PRISCILA THIHARA RODRIGUES

**GENOMAS MITOCONDRIAIS DE *Plasmodium vivax* E
A ORIGEM GEOGRÁFICA DA MALÁRIA IMPORTADA**

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 do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

PRISCILA THIHARA RODRIGUES

**GENOMAS MITOCONDRIAIS DE *Plasmodium vivax* E
A ORIGEM GEOGRÁFICA DA MALÁRIA IMPORTADA**

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 do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na biblioteca digital da USP (BDTD).

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Rodrigues, Priscila Thihara.

Genomas mitocondriais de *Plasmodium vivax* e a origem geográfica da malária importada / Priscila Thihara Rodrigues. - São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Genética de populações de *Plasmodium vivax*.

Versão do título para o inglês: Mitochondrial genomes of *Plasmodium vivax* and geographic origin of imported malaria.

1. Malária 2. *Plasmodium* 3. Doença parasitária 4. Genoma
5. Marcador molecular 6. Amplificação de genes I. Ferreira, Prof. Dr. Marcelo Urbano II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeira III. Título.

ICB/SBIB0174/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Priscila Thihara Rodrigues.

Título da Genomas mitocondriais de *Plasmodium vivax* e a origem geográfica da malária importada.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 27 de setembro de 2010.

PARECER 960/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 19.08.2010, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Dinâmica populacional de polimorfismos de Plasmodium vivax na Amazônia rural brasileira*" sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. MARCELO URBANO FERREIRA e aluna **PRISCILA THIHARA RODRIGUES**.

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **19.08.2011**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M. A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

*Aos meus pais que me apresentaram à importância
da família e o caminho da honestidade e persistência.
Pelo apoio incondicional, pelas noites de preocupação
e pelas alegrias que compartilhamos nesta vida...*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor **Marcelo Urbano Ferreira**, exemplo imensurável de ética, simplicidade, humildade, generosidade e inteligência. Obrigada pela orientação prestada neste trabalho e acima de tudo, pela confiança, apoio, ensinamentos, estímulo, paciência, durante a elaboração desta dissertação.

À **Melissa da Silva Bastos**, por todos os momentos compartilhados durante o período de mestrado. Obrigada por todos os ensinamentos científicos, pelo incentivo, pela companhia de bancada, pelos protocolos padronizados... Obrigada pela disposição em me ajudar sempre e por sua amizade verdadeira!!!

À **Maria José Menezes (Zezé)**, por todo suporte prestado durante a execução deste projeto. Obrigada pela amizade, por todo incentivo e pela confiança depositada em mim.

À **Michelle Cristina do Couto Brandi**, companheira de mestrado, sempre disposta a me ajudar a desvendar os mistérios de uma PCR e das análises de bioinformática. Obrigada pela amizade, pela companhia de bancada.

Às amigas de ontem e sempre **Vanessa Cristina Nicolete, Amanda Begosso Gozze e Bianca Cechetto Carlos**. Vocês são pessoas raras e mais que especiais. Obrigada pelo companheirismo, pela amizade, pelo convívio, seja no laboratório ou em cada “fugidinha” entre intervalos de reação, pelas horas de estudos que passamos juntas e por todos os ensinamentos pessoais e científicos. Obrigada por tornarem meus dias mais felizes!

Às colegas de laboratório **Nathália Lima Ferreira, Rosa Del Carmem Miluska, Raquel Muller Gonçalves, Simone Ladeia Andrade, Camilla Luiza Batista**, por todos os ensinamentos científicos e pelos bons momentos vividos no laboratório que tornaram meus dias mais agradáveis.

Aos pesquisadores colaboradores: **Alexandre Januário da Silva, Richard M. Fairhurst, Nadira D. Karunaweera, José E. Calzada**, por ter cedido às amostras de *P. vivax* utilizadas neste estudo.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Parasitologia, em especial à **Carmen Takata** e **Márcio Yamamoto**, por sua imensa e boa disposição com o sequenciamento, além de todos os ensinamentos e dicas científicas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de Mestrado concedida.

Aos meus pais **Audenil Rodrigues Peres** e **Maruta Hatsue Thihara Rodrigues**, vocês são meu alicerce, minha inspiração. Obrigada por sempre me incentivarem perante os desafios, a fazer mais e melhor, por acreditarem em mim e me ensinarem a ter paciência frente aos obstáculos, quero partilhar convosco a alegria de os conseguir vencer continuamente!

Ao meu irmão **Flávio Thihara Rodrigues**, cuja presença em minha vida é de importância ímpar. Obrigada pela amizade, companheirismo e incentivo.

