

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo
desta dissertação será
disponibilizado somente
a partir de 01/03/2020.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Letícia Cardoso Orlandini

**Análise comparativa das frequências alélicas e genotípicas dos
polimorfismos da Glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com
malária vivax e indivíduos não maláricos de áreas endêmicas no Brasil**

São José do Rio Preto

2018

Letícia Cardoso Orlandini

Análise comparativa das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos da Glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com malária vivax e indivíduos não maláricos de áreas endêmicas no Brasil

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, área de concentração Genética e Biologia Evolutiva, junto ao Programa de Pós-Graduação Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto

2018

Orlandini, Leticia Cardoso.

Análise comparativa das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos da Glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com malária vivax e indivíduos não maláricos de áreas endêmicas no Brasil / Leticia Cardoso Orlandini. -- São José do Rio Preto, 2018

85 f. : il.

Orientador: Ricardo Luiz Dantas Machado

Coorientador: Claudia Regina Bonini Domingos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Anemia. 2. Malária - Tratamento. 3. Plasmodium vivax. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 616.936

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Letícia Cardoso Orlandini

**Análise comparativa das frequências alélicas e genotípicas dos
polimorfismos da Glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com
malária vivax e indivíduos não maláricos de áreas endêmicas no Brasil**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, área de concentração Genética e Biologia Evolutiva, junto ao Programa de Pós-Graduação Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado
UFF – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, RJ
Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Andréa Regina de Souza Baptista
UFF – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, RJ

Prof^ª. Dr^ª. Ana Regina Chinelato Fernandes
UNIP - Universidade Paulista, São José do Rio Preto, SP

São José do Rio Preto
01 de Março de 2018

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto, com auxílio do CNPq.

Dedico este trabalho aos meus pais, Jorge e Maria Cláudia, por me permitirem sonhar alto, sempre acreditarem em mim e por me apoiarem incondicionalmente em todos os momentos. E à minha tia-avó, Maria Aparecida Orlandini, estrela da minha vida e eterna saudade, que sempre fez da minha jornada mais leve e hoje não está comigo para celebrar mais uma conquista.

AGRADECIMENTOS

*Primeiramente, à minha família, meus pais **Maria Cláudia Cardoso Orlandini e Jorge Guilherme Orlandini**, que desde o início investiram muito para que eu pudesse estudar em uma das melhores universidades do país, o curso que sempre sonhei e desde sempre me deram apoio incondicional em todos os momentos e em todas as escolhas e caminhos que escolhi percorrer em busca dos meus sonhos! A vocês, meu amor e minha eterna gratidão!*

*Ao meu orientador **Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado** pela confiança e acolhimento em seu grupo de pesquisa, permitindo que eu explorasse um novo mundo científico, bem como pela oportunidade de conhecer novas regiões e realidades, além de todo conhecimento compartilhado. Este estudo me propiciou várias lições de vida e me trouxe sentimento de responsabilidade, como jovem e cientista, na mudança do atual cenário que se encontra o nosso país e a ciência.*

*À minha coorientadora **Prof^ª. Dr^ª. Claudia Regina Bonini Domingos** por ser um exemplo, minha amiga e me acolher desde os meus primeiros anos de PET Biologia. Sou muito grata pela oportunidade que você me abriu em um momento que eu mais me senti infeliz profissionalmente. Mais ainda pela paciência, incentivo, conselhos, experiências gastronômicas e por tudo que você me ensinou e me ensina todos os dias com muito amor e carinho!*

*Aos meus amigos do LHGDH + CEQ por me acompanharem durante essa trajetória, por todo aprendizado e paciência desde que cheguei ao laboratório e até nos últimos dias, em especial à **Patrícia Pereira, Jéssika Okumura, Gabriela Martins, Camila Zucchini, Nayara Chaves e a Letícia Sybuia!** Muito obrigada por serem essas capivarinhas, comprarem minhas ideias mirabolantes e alegrarem meus dias!*

*À minha família e companheiros de casa Riopretense, antigos e atuais: **Julia Audrey de Paula, Guilherme Henrique da Silva, Camila Ortigossa e Lara Bérghamo Silva** pela paciência, longas noites de estudo, bagunças pela casa e todas as alegrias compartilhadas diariamente!*

*Todos os amigos, tanto os de longa data e os que ganhei em Rio Preto, e familiares, que sempre me apoiaram e cuidaram de mim, viram-me crescer e amadurecer, fizeram meus dias mais leves e celebraram comigo minhas conquistas! Em especial, ao meu namorado e companheiro **Yan Okumura**, pela parceria, carinho e compreensão!*

À UNESP/IBILCE por ter sido minha casa nos últimos anos. Tenho muito orgulho de estudar nessa universidade!

À todos professores que me ensinaram, inspiraram e me proporcionaram a melhor formação que eu poderia ter, tanto pessoal quanto profissionalmente, durante a graduação e pós-graduação!

À FAPIZZA, a pizza de amparo à pesquisa, e todos que contribuíram com esta ideia e auxiliaram a financiar grande parte dos reagentes utilizados neste projeto!

E não menos importante, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado (processo:132946/2016-5)!

“De tudo ficaram três coisas...

A certeza de que estamos começando...

A certeza de que é preciso continuar...

*A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...*

Façamos da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro!”

