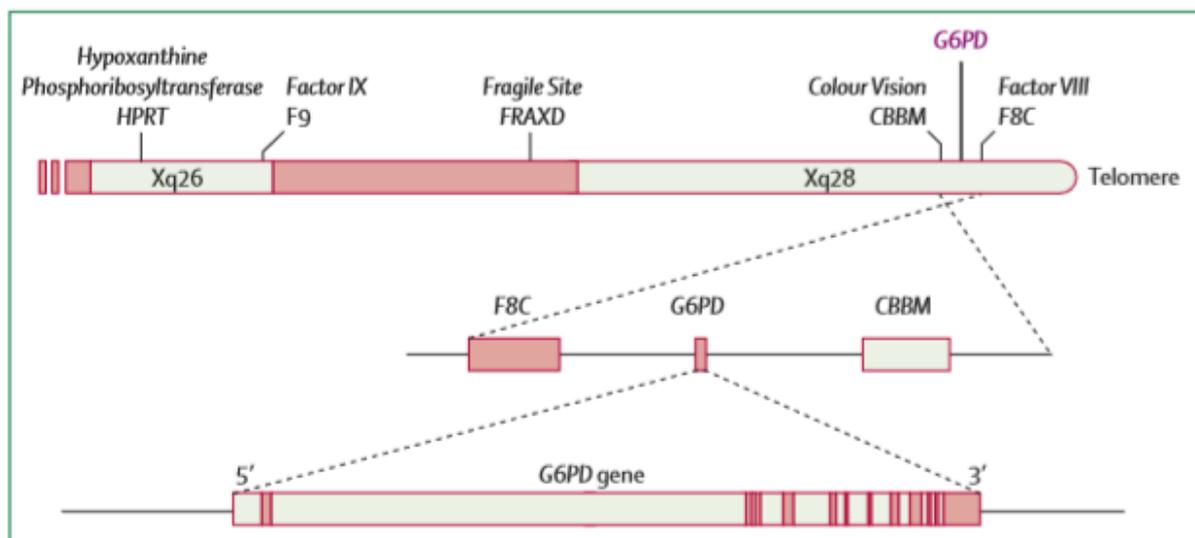


Figura 3. Localização do gene da G6PD no cromossomo X. Fonte: Cappellini&Fiorelli 2008.

1.5.8 Mutações e Variantes da desidrogenase-6-fosfato

Existem atualmente 186 mutações em G6PD humanas conhecidas, e a maioria são mutações pontuais que afetam um único nucleotídeo. As variantes de G6PD mais comuns são G6PDA Africano, frequentemente observada em regiões tropicais da África e América do norte e do sul, e a chamada variante mediterrânea, amplamente encontrada na Itália, Espanha, Portugal e Oriente Médio (SANNA et al., 2017).

A organização Mundial da saúde classificou as diferentes variantes da G6PD em cinco classes, de acordo com o nível de atividade enzimática residual e gravidade de hemólise. Adaptado de (ZAGO & PASQUINI 2014; SILER et al., 2017).

Classe I – Deficiência Grave com menos de 10% da enzima levando a hemólise crônica;

Classe II – Deficiência Grave com <10% de atividade residual, com episódios intermitentes de hemólise aguda: (incluem aqui as variantes Mediterrânea, Santamaria e Cantão);

Classe III – Deficiência Moderada (10% a 60% de atividade residual) incluindo as variantes A-, africana, Seattle, Chatam;

Classe IV – Deficiência ligeiramente diminuída ou não deficientes (60% a 100% de atividade (inclui Variante A);

Classe V - Atividade enzimática aumentada (>150% de atividade) (variante Verona).

Devido a várias ondas de imigração que resultaram em diversidade cultural, socioeconômica e étnica, o Brasil é um país grande, com uma população altamente heterogênea, assim populações mistas podem apresentar diversidade no que diz respeito às variações da deficiência da G6PD (MOURA-NETO et al., 2008).

As duas formas mais comuns de deficiências são o tipo mediterrâneo, com uma atividade residual aproximada de 2%, e o tipo africano variantes -A, com 15% de atividade residual nos glóbulos vermelhos. As variantes africanas do tipo -A ocorrem com uma frequência de 10% a 11% na população afro-americana (SPOLARICSET al., 2011). A distribuição dessas variantes varia de acordo com a região geográfica e grupo étnico (ZAGO & PASQUINI2014).

A clonagem e sequenciamento do gene normal da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) levou ao estudo dos defeitos moleculares que determinam variantes enzimáticas (CAPPELLINI et al., 1994).

Algumas variantes são estudadas com maior frequência, pois podem ser encontradas com maior abundância em várias regiões. Nesse estudo, apresentamos as variantes a serem investigadas de acordo com a frequência:

Variante A+ 376 A/G

Esta variante corresponde à troca do nucleotídeo adenina (A) para uma guanina (G) na posição 376. Essa mutação resulta na mudança do aminoácido asparagina (Asn) para o aminoácido ácido aspárgico (Asp) na posição 126 da proteína. Esta mutação não está relacionada com a anemia hemolítica (classe III-IV), pois mantém a termo estabilidade e os níveis de atividade enzimática normais. Ocorre mais frequentemente em indivíduos negros, italianos, judeus, árabes, gregos, orientais e persas. Sua prevalência em populações da África subsaariana é de 0.1 a 0.34 (G6PD Homepage net acesso em 11/11/2018).

Variante G6PD A-202 G/A

Também chamada de Distrito Federal, Matera e Bética, este haplótipo é encontrado em diversos lugares do mundo. Trata-se de uma mutação, com troca de uma guanina por uma adenina na posição 202, o que resulta na alteração do aminoácido metionina (Met) pelo aminoácido valina (Val) na posição 68 de proteína juntamente com uma mutação ocasionada pela variante A. Este haplótipo é encontrado em frequências superiores a 0.24 em populações africanas (VULLIAMY et al., 1998).

Variante G6PD A- 968 T/C

Trata-se da alteração de uma timina por uma citosina na posição 680, o que resulta na troca do aminoácido leucina pelo aminoácido prolina (Pro) na posição 323 da proteína combinada com a variante A (VULLIAMY et all. 1998).

Variante Santa Maria -542 A/T

É caracterizada pela combinação da variante com a mutação A/T na posição 542, com alteração do aminoácido ácido aspárgico para o aminoácido valina na posição 181 da proteína. A mutação O 542, que não destrói ou gera quaisquer sítios de restrição, foi detectada usando

um primer mismatched previamente descrito, que cria artificialmente um sítio ACC 3 quando a mutação está presente (NAFA et al., 1994).

Variante Santiago de Cuba-1339 G/A

A substituição de Adenina por Guanina como número de referência 1339 (exon 11) leva à substituição de Arginina por Glicina na posição de aminoácido 447. Esta variante está associada à anemia hemolítica crônica grave (classe I) (VULLIAMY et al., 1998).

Esta variante foi descoberta quando um paciente na província de Liaoning, no nordeste da China foi classificado pela OMS como classe I (deficiência muito grave de G6PD), porém quando o gene da G6PD foi investigado viu-se que ele tinha uma substituição de G para A no nucleotídeo 1339. Como resultado o aminoácido na posição 447 deveria mudar de Gly para Arg. Este substituto é conhecido como G6PD Santiago de Cuba, porque foi descoberto pela primeira vez em um menino cubano que apresentou anemia crônica grave. A Anemia não está presente na vida diária, mas o ataque hemolítico pode ocorrer quando o portador ingere certos medicamentos antioxidantes (WANGET al., 2010).

Variante Mediterrânea 563 C/T

Essa variante consiste na alteração do nucleotídeo C/T na posição 563, o que ocasiona a mudança do aminoácido Serina (Ser) para o aminoácido Fenilalanina (Phe) na posição 188 da proteína, a primeira descrição foi na Itália e Chipre. A proteína derivada desta variante possui menos de 10% da atividade enzimática, tal característica relaciona essa variante com a anemia hemolítica medicamentosa e a enquadra na classe II, segundo a WHO. Com base nas regiões do planeta esta variante também pode ser denominada de Dallas, Sassari, Panamá entre outros (VULLIAMY et al., 1998; KAMPEN, 2012).

A variante mediterrânea da G6PD (Gd-Md, 563 C >T) também é uma das deficiências mais comuns de G6PD observado em vários países do Oriente Médio, como o Irã, no subcontinente indiano, e tem sido documentada no extremo leste como a China, Malásia e Cingapura. No sul da Ásia, esta variante da deficiência de G6PD é de relevância prática, uma vez que existe uma sobreposição geográfica substancial com a malária (JAMORNTHANYAWAT et al., 2014).

Variante Chatham A1003G

Após a variante mediterrânea da G6PD, a variante Chatham é a mutação mais comum e severa nos países do Oriente Médio incluindo províncias do Irã (Rahimi et al., 2006). Ocorre com a substituição da Adenina pela Guanina no nucleotídeo 1003e substituição da alanina com Threonina na posição do aminoácido 335(Vulliamy et al., 1988).

A variante Chatham (AL335Thr) é causada pela mutação G1003A no exon 9 do gene da G6PD. Essa mutação causa deficiência de classe II caracterizada por um valor menor que 10% da atividade normal da enzima, levando a forma severa da deficiência da G6PD (RAHIMI et al. 2006).

Sanna e col. (2017) detectaram infecções em pacientes com LMA, sendo que a maior a incidência foi de infecções fúngicas, de forma significativa e mais elevada em pacientes com deficiência da G6PD (cerca de 7 vezes mais).

Gafer-Gvilli (2017) demonstrou a presença de infecções bacterianas nove (09) vezes mais elevadas naqueles pacientes com LMA e deficientes da G6PD com relação àqueles com LMA e normais para a G6PD. Nesse mesmo estudo o autor descreve importância do rastreio de neonatos que apresentaram sepse por organismo catalase-positivo com incidência mais elevada naqueles deficientes da enzima G6PD. Além disso, se observou um aumento no tempo de internação dos pacientes deficientes da G6PD em relação aos não deficientes.

Sanna e col. (2017) realizaram outro estudo abordando o gerenciamento de infecções fúngicas invasivas em pacientes com LMA submetidos ou não à quimioterapia naqueles com a deficiência da G6PD, propondo um conjunto de regras e procedimentos como: identificação correta do microorganismo invasor, profilaxia e tratamento de infecção fúngica. Neste estudo o papel da deficiência da G6PD na suscetibilidade à infecções foi confirmada em granulócitos com função reduzida apresentando menos de 30% de atividade.

Importante ressaltar que nestes estudos acima citados, a atividade da enzima G6PD foi somente quantificada. Para estes estudos, foi considerado o valor mínimo 10% de atividade para que o paciente fosse considerado deficiente da enzima. Cumpre ressaltar que não foram realizados estudos moleculares para determinação do polimorfismo e sua variante. Além disso, também não foram estratificados os subtipos de LMA, na metodologia utilizada.

Nos estudos acima a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDd) demonstrou associação com infecções fúngicas em portadores da LMA, mas ainda há escassez desses estudos ao redor do mundo especialmente nas Américas.

