

THAIS CRIPPA DE OLIVEIRA

**Genômica populacional de *Plasmodium vivax*: níveis e mecanismos de diversidade genética na América**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira.

Co-Orientador: Prof. Dr. João Marcelo Pereira Alves

Versão Original

São Paulo  
2016

## RESUMO

**CRIPPA, T. O. Genômica populacional de *Plasmodium vivax*: níveis e mecanismos de diversidade genética na América.** 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Malária é um problema de saúde pública global. No Brasil, *Plasmodium vivax* é o causador de 85% dos 142 mil casos de malária relatados em 2013. Estudos genômicos tem o potencial de complementar os estudos *in vitro*, provendo novas oportunidades para o descobrimento de alvos para vacinas e drogas, além de auxiliar em testes de expressão de genes. Deste modo, este projeto teve como objetivos, a partir do sequenciamento de 9 genomas nucleares de isolados simpátricos brasileiros de *P. vivax* coletados entre 2012 e 2013, avaliar: (a) os níveis e os potenciais mecanismos de geração de diversidade genética utilizando polimorfismos de base única (SNPs), (b) os níveis de estrutura populacional na população brasileira simpátrica em comparação com outras regiões da América, (c) os *loci* sob pressão seletiva. Utilizamos técnicas de sequenciamento de nova geração associadas à identificação de marcadores moleculares do tipo SNPs e análises subsequentes de diversidade, estrutura populacional e de evidências de seleção natural. Nossos resultados mostraram a população do Brasil compartilhando mais ancestrais com a do Peru, bem como a da Colômbia compartilhando mais ancestrais com a do México. Genes de famílias previamente descritas como hipervariáveis foram observados com os maiores valores de diversidade; alguns genes envolvidos com a interação parasito-hospedeiro apresentaram evidência de seleção balanceada, a partir do valor D de Tajima. A alta frequência de recombinação meiótica encontrada em amostras das populações de parasitos, apesar da baixa transmissão local de malária, resultou no declínio do desequilíbrio de ligação entre pares de SNPs situados em uma distância de 50 pares de bases ao longo do mesmo cromossomo. Os dados apresentados corroboram com dados prévios de análises com uso de SNPs, complementando as informações sobre diversidade em escala genômica de populações de *P. vivax* nas Américas.

**Palavras-chaves:** *Plasmodium vivax*. Malária. SNP. Diversidade genética.

## ABSTRACT

**CRIPPA, T. O. Population Genomics of *Plasmodium vivax*: levels and mechanisms of genetic diversity in America.** 2016. 95 p. Master thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Malaria is a public health problem worldwide. In Brazil, *Plasmodium vivax* is responsible for 85% of the 142 thousand malaria cases reported in 2013. Genomic studies complement *in vitro* experiments, providing new opportunities for the discovery of targets for vaccines and drugs, as well as enabling gene expression tests. Our objectives for this project, using genome sequences from 9 *P. vivax* Brazilian sympatric isolates collected between 2012 and 2013, were to evaluate the: a) genetic diversity levels and potential generating mechanisms using single nucleotide polymorphisms (SNPs); b) population structure levels in the Brazilian population in comparison with other regions in America; c) *loci* under selective pressure. We used new generation sequencing techniques in association with the identification of SNPs as molecular markers, and subsequent analysis of diversity, population structure and natural selection. Our results show the Brazilian population sharing more ancestrals with Peru, and in addition Colombia sharing more ancestrals with Mexico. Families of genes previously described as hyper variable were observed to have the same diversity values and some genes involved in the host-parasite interaction presented evidences of positive selection, considering Tajima's D. The high meiotic recombination frequency found in the parasite population samples, despite local low transmission, produced a decrease in the linkage disequilibrium between SNPs pairs located in the same chromosome at a 50 base pairs distance. The results presented here corroborate previous results using SNPs analysis, complementing knowledge on diversity at a genomic scale of *P. vivax* in the Americas.

**Keywords:** *Plasmodium vivax*. Malaria. SNP. Genetic diversity.

# 1 INTRODUÇÃO

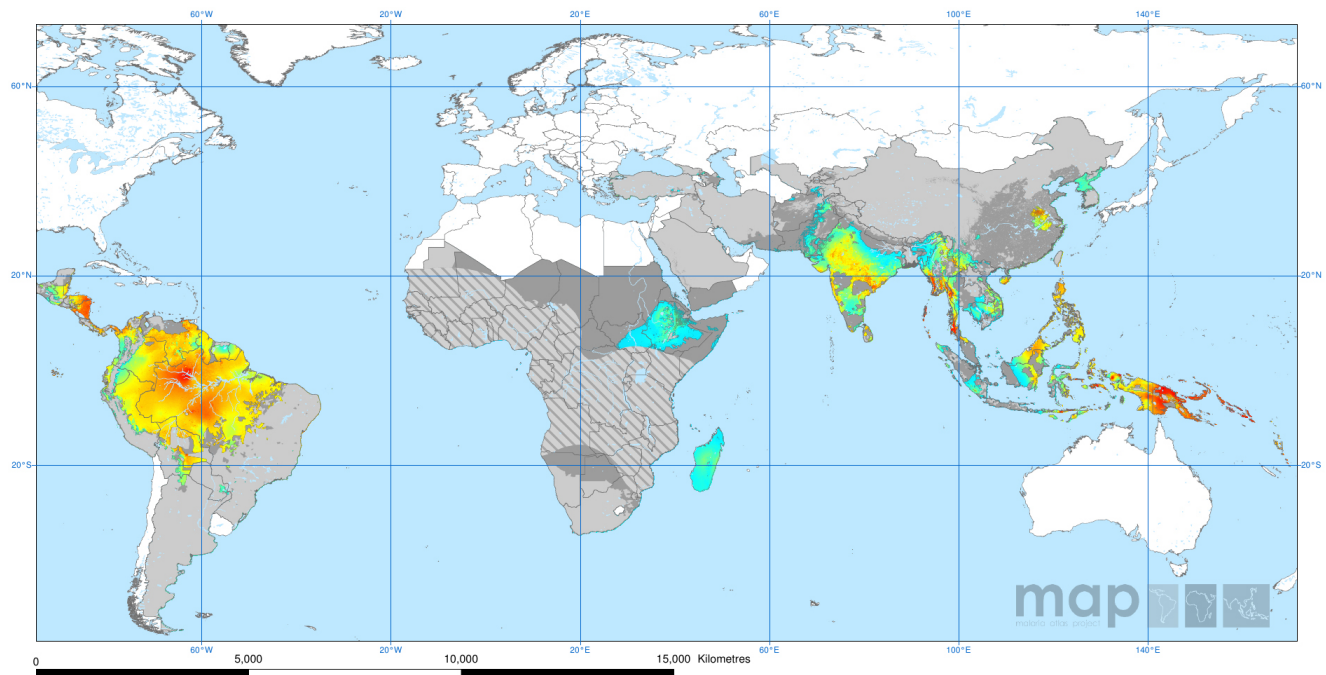
## 1.1 Malária

Malária é um problema de saúde pública global e a terceira principal causa de morte por doenças infecciosas em crianças menores que cinco anos em todo o mundo (BLACK et al., 2010) (BLACK et al., 2010). A malária é uma doença causada por parasitos apicomplexos do gênero *Plasmodium*, transmitidos pela picada da fêmea dos mosquitos do gênero *Anopheles*. Há cinco agentes etiológicos causadores de infecção em seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (World Health Organization - WHO -, 2014). Embora as metas de eliminação abordem todas as malárias humanas, a alocação de fundos e recursos está em dois parasitos de maior importância, *P. falciparum* e *P. vivax*. Essas duas espécies são epidemiológica e biologicamente diferentes, portanto, não é possível supor que os métodos de controle desenvolvidos para a malária falciparum sejam transferíveis para malária vivax (BAIRD, 2007; BOCKARIE; DAGORO, 2006; BOUSEMA; DRAKELEY, 2011; LUXEMBURGER et al., 1994). Evidências de infecções por *P. vivax* em populações cuidadosamente monitoradas mostram que a malária vivax não deve mais ser pensada como uma doença benigna e raramente fatal, mas que pode ser grave e letal (ANSTEY et al., 2009; BAIRD, 2007; PRICE et al., 2007)

## 1.2 Malária nas Américas

*P. vivax* é o principal causador de malária fora da África, principalmente atingindo a Ásia e as Américas, sendo ausente em regiões da África Central e Ocidental. Nas Américas os casos ocorrem normalmente em áreas de densidade populacional muito baixa, enquanto que o fenômeno oposto é encontrado na Ásia, com alta densidade populacional (BATTLE et al., 2012) (Figura 1). Na última década, a incidência de malária vem diminuindo na América do Norte (México), Central e do Sul. No final do ano de 2011, 12 dos 21 países endêmicos para malária na América chegaram ao objetivo traçado para 2015 (redução de 75% da incidência de malária quando comparado ao ano de 2000), enquanto outros 5 países estão próximos dessa meta (WHO, 2012). As conquistas recentes são consideradas um reflexo da vontade política e empenho aos níveis nacional e global acompanhada do aumento do financiamento para a malária e do controle de doenças transmitidas por vetores.