Fernando Sabino

RESUMO

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é uma enzima metabólica e citoplasmática de importante papel na prevenção de danos oxidativos. Nos glóbulos vermelhos sua ausência é prejudicial à célula, devido à falta da maioria das organelas celulares e à sensibilidade ao estresse oxidativo. A deficiência da enzima G6PD (G6PDd) é, em geral, assintomática. Porém, fatores como a utilização da primaquina, de alto potencial hemolítico, no tratamento da malária *vivax*, podem levar o portador da deficiência a uma anemia hemolítica aguda. O gene *G6PD* apresenta vários sítios polimórficos, com cerca de 217 mutações e mais de 400 variantes bioquímicas significativas descritas. As variantes A- e Mediterrânea são encontradas com frequências consideráveis mundialmente, sendo essas variantes caracterizadas por redução considerável na atividade enzimática. No Brasil, devido à ausência de testes de rotina para detecção de G6PDd e a utilização de primaquina como droga principal de combate a malária *vivax*, responsável por cerca de 90% dos casos na região Amazônica Brasileira, faz-se necessário conhecer a frequência de G6PDd A- para implantação de novas estratégias a fim de melhorar a segurança no tratamento e reduzir o número de transfusões sanguíneas. Assim, o estudo avaliou a frequência da variante A- por PCR-RFLP em 476 indivíduos, 200 maláricos e 276 não maláricos, procedentes de áreas endêmicas de malária *vivax* na Região Norte do país. Após as análises, foram encontrados 14 indivíduos com a G6PDd A-, o que corresponde a 2,94% das amostras avaliadas, sendo seis indivíduos do grupo de maláricos e oito indivíduos do grupo controle. Esta frequência se encontra próxima ao que é relatado em outros estudos na região Norte. Porém, não houve diferenças significativas entre a frequência dos genótipos entre os grupos de estudo e entre as regiões avaliadas, de forma que, a associação entre a presença da mutação e as chances da infecção de malária se estabelecer e da doença se desenvolver em cada grupo de estudo e em cada região apresentam resultados divergentes e reforçam a necessidade de maiores investigações. Por fim, o cenário observado neste estudo, ressalta a importância do diagnóstico preciso da G6PDd em populações multiétnicas antes da administração de drogas antimaláricas de elevado potencial hemolítico, a fim de contribuir com a segurança do tratamento e a erradicação da malária na Região endêmica Brasileira.

Palavras-chave: *G6PDd*. Variante A-. *Plasmodium vivax*. Anemia.

ABSTRACT

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is a metabolic and cytoplasmic enzyme of important role in preventing oxidative damage. In red blood cells their absence is detrimental to the cell, due to the lack of most cellular organelles and the sensitivity to oxidative stress. Deficiency of the enzyme G6PD (G6PDd) is generally asymptomatic. However, factors such as the use of primaquine with a high hemolytic potential for treatment of vivax malaria, can lead the person with the deficiency to an acute hemolytic anemia. The G6PD gene has several polymorphic sites, with about 217 mutations and more than 400 significant biochemical variants described. The A- and Mediterranean variants are found with considerable frequencies worldwide, that variants being characterized by a considerable reduction in the enzymatic activity. In Brazil, is necessary to know the frequency of G6PDd A- to implement new strategies to improve treatment safety and reduce the number of blood transfusions, due to the absence of routine tests to detect G6PDd and the use of primaquine as the main drug to combat vivax malaria, responsible for about 90% of the cases in the Brazilian Amazon region. Thus, the frequency of the A-variant was evaluated by PCR-RFLP in 476 individuals, 200 malaria and 276 non malaria, from endemic areas of vivax malaria in the Northern Region of the country. After the analysis, 14 individuals were found with G6PDd A-, which corresponds to 2.94% of the samples evaluated, six of which were individuals from the malaria group and eight from the control group. This frequency is close to what is reported in other studies in the Northern region. However, there were no significant differences between the genotype frequency between the study groups and between the evaluated regions, so the association between the presence of the mutation and the chances of malaria infection was established and the disease developed in each group in each region present divergent results and reinforce the need for further investigation. Finally, the scenario observed in this study underscores the importance of accurate diagnosis of G6PDd in multiethnic populations prior to the administration of antimalarial drugs of high hemolytic potential, in order to contribute to the safety of treatment and eradication of malaria in the Brazilian endemic region.

Keywords: G6PDd. Variant A-. Plasmodium vivax. Anemia.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A produção de NADPH nos eritrócitos acontece pela ação das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e 6-fosfogliconato desidrogenase (6PGD)21
- Figura 2.** Ilustração do Ciclo de vida do parasito da malária26
- Figura 3.** Gel em agarose 3%, ilustrando: 1 – amostra de um indivíduo homozigoto/hemizigoto deficiente para o SNP G202A (AA/A) – fragmentos de 63 e 46 pb; 2 e 3 – amostra de um indivíduo heterozigoto para o SNP G202A (GA) – fragmentos de 109, 63 e 46 pb; e 4 e 5 - mostra de um indivíduo homozigoto/hemizigoto normal para o SNP G202A (GG/G) – fragmento 109 pb não digerido40
- Figura 4.** Gráfico ilustrando a presença de G6PDd A- entre os indivíduos dos grupos com malária e sem malária (controle) avaliados na Região Norte Brasileira40
- Figura 5.** Gráfico ilustrando a presença de G6PDd A- comparada entre os grupos, malária e controle, de cada uma das localidades avaliadas44
- Figura 6.** Gráfico ilustrando a presença de G6PDd A- comparada entre os grupos, somente malária e somente controle, entre cada uma das localidades avaliadas44
- Figura 7.** Gel em agarose 3%, ilustrando: 1 – amostra de um indivíduo homozigoto/hemizigoto normal para o SNP A376G (AA/A) – fragmento de 295 pb não digerido; 2 e 3 – amostra de um indivíduo heterozigoto para o SNP A376G (AG) – fragmentos de 295, 154 e 141 pb45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos grupos de estudo por região	36
Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho dos fragmentos amplificados por cada um durante a reação de PCR e enzima de restrição necessária para reconhecer a mutação	37
Tabela 3. Caracterização do grupo de estudo	39
Tabela 4. Frequência genotípica e alélica da mutação G6PD 202 G>A (rs1050828) nos grupos com malária e sem malária, de acordo com o sexo	41
Tabela 5. Frequência genotípica e alélica da mutação G6PD 202 G>A (rs1050828) encontrada em cada região estudada somando os dois grupos de estudo: malária e controle	42
Tabela 6. Frequência genotípica e alélica da mutação G6PD 202 G>A (rs1050828) em cada grupo, com malária e sem malária, por região estudada	43
Tabela 7. Resumo das análises de Odds ration para cada região, comparando os grupos maláricos e controle em relação a chances de adquirir malária na presença ou ausência da mutação	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6PGD	6-fosfoglicono-lactonase
6PGL	6-fosfogliconato -δ-lactona
ATP	adenosina trifosfato
BEL	Belém
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CoA	coenzima A
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	ácido desoxirribonucleico
Dntp	desoxinucleotídeo trifosfato
DP	desvio padrão
EDTA	ácido etileno diamino tetra-acético
ERRO	espécies reativas de oxigênio
FAD	dinucleotídeo de flavina e adenina
G6P	glicose-6-fosfato
G6PD	glicose-6-fosfato desidrogenase
G6PDd	deficiência de glicose -6-fosfato desidrogenase
GHS	monômero de glutiona reduzido
GPx	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase
GSSH	dímeros de glutaciona
Hb SS	homozigoto para a hemoglobina S (anemia falciforme)
HEMORIO	Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti do Rio de Janeiro