Assim, entendemos ser racional descrever e verificar possível associação entre ser portador de LMA com estratificação de seus subtipos e possuir a deficiência da G6PD com a determinação de polimorfismos genéticos e possível aumento de suas infecções.

Sugerindo-se a elaboração de um algoritmo para correta identificação do microorganismo, prevenção para gerenciar o risco de infecções sendo invasivas ou não nesses pacientes, reduzindo o tempo de internação hospitalar, tempo de uso de antibióticos, além de manifestações de outras infecções.

Desta forma acreditamos que o nosso trabalho pode responder com um melhor acompanhamento a esses pacientes com tratamento diferenciado, proporcionando melhor qualidade de vida, permitindo traçar estratégias de monitoramento, diagnóstico precoce, menor tempo de internação, uso racional de antimicrobianos e terapêutica direcionada à doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Estimar polimorfismos genéticos no gene da G6PD em pacientes diagnosticados com LMA acompanhados no Hemocentro do Amazonas.

2.2 Específicos

- Realizar levantamento demográfico e clínico dos pacientes com LMA do Hemocentro do Amazonas;
- Classificar os tipos de infecções mais frequentes nos pacientes com LMA, especialmente às fúngicas.
- Descrever polimorfismos encontrados com a clínica e subtipo de LMA estratificado
- Analisar a deficiência da G6PD com a gravidade clínica da infecção nos pacientes com LMA.

3. MÉTODOS E CASUÍSTICA

3.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo de corte transversal

3.2 CASUÍSTICA

A população deste estudo foi constituída de forma aleatória num total de 157 pacientes entre adultos, crianças de ambos os sexos, independentemente da idade, da origem e com diagnóstico de Leucemia Mielóide Aguda, todos em tratamento na Fundação HEMOAM no período de Fevereiro de 2009 a Outubro de 2019. Esses pacientes foram recrutados na Fundação HEMOAM da seguinte forma: demanda espontânea com abordagem sem agendamento prévio, consulta agendada, ou estavam internados.

Todos foram orientados a respeito do projeto e convidados a participar da pesquisa, ao aceitar, assinaram o TCLE e no caso de menores de 18 anos, Termo de Assentimento assinado por responsável legal. Também foram convidados a responder a um questionário sócio-demográfico e clínico. Pacientes ou responsáveis que não autorizaram participação no presente estudo ou não se obtiveram informações suficientes incluindo material biológico, não foram incorporados nesse estudo, sendo devidamente excluídos.

O projeto foi desenvolvido nas dependências da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, por ser o centro de referência no Estado do Amazonas para o tratamento das Leucemias, assim como o Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas para realização dos testes moleculares, por já estar devidamente equipado para realização desses testes e contar com profissionais especializados na área.

Do total de 157 pacientes que aceitaram participar do estudo, 107 são acompanhados atualmente na Fundação HEMOAM e 50 foram a óbito. Alguns pacientes que foram a óbito não possível fazer a coleta de sangue total, porém foram incluídas suas amostras de sangue em esfregaço sanguíneo durante este período, com anuência da Fundação HEMOAM. Para esses pacientes cuja obtenção do TCLE tornou-se inviável devido ao óbito ou perda de seguimento, o Comitê de Ética aprovou a dispensa de obtenção de consentimento por parte dos pacientes conforme o capítulo IV-8 da Resolução 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde.

3.3 Considerações Éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, parecer n° 3700618 CAAE 83413718600000009.

O estudo foi realizado de acordo com os critérios de Regulação de Bioética no Brasil Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e Resolução Complementar. O TCLE e Assentimento foram aplicados de acordo com cada caso, também foram coletados dados dos respectivos prontuários médicos mediante anuência do HEMOAM.

As informações obtidas foram mantidas de forma confidencial, garantindo que este estudo fosse realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos.

3.4 Coleta de Dados Clínicos

Na coleta de dados clínicos e epidemiológico foi feita uma entrevista com o paciente utilizando questionário sociodemográfico e clínico, além de levantamento de dados de prontuários físicos e eletrônicos dos programas, I-Doctor e Soft-lab implantados na Fundação HEMOAM, sob consentimento de cada paciente e anuência da Fundação.

As informações coletadas desses prontuários foram HDA, exames laboratoriais, principalmente microbiológicos, Raio X de tórax, sinais de infecções com neutropenia febril, alterações na mucosa oral, tempo de tratamento, subtipo de LMA, hemograma do inicial e final com valores de blastos quando fornecido. Mesmo com indisponibilidade de algumas dessas informações no prontuário, o caso não foi excluído.

3.5 Coleta de dados Laboratoriais e Inclusão de amostras

Mediante os critérios de inclusão e com o aceite por parte desses pacientes, foi feita coleta do material biológico. Para análise laboratorial foram coletadas amostras de sangue total por profissional devidamente treinado, no volume de 2 a 5ml por punção venosa com tubo primário (tampa roxa) contendo EDTA e encaminhado ao laboratório de hematologia.

Dessa amostra foram retirados 200 microlitros de sangue total onde foram identificados, armazenados em microtubos e conservados em refrigerador a temperatura de 2°C à 6°C, para que posteriormente fosse feita a extração do DNA e análise molecular. Já amostras de pacientes

que foram a óbitos sem o devido tempo para a coleta de sangue total, foi feita análise das lâminas desses pacientes sem coloração, fornecidas pelo setor de imunofenotipagem com devida anuência da Fundação HEMOAM.

O material da lâmina foi raspado para que fosse feita extração de DNA desse material e posteriormente análise molecular.

3.6 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de 200µL de sangue total de acordo com o protocolo do fabricante do Brazol (LGC Biotecnologia, SP Brasil).

Após a extração, o DNA foi quantificado no equipamento NanoDrop 2000. Já com o material retirado das lâminas foi utilizado o AccuPrep ® Genomic DNA Extraction kit Bioneer de acordo o protocolo do fabricante.

Para visualização dos fragmentos de DNA, alíquotas de 10µl do produto da extração foram misturados 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 (80V/160A) por 30 minutos. E após corados durante dois minutos com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

O DNA foi armazenado a -20°C até o momento da análise molecular atendendo a Resolução 441/2011-CNS.

Tanto a extração de DNA quanto as análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

3.7 Genotipagem da G6PD

Para a caracterização dos polimorfismos foi utilizada a técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) com o equipamento QuantStudio 3 (Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific), utilizando sondas TaqMan específicas para a amplificação (Quadro 2).

A reação de amplificação foi realizada para volume final de 12µL/reação, contendo 5µL de 2x TaqMan Universal Master Mix, 0,3µL de 20x SNP Genotyping Assay, 4,8µL de água esterilizada e 2,0µL de DNA (~100ng) da amostra.

As variantes genéticas da G6PD analisadas neste projeto foram escolhidas com base conhecimento prévio das frequências observadas mundialmente e sua importância clínica de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde.

Quadro 2: Identificação das sondas para a técnica de PCR Real Timer de acordo com o Thermofisher

POLIMORFISMO	IDENTIFICAÇÃO
A-T968C	rs 76723693
A542T Santamaria	rs 5030872
G1339A- Santiago de Cuba	rs 137852317
A1033G Chatham	rs5030869
C563T Mediterranean	rs 5030868
A376 G	rs1050829
G202A	rs1050828

3.8 Análise Estatística

Os dados dos questionários e dos resultados obtidos dos experimentos realizados foram digitados em banco de dados nos Software Graph pad Prism 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 categórico, foi utilizado o teste exato de Fisher.

Os intervalos de confiança em 95% e a razão de prevalência foram calculados para essas variáveis. As análises de correlação foram 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.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Artigo

ASSOCIATION BETWEEN 202/376 G6PD POLYMORPHISMS AND MOLDS INFECTIONS IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA PATIENTS FROM MANAUS-AMAZON

Noeme Henriques Freitas^{1,2}, Cinthia Cristina Matheus Xerez Albuquerque²; Marilda de Souza Gonçalves⁵, Sérgio Roberto Lopes Albuquerque², Nelson Abrahim Fraiji², José Pereira de Moura Neto^{2,3,4}

1 Universidade do Estado do Amazonas- UEA

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

3 Programa de Pós Graduação em Hematologia

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

5 Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brasil.

****Address correspondence to:***

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

Sponsorships:

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

ABSTRAT

Introduction: Patients with acute myeloid leukemia (AML) show at higher risk for several infections, including molds infections, which is one of the main causes of morbidity and mortality. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is an enzyme located in all cells, with primordial function to protect against oxidative stress in erythrocytes, however, very necessary in leukocytes for the production of its basic and acid proteases used to destruction of invading microorganisms. **Objective:** To evaluate whether polymorphisms in the G6PD gene concomitantly with molds infections (FI) are associated with clinical and morbidity in patients diagnosed with AML followed up at the blood foundation from Amazon (FHEMOAM). **Methodology:** We performed an active search for patients and review of medical records. G6PD mutations was determination of was performed using the qPCR technique and subsequent genetic sequencing to confirm the mutations. **Results:** A total of 157 patients were involved in the study, being 91 (58%) men and 66 (42%) women. The most prevalent AML subtype in the studied group was M3 in 63 patients (40.12%), followed by M5 in 33 patients (21.02%), M2 in 21 patients (13.37%) and M4 in 15 patients (9.55%), with similar prevalence between genders. The prevalence of molds infections was identical between genders, however, bruising ($p=0.004$), vomiting ($p=0.016$) and cardiac changes ($p<0.001$) was higher in females, while persistent cough ($p=0.049$) and diarrhea ($p<0.001$) in males. Eighteen patients were diagnosed with two G6PD mutations, with 08 (5.1%) for c.202G/A, 18 (11.5%) for c.376A/G and 04 (2.5%) for both mutations concomitantly (c. 202G/A / c.376A/G). Although the carriers of the mutations were more frequently affected with molds infections, 9.8% in carriers for c202G/A vs 3.4% in normal, 12.2% for c376G/A vs 11.2% in normal and 7.3% for both c202G/A / c.376A/G vs 0.7%, this incidence was not significant, although we believe that with a larger sample number of carriers of mutations and molds infections, this data would be significant. Otherwise, the prevalence of death in patients with the mutations found was much higher when affected by FI ($p<0.001$). **Conclusion:** We believe that the determination of G6PD polymorphisms will allow the development of monitoring strategies, early diagnosis and appropriate and targeted treatment for AML, as well as evaluating its activity may help to identify AML patients at higher risk for FI, allowing the design of more therapeutic and surveillance strategies intensive.

Keywords: Acute myeloid leukemia, G6PD, Fungal infection, Manaus.

INTRODUCTION

Leukemias are a set of diseases characterized by malignant changes in the hematopoietic system, classified as chronic and acute. Acute Myeloid Leukemias (AML) occur due to clonal proliferation of myeloblasts that accumulate in the bone marrow and inhibit normal hematopoietic activity, characterized by anomalous proliferation of immature bone marrow precursors [1,2,3,4,5].