Figura 1 – Mapa de distribuição espacial da endemidade de *Plasmodium vivax* no mundo em 2010



Cores tendendo para vermelho representam uma maior endemidade. Fonte: Adaptado de Malaria Atlas Project (MAP, 2016)

México, El Salvador e Costa Rica, três países em fase de pré-eliminação de malária, vem mantendo reduções da incidência de malária por mais de duas décadas (CARTER et al., 2015). Responsável por 99% dos casos de malária no México, *P. vivax*, em 1980, atingia mais de 100.000 hospedeiros humanos. Devido aos esforços no controle intensivo de malária realizadas pelo Programa Nacional de Controle da Malária na década de 1990, o número de casos tem diminuído desde então (GONZALEZ-CERON et al., 2013). A transmissão da malária nesse país é geralmente baixa e sazonal, e está concentrada em focos residuais ao longo da costa do Pacífico. Nos últimos 10 anos, aproximadamente 80% dos casos de malária relatados no México provêm das províncias de Oaxaca e Chiapas (BETANZOS, 2011). Estes focos de malária são vulneráveis a eventos climáticos severos, como evidenciado por surtos de malária ocorridos coincidente com *el Niño* e o furacão Paulina em 1998, em Oaxaca e Chiapas, e do furacão Stan, no final de 2005 no sul do Chiapas.

Na América Central e do Sul, República Dominicana, Haiti and Venezuela mostraram aumento da incidência de malária na última década e países que compartilham a Bacia Amazônica apresentaram declínio (CARTER et al., 2015), tais como a Colômbia, Peru e Brasil. Apesar do declínio, o Peru é um dos países da América Latina com maior valor de endemidade

em malária, com impacto negativo na saúde e no desenvolvimento econômico (WHO, 2014). A maioria dos casos de malária (76% de 64,673) foram reportados na área da bacia Amazônia (região de Loreto) em 2014, sendo 83% de *P. vivax* (CHAPILLIQUÉN, 2015). A maior parte das infecções por *P. vivax* eram assintomáticas e não detectáveis por microscópica, provendo uma potencial importância na transmissão local (BRANCH et al., 2005; DELGADO-RATTO et al., 2014; GRIFFING; GAMBOA; UDHAYAKUMAR, 2013). Além disso, infecções múltiplas ocorreram mesmo depois da administração de tratamentos indicados (primaquina e cloroquina) pela *World Health Organization* (WHO) (DELGADO-RATTO et al., 2014; GRAF et al., 2012).

A malária na Colômbia, vem experimentando declínio entre os anos de 2006 a 2011, que pode ser explicado por esforços para reduzir a carga da doença, gravidade e mortalidade por uso extensivo de mosquiteiros com inseticidas, diagnóstico precoce e tratamento imediato (WHO, 2014). Entre 1990 e 2011, houve predominância de *P. vivax* sobre *P. falciparum* nos 2.964.818 casos, com média anual de 134.764; picos de índice parasitário anual (IPA) em 1994, nas cidade de Guainía e Guaviare, e em 1998, nas cidades de Guaviare e Chocó (RAMIREZ et al., 2014).

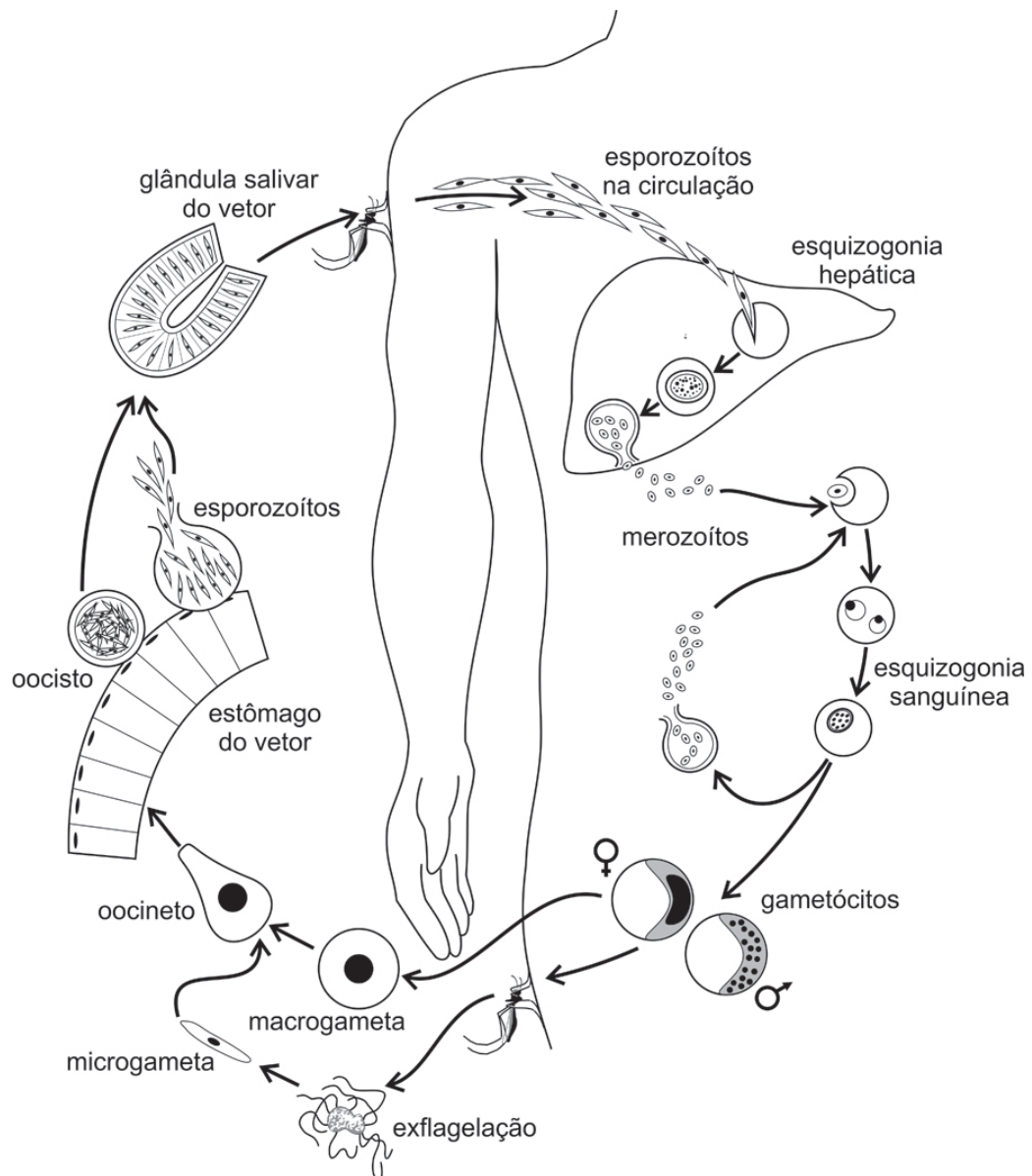
O Brasil também reportou decréscimo na incidência de malária (76.8%) nos anos de 2000 a 2014, ainda assim atualmente contribui com 42% de todos os casos reportados de malária na América (FERREIRA; CASTRO, 2016). A transmissão se mantém basicamente associada a bacia Amazônica, que contribui com 99.5% dos casos de malária do país (FERREIRA; CASTRO, 2016). No Brasil, ambos *P. falciparum* e *P. vivax* são transmitidos através da Bacia Amazônica, com infecções raras por *P. malariae*. A incidência relativa das duas espécies principais de *Plasmodium* transmitidos no Brasil era de cerca de 50% cada, em 1988. Isso mudou a partir de 1990 (quando 44,3% dos casos foram devidos ao *P. falciparum*) atingindo a situação em 2009, quando *P. vivax* tornou-se a espécie predominante (apenas 16,3% dos casos devido à *P. falciparum*) (BARBOSA et al., 2014). *P. vivax* atualmente é o causador de 85% dos 142 mil casos de malária relatados neste país em 2014 (WHO, 2014). Essa recente predominância de *P. vivax* no Brasil pode ser parcialmente explicado por características biológicas que tornam essa espécie menos responsiva que *P. falciparum* para estratégias de controle baseadas somente no diagnóstico precoce e tratamento imediato de infecções de estágio-sanguíneo. *P. vivax*, apresenta a forma de hipnozoito que pode persistir no hospedeiro humano durante vários meses, estágio do parasito no fígado em que ele fica dormente e eventualmente pode causar recaídas (WHITE; IMWONG, 2012).

### 1.3 Ciclo de vida e tratamentos

A transmissão do parasita ocorre através de um ciclo de vida complexo (Figura 2) que se inicia com o repasto sanguíneo da fêmea do vetor *Anopheles*, a qual inocula no hospedeiro, humano ou símio, centenas de formas esporozoítas. Essas formas atravessam a pele, alcançando

a corrente sanguínea, o que possibilita a sua migração ao fígado. Após um processo de replicação mitótica assexuada denominado esquizogônia, os hepatócitos se rompem, liberando milhares de merozoítos novamente para a corrente sanguínea. No momento em que essas formas invadem os eritrócitos, inicia-se o ciclo intra-eritrocítico que se mantém por uma constante reprodução assexuada, acompanhada da diferenciação para formas intra-eritrocíticas: anel, trofozoito maduro e esquizontes respectivamente. Neste momento, os eritrócitos são rompidos e os merozoítos jovens infectam novas hemácias. Durante esses ciclos de infecção, uma parcela dos merozoítos originam as formas sexuadas: gametócitos feminino e masculino, que podem ser aspiradas pelo vetor, quando este pica um hospedeiro infectado. No intestino do mosquito os gametas se diferenciam em o microgameta (masculino) e macrogameta (feminino) que se fundem gerando a forma móvel chamada de oocineto, permitindo a recombinação entre cromossomos homólogos. O oocineto após sua maturação na membrana basal origina o oocisto, que se rompe liberando milhares de esporozoítos, que então migram para o epitélio da glândula salivar maturando para a forma infectiva e possibilitando assim o recomeço do ciclo.