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	intervalo de confiança
IPA	índice parasitário anual
ITB	Itaituba
Kb	kilobase
LHGDH	Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas
MAF	frequência do alelo menos comum (do Inglês: minor allele frequency)
mg/kg	miligramas por quilogramas
NAD	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH	fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
PB	pares de bases
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	odds-ration
PQ	primaquina
PCR	reação em cadeia da polimerase (do Inglês: Polymorphism Chain Reaction)
PCR-RFLP	reação em cadeia da polimerase-polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (do Inglês: Polymorphism Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism)
pH	potencial hidrogênico
PM	Peso molecular
PVL	Porto Velho
q.s.p	quantidade suficiente para
RBR	Rio Branco
RNA	ácido ribonucleico
RPM	rotações por minuto
SOD	superóxido dimutase

SIVEP-Malária	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único (do Inglês: single nucleotide polymorphism)
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEB	tris-EDTA-borato
TQ	Tafenoquina
TRIS	tris (hidroximetil) aminometano
UV	Ultravioleta
WHO	Organização Mundial da Saúde (do Inglês: World Health Organization)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e via das pentoses-fosfato	19
1.2 Epidemiologia da deficiência da enzima G6PD.....	21
1.3 Aspectos genéticos e classificação das principais variantes de G6PD	21
1.4 Malária e G6PD	22
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. METODOLOGIA.....	33
4.1 Aspectos éticos.....	34
4.2 Casuística e áreas de estudo.....	33
4.3 Amostras biológicas.....	35
4.4 Diagnóstico de malária	35
4.5 Extração de DNA por fenol-clorofórmio.....	35
4.6 Análise da variante G6PD A- (G202A /A376G).....	35
4.7 Análise estatística	36
5. RESULTADOS.....	38
5.1 Caracterização dos grupos de estudo	38
5.2 Frequências alélica e genotípica da mutação G6PD 202 G>A (rs1050828)	38
5.3 Frequências alélica e genotípica da mutação G6PD 376 A>G (rs1050829).....	44
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÃO	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
9. ANEXOS.....	61

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e via das pentoses-fosfato

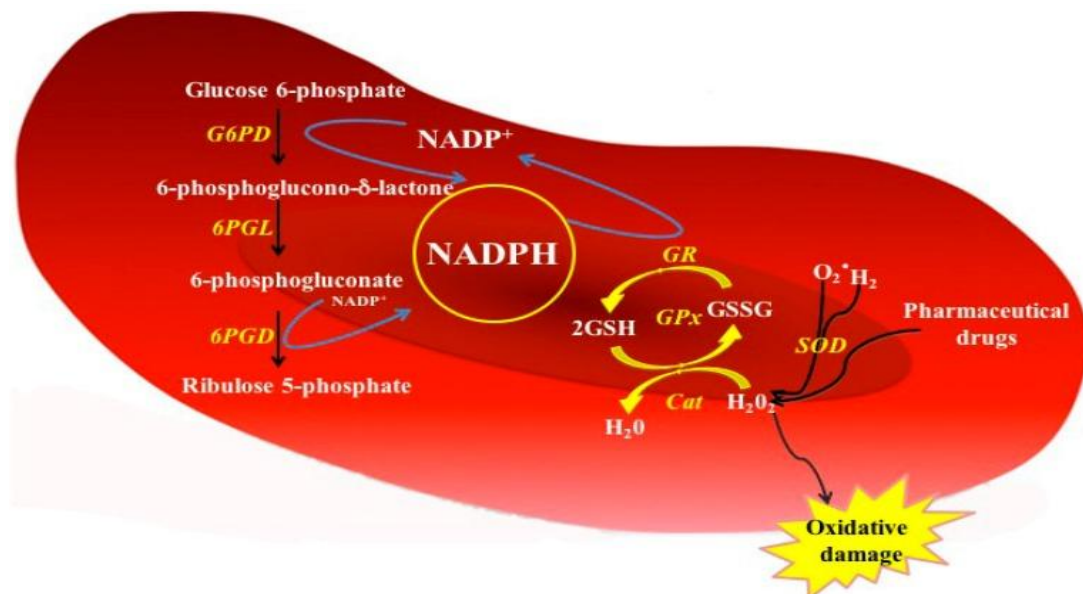
A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é uma enzima metabólica e citoplasmática que desempenha importante papel na prevenção de danos oxidativos nas células por meio de detoxificação de radicais livres (VALENCIA et al., 2016). Essa enzima catalisa o primeiro passo da via das pentoses fosfato que, por meio de uma série de reações, converte a glicose-6-fosfato (G6P) à ribose-5-fosfato (Figura 1), precursora de moléculas importantes como ácido ribonucleico (RNA), ácido desoxirribonucleico (DNA), adenosina trifosfato (ATP), coenzima A (CoA), dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD), dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) (TRIPATHY; REDDY, 2007).

Nos eritrócitos, devido à ausência da maioria das organelas celulares e à sensibilidade ao estresse oxidativo, a falta da enzima G6PD é prejudicial, pois essa via metabólica é a única fonte doadora de elétron de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), que participa continuamente, em, pelo menos, três caminhos antioxidantes: os ciclos da glutathiona, tioredoxina e glutaredoxina, como ilustra a Figura 1 (GÓMEZ-MANZO et al., 2016; VALENCIA et al., 2016).

No primeiro caminho, o elétron de NADPH passa para os dímeros de glutathiona (GSSG) durante a reação catalisada pela enzima glutathiona redutase que produz dois monômeros de glutathiona reduzidos (GSH), fornecendo a primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, a glutathiona peroxidase (GPX) remove o peróxido dos glóbulos vermelhos usando GSH como substrato, enquanto o NADPH é necessário para reduzir o GSSG oxidado. Dessa forma, os níveis de glutathiona reduzida (GSH) são regulados, o equilíbrio oxidativo dentro das células é assegurado e os eritrócitos são protegidos contra danos induzidos por peróxido de hidrogênio e radicais livres, convertidos em água (GHASHGHAIEINIA et al., 2016; GÓMEZ-MANZO et al., 2016).

Em alguns tecidos como fígado, tecido adiposo e glândulas mamárias, o NADPH é o doador de elétrons necessários para muitos processos biossintéticos, incluindo várias reações nas vias de síntese dos ácidos graxos, colesterol e hormônios esteroides, bem como para formação de ribose necessária para a síntese de DNA (LUZZATTO; NANNELLI; NOTARO, 2016).