It occurs mostly in adults over 60 years old, being more frequent in males. In Brazil, estimates are 1.11 thousand new cases per 100,000 inhabitants per year, with a percentage of deaths of 60% [6].

In the state of Amazonas, according to the Hematology and Hemotherapy Foundation of Amazonas (HEMOAM), currently 107 patients with AML are being followed up. AML patients undergoing chemotherapy are at increased risk of infections, including molds infections, and are the main causes of morbidity and mortality [7,8].

Some current studies have shown an increase in molds infections in AML patients with concomitant glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency [9,10].

G6PD deficiency is a common genetic disorder that affects approximately 400 million people worldwide, and the percentage described worldwide affects 7.5% of the population [13,14].

The G6PD enzyme is located in all cells, but has a primordial function in erythrocytes to protect against oxidative stress, preventing its early hemolysis and also in leukocytes for the production of its basic and acid proteases contained in its granules, for destruction of invading microorganisms [10,12].

AIMS

The aim of this study was to determine genetic polymorphisms in the G6PD gene in patients diagnosed with AML followed up in the Blood Center from Amazonas, associating the presence of molds infections.

In order to respond with better monitoring of these patients, with shorter hospital stay and use of antibiotics, providing a better quality of life, allowing the design of monitoring strategies, early diagnosis and therapy directed to the disease.

METHODS (STUDY DESIGN)

The population of this study was randomly constituted by a total of 157 patients among adults, children, of both sexes, at any age, with diagnosis of Acute Myeloid Leukemia, all under treatment at the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM) in the period of February 2009 to October 2019. All patients were recruited as spontaneous demand with approach without prior appointment, scheduled appointment or hospitalized. All of them were instructed about the project and invited to participate in the research, when they accepted, they signed the informed consent form and in the case of minors under 18, the term of assent was signed by a legal guardian.

This project was approved by the Ethics and Research Committee (CEP) of the FHMOAM, and developed according to the criteria of the Regulation of Bioethics in Brazil, Resolution 466/2012 of the National Health Council. All participants or guardians (in the case of children under 18 years of age) have signed the written consent form and the study has been approved by CEP under number 3700618 CAAE 8341371860000009.

Following the inclusion criteria and after the agreement of each patient, assent term was applied and to answer a sociodemographic and clinical questionnaire. Of the total of 157 patients who agreed to participate in the study, 107 are currently being followed up at the HEMOAM Foundation and 50 have died. A survey of physical and electronic medical records was also carried out, such as I-Doctor and Soft-lab programs implemented at the FHMOAM. All data collected were under the consent of each patient and with the consent of the Foundation, the information obtained was kept confidential, ensuring that this study was carried out under strict scientific and ethical principles.

The main information collected from these medical records were current history of the disease, microbiological results, chest X-ray, signs of infections with febrile neutropenia, changes in the oral mucosa, treatment time, AML subtype and initial and final blood count with values of blasts when supplied.

For some laboratory analysis such as hemogram and total leukocyte count blood samples were collected between 2 to 5 ml in 127 patients by venipuncture in a tube containing EDTA, while another 30 samples were only extracted DNA through peripheral blood or bone marrow slides stored in their respective medical records, since they have a died before the study started. Genomic DNA was extracted from peripheral blood using HiYield Genomic DNA extraction kit (BioAmerica Inc., USA). NanoDrop ND-1000 (ISOGEN LIFE SCIENCE, Netherlands) was used to measure DNA concentration, according manufacture protocol. For the characterization of polymorphisms, the Real Time PCR (qPCR) technique was used with the QuantStudio 3

equipment (Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific), using specific TaqMan probes for amplification (Table 1)

GENOTYPING OF GLUCOSE 6 PHOSPHATE DEHYDROGENASE

SNPs Genotyping was conducted using TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) on a QuantStudio 6 and 7 Flex Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). The probes used are show in Table 1.

STATISTICAL ANALYSIS

Demographic and clinical characteristics were summarized as the median and range or number. Incidence of FI was the primary endpoint while secondary endpoints were the impact of G6PD mutations presence on the incidence of mold infections, Candida sepsis, overall survival and infection-related death. Significant differences were calculated using Fisher's two-sided exact test or Pearson's chi-squared test, as appropriate. Categorical variables were detected using the chi-square test to compare the differences between two groups. Overall survival was analyzed using the Kaplan–Meier method, which was calculated from the date of diagnosis of leukemia with infection to death or the last follow-up time. Analyses were performed using SPSS 19.0 software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

SOCIODEMOGRAPHIC PROFILE

Of the total of 157 patients, 91 (58%) were male and 66 (42%) female. Of these, 149 (94.90%) were born and reside in the Amazon Region, with 133 (84.7%) belonging to the State of Amazonas, while 08 (5.1%) were born in another region of Brazil, however, have lived for at least 10 years in the State of Amazonas. The age average among men was 38.08 ± 24.01 , while 40.86 ± 23.14 in women. Most patients declared themselves to be brown color. Regarding the level of education, it was observed that men had a lower level of education and both genders had less than 10% with higher education (Table 2).

SUBTYPES OF AML

The most prevalent AML subtype in the studied group was M3 in 63 patients (40.12%), followed by M5 in 33 patients (21.02%), M2 in 21 patients (13.37%) and M4 in 15 patients (9.55%), with similar prevalence between genders. In addition to these, 5 cases of unspecified biphenotypic leukemias were diagnosed with a frequency of 05 (3.18%) (Table 3).

CLINICAL EVENTS

The information contained in the socio-epidemiological questionnaire and medical records showed fever as the first most event in both genders, 53.8% vs 54.5% , followed by anemia, 6.5% vs 16.7%, and arms and legs pains with 13.2% vs 21.2%, male and female, respectively. The prevalence of molds infections was identical between genders, however, bruising ($p=0.004$), vomiting ($p=0.016$) and cardiac changes ($p<0.001$) was higher in females, while persistent cough ($p = 0.049$) and Diarrhea ($p<0.001$) in males (Table 4). Other less frequent events were observed, such as systemic arterial hypertension, gastritis and cardiac alterations with 2.2%, 2.3% and 7.6%, respectively (Data no show).

In our study, we found episodes of recurrent infections in female more frequent than in male, such as urinary tract infection, intestinal infection and otitis with frequencies of 6.9%, 5.5% and 2.7%, respectively, however, without statistical significance. In Male, on the other hand, presented higher frequency for furuncle, pneumonia, throat infection, sepsis, sinusitis, skin infection and hepatitis, 3.6%, 3.3%, 2.2%, 2.2%, 1.9% and 1.8%, respectively. Fungal mucositis, quite common in patients undergoing treatment for hematological disease, presented a close frequency in both genders, with 12.1% in male and 15.2% in female.

Several infectious agents have been reported in medical records. Among them, *C.tropicalis*, *Malassesia sp*, *Candica sp*, *R.detocariosa*, *S.mitis*, *K .oxytoca*, *S.hyicus*, *S.maltophilia*, *A.ivolffii*, *R.mulaginoso*, *C.laurentii*, *S.marcescens* were diagnosed , *S.saprophyticus*, *S.hugdunesis*, *P.aerogenosa*, *S.epidermidis*, *S.aureus*, *A.baumanni*, *S.haemolyticus*, *S.intermedius*, *K.pneumoniae*, *S.pneumoniae*, *S.saprophyticus* and H. zoster.

Interestingly, almost all detected infectious agents have been reported as mono-infections, with the exception of *Streptococcus pneumoniae*, which has always been reported with *S. epidermidis*.

G6PD GENOTYPES

Of the 07 G6PD variants analyzed, only c.202G/A and c.376A/G were found, with 08 (5.1%) for c.202G/A, 18 (11.5%) for c.376A/G and 04 (2.5%) for both mutations concomitantly (c. 202G/A / c.376A/G). Others G6PD mutations as Mediterranean (563C→T), Santamaria (542A→T), Chatham 1003 (G→A), Santiago de Cuba (1339G→ A) and A- (968T→ C) variants were not found (Table 5).

The mutated genotypes of G6PD were more frequent in women, in the brown race and in the M3 subtype, with mucositis and throat infection being the most reported.

Kaplan–Meier estimates of candidemia free survival during follow-up showed a clear increase in risk for of patients with G6PD Mutations (Figure 1), where the prevalence of death in patients with the mutations found was much higher when affected by FI ($p < 0.001$).

DISCUSSION

Several studies have identified risk factors for the development of mainly molds infections in hematological neoplasms, among them: immunosuppressed patients undergoing induction or consolidation chemotherapy with mucositis, prolonged neutropenia and transplanted [7,8,9].

Patients with hematological diseases are part of a group of more than one million people affected worldwide by molds infections, considering that the highest prevalence of cases of infection by aspergillosis and candidiasis were detected in patients with Acute Myeloid Leukemia [10].

Recently, an epidemiological survey at FHEMOAM, between the years 2017 to 2018, detected molds infections in 25 patients and of these, 16% were patients with AML. Sanna et al. (2017) [9] demonstrated a high incidence of molds infections in patients with AML, including invasive infections, where they found significantly, almost 7X more in AML patients concomitantly with the enzyme deficiency of the G6PD enzyme. these same authors emphasized in this same study the fundamental role of G6PD in the response to infections, where it proved that in disabled patients the granulocytic function of neutrophils has a reduced activity of less than 30%.

We believe that this result occurred due to G6PD being in addition to a key enzyme in the pentose-phosphate pathway and supply (of ADPH against oxidative stress. It also promotes responses to the oxidative explosion of neutrophils against aggressive microorganisms such as fungi [11,12] .

Gafter-Gvilli (2017) [13] demonstrated bacterial infections with a 9X higher frequency in those patients with AML concomitantly with G6PD deficiency compared to those with AML and normal activity for G6PD. In addition, these authors also demonstrated a longer hospital stay in patients with G6PD deficiency compared to non-deficient patients.

It is important to note that in the studies mentioned above, only the activity of the enzyme G6PD was performed. In these studies, the minimum value of 10% of activity was considered for the patient to be considered deficient in the enzyme. It should be noted that molecular studies have not been carried out to determine the polymorphism and its variant. In addition, the acute myeloid leukemia subtypes have not been stratified.

In Brazil, our study is a pioneer in describing AML and its subtypes with genotypic variants of the G6PD enzyme and possible molds infections. Although our study did not determine G6PD

enzyme activity, the genotypic variants found could predict its activity and associate it with the patient's clinic.

Unfortunately, in our study it was not possible to define the species of infectious agent that could be directly correlated to the carriers of the G6PD mutations, since not all of them had a specific infection during treatment. However, the mutated genotypes of G6PD 202/376 (Data no Show) at some point had prolonged febrile neutropenia and at least one episode of infection, including fungal, accompanied by mucositis.

This study reported a high frequency of African variants 202 (A-) and 376 (A-) in AML patients in the State of Amazonas among individuals in that region who were brown in color, corroborating the higher prevalence of these variants in most of Brazil (MOURA NETO et al., 2004).

Our study observed that G6PD mutations influenced the risk of developing IF. In particular, G6PD mutations that have enzyme deficiency minor than 60% seems to significantly increase mold infections. Several studies have identified risk factors for developing IF in general leukemias: however, patients with AML were the categories with the highest risk [11, 17].