Figura 2 – Ciclo de vida do gênero *Plasmodium* que infectam humanos



Fonte: Adaptado de *National Institute of Allergy and Infectious Diseases - NIAID*

## 1.4 Diversidade genética em *P. vivax*

Conhecer os mecanismos que geram variação genética em populações de parasitos é essencial para compreender a origem e dispersão de fenótipos de interesse. A recente emergência de resistência à cloroquina em *P. vivax* e a ocorrência de casos graves, eventualmente fatais, de malária vivax sugerem a aquisição de novas características fenotípicas por parasitos de diferentes regiões geográficas (PRICE; DOUGLAS; ANSTEY, 2009). No Brasil, tanto a ocorrência de resistência à cloroquina (SANTANA-FILHO et al., 2007; MARQUES et al., 2014) como a de



doença grave (ANDRADE et al., 2010) estão bem caracterizadas. Os conhecimentos atuais sobre a biologia populacional do parasito não permitem prever padrões de emergência e dispersão desses fenótipos. De fato, nem sequer se conhece a contribuição relativa de mecanismos dependentes de seleção natural e de processos evolutivamente neutros (como a deriva gênica ou a migração) para a dispersão espacial e a dinâmica temporal de polimorfismos de relevância clínica ou em saúde pública.

Um dos problemas chave que medeiam o controle efetivo da malária brasileira é a falta de compreensão na estrutura populacional de *P. vivax* e sua dinâmica de transmissão. Desta forma, mais estudos de diversidade genética são necessários para se definir a diversidade, distribuição e dinâmica das populações de *P. vivax* e como as populações de parasitos se diferem entre as localidades (HUPALO et al., 2016; JOSHI et al., 2008; JOY et al., 2008; PEARSON et al., 2016; REID et al., 2010; SCHULTZ et al., 2010). O mapeamento global e local das populações de *P. vivax* é essencial para o estabelecimento de metas para eliminação e intervenção. Portanto, estudar a história demográfica dos parasitos de malária é útil por dois motivos principais. Primeiro, inferências sobre tempo e magnitude nas mudanças do tamanho populacional podem prover pistas das causas dessas mudanças. Em segundo, a influência da história demográfica ou da subestrutura populacional na variação do genoma devem ser consideradas na identificação de regiões sob pressão de seleção e de alelos de resistência a drogas (CHANG et al., 2012).

Estudar uma população local em profundidade possui duas vantagens sobre um estudo análogo de amostras de todo o mundo: (a) os polimorfismos em uma população local são melhores para revelar assinaturas de seleção recente e (b) a existência da estrutura populacional em amostras globais pode resultar em padrões de desequilíbrio de ligação e de espectro de frequência de alelos que artificialmente se assemelham aos esperados de seleção. Estudos de subestrutura em diferentes populações mundiais acometidas por malária vivax mostraram uma mesma face: a existência de pelo menos duas subpopulações dentro de uma mesma população (ABDULLAH et al., 2013; CHENET et al., 2012; DELGADO-RATTO et al., 2014; GUNAWARDENA et al., 2014; JOY et al., 2008; LARRAÑAGA et al., 2013; LIU et al., 2014a). Assim, a comparação de genomas obtidos de amostras simpátricas de parasitos é uma estratégia extremamente poderosa para avaliar a importância relativa de diferentes mecanismos (mutações pontuais, inserções e deleções, proliferação de motivos repetitivos e recombinação meiótica) na geração de diversidade genética em *P. vivax*. Além disso, essa análise permite inferir a ocorrência de pressões seletivas (diversificadora e purificadora) em diferentes regiões genômicas, que afetam os padrões de variação observados em nível populacional.

O maior obstáculo, então, para esses estudos de genética de populações de *P. vivax* foi, até recentemente, a falta de marcadores moleculares adequados para uso em larga escala. Microsatélites, por exemplo, são marcadores úteis sob certas circunstâncias, pois eles permitem a detecção de estruturas genéticas em divergências recentes (PAYSEUR; JING; HAASL, 2011)

e eles são abundantes tanto em genomas de *P. falciparum* quanto em *P. vivax* (RUSSELL; SUWANARUSK; LEK-UTHAI, 2006). Níveis altos de diversidade genética em *P. vivax*, com uso de microssatélites, vem sido demonstrado em países como Papua Nova Guiné, Tailândia, Laos, Índia, Myanmar, Sri Lanka, Honduras, Brasil, Colômbia, Peru e México (FERREIRA et al., 2007; GUNAWARDENA et al., 2014; KARUNAWEERA et al., 2008; MENEGON et al., 2014; MOBEGI et al., 2012; REZENDE et al., 2010; SUTTON, 2013). No caso do Brasil, Sri Lanka e Myanmar, foi observada a alta diversidade genética mesmo com baixos níveis de transmissão (FERREIRA et al., 2007; GUNAWARDENA et al., 2014). Gunawardena et al. (2010) observou, usando 12 microssatélites (marcadores tri e tetranucleotídeos) em 425 isolados de Sri Lanka, Myanmar e Etiópia, que há a clusterização de acordo com a origem geográfica. Esse resultado é congruente com os de Karunaweera et al. (2008) em que isolados da América Central, África, Sudeste Asiático e Oceania apresentaram uma fração de semelhança entre os *clusters* para os 14 marcadores de microssatélites utilizados. Neste mesmo estudo, em isolados de mesma área no Brasil (Acre), no entanto, foi possível observar subestrutura populacional. Assim, a maior diferenciação genética foi encontrada no Brasil, ao longo de um período de 5 a 6 anos. Na Amazônia peruana, as poucas observações disponíveis em genética de populações *P. vivax* foram coletadas em pequenas áreas (dispersas aldeias e comunidades) e relatado que as populações de parasitas eram heterogêneas e clonais. O uso em larga escala de microssatélites, porém, tem limitações. Os métodos de tipagem usados atualmente estão sujeitos a variação de resultados entre laboratórios mesmo com um conjunto de marcadores iguais, reduzindo as possibilidades de comparação entre resultados obtidos.

Em contrapartida, SNPs (*single nucleotide polymorphism*) vem tendo uma considerável atenção por causa do seu potencial como marcadores para mapeamento genético e para estudo de evolução molecular e dinâmica populacional em *P. vivax* e em espécies aparentadas (BRIGHT et al., 2012; CHAN et al., 2012; DHARIA et al., 2010; FENG et al., 2003; NEAFSEY et al., 2008; NEAFSEY et al., 2012; ORJUELA-SÁNCHEZ et al., 2010; SACHIDANANDAM et al., 2001) pois são relativamente fáceis de se manejar e se apresentam com grande frequência. Estudo realizado por Orjuela-Sanchez et al. (2010), baseado em um conjunto de 85 SNPs ao longo do cromossomo 8 de *P. vivax* provenientes de isolados de campo do Brasil, Camboja, Vietnã e Sri Lanka, mostrou uma clusterização dessas amostras em três populações distintas: uma formada por isolados do Camboja, Vietnã e Sri Lanka e outras duas de isolados do Brasil. Alguns trabalhos vem propondo SNPs significativos, como Baniecki et al. (2015) que propuseram 42 SNPs, testados em 87 amostras de países da América, África e Ásia, que poderiam ser utilizados como *barcode* para *P. vivax*, utilizando técnica similar de geração de *barcode* de SNP usada por este grupo em *P. falciparum* (DANIELS et al., 2008).

## 1.5 Genômica de *P. vivax*

A conclusão do sequenciamento de um genoma de referência de *P. vivax* (CARLTON et al., 2008), gerado a partir do isolado Salvador I (paciente de El Salvador (Sal-I)), representou um avanço crucial para os estudos de diversidade genética dessa espécie. Em muitos aspectos, os genomas das espécies de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. vivax* e *P. y. yoelii*) são uniformes, tendo cerca de 23 a 27 Mpb entre os 14 cromossomos e contendo ~5500 genes, com a maioria (~51%) contendo pelo menos 1 intron. O genoma de ~26,8 Mpb de *P. vivax*, consiste em 14 cromossomos em tamanhos que variam de 0,76 a 3,12 Mpb e 2733 pequenos *contigs* de tamanhos 200-101.928 bases, com conteúdo G+C de ~42,3%; 4,3 Mb de pequenos *contigs* nas regiões subteloméricas ainda permanecem não especificados devido a sua natureza repetitiva (CARLTON et al., 2008).