Figura 1. A produção de NADPH nos eritrócitos acontece pela ação das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e 6-fosfogliconato desidrogenase (6PGD).



Cat = Catalase; GPx = Glutathiona peroxidase; GR = Glutathiona redutase; 6PGL = 6-fosfogliconato desidrogenase; 6PGD = 6-fosfogliconato desidrogenase; SOD = Superóxido dismutase; GSH = Glutathiona reduzida; GSSG = Glutathiona oxidada; H_2O_2 = Peróxido; $O_2^{\cdot-}$ = Superóxido. Fonte: (GOMEZ-MANZO et al., 2016).

1.2 Epidemiologia da deficiência da enzima G6PD

A deficiência de G6PD (G6PDd) é uma condição hereditária polimórfica que ocasiona desequilíbrio redox e se caracteriza como uma das enzimopatias mais prevalentes, afetando cerca de 400 milhões de pessoas em todo o mundo (BOONYUEN et al., 2017).

Em geral, a maioria dos indivíduos afetados são assintomáticos e a deficiência nunca é completa, pois seria fatal (LUZZATTO et al., 2016). No entanto, é observado um amplo espectro de manifestações clínicas, que podem ser desencadeadas por diversos fatores como fármacos e alimentos específicos. Entre os distúrbios observados, destaca-se o favismo (ingestão de feijão de fava), anemia hemolítica, anemia hemolítica não esferocítica crônica, aborto espontâneo e hiperbilirrubinemia neonatal, resultando em encefalopatia crônica por bilirrubina (kernicterus) (BOONYUEN et al., 2017; MASON; BAUTISTA; GILSANZ, 2007).

Atualmente, a G6PDd é encontrada em todo o mundo com diferentes frequências e está amplamente distribuída em países considerados endêmicos para malária, sendo as regiões da África Subsaariana (20%), seguida pelo Sudoeste da Ásia (10-20%), Mediterrâneo (4-30%) e América Latina (<2%), as áreas de maior

prevalência (BUBP; JEN; MATUSZEWSKI, 2015; MONTEIRO et al., 2014; PEIXOTO et al., 2015). No Brasil, devido à escassez de dados, não se conhece as reais frequências da G6PDd, estimando-se que sua prevalência seja menor do que 10% (MONTEIRO et al., 2014; ONDEI et al., 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem classificado a G6PDd em classes de I-V, de acordo com a atividade da enzima nos eritrócitos e suas manifestações clínicas consideradas de risco para eventos hemolíticos: Classe I: deficiência enzimática grave com anemia hemolítica crônica não esferocítica; Classe II: deficiência de enzima grave (<10% da atividade considerada normal – G6PD B); Classe III: deficiência da enzima leve (10-60% do normal); Classe IV: deficiência da enzima leve ou ausente (60-100% do normal); e Classe V: atividade da enzima aumentada (duas vezes mais do que o normal) (WHO, 2015).

1.3 Aspectos genéticos e classificação das principais variantes de G6PD

O gene *G6PD* abrange aproximadamente 18,5 Kb e apresenta 13 éxons, localizadas na região telomérica do cromossomo X (região Xq28), destacando-se como um dos genes mais estudados devido sua associação com a malária, vários tipos de anemia, favismo e outras afecções (MASON; BAUTISTA; GILSANZ, 2007). As mutações que causam deficiência de G6PD, geralmente, são ocasionadas pela substituição de um único aminoácido, as quais podem afetar ambos os sexos, de forma que há apenas dois genótipos possíveis para o sexo masculino: hemizigoto normal ou hemizigoto deficiente; e três genótipos possíveis para o sexo feminino: homozigoto normal, homozigoto deficiente ou heterozigoto, considerando que um cromossomo X é inativado aleatoriamente em cada uma das células dos organismos do sexo feminino como um fenômeno de compensação de dose; sendo o fenótipo deficiente e as manifestações clínicas mais frequentes em indivíduos do sexo masculino (AHN; LEE, 2008; KEMPINSKA-PODHORODECKA et al., 2013; MASON; BAUTISTA; GILSANZ, 2007; PEIXOTO et al., 2015).

O gene *G6PD* apresenta vários sítios polimórficos e cerca de 217 mutações foram descritas, das quais apenas em torno de 10% são estrutural e funcionalmente caracterizadas (GÓMEZ-MANZO et al., 2016). Essas mutações resultam em mais de 400 variantes bioquímicas significativas, sendo a maioria das mutações causadas pela substituição de um único aminoácido (KEMPINSKA-PODHORODECKA et al., 2013; VALENCIA et al., 2016).

As principais variantes do gene G6PD são: B, A+, e A- (KEMPINSKA-PODHORODECKA et al., 2013). A variante B (202G/376A), encontrada mais frequentemente, é utilizada como um padrão para a atividade da enzima normal e para mobilidade eletroforética. As variantes G6PD A- (202A/376G ou G680T, T968C, e C1159T) e G6PD A+ (A376G), de origem Africana, são encontradas com frequência em todo o mundo, estando entre as variantes mais comuns notificadas nas Américas (VALENCIA et al., 2016). A variante A+ pode exibir atividade enzimática normal e até uma deficiência sutil (Classe IV), enquanto que a variante A- (Classe III) apresenta apenas de 8-20% da atividade enzimática normal, sendo de grande importância médica (KEMPINSKA-PODHORODECKA et al., 2013; VALENCIA et al., 2016).

A variante G6PD A- (G202A /A376G) é caracterizada pela troca de uma guanina por uma adenina na posição de nucleotídeo 202, que provoca uma substituição de uma valina por uma metionina na posição de aminoácido 68, em combinação com uma substituição de adenina por guanina no nucleotídeo 376, que alterna uma asparagina por aspartato na posição aminoácido 126 (MONTEIRO et al., 2014).

Outra variante de importância médica é a variante do Mediterrâneo (Classe II), caracterizada por uma alteração na posição 56, trocando citosina para timina (C563T), amplamente encontrada na região do Mediterrâneo, Oriente Médio, Índia e Américas, apresentando menos de 5% de atividade enzimática, considerada grave (HOWES et al., 2013).