Our data corroborate with the literature, which demonstrated frequencies close to what was observed and that these are linked to a higher occurrence in patients with AML, mainly during treatment [8].

CONCLUSION

Our study was able to describe Acute Myeloid Leukemia with its subtypes in patients with G6PD polymorphisms and molds infections. The frequency of the -c.202G/A variant was more frequent in women, while c.376A/G in men, with no statistical significance when associated with infections for both genders.

Although a more significant sample number is necessary for possible association, we were able to detect a prevalence of 12.1% of G6PD mutations in patients with AML, with the highest frequency in the M3 subtype and with random infections.

We found the prevalence of death in patients with the mutations found was much higher when affected by molds infections.

Conclusion: We believe that the determination of G6PD polymorphisms will allow the development of monitoring strategies, early diagnosis and appropriate and targeted treatment for AML, as well as evaluating its activity may help to identify AML patients at higher risk for FI, allowing the design of more therapeutic and surveillance strategies.

REFERENCES

1. INCA Instituto Nacional do Câncer (*Homepage na Internet* . Acesso 08 de Outubro de 2018). em Available <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>
2. Hoffbrand, AV, Moss, P.A.H Pettit J.E., *Fundamentos em Hematologia* 6° Edição. Porto Alegre Artmed. 2013.
3. Kampen KR. *The discovery and early understanding of leukemia*. Leukemia Research 2012; 36: 6 – 13.
4. Raimundo Antônio Gomes Oliveira. *Atlas de Hematologia, da morfologia para clínica* 2ª edição 2018 São Paulo.
5. A. MerinoL. Boldú, A. Ermens . *Acute myeloid leukaemia: How to combine multiple tools*. Int J Lab Hem. 2018;40 (Suppl. 1):109–119.
6. Zago, M.A., Passeto, F.R. & Ricardo Pasquini, 2014. *Tratado de Hematologia*, São Paulo 2014.
7. Pagano L., Caira M, Candoni A, Offidoni M, Fianchi L, Martino B, et al. The epidemiology of molds infections in patients with hematologic malignancies. The Seifem - 2004 study. *Haematologia* 2006 Aug; 91 (98): 1068-75.
8. Nucci M, Bijay N., Anaissie E. *Management of infections complications in patients with leukemia*. In: Faderl S, Kantarjian H, editors. *Leukemias: Principles and practice of Therapy*. Oxford: wiley – Black well;2010.
9. Sanna M, Caocci G, and La Nasa G. *How we manage Invasive Fungal Disease in Acute Myeloid Leukemia patients with G6PD*. *Mediterr J.Hematol Infect Dis*. 2017 Aug 14;9(1)e 047.
10. Giacomazzi, Juliana et all. *The burden of serious human molds infections in Brazil*. *Mycoses*, Berlin, v.59.n.3, Mar. 2016. P145-150.
11. Sanna M1, Caocci G1, Ledda A1, Orrù F1, et al. *G6PD deficiency and risk of invasive fungal disease in patients with acute Myeloid Leukemia*. *Jornal leukemia e Linfoma* 2017 Apr 12.1-10. doi:10.10.8028194.2017.1312666.
12. Luzzatto L, Metha A, Vulliamy T. *Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency*. In: *Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (eds.). The metabolic and molecular bases of Inherited disease*. 8. Ed. Columbus: McGraw-Hill, 2001. P. 4517-53.
13. Gafter-Gvili A. G6PD deficiency and molds infections in patients with acute myeloid leukemia: less enzyme more fungus. *Leuk Lymphoma*. 2017 Nov;58(11):2519-2520.

14. Giovelli LL., Dal S.B.,Weber R.,Santin A.P., Castro S.M. *Determination of the accuracy of the measurement method for dehydrogenase glicose-6-fosfato activity*.Rev.bras.hematol.hemoter. 2007; 29(4);378-381.
15. S Russ Rhichardson; Gerald F. O Malley. *Glucose 6 phpsfhate dehydrogenase (G6PD) deficiency*, decembre 8, 2017.
16. Moura Neto, J.P. *Bases Moleculares da Deficiência da desidrogenase da Glicose de 6-Fosfato e sua Associação com Hemoglobiniopatias em Recém-Nascidos e Portadores de Hemoglobinopatias da Cidade de Salvador-BA*, Dissertação(Mestrado) Pág.33. UFBA 2004.
17. Pagano L, Busca A, Candoni A, et al. Risk stratification for invasive molds infections in patients with hematological malignancies: SEIFEM recommendations. *Blood Rev.* 2017;31:17–29.

Table 1: Probes performed on the Real Time PCR technique.

Coding DNA position ^A	Nucleotide Variation (Ref/Alt)	Ref SNP identifier ^B	Minor allele frequency ^C
202	G/A	rs1050828	A= 0.03
376	A/G	rs1050829	G= 0.07
542	A/T	rs5030872	T= 0.01
563	C/T	rs5030868	T= 0.03
968	T/C	rs76723693	C= 0.02
1033	A/G	rs5030869	G= 0.01
1339	G/A	rs137852317	A= 0.01

A: Originally described cDNA positions across different manuscripts focused on G6PD polymorphisms.

B: RefSNP accession ID (rs number): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

C: Brazil minor allele frequency by <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Table 2. Socio-demographic Characteristics of Patients with Diagnosis of Leukemia from FHEMOAM.

Patients Data		Male 91 (58%)	Female 66 (42%)	Total 157 (100%)
Age (Means \pm SD)		38.08 \pm 24.01	40.86 \pm 23.14	39.25 \pm 23.64
Race	Brown	84 (92.31)	57 (86.2)	141 (89.81)
	White	07 (7.69)	09 (13.8)	16 (10.19)
Schooling	FI	48 (52.75)	22 (33.34)	70 (44.59)
	FC	19 (20.88)	10 (15.16)	29 (18.47)
	MI	06 (6.59)	06 (9.09)	12 (7.64)
	MC	06 (6.59)	19 (28.78)	25 (15.92)
	SI	04 (4.40)	04 (6.06)	08 (5.10)
	G	08 (8.79)	05 (7.57)	13 (8.28)

FI: Incomplete Fundamental
MC: High School

FC: Complete Elementary
SI: Incomplete higher

MI: Incomplete Medium
G: Graduated

Table 3. French-American-British (FAB) classification of acute myeloid leukemia (AML) subtypes and numbers of samples from FHMOAM.

Population		Male n (%)	Female n (%)	Total n (%)
Subtypes	M0	1 (1.09)	1 (1.51)	02 (1.27)
	M1	4 (4.39)	3 (4.54)	07 (4.45)
	M2	14 (15.38)	07 (10.60)	21 (13.37)
	M3	38 (41.75)	25 (37.87)	63 (40.12)
	M4	09 (9.89)	06 (9.09)	15 (9.55)
	M5	18 (19.78)	15 (22.72)	33 (21.02)
	M6	2 (2.19)	0 (0)	02 (1.27)
	M7	2 (2.19)	7 (10.60)	09 (5.73)
	Biphenotypic	3 (3.29)	2 (3.03)	05 (3.18)
Total		91	66	157 (100.0)

M0	Undifferentiated acute myeloblastic
M1	Acute myeloblastic leukemia with minimal maturation
M2	Acute myeloblastic leukemia with maturation
M3	Acute promyelocytic leukemia
M4	Acute myelomonocytic leukemia
M5	Acute monocytic leukemia
M6	Acute erythroid leukemia
M7	Acute megakaryoblastic leukemia

Table 4. Most frequent clinical events reported from leukemia patients from FHEMOAM.

CLINICAL EVENTS		Male	Female	RP	CI (95%)	P value
Fever	No	42	30	1.01	0.76-1.29	0.936 **
	Yes	49	36			
Anemia	No	76	55	0.98	0.69-1.43	0.975 **
	Yes	15	11			
Pancytopenia	No	86	58	0.45	0.13-1.35	0.136 **
	Yes	05	08			
Bruises	No	81	47	0.38	0.32-0.92	0.004 **
	Yes	10	19 ↑			
Cough	No	83	65	5.87	1.21-2.08	0.049 *
	Yes	08 ↑	01			
Vomiting	No	88	57	0.24	0.06-0.83	0.016 *
	Yes	03	09 ↑			
Pain (Arms and Legs)	No	79	52	0.65	0.49-1.19	0.181 **
	Yes	12	14			
Diarrhea	No	87	66	7.69	1.53-2.02	<0.001 *
	Yes	07 ↑	0			
Heart disease	No	91	61	7.57	0.52-0.68	<0.001 *
	Yes	0	05 ↑			

RP: Prevalence Ratio

* Fisher Exact Probability Test

CI: Confidence interval

** Kruskal-Wallis Test

Table 5. Relationship between individuals with African genotypic variants and other variables