Atualmente, há cinco genomas completamente montados e anotados (NEAFSEY et al., 2012) e outros com disponibilização apenas dos *reads* (BRIGHT et al., 2012; CHAN et al., 2012; CHAN et al., 2015; DHARIA et al., 2010; FENG et al., 2003; HUPALO et al., 2016; NEAFSEY et al., 2008; NEAFSEY et al., 2012; ORJUELA-SÁNCHEZ et al., 2010; PEARSON et al., 2016; SACHIDANANDAM et al., 2001), que fornecem uma base de dados para estudos de variação genética de *P. vivax* em escala genômica. A primeira análise comparativa de genomas completos de *P. vivax* (NEAFSEY et al., 2012) com uso de SNPs revelou uma característica extremamente interessante dessa espécie: para todos os tipos de polimorfismos estudados (regiões codificadoras e não-codificadoras, polimorfismos sinônimos e não-sinônimos, regiões repetitivas e não-repetitivas), os isolados analisados de *P. vivax* apresentaram muito mais diversidade genética do que um conjunto de isolados de *P. falciparum* provenientes das mesmas regiões geográficas. Uma análise comparativa de diversidade de microssatélites em amostras de ambas as espécies provenientes do Camboja havia chegado à mesma conclusão (ORJUELA-SÁNCHEZ et al., 2013). Não se conhecem, entretanto, os mecanismos responsáveis por essa grande diversidade genética em *P. vivax*.

Este ano, dois artigos publicaram 228 (PEARSON et al., 2016) e 117 (HUPALO et al., 2016) genomas completos de isolados de regiões do Sudeste Asiático, Índia, Oceania e América, sendo 303,616 SNPs e 134,800 SNPs de alta qualidade, respectivamente. Desses genomas, 25 são provenientes de amostras da região noroeste do Brasil, contudo nesses trabalhos os genomas apresentaram baixa cobertura. Ambos os trabalhos observaram estruturas populacionais primeiramente determinadas pela localização das amostras, sendo esses resultados condizentes com resultados prévios de microssatélites e estudos de SNPs (CARLTON et al., 2008; KOEPFLI et al., 2015; NEAFSEY et al., 2012; SCHOUSBOE et al., 2014), porém promoveram uma resolução maior dado a quantidade de informações agregadas. Amostras de Velho Mundo separaram-se de amostras de Novo Mundo (HUPALO et al., 2016), sendo que a Ásia apresentou de modo geral *clusters* populacionais por país (HUPALO et al., 2016; PEARSON et al., 2016), excluindo-se a Índia, que apresentou uma população composta por ancestrais

distintos (HUPALO et al., 2016). No Novo Mundo, amostras americanas apresentaram presença de 3 ancestrais distintos, claramente diferentes dos encontrados no Velho Mundo, sendo que o Brasil mostrou ser mais miscigenado, mesmo com amostras provindas de mesmo localidade (HUPALO et al., 2016).

Além disso, evidenciaram fortes sinais de seleção ocasionada por evolução recente tanto em genes de resistência a drogas, como DHPS (*dihydropteroate synthase*) e DHFR-TS (*dihydrofolate reductase-thymidylate synthase*) (HUPALO et al., 2016; PEARSON et al., 2016), quanto em novos *loci*, como MAEBL (*merozoite adhesive erythrocytic binding protein*) (Hupalo, et al, 2016). Hupalo et al. (2016) observaram que esses genes sob seleção estavam adaptados as diferenças regionais nos hospedeiros humano, mosquito e a outras variáveis ambientais. De modo geral, esses dados reforçam a epidemiologia variável desses parasitas e destacam a amplitude das abordagens que poderão ser necessárias para a eliminação global de *P. vivax*.

Assim, estudos genômicos tem o potencial para complementar os estudos *in vitro*, provendo novas oportunidades para o descobrimento de alvos para vacinas e drogas e, auxílio em testes de expressão de genes (BOZDECH et al., 2008; WESTENBERGER et al., 2010), preenchendo assim, algumas das lacunas em nossa compreensão da biologia *P. vivax*. Os novos genomas brasileiros adicionam informações importantes ao banco de dados atual melhorando o panorama sobre a variação genética em diferentes regiões genômicas e em diferentes tipos de sequências (codificadoras e não-codificadoras). A disponibilidade de genomas adicionais em regiões brasileiras permite ampliar a base de comparação com dados de outras origens geográficas, elucidando padrões de divergência genética em cada população e entre as diversas populações já analisadas na América.

Neste projeto foram analisados 9 genomas completos de isolados simpátricos de *P. vivax* da Amazônia brasileira e genomas completos das Américas já disponíveis no bando de dados, avaliando: (a) os níveis e os potenciais mecanismos de geração de diversidade genética, como mutações ou recombinações; (b) os níveis de diferenciação entre a população simpátrica brasileira e outras regiões das Américas e (c) os *loci* sob pressão seletiva.

## 2 CONCLUSÃO

Encontramos divergência entre as populações americanas estudadas, com uma tendência a ancestrais distintos em função ao aumento da distância geográfica. Deste modo, as populações de *P. vivax* do Brasil compartilham mais ancestrais com o Peru e as da Colômbia com as populações do México. A divergência entre populações do mesmo continente é evidente quando se analisa o conjunto de SNPs observados nos genomas nucleares completos, porém não é claramente observada quando se analisa um conjunto restrito de 42 marcadores propostos como um *barcode* para essa espécie.

Os níveis de diversidade encontrados em nossas análises mostraram similaridade com o proposto na literatura, em que genomas de *P. vivax* possuem mais diversidade do que genomas de *P. falciparum*, mesmo em uma população simpátrica como a brasileira. A alta taxa de recombinação meiótica encontrada em amostras da população brasileira sugere que a recombinação seja um importante mecanismo de geração de diversidade genética nessa espécie a partir de polimorfismos presentes nos ancestrais e de novos polimorfismos gerados por mutações.

Genes de famílias previamente descritas como hipervariáveis foram observados com os maiores valores de diversidade, seguidos, no caso do Brasil, de genes codificantes de fatores de transcrição e de actina. Identificamos, sob seleção balanceada, mais genes envolvidos com a interação parasito-hospedeiro do que associados ao ciclo de vida e a fertilidade, apesar do único gene com alto valor de D de Tajima encontrado nas 4 regiões, *ApiAP2*, estar associado a regulação da transcrição.

## REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, N. R.; BARBER, B. E.; WILLIAM, T.; NORAHMAD, N. A.; SATSU, U. R.; MUNIANDY, P. K.; ISMAIL, Z.; GRIGG, M. J.; JELIP, J.; PIERA, K.; Von Seidlein, L.; YEO, T. W.; ANSTEY, N. M.; PRICE, R. N.; AUBURN, S. Plasmodium vivax population structure and transmission dynamics in Sabah Malaysia. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.
- ALECRIM, G. C.; ALECRIM, W.; MACÊDO, V. Plasmodium vivax resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 1, p. 67–68, 1999.
- ALEXANDER, D.; LANGE, K. A quasi-Newton acceleration for high-dimensional optimization algorithms. **Statistics and Computing**, v. 21, n. 2, p. 261–273, 2011.
- ANDRADE, B. B.; REIS-FILHO, A.; SOUZA-NETO, S. M.; CLARÊNCIO, J.; CAMARGO, L. M. A.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria Journal**, v. 9, p. 13, 2010.
- ANSTEY, N. M.; RUSSELL, B.; YEO, T. W.; PRICE, R. N. The pathophysiology of vivax malaria. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 5, p. 220–227, 2009.
- BAIRD, J. K. Chloroquine Resistance in Plasmodium vivax. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4075–4083, 2004.
- BAIRD, J. K. Neglect of Plasmodium vivax malaria. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 11, p. 533–539, 2007.
- BANE, K. S.; LEPPER, S.; KEHRER, J.; SATTTLER, J. M.; SINGER, M.; REINIG, M.; KLUG, D.; HEISS, K.; BAUM, J.; MUELLER, A. K.; FRISCHKNECHT, F. The Actin Filament-Binding Protein Coronin Regulates Motility in Plasmodium Sporozoites. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 7, 2016.
- BANIECKI, M. L.; FAUST, A. L.; SCHAFFNER, S. F.; PARK, D. J.; GALINSKY, K.; DANIELS, R. F.; HAMILTON, E.; FERREIRA, M. U.; KARUNAWEERA, N. D.; SERRE, D.; ZIMMERMAN, P. A.; S??, J. M.; WELLEMS, T. E.; MUSSET, L.; LEGRAND, E.; MELNIKOV, A.; NEAFSEY, D. E.; VOLKMAN, S. K.; WIRTH, D. F.; SABETI, P. C. Development of a Single Nucleotide Polymorphism Barcode to Genotype Plasmodium vivax Infections. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, 2015.
- BARBOSA, S.; GOZZE, A. B.; LIMA, N. F.; BATISTA, C. L.; BASTOS, M. d. S.; NICOLETE, V. C.; FONTOURA, P. S.; GONCALVES, R. M.; VIANA, S. A. S.; MENEZES, M. J.; SCOPEL, K. K. G.; CAVASINI, C. E.; MALAFRONTI, R. d. S.; SILVA-NUNE, M. d.; VINETZ, J. M.; CASTRO, M. C.; FERREIRA, M. U. Epidemiology of Disappearing Plasmodium vivax Malaria : A Case Study in Rural Amazonia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, 2014.
- BATTLE, K. E.; GETHING, P. W.; ELYAZAR, I. R. F.; MOYES, C. L.; SINKA, M. E.; HOWES, R. E.; GUERRA, C. A.; PRICE, R. N.; BAIRD, K. J.; HAY, S. I. **The Global Public Health Significance of Plasmodium vivax**. [S.l.]: Elsevier, 2012. 1–111 p. ISBN 9780123979001.