1.4 Malária e G6PD

A malária humana é causada por seis espécies de parasitos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e também *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium simium*; estes dois últimos são patógenos naturais de espécies selvagens de macacos no sudeste da Ásia e da Mata Atlântica, respectivamente, apontados como causa significativa da malária zoonótica (BRASIL et al., 2017; MOYES et al., 2014). A malária pelo *P. knowlesi* tem sido descrita com rápida progressão para uma infecção grave, além de casos fatais terem sido relatados (MOYES et al., 2014). No Brasil, somente quatro espécies são notificadas: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium simium* (BRASIL et al., 2017). Nas últimas décadas, de acordo com o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária) (SIVEP-MALÁRIA, 2018), o *P. vivax* tem sido a espécie mais prevalente no país,

responsável por cerca de 90% dos casos, enquanto o *P. falciparum* é responsável por aproximadamente 10%, e o *P. malariae* e os demais raramente detectados (SIVEP-MALÁRIA, 2018). Historicamente, casos clínicos graves por *P. vivax* são raros, no entanto, estudos recentes reforçam a associação dessa espécie com complicações clínicas e casos fatais, sendo este um motivo de preocupação para a saúde pública (ANDRADE et al., 2010; LACERDA; HIPÓLITO; PASSOS, 2008).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mundialmente, o *P. vivax* representa um grande problema para saúde pública e, somente no ano de 2015, foi a causa de 13,8 milhões de casos de malária e pelo número total de óbitos estimado entre 1.400 e 14.900 (WHO, 2015).

O Brasil é um país de dimensões continentais onde se verificam diferentes aspectos de transmissão de malária em três distintos ambientes: na região Amazônica e na Mata Atlântica (no litoral do país, mais frequente na região Sudeste), ambas com predomínio de casos autóctones e em outras áreas brasileiras com casos importados provenientes de viagem recente aos locais endêmicos de malária no próprio país ou de outros países da Américas Central e do Sul, África e Ásia (DE PINA-COSTA et al., 2014). A região Amazônica, que inclui os Estados Brasileiros do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, concentra a maioria dos casos de malária no país (PEIXOTO et al., 2016). Em 2017, foram notificados mais de 193 mil casos de malária nessa área, dos quais aproximadamente 90% dos casos foram causados por malária *vivax* (SIVEP-MALÁRIA, 2018). Em relação ao sexo, 60% dos casos relatados são em indivíduos do sexo masculino. Ainda segundo o Boletim Epidemiológico do SIVEP-MALÁRIA, comparado a 2016, o número de casos de malária no Brasil aumentou em quase 50%.

O ciclo dos parasitos causadores da malária humana é heteroxênico (seres humanos e fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*) e bastante similar entre as espécies de *Plasmodium* (CDC, 2017). A infecção do hospedeiro humano inicia-se quando a fêmea do mosquito inocula as formas infectantes, os esporozoítos, que entram na corrente sanguínea e atingem o fígado (fase pré-eritrocítica ou hepática). Durante a infecção dos hepatócitos, cada esporozoíto desenvolve-se em dezenas de milhares de merozoítos, que se rompem e são liberados para corrente sanguínea para infecção dos eritrócitos. Nos eritrócitos, o parasito inicia a multiplicação assexuada até o rompimento da célula sendo esta a fase denominada de eritrocítica. Nesta fase, os primeiros sintomas da doença começam a aparecer, tais como febre, calafrio, dor de cabeça e também

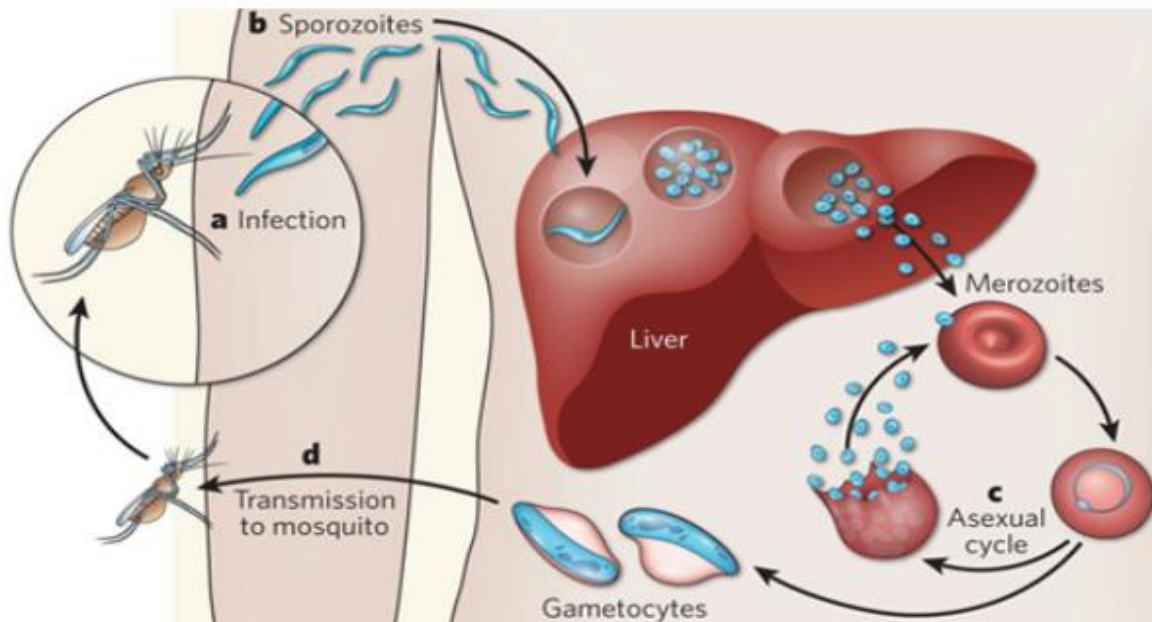
anemia grave. No ciclo de vida do *P. vivax*, os esporozoítos podem dar origem aos hipnozoítos, que permanecem no hepatócito em um estado dormente, desenvolvendo-se meses ou anos mais tarde, sendo responsável pelas recaídas da doença (TUTEJA, 2007). Para completar o ciclo de vida no hospedeiro humano, formas sexuais do parasito, denominadas gametócitos, desenvolvem-se, também dentro dos eritrócitos e, devido ao novo repasto sanguíneo pela fêmea do mosquito, perpetua o ciclo sexual no inseto. No estômago do mosquito, gametócitos se unem e geram zigotos. Os zigotos por sua vez, tornam-se móveis e alongados, denominando-se oocinetos, e invadem a parede do intestino médio do mosquito, onde se desenvolvem em oocistos, que crescem até se romperem e liberam novos esporozoítos, que se concentram nas glândulas salivares do mosquito para inoculação em um novo hospedeiro, reiniciando o ciclo (MILLER et al., 2002) (Figura 2).