Ao meu companheiro e eterno namorado **Edmar do Monte Braga**, ouvinte atento de dúvidas, inquietações, desânimos e sucesso. Obrigada pelo apoio, amizade, pela confiança e pela valorização sempre tão entusiasmada do meu trabalho, dando-me, desta forma, coragem para ultrapassar todas as barreiras.

E principalmente, agradeço a **Deus**, pela vida, proteção, força espiritual e física, por me sustentar e me capacitar a fazer este trabalho e alcançar mais uma vitória.

Muito obrigada!!!

*“... Foi o tempo que investiste em tua rosa que fez
tua rosa tão importante...”*

Pequeno Príncipe – Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

RODRIGUES, P. T. **Genomas mitocondriais de *Plasmodium vivax* e a origem geográfica da malária importada**. 2012. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Plasmodium vivax, um é parasito da malária humana que atinge a população da América Central, América do Sul, Oriente Médio, Sul, Sudeste e Centro da Ásia, Oceania e África Oriental, onde 3,3 bilhões de pessoas estão atualmente em risco de infecção e 70-80 milhões casos clínicos são relatados a cada ano. Em áreas livres de malária, a malária é o patógeno importado mais proeminente. Casos de malária importada, contraídos em região endêmica, mas diagnosticados em um país não-endêmico, são um evento raro mas com desfecho potencialmente fatal. Técnicas de tipagem moleculares podem auxiliar na identificação da origem geográfica da malária importada. Nosso objetivo foi investigar se a análise de genomas mitocondriais permite inferir a origem geográfica de casos importados de malária vivax diagnosticados nos Estados Unidos, comparando os resultados com aqueles obtidos por análise de DNA microssatélite. Foi sequenciado o genoma mitocondrial completo de 63 amostras de *P. vivax* provenientes de infecções importadas diagnosticadas pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, EUA), além de 7 amostras do Brasil e 6 do Panamá. A tipagem de DNA microssatélite foi empregada como uma segunda abordagem para determinar os padrões regionais de polimorfismo de amostras de *P. vivax*. A rede de haplótipos com DNA mitocondrial foi construída com o programa Network, combinando 336 sequências genômicas disponíveis no banco de dados GenBank com 63 sequências deste estudo. Foi possível classificar com precisão a origem geográfica presumida dos isolados da América do Sul, Coreia, Sudeste Asiático e Melanésia, porém os isolados do Sul da Ásia, América Central e África não puderam ser classificados geograficamente. A análise bayesiana realizada com a tipagem de marcadores de microssatélites não apresentou sucesso quanto à classificação geográfica dos isolados de *P. vivax*. Além disso, estes métodos de tipagem estão muito sujeitos a variação entre laboratórios, reduzindo as possibilidades de comparação de resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa com o mesmo conjunto de marcadores.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium vivax*. Infecção importada. Genoma mitocondrial. Microssatélite.

ABSTRACT

RODRIGUES, P. T. **Mitochondrial genomes of *Plasmodium vivax* and geographic origin of imported malaria**. 2012. 103 p. Master's thesis (Biology of the Relation Pathogen-Host) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The human malaria parasite *Plasmodium vivax* affects the population of Central America, South America, Middle East, South, Southeast and Central Asia, Oceania and East Africa, where 3.3 billion people are currently at risk of infection and 70-80 million clinical cases are reported each year. In malaria-free areas, malaria parasites are the most prominent imported pathogen. Cases of imported malaria (infection acquired in an endemic region, but diagnosed in a non-endemic country) are rare, but can lead to a fatal outcome. Molecular techniques can be used to identify the geographic origin of imported cases of malaria. Our objectives were (a) to investigate whether the analysis of mitochondrial genomes allows inferring the geographic origin of isolates of *P. vivax* derived from cases of imported malaria diagnosed in the United States, and (b) to compare the performance of mitochondrial genome and DNA microsatellite analysis in determining the geographic origin of imported *P. vivax* infections. We sequenced full mitochondrial genomes from 63 *P. vivax* isolates collected at the CDC (Atlanta, USA) from imported infections, and 7 samples from Brazil and 6 Panama. Limited microsatellite DNA typing was used as a second approach to determine regional patterns of polymorphism samples of *P. vivax*. A network of mitochondrial DNA haplotypes was built with the program Network, combining 336 genomic sequences available in the GenBank database with 63 sequences from this study. We were able to classify accurately isolates from South America, Korea, Southeast Asia and Melanesia according to their presumed geographic origin, but failed to do so with samples from South Asia, Central America and Africa. A Bayesian analysis of microsatellite haplotypes failed to group parasites according to their continents of origin, possibly as a result of the extremely high mutation rate of this molecular marker. Furthermore, microsatellite analysis is subject to wide variation among laboratories, limiting our ability to compare results obtained by different research groups with the same set of markers.