- BETANZOS, A. Challenges and progress in the elimination of malaria in Mexico. **Boletín Médico del Hospital Infantil de México**, v. 68, n. 2, p. 159–168, 2011.
- BLACK, R. E.; COUSENS, S.; JOHNSON, H. L.; LAWN, J. E.; RUDAN, I.; BASSANI, D. G.; JHA, P.; CAMPBELL, H.; WALKER, C. F.; CIBULSKIS, R.; EISELE, T.; LIU, L.; MATHERS, C. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **The Lancet**, Elsevier Ltd, v. 375, n. 9730, p. 1969–1987, 2010.
- BOCKARIE, M. J.; DAGORO, H. Plasmodium falciparum than Plasmodium vivax- infected mosquitoes ? **Malaria Journal**, v. 5, p. 1–5, 2006.
- BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C. Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 377–410, 2011.
- BOZDECH, Z.; MOK, S.; HU, G.; IMWONG, M.; JAIDEE, A.; RUSSELL, B.; GINSBURG, H.; NOSTEN, F.; DAY, N. P. J.; WHITE, N. J.; CARLTON, J. M.; PREISER, P. R. The transcriptome of Plasmodium vivax reveals divergence and diversity of transcriptional regulation in malaria parasites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 42, p. 16290–16295, 2008.
- BRANCH, O.; CASAPIA, W. M.; GAMBOA, D. V.; HERNANDEZ, J. N.; ALAVA, F. F.; RONCAL, N.; ALVAREZ, E.; PEREZ, E. J.; GOTUZZO, E. Clustered local transmission and asymptomatic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. **Malaria Journal**, v. 4, p. 27, 2005.
- BREGA, S.; MESLIN, B.; MONBRISON, D.; SEVERINI, C.; GRADONI, L.; UDOMSANG-PETCH, R.; SUTANTO, I. Identification of the Plasmodium vivax mdr- Like Gene ( pvmdr1 ) and Analysis of Single-Nucleotide Polymorphisms among Isolates from Different Areas of Endemicity. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, 2005.
- BRIGHT, A. T.; TEWHEY, R.; ABELES, S.; CHUQUIYAURI, R.; LLANOS-CUENTAS, A.; FERREIRA, M. U.; SCHORK, N. J.; VINETZ, J. M.; WINZELER, E. A. Whole genome sequencing analysis of Plasmodium vivax using whole genome capture. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 262, 2012.
- CARLTON, J. M.; ADAMS, J. H.; SILVA, J. C.; BIDWELL, S. L.; LORENZI, H.; CALER, E.; CRABTREE, J.; ANGIUOLI, S. V.; MERINO, E. F.; AMEDEO, P.; CHENG, Q.; COULSON, R. M. R.; CRABB, B. S.; Del Portillo, H. A.; ESSIEN, K.; FELDBLYUM, T. V.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; GILSON, P. R.; GUEYE, A. H.; GUO, X.; KANG'A, S.; KOUIJ, T. W. A.; KORSINCZKY, M.; MEYER, E. V.-S.; NENE, V.; PAULSEN, I.; WHITE, O.; RALPH, S. A.; REN, Q.; SARGEANT, T. J.; SALZBERG, S. L.; STOECKERT, C. J.; SULLIVAN, S. A.; YAMAMOTO, M. M.; HOFFMAN, S. L.; WORTMAN, J. R.; GARDNER, M. J.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W.; FRASER-LIGGETT, C. M. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite Plasmodium vivax. **Nature**, v. 455, n. 7214, p. 757–763, 2008.
- CARTER, K. H.; SINGH, P.; MUJICA, O. J.; ESCALADA, R. P.; ADE, M. P.; CASTELLANOS, L. G.; ESPINAL, M. A. Malaria in the Americas: Trends from 1959 to 2011. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 2, p. 302–316, 2015.

CHAN, E. R.; BARNWELL, J. W.; ZIMMERMAN, P. A.; SERRE, D. Comparative Analysis of Field-Isolate and Monkey-Adapted *Plasmodium vivax* Genomes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, 2015.

CHAN, E. R.; MENARD, D.; DAVID, P. H.; RATSIMBASOA ARSÈ, n.; KIM, S.; CHIM, P.; DO, C.; WITKOWSKI, B.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; ZIMMERMAN, P. A.; SERRE, D. Whole Genome Sequencing of Field Isolates Provides Robust Characterization of Genetic Diversity in *Plasmodium vivax*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, 2012.

CHANG, H.-H.; PARK, D. J.; GALINSKY, K. J.; SCHAFFNER, S. F.; NDIAYE, D.; NDIR, O.; MBOUP, S.; WIEGAND, R. C.; VOLKMAN, S. K.; SABETI, P. C.; WIRTH, D. F.; NEAFSEY, D. E.; HARTL, D. L. Genomic sequencing of *Plasmodium falciparum* malaria parasites from Senegal reveals the demographic history of the population. **Molecular biology and Evolution**, v. 29, n. 11, p. 3427–3439, 2012.

CHAPILLIQUÉN, F. Situación epidemiológica de la malaria (a la SE 53). **Ministry Health of Peru**, 2015.

CHEHUAN, Y. F.; COSTA, M. R. F.; COSTA, J. S.; ALECRIM, M. G. C.; NOGUEIRA, F.; SILVEIRA, H.; BRASIL, L. W.; MELO, G. C.; MONTEIRO, W. M.; LACERDA, M. V. G. In vitro chloroquine resistance for *Plasmodium vivax* isolates from the Western Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, p. 1–5, 2013.

CHENET, S. M.; SCHNEIDER, K. a.; VILLEGAS, L.; ESCALANTE, A. a. Local population structure of *Plasmodium*: impact on malaria control and elimination. **Malaria Journal**, *Malaria Journal*, v. 11, n. 1, p. 412, 2012.

CINGOLANI, P.; PLATTS, A.; WANG, L. L.; COON, M.; NGUYEN, T.; WANG, L.; LAND, S. J.; LU, X.; RUDEN, D. M. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w 1118; iso-2; iso-3. **Fly**, v. 6, n. 2, p. 80–92, 2012.

CONWAY, D. J.; ROPER, C.; ODUOLA, A. M. J.; ARNOT, D. E.; KREMSNER, P. G.; GROBUSCH, M. P.; CURTIS, C. F.; GREENWOOD, B. M. High recombination rate in natural populations of *Plasmodium falciparum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 8, p. 4506–4511, 1999.

CULLETON, R.; COBAN, C.; ZEYREK, F. Y.; CRAVO, P.; KANEKO, A.; RANDRIANARIVE-LOJOSIA, M.; ANDRIANARANJAKA, V.; KANO, S.; FARNERT, A.; AREZ, A. P.; SHARP, P. M.; CARTER, R.; TANABE, K. The origins of african *plasmodium vivax*; insights from mitochondrial genome sequencing. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, 2011.

DANECEK, P.; AUTON, A.; ABECASIS, G.; ALBERS, C. A.; BANKS, E.; DEPRISTO, M. A.; HANDSAKER, R. E.; LUNTER, G.; MARTH, G. T.; SHERRY, S. T.; MCVEAN, G.; DURBIN, R. The variant call format and VCFtools. **Bioinformatics**, v. 27, n. 15, p. 2156–2158, 2011.

DANIELS, R.; VOLKMAN, S. K.; MILNER, D. A.; MAHESH, N.; NEAFSEY, D. E.; PARK, D. J.; ROSEN, D.; ANGELINO, E.; SABETI, P. C.; WIRTH, D. F.; WIEGAND, R. C. A general SNP-based molecular barcode for *Plasmodium falciparum* identification and tracking. **Malaria Journal**, v. 7, p. 223, 2008.



- DELGADO-RATTO, C.; GAMBOA, D.; SOTO-CALLE, V. E.; DEN, P. V.; TORRES, E.; SÁNCHEZ-MARTÍ NEZ, L.; CONTRERAS-MANCILLA, J.; ROSANAS, A.; VAN, P.; ALESSANDRO, U. D. Population Genetics of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2016.
- DELGADO-RATTO, C.; SOTO-CALLE, V. E.; Van den Eede, P.; GAMBOA, D.; ROSAS, A.; ABATI, E. N.; Rodríguez Ferrucci, H.; LLANOS-CUENTAS, A.; Van Geertruyden, J.-P.; ERHART, A.; D'ALESSANDRO, U. Population structure and spatio-temporal transmission dynamics of *Plasmodium vivax* after radical cure treatment in a rural village of the Peruvian Amazon. **Malaria Journal**, v. 13, p. 8, 2014.
- DHARIA, N. V.; BRIGHT, a. T.; WESTENBERGER, S. J.; BARNES, S. W.; BATALOV, S.; KUHEN, K.; BORBOA, R.; FEDERE, G. C.; MCCLEAN, C. M.; VINETZ, J. M.; NEYRA, V.; LLANOS-CUENTAS, A.; BARNWELL, J. W.; WALKER, J. R.; WINZELER, E. a. Whole-genome sequencing and microarray analysis of ex vivo *Plasmodium vivax* reveal selective pressure on putative drug resistance genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 46, p. 20045–20050, 2010.
- ESCALANTE, A. A.; CORNEJO, O. E.; ROJAS, A.; UDHAYAKUMAR, V.; LAL, A. A. Assessing the effect of natural selection in malaria parasites. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 8, p. 388–395, 2004.
- FENG, X.; CARLTON, J. M.; JOY, D. A.; MU, J.; FURUYA, T.; SUH, B. B.; WANG, Y.; BARNWELL, J. W.; SU, X.-Z. Single-nucleotide polymorphisms and genome diversity in *Plasmodium vivax*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8502–8507, 2003.
- FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malaria Journal**, BioMed Central, v. 15, n. 1, p. 284, 2016.
- FERREIRA, M. U.; KARUNAWEEERA, N. D.; SILVA-NUNES, M. da; SILVA, N. S. da; WIRTH, D. F.; HARTL, D. L. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. **Journal of infectious diseases**, v. 195, p. 1218–1226, 2007.
- FINN, R. D.; COGGILL, P.; EBERHARDT, R. Y.; EDDY, S. R.; MISTRY, J.; MITCHELL, A. L.; POTTER, S. C.; PUNTA, M.; QURESHI, M.; SANGRADOR-VEGAS, A.; SALAZAR, G. A.; TATE, J.; BATEMAN, A. The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. 279–285, 2016.
- GARZÓN-OSPINA, D.; FORERO-RODRÍ GUEZ, J.; PATARROYO, M. A. Heterogeneous genetic diversity pattern in *Plasmodium vivax* genes encoding merozoite surface proteins (MSP) -7E, -7F and -7L. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 495, 2014.
- GARZÓN-OSPINA, D.; FORERO-RODRÍ GUEZ, J.; PATARROYO, M. A. Inferring natural selection signals in *Plasmodium vivax*-encoded proteins having a potential role in merozoite invasion. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 33, p. 182–188, 2015.
- GARZÓN-OSPINA, D.; LÓPEZ, C.; FORERO-RODRÍ GUEZ, J.; PATARROYO, M. A. Genetic Diversity and Selection in Three *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 7 (Pvmsp-7) Genes in a Colombian Population. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