O quadro de anemia na malária, complicação mais comumente associada a *P. vivax*, é uma problemática frequente e grave para crianças e mulheres grávidas, pois a etiologia da anemia é complexa e multifatorial em áreas endêmicas. Entre os principais fatores que influenciam neste quadro, podemos destacar a hemólise, atraso no diagnóstico e tratamento da malária, autoimunidade, deficiências nutricionais, inibição da eritropoiese, gravidez, fagocitose dos eritrócitos, infecção concomitante com helmintos intestinais ou Parvovírus B19, bem como desordens genéticas, tais como as hemoglobinopatias e a G6PDd (PRICE et al., 2007; MOURÃO et al., 2013).

Em países considerados endêmicos para malária, como algumas regiões da África Subsaariana, seguida pela Ásia e América Latina, estima-se que 353 milhões de pessoas são afetadas por G6PDd, dos quais 220 milhões são homens (PEIXOTO et al., 2015). Como evidenciado em outros estudos (HOWES et al., 2013; KEMPINSKA-PODHORODECKA et al., 2013), há uma associação direta entre a incidência de malária e frequência de determinadas variantes do gene *G6PD*; como em pacientes com o fenótipo A, nos quais a proteção contra a malária é incompleta assim como a atividade enzimática da G6PD é consideravelmente reduzida, 20% em comparação com o tipo selvagem. Por outro lado, a variante A- está associada a uma diminuição de 50% no risco de desenvolvimento de malária entre mulheres heterozigotas e homens hemizigotos deficientes, o que pode explicar essa associação é o fato de que uma defesa antioxidante prejudicada pode ser o mecanismo que confere resistência em indivíduos G6PDd, o que leva a danos na membrana das células vermelhas e provoca um aumento da eliminação de células infectadas por fagocitose, antes mesmo da

maturação do parasito aos estágios de trofozoíto e esquizontes (MASON; BAUTISTA; GILSANZ, 2007; MONTEIRO et al., 2014; TRIPATHY; REDDY, 2007).

Figura 2. Ilustração resumida do Ciclo de vida do parasito da malária.



Fonte: (MICHALAKIS; RENAUD, 2009).

Segundo o guia prático de tratamento da malária no Brasil do Ministério da Saúde (WHO, 2015), o serviço público de saúde, orientado pelo Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM), é responsável pelo diagnóstico e tratamento da malária no país e o teste de G6PDd não é realizado em sua rotina. Este manual recomenda o uso de primaquina (PQ) para todos os pacientes infectados por *P. vivax*, a fim de eliminar as formas parasitárias teciduais no fígado e para indivíduos infectados com o *P. falciparum* que tenham gametócitos circulantes na corrente sanguínea (HOWES et al., 2013). Sua prescrição não é recomendada para mulheres grávidas e crianças com menos de seis meses de idade devido sua ação teratogênica (VALENCIA et al., 2016; WHO, 2015). Contudo, considerando as propriedades da PQ, a utilização deste fármaco para um indivíduo G6PDd pode resultar em anemia grave, insuficiência renal e morte, como resultado de hemólise intensa, gerando consequente demanda por recursos do sistema público de saúde (PEIXOTO et al., 2015). A gravidade da hemólise depende do grau de deficiência de G6PD, da dose e da duração da exposição a este medicamento, sendo a gravidade da hemólise mais intensa na maioria dos casos de portadores das variantes Mediterrâneo e Africana A- (ASHLEY; RECHT; WHITE, 2014). Na Amazônia Brasileira, estudo avaliando os aspectos clínicos da hemólise em

pacientes infectados com *P. vivax*, observou que a febre e a leucocitose são os principais achados que acompanham o quadro de hemólise. Observaram também que estes pacientes desenvolveram falência renal aguda (RAMOS JUNIOR et al., 2010).

A primaquina, uma 8-aminoquinolina, foi licenciada para uso pela primeira vez na década de 1950 para o tratamento da malária *vivax* e desde então é a única droga disponível capaz de eliminar os hipnozoítos (RAJAPAKSE; RODRIGO; FERNANDO, 2015). O metabolismo da primaquina gera ERO, que rapidamente esgotam a glutatona em eritrócitos deficientes em G6PD, ocasionando danos à hemoglobina e proteínas de membrana, que permite a observação de inclusões chamadas de corpos de Heinz, visualizados no início de um episódio hemolítico induzido pela PQ. Além disso, há evidências de que a hemólise intravascular (hemoglobinúria) e hemólise extravascular (hiperbilirrubinemia) coexistem em todos os casos, pois é provável que os eritrócitos mais gravemente danificados sofram hemólise intravascular, enquanto outros são removidos por macrófagos no baço, assim, dando origem a hemólise extravascular (ASHLEY; RECHT; WHITE, 2014; RUEANGWEERAYUT et al., 2017). Atualmente, em busca de drogas alternativas a PQ, devido ao seu potencial hemolítico e outros efeitos colaterais indesejáveis, tais como metemoglobinemia e distúrbios gastrointestinais, a tafenoquina (TQ), um análogo sintético de PQ, tem sido a opção mais estudada nos últimos anos e tem mostrado resultados promissores tanto para a prevenção como para a cura. A grande vantagem deste fármaco é ser administrado como uma dose única ou em regimes de tratamento muito mais curtos do que a PQ, embora exista um maior risco de hemólise devido à meia-vida prolongada do mesmo (RAJAPAKSE; RODRIGO; FERNANDO, 2015; VIZZI et al., 2016).

Ademais, os testes de triagem para G6PDd disponíveis por cerca de meio século, eram considerados pouco confiáveis e fora da realidade econômica pelos países em que a malária é endêmica. Porém, apenas recentemente, a Organização Mundial da Saúde, autoridades de saúde pública e a indústria de diagnósticos tornaram-se favoráveis a utilização desses testes devido às consequências graves que a deficiência da enzima apresenta aos portadores, e aos valores dos kits de detecção, que podem custar, em um futuro próximo, menos US \$ 1 por teste (LUZZATTO; NANNELLI; NOTARO, 2016).