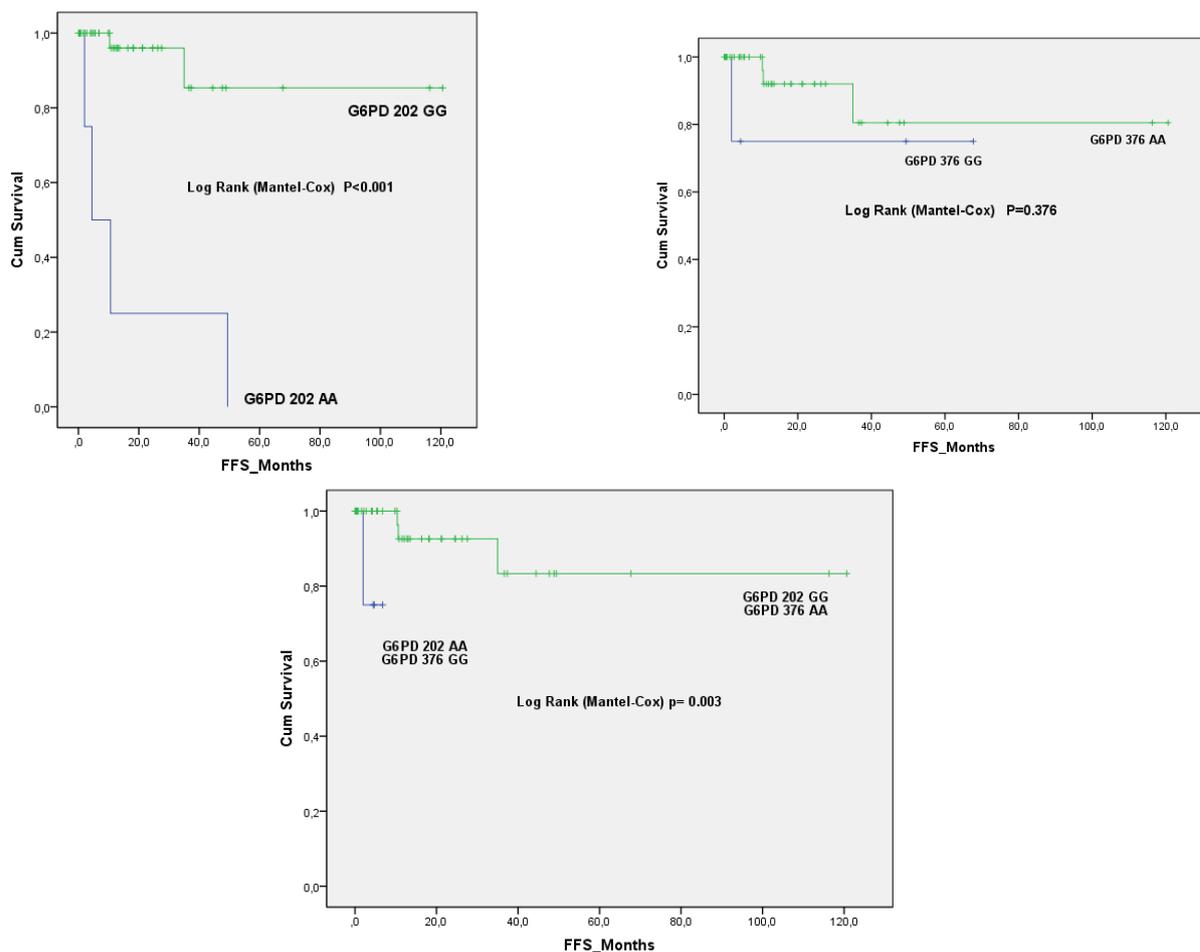
N	Gender / Age	Race	G202A	A376G	AML Subtype	Fungal Infection
1	F /8	Brown	GG	AG	M7	No
2	F /43	Brown	GG	AG	M3	Skin
3	M /24	White	AA	GG	M3	Legs
4	F /45	Brown	GG	AG	M3	No
5	M /18	Brown	GG	GG	M3	Mucositis
6	M /83	Brown	AA	GG	M0	No
7	M /46	Brown	AA	AA	M2	Mucositis
8	F /8	Brown	GG	AG	M5	No
9	F /41	Brown	GG	AG	M3	Mucositis
10	M /2	Brown	AA	GG	M2	Throat
11	F /39	Brown	GA	AG	M1	Skin
12	F /64	Brown	GG	AG	M0	No
13	F /38	Brown	GA	AG	M3	No
14	M /67	Brown	GG	GG	M1	Mucositis
15	F /50	Brown	GG	AG	M3	Mucositis
16	F /12	White	GG	AG	M3	No
17	F /69	Brown	GG	AG	M2	No
18	M / 07	Brown	AA	GG	M2	Mucositis

M: Male

F: Female

N: Patients Number

Figure 1. Fungal-free survival (FFS) in acute myeloid leukemia patients according in two groups of G6PD polymorphisms (G202A / A376G).



G6PD 202: GG – Homozygous Wild-Type AA: Homozygous Mutant

G6PD 376: AA – Homozygous Wild-Type GG: Homozygous Mutant

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A Snapshot of Leukemia _ National Cancer Institute-NIH (Homepage na Internet . Acesso 15 de novembro de 2017). em Availableat:<http://www.cancer.gov/research/progress/snapshots/leukemia>.
- Acharya UH, Halpern AB, Wu QV, Voutsinas JM, Walter RB, Yun S, Kanaan M, Estey EH. *Impact of region of diagnosis, ethnicity, age, and gender on survival in acute myeloidleukemia (AML)*. J Drug Assess. 2018 Jul 10;7(1):51-53.
- Agudelo-Flórez P, Costa-Carvalho BT, López JA, Redher J, Newburger PE, Olalla-Saad ST, Condino-Neto A. *Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and X-linked chronic granulomatous disease in a child with anemia and recurrent infections*. Am J Hematol. 2004 Mar;75(3):151-6.
- Alberts, B. et al. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 191-234
- American Cancer Society(Hompage na Internet . Acesso 10 de Fevereiro de 2020). em Availableat:<http://www.cancer.org>
- Arber DA et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. Blood. 2016 May 19;127(20):2391-405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544. Epub 2016 Apr 11.
- Ardati KD, Bajakion KM, Tabbara KS. *Effect of glucose-6-phosphate dehydrogenasedeficiency on neutrophil function*. Acta Hematol.1997; 97 (4): 211-5.
- Bernard W. Stewart Christopher P. Wild. *World Cancer Report 2014*
- Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. *Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity*. Curr. opin. immunol., Philadelphia, v. 12, pt.1, p. 64-76, 2000.
- Cappellini MD, Sampietro M, Toniolo D, Carandina G, Martinez di Montemuros F, Tavazzi D, Fiorelli G. *G6PD Ferrara I has the same two mutations as G6PD A(-) but a distinct biochemical phenotype*. Hum Genet, 1994 Feb;93(2):139-42.
- Cappellini, M.D. and G. Fiorelli, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Lancet, 2008. 371(9606): p. 64-74.
- Carlos Rômulo Filgueira Maurício, Ranieri Duarte Maia, Sílvia Maria Varela de Queiroz, Maria das Graças Moreira de Araújo, Rosinete Guedes Carvalho de Miranda&Tereza Maria Dantas de Medeiros. *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: prevalence in patients attended in Hospital Universitário Onofre Lopes, Natal – RN*. RBAC, vol. 38(1): 57-59, 2006.
- Carvalho QGS, Pedrosa WA,Sebastião QP. *Leucemia Mielóide aguda, versus ocupação profissional: perfil dos trabalhadores atendidos no centro de hematologia de Recife*. Rev. Esc. Enferm USP 2011;45(6);1446-51.
- Cavalcanti, J.E.T. *Diagnóstico Laboratorial em Hematologia*. 1. Ed. São Paulo; Roca, 2006.
- Cheng ML, Ho HY, Lin HY, Lai YC, Chiu DT. *Effective NET formation in neutrophils from individuals with G6PD Taiwan-Hakka is associated with enhanced NADP(+) biosynthesis*. Sep;47(9):699-709. doi: 10.3109/10715762.2013.816420. Epub 2013 Jul 12
- Colombo AL, de Almeida Júnior JN, Slavin MA, Chen SC, Sorrell TC. *Candida and invasive mould diseases in non-neutropenic critically ill patients and patients with haematological cancer*. Lancet Infect Dis. 2017 Nov;17(11):e344-e356. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30304-3. Epub 2017 Jul 31.

- Compri MB, Saad ST, Ramalho AS. *Genético-epidemiological and molecular investigation of*
- Daniel A. Arber, Attilio Orazi, Robert Hasserjian, Jürgen Thiele, Michael J. Borowitz, Michelle M. Le Beau, Clara D. Bloomfield, Mario Cazzola, and James W. Vardiman. *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. BLOOD, 19 MAY 2016 x VOLUME 127, NUMBER 20.
- Debkrishna Mallick, Rajoo Thapa, Biswajit Biswas. *Co-occurrence of biphenotypic acute leukaemia, glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and haemoglobin E trait in a single child*. MJ Case Rep. 2016.
- Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burett AK et al. *European Leukemia Net, Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net*. Blood. 2010;115:453-74.
- Döhner H, Weisdorf, DJ, Bloomfield, CD. *Acute Myeloid Leukemia*. N Engl. J Med. 2015, 373, 1136-1152. Yuio
- Donnell MR et al. *Acute Myeloid Leukemia version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. J Natl Cancer Netw. 2017 Jul;15(7):926-957. doi: 10.6004/jnccn.2017.0116.
- G6PD (Homepage na internet, acesso em 11 de novembro de 2018) Disponível em: <http://dile.com.br/Teste-molecular-deficiencia-de-6-fosfato-desidrogenase>.
- *G-6-PD deficiency in a Brazilian community*. 2000 Apr-Jun;16(2):335-42.
- Gafter – Gvilli A. *G6PD deficiency and fungal infections in patients with acute myeloid leukemia: less enzyme more fungus*. Leuk Lymphoma. 2017 nov. 58
- Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MA, Denning DW, Colombo AL, Pasqualotto AC. *The burden of serious human fungal infections in Brazil*. Mycoses, Berlin, v.59.n.3, Mar. 2016. P145-150.
- Giovelli LL, Dal SB, Weber R, Santin AP, Castro SM. *Determination of the accuracy of the measurement method for dehydrogenase glucose-6-phosphatase activity*. Rev. bras. hematol. hemoter. 2007; 29(4):378-381.
- Globocan 2018 (Homepage na Internet). Acesso 31 Janeiro de 2020). em Available at: <http://..>
- Hamerschlag N. *Leucemia: Fatores prognósticos e genética*. J. P ediatría (Rio J.) vol.84 no.4 suppl.0 Porto Alegre Aug.2008.
- Hoffbrand, AV, Moss, PA, Pettit JE., *Fundamentos em Hematologia* 6ª Edição. Porto Alegre Artmed.2013.
- Jamornthanyawat N, Awab GR, Tanomsing N, Pukrittayakamee S, Yamin F, Dondorp AM, Day NP, White NJ, Woodrow CJ, Imwong M. *A Population Survey of the Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) 563C>T (Mediterranean) Mutation in Afghanistan*. PLoS One. 2014 Feb 21;9(2):e88605. doi: 10.1371/journal.pone.0088605. eCollection 2014.
- Jennifer N. Saultz & Ramiro Garzon. *Acute Myeloid Leukemia: A concise Review*. Journal of Clinical Medicine 2016.
- José Pereira de Moura Neto, Marcos Vinícius Dourado, Mitermayer Galvão dos Reis, Marilda Souza Gonçalves. *Uma nova variante de G6PD em neonatos brasileiros com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase*. Genet Mol. Biol. vol.31 no.1 São Paulo 2008.
- Kampen KR. *The discovery and early understanding of leukemia*. Leukemia Research 2012; 36: 6 – 13.
- Kasin Omar Ardati, Koharik Minas Bajakian, Khalad Saud Tabbara. *Effect of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on neutrophil function*. Acta Haematol 1997;97:211-215.