GOMES, L. R.; OLIVEIRA, N. K. Almeida-de; LAVIGNE, A. R. de; LIMA, S. R. F. de; PINA-COSTA, A. de; BRASIL PATRÍ, c.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; MÉNARD, D.; CRUZ, M. D. F. Ferreira-da. Plasmodium vivax mdr1 genotypes in isolates from successfully cured patients living in endemic and non-endemic Brazilian areas. **Malaria Journal**, BioMed Central, v. 15, n. 1, p. 96, 2016.

GONÇALVES LÍ, g. A.; CRAVO, P.; FERREIRA, M. U. Emerging Plasmodium vivax resistance to chloroquine in South America : an overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. August, p. 534–539, 2014.

GONZALEZ-CERON, L.; MU, J.; SANTILLÁN, F.; JOY, D.; SANDOVAL, M. a.; CAMAS, G.; SU, X.; CHOY, E. V.; TORREBLANCA, R. Molecular and epidemiological characterization of Plasmodium vivax recurrent infections in southern Mexico. **Parasites & vectors**, v. 6, p. 109, 2013.

GRAF, P. C.; DURAND, S.; Alvarez Antonio, C.; MONTALVAN, C.; Galves Montoya, M.; GREEN, M. D.; SANTOLALLA, M. L.; SALAS, C.; LUCAS, C.; BACON, D. J.; FRYAUFF, D. J. Failure of Supervised Chloroquine and Primaquine Regimen for the Treatment of Plasmodium vivax in the Peruvian Amazon. **Malaria Research an Treatment**, v. 2012, p. 936067, 2012.

GREGSON, A.; PLOWE, C. V. Mechanisms of Resistance of Malaria Parasites to Antifolates. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 1, p. 117–145, 2005.

GRIFFING, S. M.; GAMBOA, D.; UDHAYAKUMAR, V. The history of 20th century malaria control in Peru. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 303, 2013.

GUNAWARDENA, S.; FERREIRA, M. U.; KAPILANANDA, G. M. G.; WIRTH, D. F.; KARUNAWEEERA, N. D. The Sri Lankan paradox: high genetic diversity in Plasmodium vivax populations despite decreasing levels of malaria transmission. **Parasitology**, v. 141, p. 880–890, 2014.

HERNÁNDEZ, D. C.; GUERRA, A. P.; MILENA, C. Z.; NICHOLLS, R. S.; BARRERA, S. M. Haplotypes associated with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in Plasmodium falciparum in two malaria endemic locations in Colombia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18, p. 183–190, 2013.

HORII, T.; SHIRAI, H.; JIE, L.; ISHII, K. J.; PALACPAC, N. Q.; TOUGAN, T.; HATO, M.; OHTA, N.; BOBOGARE, A.; ARAKAKI, N.; MATSUMOTO, Y.; NAMAZUE, J.; ISHIKAWA, T.; UEDA, S.; TAKAHASHI, M. Evidences of protection against blood-stage infection of Plasmodium falciparum by the novel protein vaccine SE36. **Parasitology International**, Elsevier Ireland Ltd, v. 59, n. 3, p. 380–386, 2010.

HUPALO, D. N.; LUO, Z.; MELNIKOV, A.; SUTTON, P. L.; ROGOV, P.; ESCALANTE, A.; VALLEJO, A. F.; HERRERA, S.; ARÉVALO-HERRERA, M.; FAN, Q.; WANG, Y.; CUI, L.; LUCAS, C. M.; DURAND, S.; SANCHEZ, J. F.; BALDEVIANO, G. C.; LESCOANO, A. G.; LAMAN, M.; GAMBOA, D.; KOSEK, M.; VINETZ, J. M.; GONZÁLEZ-CERÓN, L.; BIRREN, B. W.; NEAFSEY, D. E.; CARLTON, J. M. Population genomics studies identify signatures of global dispersal and drug resistance in Plasmodium vivax. **Nature Genetics**, v. 48, n. May, p. 953–959, 2016.

HYDE, J. E. The dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase gene in the drug resistance of malaria parasites. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 48, n. 1, p. 45–59, 1990. ISSN 01637258.

IMWONG, M.; NAIR, S.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; SUDIMACK, D.; WILLIAMS, J. T.; MAYXAY, M.; NEWTON, P. N.; KIM, J. R.; NANDY, A.; OSORIO, L.; CARLTON, J. M.; WHITE, N. J.; DAY, N. P. J.; ANDERSON, T. J. C. Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 8-9, p. 1013–1022, 2007.

IMWONG, M.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; RÉNIA, L.; LETOURNEUR, F.; CHARLIEU, J.-p.; LOOAREESUWAN, S.; NICHOLAS, J.; SNOUNOU, G.; RE, L.; LEARTSAKULPANICH, U. Novel Point Mutations in the Dihydrofolate Reductase Gene of *Plasmodium vivax* : Evidence for Sequential Selection by Drug Pressure Novel Point Mutations in the Dihydrofolate Reductase Gene of *Plasmodium vivax* : Evidence for Sequential Selection by Drug Pr. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 1514–1521, 2003.

JOMBART, T. Analysing genome-wide SNP data using adegenet. **Software User Manual**, p. 1–37, 2012.

JOSHI, H.; PRAJAPATI, S. K.; VERMA, A.; KANG'A, S.; CARLTON, J. M. *Plasmodium vivax* in India. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 5, p. 228–235, 2008.

JOY, D. A.; GONZALEZ-CERON, L.; CARLTON, J. M.; GUEYE, A.; FAY, M.; MCCUTCHAN, T. F.; SU, X. Z. Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax* malaria. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 6, p. 1245–1252, 2008.

KARUNAWEEERA, N. D.; FERREIRA, M. U.; MUNASINGHE, A.; BARNWELL, J. W.; COLLINS, W. E.; KING, C. L.; KAWAMOTO, F.; HARTL, D. L.; WIRTH, D. F. Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Gene**, v. 410, n. 1, p. 105–112, 2008.

KOEPFLI, C.; RODRIGUES, P. T.; ANTAO, T.; ORJUELA-SÁNCHEZ, P.; EEDE, P. V. D.; GAMBOA, D.; HONG, N. V.; BENDEZU, J. *Plasmodium vivax* Diversity and Population Structure across Four Continents. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2015.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, 2012. ISSN 1548-7105.

LARRAÑAGA, N.; MEJÍA, R. E.; HORMAZA, J. I.; MONTOYA, A.; SOTO, A.; FONTECHA, G. A. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* populations across the Honduras-Nicaragua border. **Malaria Journal**, v. 12, p. 354, 2013.

LEE, K. S.; KIM, T. H.; KIM, E. S.; LIM, H.-s.; YEOM, J.-s.; JUN, G.; PARK, J.-w. Short Report : Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea. **The American Journal of Tropical Medicine and Health**, v. 80, n. 2, p. 215–217, 2009.

LI, H.; HANDSAKER, B.; WYSOKER, A.; FENNEL, T.; RUAN, J.; HOMER, N.; MARTH, G.; ABECASIS, G.; DURBIN, R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 2009.

LIU, W.; LI, Y.; SHAW, K. S.; LEARN, G. H.; PLENDERLEITH, L. J.; MALENKE, J. a.; SUNDARARAMAN, S. a.; RAMIREZ, M. a.; CRYSTAL, P. a.; SMITH, A. G.; BIBOLLET-RUCHE, F.; AYOUBA, A.; LOCATELLI, S.; ESTEBAN, A.; MOUACHA, F.; GUICHET, E.; BUTEL, C.; AHUKA-MUNDEKE, S.; INOGWABINI, B.-I.; NDJANGO, J.-B. N.; SPEEDE, S.; SANZ, C. M.; MORGAN, D. B.; GONDER, M. K.; KRANZUSCH, P. J.; WALSH, P. D.; GEORGIEV, A. V.; MULLER, M. N.; PIEL, A. K.; STEWART, F. a.; WILSON, M. L.; PUSEY, A. E.; CUI, L.; WANG, Z.; FÄ RNERT, A.; SUTHERLAND, C. J.; NOLDER, D.; HART, J. a.; HART, T. B.; BERTOLANI, P.; GILLIS, A.; LEBRETON, M.; TAFON, B.; KIYANG, J.; DJOKO, C. F.; SCHNEIDER, B. S.; WOLFE, N. D.; MPOUDI-NGOLE, E.; DELAPORTE, E.; CARTER, R.; CULLETON, R. L.; SHAW, G. M.; RAYNER, J. C.; PEETERS, M.; HAHN, B. H.; SHARP, P. M. African origin of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Nature Communications**, v. 5, p. 3346, 2014.