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Assim, com os resultados obtidos podemos concluir:

- A frequência da variante G6PD A- (G202A /A376G) de 2,94% para área endêmica de malária *vivax* encontra-se próximo ao que é descrito na literatura e em estudos em outras áreas da Região Norte.
- O perfil da G6PDd na Amazônia brasileira não pode ser visto de forma única, visto que a associação entre a presença da mutação e as chances de adquirir malária em cada grupo de estudo e em cada região apresentam resultados divergentes e reforçam a necessidade de maiores investigações.

Por fim, o cenário observado neste estudo, ressalta a importância do diagnóstico preciso da deficiência de G6PDd em populações multiétnicas antes da administração de drogas antimaláricas de elevado potencial hemolítico, a fim de contribuir com a segurança do tratamento e a erradicação da malária na Região endêmica Brasileira.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHAJANI, F. et al. Identification of β -globin haplotypes linked to sickle hemoglobin (Hb S) alleles in Mazandaran province, Iran. **Genes & Genetic Systems**, v. 91, n. 6, p. 311–313, 13 maio 2016.
- AHN, J.; LEE, J. X chromosome: X inactivation. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p.24, 2008.
- ANDRADE, B. B. et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria journal**, v. 9, n. 1, p. 13, 13 jan. 2010.
- ASHLEY, E. A.; RECHT, J.; WHITE, N. J. Primaquine: the risks and the benefits. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 418, 3 nov. 2014.
- AUTON, A. et al. A global reference for human genetic variation. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 68–74, 30 set. 2015.
- BOONYUEN, U. et al. A trade off between catalytic activity and protein stability determines the clinical manifestations of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. **International journal of biological macromolecules**, v. 104, n. Pt A, p. 145–156, nov. 2017.
- BOUANGA, J. C. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and homozygous sickle cell disease in Congo. **Human heredity**, v. 48, n. 4, p. 192–7, [s.d.].
- BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet. Global health**, v. 5, n. 10, p. e1038–e1046, out. 2017.
- BUBP, J.; JEN, M.; MATUSZEWSKI, K. Caring for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD)-Deficient Patients: Implications for Pharmacy. **P & T : a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 40, n. 9, p. 572–4, set. 2015.
- CARDOSO, M. A. et al. Underlying factors associated with anemia in Amazonian children: a population-based, cross-sectional study. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36341, 2012.
- CASSIANO, G. C. et al. Impact of population admixture on the distribution of immune response co-stimulatory genes polymorphisms in a Brazilian population. **Human Immunology**, v. 76, n. 11, p. 836–842, 2015.
- CITTADELLA, R. et al. Genetic heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in south-east Sicily. **Annals of Human Genetics**, v. 61, n. 3, p. 229–234, maio 1997.
- CDC - Malaria Biology. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>. Acesso em 13 de Novembro de 2017.
- CLARK, T. G. et al. Allelic heterogeneity of G6PD deficiency in West Africa and severe malaria susceptibility. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, n. 8, p. 1080–1085, 18 ago. 2009.
- DA SILVA VENTURA, ANA MARIA REVOREDO, FERNANDES, A. et al. Clinical and immunological profiles of anaemia in children and adolescents with *Plasmodium*

vivax malaria in the Para state, Brazilian Amazon. **Acta Tropica**, 2018. No Prelo.

DE PINA-COSTA, A. et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 618–33, ago. 2014.

DOMBROWSKI, J. G. et al. G6PD deficiency alleles in a malaria-endemic region in the Western Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 253, 15 dez. 2017.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 4, p. 850–8, abr. 2007.

GHASHGHAEGINIA, M. et al. Pharmacological targeting of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes by Bay 11-7082, parthenolide and dimethyl fumarate. **Scientific reports**, v. 6, p. 28754, 29 jun. 2016.

GOMES, M. D. S. M. et al. Efficacy in the treatment of malaria by *Plasmodium vivax* in Oiapoque, Brazil, on the border with French Guiana: the importance of control over external factors. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2015.

GÓMEZ-MANZO, S. et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Update and Analysis of New Mutations around the World. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 12, 9 dez. 2016.

GUEYE TALL, F. et al. Genetic Background of the Sickle Cell Disease Pediatric Population of Dakar, Senegal, and Characterization of a Novel Frameshift β -Thalassemia Mutation [*HBB* : c.265_266del; p.Leu89Glufs*2]. **Hemoglobin**, v. 41, n. 2, p. 89–95, 4 mar. 2017.

HABARA, A.; STEINBERG, M. H. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 241, n. 7, p. 689–96, abr. 2016.

HEMORIO - Manual do Paciente: Anemias Hemolíticas Hereditárias. Disponível em: <http://www.hemorio.rj.gov.br/html/pdf/manuais_2010/anemia_hemolitica_2.pdf> Acesso em: 23 de Fevereiro de 2018.

HOBAN, M. D.; ORKIN, S. H.; BAUER, D. E. Genetic treatment of a molecular disorder: gene therapy approaches to sickle cell disease. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 839–48, 18 fev. 2016.

HOWES, R. E. et al. G6PD Deficiency. In: **Advances in parasitology**. [s.l: s.n.]. v. 81p. 133–201, 2013.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 12 de Fevereiro de 2018.

KEMPINSKA-PODHORODECKA, A. et al. Analysis of the genetic variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase in inhabitants of the 4th Nile cataract region in Sudan. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 50, n. 2, p. 115–118, fev. 2013.

LACERDA, M. V. G. et al. Postmortem Characterization of Patients With Clinical Diagnosis of *Plasmodium vivax* Malaria: To What Extent Does This Parasite Kill?

Clinical Infectious Diseases, v. 55, n. 8, p. e67–e74, 15 out. 2012.

LACERDA, M. V. G. DE; HIPÓLITO, J. R.; PASSOS, L. N. DA M. Chronic *Plasmodium vivax* infection in a patient with splenomegaly and severe thrombocytopenia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 522–3, 2008.

LAHIRI, D. K. et al. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 25, n. 4, p. 193–205, dez. 1992.

LINDENAU, J. D. et al. The effects of old and recent migration waves in the distribution of HBB*S globin gene haplotypes. **Genetics and molecular biology**, v. 39, n. 4, p. 515–523, 2016.

LUZZATTO, L.; NANNELLI, C.; NOTARO, R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 373–393, abr. 2016.

MANGAT, C. et al. Acute haemolytic anaemia and myolysis due to G6PD deficiency. **BMJ case reports**, v. 2014, 18 set. 2014.

MASON, P. J.; BAUTISTA, J. M.; GILSANZ, F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. **Blood reviews**, v. 21, n. 5, p. 267–83, set. 2007.