- Lago e Petroni, *Fisiopatologia e diagnóstico da leucemia mielóide crônica*. Revista Saúde UniToledo, Araçatuba, SP, v. 01, n. 01, p. 121-133, mar./ago. 2017
- Lichtman MA. *Battling the hemtological malignancies: the 200 years war*. *The Oncologist* 2008; 13: 126 _ 38.
- Luzzatto L, Metha A, VulliamyT. *Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency*. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (eds.). *The metabolic and molecular bases of inhetiteddisease*. 8. Ed. Columbus: McGraw-Hill, 2001. P. 4517-53.
- Manganelli G, Masullo U, Passarelli S, Filosa S. *Glucose-6-fosfato desidrogenase: desvantagens e possíveis benefícios*. *Cardiovasc Hematol Discord Drug Targets* 2013 1 de Março;13(1) 73-82.
- Martin PJ, Counts GW Jr, Appelbaum FR, et al. *Life expectancy in patients surviving morethan 5 years after hematopoietic cell transplantation*. *JournalClinical Oncology*2010;vol.28:1011–1016
- Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz. *G6PD deficiency: the genotype association*. *Blood Rev*. 2007; 21:267-83.
- Merino A, Boldú L, Ermens A. *Int J Lab Hematol*. 2018 May;40 Suppl 1:109-119. doi: 10.1111/ijlh.12831 . *Acute myeloid leukaemia: How to combine multiple tools*. *Int J Lab Hem*. 2018;40 (Suppl. 1):109–119.
- Miranda-FilhoA, PinerosM, Ferlay J, SeorjomataramI, Monnereau A, Bray F. *Epidemiological patterns of leukaemia in 184 Contries: a population-based study*. *The lancet Haemtology*, 5(10, e 14- e 24 doi: 101016/s 2352 3026(17) 30232-6.
- Moraes ES; Mello MSC; Nogueira FAM; Ubirani Barros Otero; Flávia Nascimento de Carvalho. *Análise de indivíduos com leucemia: limitações do sistema de vigilância de câncer*. *Ciência&SaúdeColetiva*, 22(10):3321-3331, 2017.
- Moura Neto, J.P. *Bases Moleculares da Deficiência da desidrogenase da Glicose de 6-Fosfato e sua Associação com Hemoglobiniopatias em Recém-Nascidos e Portadores de Hemoglobinopatias da Cidade de Salvador-BA*, Dissertação(Mestrado) Pág.33. UFBA 2004.
- Nucci M, Bijay N., Anaissie E. *Management of infections complications in patients withleukemia*. In: Faderl S, kantarjian H, editors. *Leukemias: Principles and practice of Therapy*. Oxford: wiley – Black well;2010.
- Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidoni M, Fianchi L, Martino B, et al. *The epidemiology of fungal infections in pacientes with hematologic malignancies*. *The Seifem - 2004 study*. *Haematologia* 2006 Aug; 91 (98): 1068-75.
- Pelloso, Luís Arthur Flores et al. *Cariótipo em leukemiamielóideaguda: importância e tipode alteração em 30 pacientes ao diagnóstico*. *Rev.Assoc.Med.Bras.*, São Paulo, v.49,n.2, June 2003.
- Rahimi Z, Vaisi-Raygani A, Nagel R. L. and Muniz A. 2006. *Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Kurdish population of Western Iran*. *BloodCells Mol. Dis*. 37, 91-94.
- Raimundo Antônio Gomes Oliveira. *Atlas de Hematologia, da morfologia para clínica* 2ª edição 2018 São Paulo.
- Romani L. *Immunit to fungal infections*. *Nat Rev Immunol* 2004;4: 1 – 23.
- S Russ Rhichardson; Gerald F. O Malley. *Glucose 6 phosfhate dehydrogenase (G6PD) deficiency*, dezembro 8, 2017.
- Sanna M, Caocci G, La Nasa G. *How we manage Invasive Fungal Disease in Acute Myeloid Leukemia patientswith G6PD*. *MediterrJ.HematolInfectDis*. 2017 Aug 14;9(1)e 047.
- Sanna M, Caocci G, Ledda A, Orrù F, Fozza C, Deias P, Tidore G, Dore F, La Nasa G. *G6PD deficiency and risk of invasive fungal disease in pacientes with acuteMyeloid Leukemia*. *Jornal leukemia eLynfoma* 2017 Apr 12.1-10. doi:10.10.8028194.2017.1312666.

- Santana MS, Monteiro WM, Siqueira AM, Costa MF, Sampaio V, Lacerda MV, Alecrim MG., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency variants are associated with reduced susceptibility to malaria in the Brazilian Amazon*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2013. 107(5): p. 301-6.
- Siler U, Romao S, Tejera E, Pastukhov O, Kuzmenko E, Valencia RG, Meda Spaccamela V, Belohradsky BH, Speer O, Schmutz M, Kohne E, Hoenig M, Freihorst J, Schulz AS, Reichenbach J. *Severe glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency leads to susceptibility to infection and absent NETosis*. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Jan;139(1):212-219.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2016.04.041.
- Silva, G.C., et al, *Diagnóstico laboratorial das leucemias agudas*, J. Bras. Patol. Med. Lab. Vol. vol.42 no 2 Rio de Janeiro Apr. 2006.
- Stadem PS, Hilgers MV, Bengo D, Cusick SE, Slusher TML. *Markers of oxidative stress in umbilical cord blood from G6PD deficient African newborns*. 2017 Feb 24;12(2):e0172980. doi: 10.1371/journal.pone.0172980 2017.
- Swerdlow, SH; Campo, E; Harris, NL; Jaffe, ES; Pireri, AS; Stein, H; Thiele, J; Vardiman, JW. *WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues*. 4th Revised ed. Lyon: IARC, 586p, 2017.
- Velloso EDRP, Carlos Motta CHAS, Furtado JB, Bacal NS, Silveira PAA, Moyses CB, Sitnik R, Pinho JRR. *Alterações Citogenética e Moleculares em Leucemia Mielóide Aguda: revisão e descrição de casos*. Einstein, Vol. 9(2 Pt 1): p.184-189, 2011.
- Vulliamy TJ, Kaeda JS, Ait-Chata D, et al. *Clinical and haematological consequences of recurrent G6PD mutations and new mutation causing chronic non spherocytichemolytic anemia*. *Br J Haematol*, 101:670-75, 1998.
- Vulliamy TJ, D'ursot G, Battistuzzi M, Estrada N S, Foulkes G, Martini V, Calabro V, Poggi R, Giordanot M, Town I, Luzzatto, and Persico MG. *Genetics Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia (enzymopathy/genetic variants/human genetics/cloning of mutants)*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 85, pp. 5171-5175, July 1988.
- W. Ladines – Castro, G. Barragan-Ibanêz, M.A. Luna-Péres, Santoy-Sanchez, J. Collazo-Jalona, E. Mendoza-Garcia, C.O. Ramos-Penafiel. *Morphology of leukemias*. Review article 2015.
- Wang J, Matsuoka H, Hirai M, Mu L, Yang L, Luo E. *The first case of a class I glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, G6PD Santiago de Cuba (1339 G > A), in a Chinese population as found in a survey for G6PD deficiency in northeastern and central China*. *Acta Med Okayama*, 2010 Feb;64(1): 49-54.
- WHO working group, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*, *Bull World Health Organ* 67, 1989, p. 601 – 11.
- www.uicc.org/news/new-global-cancer-data-globocan-2018.
- Zago MA, Passeto FR. & Ricardo Pasquini, 2014. *Tratado de Hematologia*, São Paulo 2014.
- Zoltán Spolarics; Muhammad Siddiqi; John H. Siegel; Zenaida C. Garcia; Dana S. Stein; Hortencia Ong; David H. Livingston; Thomas Denny; Edwin A. Deitch. *Increased incidence of sepsis and altered monocyte functions in severely injured type A– glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient African American trauma patients*. *Critical Care Medicine* . 29(4): 728-736, APR 2001.

6. ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DEFICIÊNCIA DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE E INFECÇÕES FÚNGICAS EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA**”.

Estamos realizando uma pesquisa com a finalidade de detectar a deficiência de uma enzima necessária para o organismo e sua relação com infecção fúngica em pacientes com neoplasia hematológica. O objetivo deste estudo além de avaliar a atividade da enzima é de obter melhorias no tratamento desta doença com diagnóstico precoce, além de um acompanhamento mais apropriado aos pacientes, proporcionando desta forma uma melhor qualidade de vida aos mesmos.

É de grande importância que você entenda os princípios gerais que se seguem e que serão aplicados a todos os participantes do nosso estudo:

- A) Sua participação é totalmente voluntária;
- B) Você poderá interromper sua participação antes ou em qualquer momento do estudo. Sua recusa em participar não envolverá punições ou perda de seus direitos constituídos;
- C) Depois de lidas as explicações, você pode fazer qualquer pergunta necessária ao seu entendimento.

EXPLICAÇÃO BREVE SOBRE O PROJETO

Se você quiser participar, será colhida uma amostra de sangue da veia do braço (mais ou menos uma colher de chá) com seringa e agulha. Durante a coleta de sangue você poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da picada após a coleta. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal bastante treinado e habilitado.

As amostras de sangue serão utilizadas para a realização de um exame para diagnosticar a deficiência da enzima desidrogenase glicose-6-fosfato e você terá acesso total aos resultados, sendo estes enviados para o seu endereço pelos correios ou e-mail se preferir. O tempo previsto para a realização do nosso estudo será de aproximadamente um ano(01) e seis(06) meses. Se o resultado for positivo, talvez seja necessária uma nova coleta de sangue para confirmar o resultado. Se o seu exame for confirmado como positivo você será orientado e convidado para o acompanhamento pelo sistema de saúde local.

BENEFÍCIOS

No estado do Amazonas ainda não há um estudo sobre a deficiência da enzima desidrogenase glicose-6-fosfato conhecida como G6PD e sua possível associação com infecção fúngica em pacientes com neoplasias hematológicas. Um benefício de sua participação neste estudo é a contribuição para o conhecimento científico na área da saúde. Além disso, você poderá se beneficiar do diagnóstico, do aconselhamento e orientação sobre a deficiência desta enzima relacionada com infecções fúngicas, mesmo não possuindo a deficiência. Com isso, o acompanhamento para você e os demais pacientes será de muita importância para um melhor tratamento, uma vez que possibilitará a realização do acompanhamento clínico, laboratorial e aconselhamento adequado sobre a doença.

Polegar
Direito ou
Rubrica

Rubricas

COMPROMISSO COM A CONFIDENCIALIDADE DA IDENTIDADE DO VOLUNTÁRIO

Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo você tem garantia de que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos. Os registros da sua participação no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento dos participantes do projeto e do médico que o acompanha.

ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

O material coletado (amostra de sangue) será armazenado por até 10 anos somente se o Sr(a) autorizar. Sua amostra poderá ser utilizada em estudos posteriores desde que autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Amazonas ou, caso necessário, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e pelo responsável por esta pesquisa atual.

Por isso, pedimos que o Sr(a) se manifeste abaixo sobre o armazenamento e uso da sua amostra de sangue em estudos posteriores.

- Não, a minha amostra não deverá ser armazenada.
- Sim, concordo que a minha amostra seja armazenada e utilizada em estudos posteriores. Se concordar com o armazenamento da amostra de sangue, pedimos que se manifeste abaixo sobre a necessidade de ser consultado para cada nova pesquisa com a sua amostra e seus dados:
 - Não quero ser consultado, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.
 - Sim, exijo ser consultado para autorizar o uso de minha amostra no novo projeto de pesquisa.