LIU, Y.; AUBURN, S.; CAO, J.; TRIMARSANTO, H.; ZHOU, H.; GRAY, K.-A.; CLARK, T. G.; PRICE, R. N.; CHENG, Q.; HUANG, R.; GAO, Q. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium vivax* in Central China. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 262, 2014.

LUXEMBURGER, C.; PEREA, W. A.; DELMAS, G.; PRUJA, C.; PECOU1, B.; MOREN, A. Permethrin-impregnated bed nets for the prevention of malaria in schoolchildren on the thai-burmese border. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 2, p. 155–159, 1994.

MalariaGen. Malaria Genomic Epidemiology Network. Banco de Dados. Disponível em: <<https://www.malariagen.net/projects>>. acesso em: 05 jan. 2016.

MAP. Malaria Atlas Project. Banco de Dados. Disponível em: <<http://www.map.ox.ac.uk/>>. acesso em: 12 jul. 2016.

MARQUES, M. M.; COSTA, M. R. F.; Santana Filho, F. S.; VIEIRA, J. L. F.; NASCIMENTO, M. T. S.; BRASIL, L. W.; NOGUEIRA, F.; SILVEIRA, H.; REYES-LECCA, R. C.; MONTEIRO, W. M.; LACERDA, M. V. G.; ALECRIM, M. G. C. *Plasmodium vivax* chloroquine resistance and anemia in the western brazilian amazon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 342–347, 2014.

MARTHA, S. J.; NOMURA, T.; NEVES, J. D. A.; BAIRD, J. K.; WELLEMS, T. E.; Del Portillo, H. A. *Plasmodium vivax*: Allele variants of the *mdr1* gene do not associate with chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papua, and monkey-adapted strains. **Experimental Parasitology**, v. 109, n. 4, p. 256–259, 2005.

MCKENNA, A.; HANNA, M.; BANKS, E.; SIVACHENKO, A.; CIBULSKIS, K.; KERNYTSKY, A.; GARIMELLA, K.; ALTSHULER, D.; GABRIEL, S.; DALY, M.; DEPRISTO, M. A. The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Research**, v. 20, n. 9, p. 1297–1303, 2010.

MELO, G. C.; MONTEIRO, W. M.; SIQUEIRA, A. M.; SILVA, S. R.; MAGALHÃES, B. M. L.; ALENCAR, A. C. C.; KUEHN, A.; Del Portillo, H. A.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; LACERDA, M. V. G. Expression levels of *pvcrt-o* and *pvm-dr-1* are associated with chloroquine resistance and severe *Plasmodium vivax* malaria in patients of the Brazilian Amazon. **PLoS One**, v. 9, n. 8, 2014.

MENEGON, M.; DURAND, P.; MENARD, D.; LEGRAND, E.; PICOT, S.; NOUR, B.; DAVIDYANTS, V.; SANTI, F.; SEVERINI, C. Genetic diversity and population structure of

*Plasmodium vivax* isolates from Sudan, Madagascar, French Guiana and Armenia. **Infection, Genetics and Evolution**, Elsevier B.V., v. 27, p. 244–249, 2014.

MOBEGI, V. A.; LOUA, K. M.; AHOUIDI, A. D.; SATOGUINA, J.; NWAKANMA, D. C.; AMAMBUA-NGWA, A.; CONWAY, D. J. Population genetic structure of *Plasmodium falciparum* across a region of diverse endemicity in West Africa. **Malaria Journal**, v. 11, p. 223, 2012.

NEAFSEY, D. E.; GALINSKY, K.; JIANG, R. H. Y.; YOUNG, L.; SYKES, S. M.; SAIF, S.; GUJJA, S.; GOLDBERG, J. M.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; CHAPMAN, S. B.; DASH, A. P.; ANVIKAR, A. R.; SUTTON, P. L.; BIRREN, B. W.; ESCALANTE, A. a.; BARNWELL, J. W.; CARLTON, J. M. The malaria parasite *Plasmodium vivax* exhibits greater genetic diversity than *Plasmodium falciparum*. **Nature Genetics**, Nature Publishing Group, v. 44, n. 9, p. 1046–50, 2012.

NEAFSEY, D. E.; SCHAFFNER, S. F.; VOLKMAN, S. K.; PARK, D.; MONTGOMERY, P.; MILNER, D. A.; LUKENS, A.; ROSEN, D.; DANIELS, R.; HOUDE, N.; CORTESE, J. F.; TYNDALL, E.; GATES, C.; STANGE-THOMANN, N.; SARR, O.; NDIAYE, D.; NDIR, O.; MBOUP, S.; FERREIRA, M. U.; MORAES, S. d. L.; DASH, A. P.; CHITNIS, C. E.; WIEGAND, R. C.; HARTL, D. L.; BIRREN, B. W.; LANDER, E. S.; SABETI, P. C.; WIRTH, D. F. Genome-wide SNP genotyping highlights the role of natural selection in *Plasmodium falciparum* population divergence. **Genome Biology**, v. 9, n. 12, p. 171, 2008.

OAKLEY, M. S. M.; KUMAR, S.; ANANTHARAMAN, V.; ZHENG, H.; MAHAJAN, B.; HAYNES, J. D.; MOCH, J. K.; FAIRHURST, R.; MCCUTCHAN, T. F.; ARAVIND, L. Molecular factors and biochemical pathways induced by febrile temperature in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* parasites. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 4, p. 2012–2025, 2007.

OCHOLLA, H.; PRESTON, M. D.; MIPANDO, M.; JENSEN, A. T. R.; CAMPINO, S.; MACINNIS, B.; ALCOCK, D.; TERLOUW, A.; ZONGO, I.; OUDRAOGO, J. B.; DJIMDE, A. A.; ASSEFA, S.; DOUMBO, O. K.; BORRMANN, S.; NZILA, A.; MARSH, K.; FAIRHURST, R. M.; NOSTEN, F.; ANDERSON, T. J. C.; KWIATKOWSKI, D. P.; CRAIG, A.; CLARK, T. G.; MONTGOMERY, J. Whole-genome scans provide evidence of adaptive evolution in malawian *Plasmodium falciparum* isolates. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 12, p. 1991–2000, 2014.

ORJUELA-SÁNCHEZ, P.; KARUNAWEEERA, N. D.; SILVA-NUNES MÔ, n. da; SILVA, N. S. da; SCOPEL, K. K. G.; GONÇALVES, R. M.; AMARATUNGA, C.; M, S. J.; SOCHEAT, D.; FAIRHURST, R. M.; GUNAWARDENA, S.; THAVAKODIRASAH, T.; GALAPATHTHY, G. L. N.; ABEYSINGHE, R.; KAWAMOTO, F.; WIRTH, D. F.; FERREIRA, M. U. Single-nucleotide polymorphism, linkage disequilibrium and geographic structure in the malaria parasite *Plasmodium vivax*: prospects for genome-wide association studies. **BMC Genetics**, v. 11, p. 65, 2010.

ORJUELA-SÁNCHEZ, P.; M., S. J.; BRANDI, M. C. C.; RODRIGUES, P. T.; BASTOS, M. S.; AMARATUNGA, C.; DUONG, S.; FAIRHURST, R. M.; FERREIRA, M. U. Higher microsatellite diversity in *Plasmodium vivax* than in sympatric *Plasmodium falciparum* populations in Pursat, Western Cambodia. **Experimental Parasitology**, v. 134, n. 3, p. 318–326, 2013.

OSORIO, L.; PÉREZ, P.; GONZÁLEZ, I. J. Evaluación de la eficacia de los medicamentos antimaláricos en Tarapacá, Amazonas colombiano. **Biomédica**, v. 27, p. 133–140, 2007.

PACHECO M ANDREÍ, n.; ELANGO, A. P.; RAHMAN, A. A.; FISHER, D.; COLLINS, W. E.; BARNWELL, J. W.; ESCALANTE, A. A. Infection , Genetics and Evolution Evidence of purifying selection on merozoite surface protein 8 ( MSP8 ) and 10 ( MSP10 ) in Plasmodium spp . **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 978–986, 2012.

PAYSEUR, B. A.; JING, P.; HAASL, R. J. A genomic portrait of human microsatellite variation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 1, p. 303–312, 2011.