MILLER, L. H. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673–9, 7 fev. 2002.

MOIZ, B. et al. Frequency of G6PD Mediterranean in individuals with and without malaria in Southern Pakistan. **Malaria journal**, v. 16, n. 1, p. 426, 24 out. 2017.

MONTEIRO, W. M. et al. G6PD deficiency in Latin America: systematic review on prevalence and variants. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 553–68, ago. 2014.

MONTEIRO, W. M. et al. Fatal Primaquine-Induced Hemolysis in a Patient With *Plasmodium vivax* Malaria and G6PD A(–) Variant in the Brazilian Amazon. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 9, p. 1188.1–1188, 1 maio 2016.

MOURÃO L. C.; GOMES, T.C.; BRAGA, E.M. Malarial Anemia: A Multifactorial Hematological Outcome. In Colloquium series on integrated systems Physiology: from moleCule to funCtion to disease - Malaria. ISBN: 9781615046379, 2013.

MOYES, C. L. et al. Defining the geographical range of the *Plasmodium knowlesi* reservoir. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 3, p. e2780, 27 mar. 2014.

NACHER, M. et al. The burden of *Plasmodium vivax* relapses in an Amerindian village in French Guiana. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 1–5, 2013.

NGO, D. A.; STEINBERG, M. H. Genomic approaches to identifying targets for treating β hemoglobinopathies. **BMC medical genomics**, v. 8, p. 44, 29 jul. 2015.

ONDEI, L. S. et al. Lipid peroxidation and antioxidant capacity of G6PD-deficient patients with A-(202G>A) mutation. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 1345–1351, 2009.

OKUMURA, J. V.; LOBO, C. L. DE C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 35, n. 1, p. 71–2, 2013.

PEIXOTO, H. M. et al. G6PD deficiency in male individuals infected by *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: a cost study. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 126, 24 dez. 2015.

PEIXOTO, H. M. et al. Cost-effectiveness analysis of rapid diagnostic tests for G6PD deficiency in patients with *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon. **Malaria journal**, v. 15, p. 82, 11 fev. 2016.

PEIXOTO, H. M. et al. Rapid diagnostic test for G6PD deficiency in *Plasmodium vivax*-infected men: a budget impact analysis based in Brazilian Amazon. **Tropical Medicine & International Health**, v. 22, n. 1, p. 21–31, 1 jan. 2017.

PENA, S. D. J. et al. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. **Electrophoresis**, v. 12, n. 2-3, p. 146-152, 1991.

PENA, S. D. J. et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS one**, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011.

PREFEITURA BELÉM. Disponível em: <<http://www.belem.pa.gov.br/>>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2018.

PREFEITURA ITAITUBA. Disponível em: <<http://www.itaituba.pa.gov.br/paginas/apresentacao>>. Acesso em: 12 de Fevereiro de 2018.

PREFEITURA PORTO VELHO. Disponível em: <<https://www.portovelho.ro.gov.br/>>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2018.

PRICE, R. N. et al. Vivax malaria: neglected and not benign. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 6 Suppl, p. 79–87, dez. 2007.

RAHIMI, Z. Genetic epidemiology, hematological and clinical features of hemoglobinopathies in Iran. **BioMed research international**, v. 2013, p. 803487, 2013.

RAJAPAKSE, S.; RODRIGO, C.; FERNANDO, S. D. Tafenoquine for preventing relapse in people with *Plasmodium vivax* malaria. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, p. CD010458, 2015.

RAMOS JÚNIOR, W. M. et al. Clinical aspects of hemolysis in patients with *P. vivax* malaria treated with primaquine, in the Brazilian Amazon. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 410–2, 2010.

RECHT, J. et al. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. **Malaria journal**, v. 16, n. 1, p. 273, 4 jul. 2017.

RUEANGWEERAYUT, R. et al. Hemolytic potential of tafenoquine in female volunteers heterozygous for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficiency (G6PD Mahidol Variant) versus G6PD-Normal volunteers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 702–711, 2017.

- SALOUM DE NEVES MANTA, F. et al. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e75145, 2013.
- SAMBROOK, J.; FRITCSH, E.F.; MANATIS. T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. ed.2. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 1989.
- SAMPAIO, V. S. et al. Malaria in the State of Amazonas: a typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. suppl 1, p. 4–11, jun. 2015.
- SANTANA, M. S. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in an endemic area for malaria in Manaus: a cross-sectional survey in the Brazilian Amazon. **PloS one**, v. 4, n. 4, p. e5259, 2009.
- SANTANA, M. S. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient variants are associated with reduced susceptibility to malaria in the Brazilian Amazon. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 5, p. 301–306, 1 maio 2013.
- SIQUEIRA, A. M. et al. *Plasmodium vivax* Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 95, n. 6 Suppl, p. 87–96, 28 dez. 2016.
- SIVEP-MALÁRIA - Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária. Disponível em: <http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/> Acesso em: 02 de Fevereiro de 2018.
- SNOUNOU, G. et al. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 58, p. 283-292, 1993.
- SUAREZ-KURTZ, G. et al. Pharmacogenomic diversity among Brazilians: Influence of ancestry, self-reported color, and geographical origin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3 NOV, n. November, p. 1–7, 2012.
- SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E. E.; NAGEL, R. L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. **American journal of hematology**, v. 32, n. 1, p. 66–9, set. 1989.
- TRIPATHY, V.; REDDY, B. M. Present status of understanding on the G6PD deficiency and natural selection. **Journal of postgraduate medicine**, v. 53, n. 3, p. 193–202, 2007.
- TUTEJA, R. Malaria – an overview. **FEBS Journal**, v. 274, n. 18, p. 4670–4679, set. 2007.
- VALENCIA, S. H. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency prevalence and genetic variants in malaria endemic areas of Colombia. **Malaria journal**, v. 15, p. 291, 2016.
- VIZZI, E. et al. Prevalence and molecular characterization of G6PD deficiency in two *Plasmodium vivax* endemic areas in Venezuela: predominance of the African A-(202A/376G) variant. **Malaria journal**, v. 15, p. 19, 11 jan. 2016.

VULLIAMY, T. J. et al. Polymorphic sites in the African population detected by sequence analysis of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene outline the evolution of the variants A and A-. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 19, p. 8568–71, 1 out. 1991.

WHO. Guideline for The Treatment of Malaria. 2015. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127_eng.pdf?ua=1&ua=1>. Acesso em: 15 de Novembro de 2017.