Também em caso de concordar com o armazenamento da sua amostra de sangue, e não exigir ser consultado em estudos posteriores, é possível ainda que sua identidade seja desvinculada dos seus dados e da amostra de sangue, sendo substituídos por códigos, o que aumentaria a segurança de seu anonimato. Porém, a decisão de desvincular a sua identidade da amostra significa que em todos os estudos posteriores onde a sua amostra será utilizada não será possível relacionar os resultados à sua pessoa e assim o Sr (a) não teria os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa. Assim, pedimos que se manifeste sobre a desvinculação de sua identidade da amostra de sangue e dados:

- Não, a minha identidade não pode ser desvinculada da amostra e dados
- Sim, concordo que minha identidade seja desvinculada da amostra e dados, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

A pesquisadora responsável por este estudo, Noeme Henriques Freitas, está à sua disposição e com ela você pode esclarecer qualquer dúvida que surja sobre o referido estudo, mantendo contato pessoal, na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas no endereço: Avenida Constantino Nery, 4397 Chapada – Manaus Amazonas; (92)3655 -0100; hemoam@hemoam.am.gov.br pelo telefone (92) 981078871, e-mail: noemefreitas1@gmail.com.

Também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Amazonas (CEPUEA) Av. Djalma Batista, Flores; Fone: 3578, CEP: 69050-010. cep.uea.edu.br. Manaus-AM. Você receberá uma cópia deste TCLE, que será assinada pela pesquisadora e pelo Sr(a) em todas as páginas.

<p>Polegar</p> <p>Direito ou</p> <p>Rubrica</p>

<p>Rubricas</p>

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos.

Dr. José Pereira de Moura Neto - Coordenador do projeto - Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular - UFAM - Contato: (92) 3305-5000 – (92) 98187-0920

Dr. Sérgio Roberto Lopes Albuquerque – Coordenador do projeto – Laboratório de Imunohematologia na Fundação Hemoam, endereço: Av. Constantino Nery, 397, Chapada 69050-002 – Manaus, A. Contato (92)3655 – 0100 – (92) 99176-9493.

Noeme Henriques Freitas - Farmacêutica Bioquímica – Pesquisadora na Fundação Hemoam endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Chapada – 69050-002 – Manaus, AM. Contato:(92)3655-0100) -(92) 981078871

Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte ao investigador antes de assinar.

Eu _____ aceito participar da pesquisa **“ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE DEFICIÊNCIA DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE E INFECÇÕES FÚNGICAS EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOÍDE AGUDA”**. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Li este termo de assentimento e concordo em participar da pesquisa. Assinei duas vias, uma que vai ficar comigo e outra que será guardada pelo pesquisador.

Local, Data (dia/mês/ano)

Assinatura do participante do Estudo

Assinatura do pesquisador(a)

Nome do Coordenador da pesquisa: **José Pereira de Moura Neto**

Impressão Datiloscópica:

<p>Polegar</p> <p>Direito ou</p> <p>Rubrica</p>

Assinatura do Coordenador da pesquisa

TERMO DE ASSENTIMENTO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE DEFICIÊNCIA DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE E INFECÇÕES FÚNGICAS EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA”**.

PRIMEIRAMENTE GOSTARIA DE ESCLARECER QUE SEUS PAIS JÁ PERMITIRAM QUE VOCÊ PARTICIPASSE DO NOSSO ESTUDO.

Estamos realizando uma pesquisa para conhecermos melhor a deficiência de uma enzima conhecida como glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) nos pacientes com neoplasia hematológica e infecções fúngicas. O objetivo deste estudo é fornecer o diagnóstico da deficiência desta enzima em pacientes com neoplasia hematológica e possível associação com infecções fúngicas bem com as suas características clínicas, melhorando o tratamento desses pacientes, proporcionando uma melhor qualidade de vida aos mesmos.

É de grande importância que você entenda os princípios gerais que se seguem e que serão aplicados a todos os participantes do nosso estudo:

- A) Sua participação é totalmente voluntária;
- B) Você poderá interromper sua participação antes ou em qualquer momento do estudo. Sua recusa em participar não envolverá punições ou perda de seus direitos constituídos;
- C) Depois de lidas as explicações, você pode fazer qualquer pergunta necessária ao seu entendimento.

EXPLICAÇÃO BREVE SOBRE O PROJETO

As crianças que irão participar dessa pesquisa têm de 2 a 17 anos de idade. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir.

Se você quiser participar, será colhida uma amostra de sangue da veia do braço (mais ou menos uma colher de chá) com seringa e agulha. O objetivo deste estudo é de avaliar a atividade da enzima G6PD e obter melhorias no tratamento desta doença com diagnóstico precoce e um acompanhamento mais apropriado aos pacientes, proporcionando desta forma uma melhor qualidade de vida aos mesmos.

Durante a coleta de sangue você poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da picada da agulha após a coleta. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal bastante treinado e habilitado.

As amostras de sangue serão utilizadas para a realização de um exame para diagnosticar a deficiência de uma enzima e você terá acesso total aos resultados, sendo estes enviados para o seu endereço pelos correios. Se o resultado for positivo, talvez seja necessária uma nova coleta de sangue para confirmar o resultado.

O sangue será coletado através da utilização de materiais novos, estéreis e descartáveis, por pessoal habilitado e especializado. As amostras para análise molecular serão retiradas das mesmas amostras coletadas para o diagnóstico, sem a necessidade de coletas extras. O resultado do exame será informado aos seus pais tão logo esteja disponível.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der.

Os resultados da pesquisa serão publicados e também fornecidos as autoridades de saúde da sua cidade e seu estado, mas sem identificar as crianças que participaram da pesquisa.

<p>Polegar Direito ou Rubrica</p>

<p>Rubricas</p>

BENEFÍCIOS

No estado do Amazonas ainda não há um estudo sobre a deficiência da enzima conhecida como G6PD e sua relação com infecção fúngica em pacientes com neoplasias hematológicas. Um benefício de sua participação neste estudo é a contribuição para o conhecimento científico na área da saúde. Além disso, você poderá se beneficiar do diagnóstico, do aconselhamento e orientação sobre a deficiência desta enzima relacionada com infecções fúngicas, mesmo não possuindo a deficiência. Com isso, o acompanhamento para você e as demais pessoas será de muita importância para um melhor tratamento, uma vez que possibilitará a realização do acompanhamento clínico, laboratorial e aconselhamento adequado sobre a doença.

COMPROMISSO COM A CONFIDENCIALIDADE DA IDENTIDADE DO VOLUNTÁRIO

Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo você tem garantia de que este estudo está sendo realizado sobrigorosos princípios científicos e éticos. Os registros da sua participação no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento dos participantes do projeto e do médico que o acompanha.

ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

O material coletado (amostra de sangue) será armazenado por até 10 anos somente se você e seu responsável legal autorizar. Sua amostra poderá ser utilizada em estudos posteriores desde que autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas ou, caso necessário, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e pelo responsável por esta pesquisa atual.

Por isso, pedimos que você e seu responsável legal se manifestem abaixo sobre o armazenamento e uso da sua amostra de sangue em estudos posteriores.

- Não, a minha amostra não deverá ser armazenada.
- Sim, concordo que a minha amostra seja armazenada e utilizada em estudos posteriores. Se concordar com o armazenamento da amostra de sangue, pedimos que se manifeste abaixo sobre a necessidade de ser consultado(a) para cada nova pesquisa com a sua amostra e seus dados:
 - Não quero ser consultado, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.
 - Sim, exijo ser consultado para autorizar o uso de minha amostra no novo projeto de pesquisa.

Também em caso de concordar com o armazenamento da sua amostra de sangue, e não exigir ser consultado em estudos posteriores é possível ainda que sua identidade seja desvinculada dos seus dados e da amostra de sangue, sendo substituído por códigos, o que aumentaria a segurança de seu anonimato. Porém, a decisão de desvincular a sua identidade da amostra significa que em todos os estudos posteriores onde a sua amostra será utilizada não será possível relacionar os resultados à sua pessoa e assim você não teria os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa. Assim, pedimos que se manifeste sobre a desvinculação de sua identidade da amostra de sangue e dados:

- Não, a minha identidade não pode ser desvinculada da amostra e dados
- Sim, concordo que minha identidade seja desvinculada da amostra e dados, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

<p>Polegar Direito ou Rubrica</p>

<p>Rubricas</p>

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos.

Dr. José Pereira de Moura Neto - Coordenador do projeto - Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular - UFAM - Contato: (92) 3305-000 – (92) 98187-0920

Dr. Sérgio Roberto Lopes Albuquerque – Coordenador do projeto – Laboratório de Imunohematologia na Fundação Hemoam, endereço: Av. Constantino Nery, 397, Chapada 69050-002 – Manaus, A. Contato (92) 3655 – 0100 – (92) 99176-9493.

Noeme Henriques Freitas - Farmacêutica Bioquímica – Pesquisadora na Fundação Hemoam endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Chapada – 69050-002 – Manaus, AM. Contato:(92)3655-0100) - (92) 981078871

Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte ao investigador antes de assinar.

Eu _____ aceito participar da pesquisa “**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DENTRE DEFICIÊNCIA G6PD E INFECÇÕES FÚNGICAS EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA**”.Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Li este termo de assentimento e concordo em participar da pesquisa Assinei duas vias, uma que vai ficar comigo e outra que será guardada pelo pesquisador.

Local, Data (dia/mês/ano)

Assinatura do menor

Assinatura do pesquisador(a)

Impressão Datiloscópica:

<p>Polegar</p> <p>Direito ou</p> <p>Rubrica</p>

<p>Rubricas</p>

Nome do Coordenador da pesquisa: **José Pereira de Moura Neto**

Assinatura do Coordenador da pesquisa:

QUESTIONÁRIO

Todos os dados obtidos desde questionário serão confidenciais

PROJETO DE PESQUISA TÍTULO: ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE DEFICIÊNCIA DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE E INFECÇÕES FÚNGICAS EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA.

Dados demográficos

- Número (Registro HEMOAM): _____
- Nome do paciente: _____
- Número do prontuário: _____
- Idade: _____ Sexo: _____
- Data de nascimento: ___/___/___
- Escolaridade: _____
- Ocupação: _____

Dados clínicos

- Data do diagnóstico: _____
- Primeira manifestação clínica: _____
- Local do diagnóstico: _____
- Malformações arteriovenosas (AVM):
 - Pulmões: Sim Não Caracterização: _____
 - SNC: Sim Não Caracterização: _____
 - Fígado: Sim Não Caracterização: _____
 - Outros: Sim Não Caracterização: _____
- Comprometimento funcional ou complicações Sim Não Caracterização: _____

- História Clínica ou Infecção
 - Idade de início: _____
 - Frequência estimada nos últimos 3 anos: _____
 - Necessidade de atendimento de emergência: Sim Não
 - Tipos de procedimentos invasivos na emergência: _____

 - Necessidade de transfusão de sangue na emergência: Sim Não
 - Numero estimado de concentrados de hemácias: _____
 - Uso de medicamentos: _____

Comorbidades Sim Não Não sabe/sem dados

- Medicamentos em uso regular:

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Correlação entre deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase e infecções fúngicas em pacientes com leucemia mielóide aguda e crônica no Estado do Amazonas.

Pesquisador: NOEME HENRIQUES FREITAS

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 83413718.6.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.700.618

Apresentação do Projeto:

A deficiência da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é uma desordem genética que afeta aproximadamente 400 milhões de pessoas no mundo, atinge especialmente as regiões do mediterrâneo, africanas e asiáticas. Cerca de 75% da população carrega um ou mais gene dessa condição, sendo considerada um problema de saúde global. (Giovelli LL et al., 2007).