PEARSON, R. D.; AMATO, R.; AUBURN, S.; MIOTTO, O.; ALMAGRO-GARCIA, J.; AMARATUNGA, C.; SUON, S.; MAO, S.; NOVIYANTI, R.; TRIMARSANTO, H.; MARFURT, J.; ANSTEY, N. M.; WILLIAM, T.; BONI, M. F.; DOLECEK, C.; TRAN, H. T.; WHITE, N. J.; MICHON, P.; SIBA, P.; TAVUL, L.; HARRISON, G.; BARRY, A.; MUELLER, I.; FERREIRA, M. U.; KARUNAWEEERA, N.; RANDRIANARIVELOJOSIA, M.; GAO, Q.; HUBBART, C.; HART, L.; JEFFERY, B.; DRURY, E.; MEAD, D.; KEKRE, M.; CAMPINO, S.; MANSKE, M.; CORNELIUS, V. J.; MACINNIS, B.; ROCKETT, K. A.; MILES, A.; RAYNER, J. C.; FAIRHURST, R. M.; NOSTEN, F.; PRICE, R. N.; KWIATKOWSKI, D. P. Genomic analysis of local variation and recent evolution in Plasmodium vivax. **Nature Genetics**, Advanced o, n. 8, p. 959–964, 2016.

PICARD TOOLS. Version 2.0.1. Broad Institute. Software. Disponível em: <<http://broadinstitute.github.io/picard/>>. Acesso em: 12 jul . 2016.

PLASMODB. Plasmodium Database. Banco de Dados. Disponível em: <<http://broadinstitute.github.io/picard/>>. acesso em: 06 jan. 2016.

PORNTHANAKASEM, W.; RIANGRUNGROJ, P.; CHITNUMSUB, P.; ITTARAT, W.; KONGKASURIYACHAI, D.; UTHAIPIBULL, C. Role of Plasmodium vivax Dihydropteroate Synthase Polymorphisms in Sulfa Drug Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 4453–4463, 2016.

PRICE, R. N.; DOUGLAS, N. M.; ANSTEY, N. M. New developments in Plasmodium vivax malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 22, p. 430–435, 2009.

PRICE, R. N.; TJITRA, E.; GUERRA, C. A.; YEUNG, S.; WHITE, N. J.; ANSTEY, N. M. Vivax malaria: Neglected and not benign. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 79–87, p. 220–227, 2007.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 2000.

PURCELL, S.; NEALE, B.; TODD-BROWN, K.; THOMAS, L.; FERREIRA, M. A. R.; BENDER, D.; MALLER, J.; SKLAR, P.; BAKKER, P. I. W. de; DALY, M. J.; SHAM, P. C. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 3, p. 559–575, 2007.

RAMIREZ, A. P.; BUITRAGO, J. I. G.; Pimentel González, J. P.; Herrera Moráles, A.; CARRASQUILLA, G. Frequency and tendency of malaria in Colombia, 1990 to 2011: a descriptive study. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 202, 2014.

REID, H.; VALLELY, A.; TALEO, G.; TATEM, A. J.; KELLY, G.; RILEY, I.; HARRIS, I.; HENRI, I.; IAMAHER, S.; CLEMENTS, A. C. A. Baseline spatial distribution of malaria prior to an elimination programme in Vanuatu. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 150, 2010.

REZENDE, A. M.; TARAZONA-SANTOS, E.; FONTES, C. J. F.; SOUZA, J. M.; COUTO, A. D. A.; CARVALHO, L. H.; BRITO, C. F. A. Microsatellite loci: Determining the genetic variability of *Plasmodium vivax*. **Tropical Medicine and International Health**, v. 15, n. 6, p. 718–726, 2010.

ROY, S. W.; WEEDALL, G. D.; SILVA, R. L. da; POLLEY, S. D.; FERREIRA, M. U. Sequence diversity and evolutionary dynamics of the dimorphic antigen merozoite surface protein-6 and other *Msp* genes of *Plasmodium falciparum*. **Gene**, v. 443, n. 1-2, p. 12–21, 2009.

RUNGSIHIRUNRAT, K.; SIBLEY, C. H.; MUNGTHIN, M.; NA-BANGCHANG, K. Geographical distribution of amino acid mutations in *Plasmodium vivax* DHFR and DHPS from malaria endemic areas of Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 3, p. 462–467, 2008.

RUSSELL, B.; SUWANARUSK, R.; LEK-UTHAI, U. *Plasmodium vivax* genetic diversity: microsatellite length matters. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 399–401, 2006.

RUVALCABA-SALAZAR, O. K.; RAM, C.; VARGAS, M.; HERN, R. Recombinant and native *Plasmodium falciparum* TATA-binding-protein binds to a specific TATA box element in promoter regions. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 140, p. 183–196, 2005.

SACHIDANANDAM, R.; WEISSMAN, D.; SCHMIDT, S. C.; KAKOL, J. M.; STEIN, L. D.; MARTH, G.; SHERRY, S.; MULLIKIN, J. C.; MORTIMORE, B. J.; WILLEY, D. L.; HUNT, S. E.; COLE, C. G.; COGGILL, P. C.; RICE, C. M.; NING, Z.; ROGERS, J.; BENTLEY, D. R.; KWOK, P. Y.; MARDIS, E. R.; YEH, R. T.; SCHULTZ, B.; COOK, L.; DAVENPORT, R.; DANTE, M.; FULTON, L.; HILLIER, L.; WATERSTON, R. H.; MCPHERSON, J. D.; GILMAN, B.; SCHAFFNER, S.; Van Etten, W. J.; REICH, D.; HIGGINS, J.; DALY, M. J.; BLUMENSTIEL, B.; BALDWIN, J.; STANGE-THOMANN, N.; ZODY, M. C.; LINTON, L.; LANDER, E. S.; ALTSHULER, D. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 928–933, 2001.

SAMAD, H.; COLL, F.; PRESTON, M. D.; OCHOLLA, H.; FAIRHURST, R. M.; CLARK, T. G. Imputation-Based Population Genetics Analysis of *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 4, 2015.

SANTANA-FILHO, F. S. de; ARCANJO, A. R.; CHEHUAN, Y. M.; COSTA, M. R.; MARTINEZ-ESPINOSA, F. E.; VIEIRA, J. L.; BARBOSA, M.; ALECRIM, W. D.; ALECRIM, M. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1125–1126, 2007.

SCHOUSBOE, M. L.; RANJITKAR, S.; RAJAKARUNA, R. S.; AMERASINGHE, P. H.; KONRADSEN, F.; MORALES, F.; ORD, R.; PEARCE, R.; LESLIE, T.; ROWLAND, M.; GADALLA, N.; BYGBJERG, I. C.; ALIFRANGIS, M.; ROPER, C. Global and local genetic diversity at two microsatellite loci in *Plasmodium vivax* parasites from Asia, Africa and South America. **Malaria Journal**, v. 13, p. 392, 2014.

SCHULTZ, L.; WAPLING, J.; MUELLER, I.; NTSUKE, P. O.; SENN, N.; NALE, J.; KINIBORO, B.; BUCKEE, C. O.; TAVUL, L.; SIBA, P. M.; REEDER, J. C.; BARRY, A. E. Multilocus haplotypes reveal variable levels of diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* in Papua New Guinea, a region of intense perennial transmission. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 336, 2010.

- SIBLEY, C. H.; HYDE, J. E.; SIMS, P. F.; PLOWE, C. V.; KUBLIN, J. G.; MBERU, E. K.; COWMAN, a. F.; WINSTANLEY, P. a.; WATKINS, W. M.; NZILA, a. M. Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 12, p. 582–588, 2001.
- SINGH, V.; GUPTA, P.; PANDE, V. Revisiting the multigene families: *Plasmodium var* and *vir* genes. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 51, n. 2, p. 75–81, 2014.
- SNOUNOU, G.; WHITE, N. J. The co-existence of *Plasmodium*: Sidelights from *falciparum* and *vivax* malaria in Thailand. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 7, p. 333–339, 2004.
- SRA. Sequence Read Archive. Banco de Dados do National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>>. acesso em: 03 jan. 2016.
- SUTTON, P. L. A call to arms: on refining *Plasmodium vivax* microsatellite marker panels for comparing global diversity. **Malaria Journal**, v. 12, p. 447, 2013. ISSN 1475-2875.
- VANDENEDEE, P.; VANDERAUWERA, G.; DELGADO, C.; HUYSE, T.; SOTO-CALLE, V. E.; GAMBOA, D.; GRANDE, T.; RODRIGUEZ, H.; LLANOS-CUENTAS, A.; JOZEF, A.; ERHART, A.; D’ALESSANDRO, U. Multilocus genotyping reveals high heterogeneity and strong local population structure of the *Plasmodium vivax* population in the Peruvian Amazon. **Malaria Journal**, v. 9, p. 151, 2010.
- WANG, P.; READ, M.; SIMS, P. F.; HYDE, J. E. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. **Molecular microbiology**, v. 23, n. 5, p. 979–986, 1997.
- WEEDALL, G. D.; CONWAY, D. J. Detecting signatures of balancing selection to identify targets of anti-parasite immunity. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 7, p. 363–369, 2010.
- WESTENBERGER, S. J.; MCCLEAN, C. M.; CHATTOPADHYAY, R.; DHARIA, N. V.; CARLTON, J. M.; BARNWELL, J. W.; COLLINS, W. E.; HOFFMAN, S. L.; ZHOU, Y.; VINETZ, J. M.; WINZELER, E. A. A systems-based analysis of *Plasmodium vivax* lifecycle transcription from human to mosquito. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 4, 2010. ISSN 1935-2735.
- WHITE, N.; IMWONG, M. . Relapse. **Advances in Parasitology**, v. 80, p. 113–150, 2012.
- WHO. World Malaria report. 2012.
- WHO. World Malaria Report. 2014.

---

<sup>1</sup> De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.