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) faz parte da via do fosfato de pentose, e seu principal papel fisiológico é fornecer NADPH. A deficiência da G6PD, uma das anormalidades enzimáticas hereditárias mais comuns em seres humanos, surge através de uma das muitas mutações possíveis, a maioria dos quais reduz a estabilidade da enzima e seu nível como idade das células vermelhas (Luzzato L et al. 2016) As pessoas deficientes da G6PD são principalmente assintomáticas, mas podem desenvolver icterícia grave durante o período neonatal e anemia hemolítica aguda quando ingerem alimentos como feijão fava, quando estão expostas a certas drogas ou em casos de infecções incluindo as fúngicas. (Luzzato L et al. 2016).

No Brasil as infecções fúngicas são predominantes e varia de acordo com a condição sócio econômica, regional, cultural e em indivíduos em condições de risco como pacientes imunodeprimidos, transplantados e pacientes com câncer, sendo considerado casos de infecção por aspergillosis em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda (Giacomazzi et al. 2016).

As leucemias mielóide aguda (AML) e crônica (CML) são consideradas malignidades hematológicas

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bl. A, Sala do CEP-HEMOAM
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cephemam@gmail.com

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 3.700.618

heterogêneas, caracterizadas pela expansão clonal de explosões mielóides no sangue periférico, medula óssea e ou outros tecidos, são as formas mais comuns de leucemia aguda e crônica entre adultos, e responsáveis pelo maior número de mortes anuais de leucemias nos Estados Unidos.(O Donell MR et al. 2017).

As doenças causadas por fungos ainda são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) e (LMC). A glicose -6-fosfato desidrogenase é uma enzima que leva à produção de NADPH, necessária para destruir microorganismos na reação do estímulo respiratório de glóbulos brancos. A avaliação da atividade da G6PD pode ajudar a identificar pacientes com LMA e LMC com maior risco de doenças invasivas por fungos (Sanna M. et al. 2017).

Diante do exposto, considera-se importante realizar um estudo, de modo a investigar a deficiência da G6PD em pacientes com LMA e LMC e sua correlação com infecções fúngicas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral:

- Correlacionar a deficiência da G6PD em pacientes com LMA e LMC que apresentarem infecções fúngicas

Objetivos específicos:

- Traçar estratégias de vigilância nos pacientes com deficiência da G6PD;
- Contribuir com a clínica e terapêutica desses pacientes;
- Desenvolver estratégias de tratamento e diagnóstico para pacientes futuros na própria Fundação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sobre os riscos os pesquisadores declaram que "Os possíveis riscos serão esclarecidos da seguinte forma ao participante da pesquisa ou representante legal no caso de menores de 18 anos: Durante a coleta de sangue o senhor (a) poderá sentir dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da picada, após a coleta. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por profissional treinado com materiais estéreis e descartáveis. As amostras de sangue serão utilizadas para a realização de exames para determinar marcadores hematológicos, bioquímicos e moleculares e o senhor(a) terá acesso total aos resultados. Todos os resultados dos exames serão entregues ao médico responsável e sua equipe, também serão anexados ao prontuário médico de cada paciente. Nos exames positivos para algum marcador molecular, talvez seja necessário uma nova coleta de sangue para confirmar os resultados. As amostras coletadas serão retiradas das mesmas amostras coletadas para os exames de rotina realizado na Fundação

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bl. A, Sala do CEP-HEMOAM
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cephemoam@gmail.com

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 3.700.618

Hemoam. Ressalta-se que o trabalho será desenvolvido sob os critérios da Regulação CNS 466, de 12/10/2012 que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras adotadas nas pesquisas que envolvem seres humanos, atendendo às exigências éticas e científicas fundamentais, onde se refere a eticidade, no Termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes e a proteção a grupos vulneráveis e aos legalmente incapazes. Com ponderação entre riscos e benefícios, tanto atuais como potenciais, individuais ou coletivos, com o máximo de benefícios e o mínimo de danos e riscos. Também a garantia de que danos previsíveis serão evitados. Outro aspecto importante é quanto à relevância social da pesquisa e minimização do ônus para os sujeitos vulneráveis, o que garante a igual consideração dos interesses envolvidos, não perdendo o sentido de sua destinação sócio-humanitária. Vale ressaltar que a equipe de trabalho já possui larga experiência no desenvolvimento de técnicas que serão utilizadas, principalmente àquelas relacionadas à biossegurança na coleta, armazenamento, análises laboratoriais e moleculares, minimizando possíveis problemas e limitações que possam vir a ocorrer".

Em relação aos benefícios, relatam que "Sua participação neste estudo terá como benefício à contribuição para o conhecimento científico na área da saúde. O senhor(a) poderá se beneficiar do diagnóstico, do aconselhamento e orientação sobre sua doença. Pouco ainda se sabe sobre esse tipo de alteração genética, portanto o aconselhamento para o senhor(a) e as demais pessoas será de muita importância para um melhor acompanhamento e tratamento direcionado, uma vez que possibilitará a realização do acompanhamento clínico e laboratorial adequado. Após o diagnóstico da probabilidade da doença, o tratamento correto com monitoramento e prevenção são fundamentais. Sua participação no estudo trará benefícios diretos e possibilitará a realização de exames que não são realizados na rotina, trazendo informações importantes referentes à doença, proporcionando assim a obtenção de dados que poderão ser utilizados futuramente no acompanhamento de outros pacientes, na busca de novos tratamentos e no conhecimento do perfil genético dos pacientes atendido".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- Tipo de Estudo: Trata-se de um estudo de corte transversal observacional de investigação clínica e laboratorial, com detecção de casos de pacientes com LMA e LMC apresentando deficiência de G6PD e sua correlação com infecções fúngicas da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas na cidade de Manaus.

- Local de Estudo: O projeto será desenvolvido na dependência da Fundação Hospitalar de

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bl. A, Sala do CEP-HEMOAM
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cephemoam@gmail.com

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 3.700.618

Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, selecionada pela facilidade de recrutamento no período de um ano para coleta de dados. E no laboratório de biologia molecular da faculdade de ciências farmacêuticas da UFAM.

- Critérios de inclusão: Serão incluídos todos pacientes homens, mulheres e crianças, com diagnóstico de Leucemia Mielóide Aguda e Crônica, e que aceitem participar da pesquisa (por meio de assinatura do Termo de consentimento Livre e esclarecido), e no caso de menores o termo de assentimento assinado por responsável legal.

- Critérios de exclusão: Pacientes sem o diagnóstico de LMA e LMC e aqueles com episódios agudos de anemia hemolítica. Amostras coaguladas ou mal conservadas.

- Coleta de dados: Mediante os critérios de inclusão, a coleta consiste na aplicação de formulário com questões sócio-demográficas, clínicas e epidemiológicas.

Coleta de Amostras Biológicas: A coleta de sangue que será feita por punção venosa com tubo primário (tampa roxa) contendo EDTA, sendo coletado pela própria pesquisadora graduada em farmácia-bioquímica e/ou por equipe de saúde capacitada da própria fundação. No total, será coletado sangue no volume de 2 a 5ml

- Genotipagem: Será qualitativo por análise molecular para investigação do tipo de mutações e suas variantes por PCR Alelo Específico, é um método rápido para determinar frequências de alelos de deficiência de G6PD sendo realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas. E o Quantitativo Enzimático Colorimétrico para quantificação da atividade da G6PD com normatização da hemoglobina. É um método capaz de detectar a deficiência de G6PD, demonstrando de forma satisfatória o grau de deficiência em indivíduos que possuem mutações que causam deficiência enzimática menos severa, inclusive em mulheres heterozigotas, este último realizado no Laboratório de Bioquímica da Fundação Hemoam.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1. Folha de Rosto: Anexado na PB - Adequado e presente na PB
2. Carta de Anuência dos Setores - Adequado e presente na PB
3. Carta de Anuência da Instituição Proponente: Adequado e presente na PB

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bl. A, Sala do CEP-HEMOAM
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cspheoam@gmail.com

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 3.700.618

4. Carta de Anuência da Instituição Co-participante: Adequado e presente na PB
5. Carta de Anuência dos Pesquisadores envolvidos no projeto de pesquisa: Adequado
6. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE): Anexado na PB (Adequado)
7. Termo de Assentimento: Anexado na PB (Adequado)
8. Instrumento da pesquisa (Questionário): Anexado na PB
9. Riscos: Adequado
10. Benefícios: Adequado
11. Currículo Lattes: Link e cópia dos pesquisadores anexos na PB (Adequado)
12. Critérios de Inclusão e Exclusão: Adequado
13. Número de pacientes a serem incluídos: Adequado, amostra de conveniência.

Recomendações:

Sem recomendações. Emenda aceita, com a inclusão de atividades na Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências. Após leitura da solicitação de emenda proposta pela pesquisadora, o projeto foi considerado adequado, pois o pedido feito na emenda é apenas para a realização das atividades laboratoriais na Universidade Federal do Amazonas (UFAM), atividades essas já contempladas no projeto inicial.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_139544_2_E1.pdf	03/09/2019 18:02:13		Aceito
Parecer Anterior	riscos_beneficios.pdf	16/11/2018 17:32:50	NOEME HENRIQUES	Aceito
Outros	Termo_Anuencia_Sergio_.pdf	30/09/2018 10:26:54	NOEME HENRIQUES	Aceito
Outros	Termo_Anuencia_Sergio_Roberto_Lopes_Albuquerque_.pdf	30/09/2018 10:23:38	NOEME HENRIQUES	Aceito
Outros	Termo_anuencia_Luciane_Mendes.pdf	30/09/2018 10:22:37	NOEME HENRIQUES	Aceito
Outros	Termo_anuencia_Jose_Pereira_M_Neto_.pdf	30/09/2018 10:16:03	NOEME HENRIQUES	Aceito
TCLE / Termos de	Termo_Assentimento_Menor_Noeme.	30/09/2018	NOEME	Aceito

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bl. A, Sala do CEP-HEMOAM
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cephemoam@gmail.com

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 3.700.618

Assentimento / Justificativa de Ausência	pdf	10:13:10	FREITAS	Aceito
Outros	Sergio_Roberto_Lopes_Albuquerque.pdf	30/09/2018 10:09:42	NOEME HENRIQUES	Aceito
Outros	Lucyane_Mendes_Silva.pdf	30/09/2018 09:58:23	NOEME HENRIQUES	Aceito
Outros	Jose_Pereira_de_Moura_Neto.pdf	30/09/2018 09:57:14	NOEME HENRIQUES	Aceito
Outros	Termo.pdf	28/06/2018 23:04:57	NOEME HENRIQUES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	28/06/2018 23:03:26	NOEME HENRIQUES FREITAS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	28/06/2018 22:57:55	NOEME HENRIQUES FREITAS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	23/01/2018 00:53:19	NOEME HENRIQUES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 12 de Novembro de 2019

Assinado por:

Allyson Guimarães da Costa
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bl. A, Sala do CEP-HEMOAM
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cephemam@gmail.com