Keywords: Malaria. *Plasmodium vivax*. Imported infection. Mitochondrial genome. Microsatellite.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição das áreas sob risco de transmissão de malária no mundo, em 2010.....	21
Figura 2 – Número de mortes por malária importada entre turistas, refugiados, militares, entre outros, registradas nos Estados Unidos entre os anos de 1963 a 2001.....	23
Figura 3 – Casos de malária importada na Europa entre os anos de 1980 e 2011.....	25
Figura 4 – Organização do genoma mitocondrial de <i>P. vivax</i> . Genes que codificam proteínas mitocondriais (CoI, CoIII, Cby).....	28
Figura 5 – Árvore filogenética construída a partir do genoma mitocondrial completo de parasito de primata do Sudeste Asiático, <i>P. simium</i> e <i>P. gonderi</i> (grupo externo).....	29
Figura 6 – Localização geográfica presumida dos isolados com infecção importada por <i>P. vivax</i> cedidas pelo CDC.....	37
Quadro 1 – Sequências de <i>primers</i> e sondas do tipo TaqMan [®] marcadas com VIC (P1) e FAM (P2) para a tipagem de SNPs a partir do DNA mitocondrial de <i>P. vivax</i>	54
Figura 7 – Rede de haplótipos mostrando a relação entre populações de <i>P. vivax</i>	61
Figura 8 – Análise bayesiana com o programa Structure v. 2.3.1 contendo a tipagem de 13 marcadores de microssatélites com 779 isolado e com valor de $k=5$	67
Figura 9 - Estrutura populacional de <i>P. vivax</i> construída com Structure v. 2.3.1 contendo a tipagem de 13 marcadores de microssatélites de 842 isolados com $k=6$	73
Figura 10 – Representação da discriminação alélica do ensaio 1 com sondas TaqMan [®]	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Localização geográfica presumida dos isolados coletados no CDC entre 2004 e 2008.....	38
Tabela 2 – <i>Primers</i> para amplificação do genoma mitocondrial de <i>P. vivax</i>	42
Tabela 3 – Sequências de <i>primers</i> para o sequenciamento do genoma mitocondrial completo de <i>P. vivax</i>	44
Tabela 4 – Origem de sequências do genoma mitocondrial de <i>P. vivax</i> disponíveis atualmente no GenBank e sequenciadas neste estudo.....	47
Tabela 5 – Oligonucleotídeos iniciadores dos 13 MSTs de <i>P. vivax</i> utilizadas na tipagem.....	50
Tabela 6 – Sequências de gene sintéticos utilizada nos ensaios TaqMan® como controle negativo.....	55
Tabela 7 – Análise de variância molecular (AMOVA) a partir do genoma mitocondrial de <i>P. vivax</i> em quatro grupos – África, América, Ásia e Melanésia.....	63
Tabela 8 – Análise da distância evolutiva a partir do genoma mitocondrial de <i>P. vivax</i> agrupados em sete regiões: África, Oriente Médio, América, Sul da Ásia, Sudeste Asiático, Melanésia e China e Coreia.....	64
Tabela 9 – Dados gerados pelo programa Structure v. 2.3.1 contendo a localização geográfica de cada isolado coletados no CDC entre os anos de 2004 e 2008.....	69
Tabela 10 – Descrição dos cinco SNPs ao longo do genoma mitocondrial de <i>P. vivax</i> tipados neste estudo.....	74
Tabela 11 – Análises dos resultados dos ensaios de genotipagem com sondas marcadas (TaqMan®).....	77
Tabela 12 – Dados de tipagem molecular com 13 microsatélites em isolados de <i>P. vivax</i>	80

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A – Adenina

AMOVA – Análise de Variância Molecular

C - Citocina

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

CoI – Citocromo c oxidase subunidade I

CoIII – Citocromo c oxidase subunidade III

Cyb – Citocromo b

d - Distância

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP - desoxirribonucleotídeo trifosfatado

EUA – Estados Unidos da América

G - Guanina

g – gravidade

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas

Kb – Kilobases

l – litro

Mb – Megabases

MGB - Minor Groove Binder

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MJ – Median-joining

MSATs - Microsatélites

MSP-1 – Proteína de superfície de merozoíto 1

n – Tamanho amostral

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em cadeia da polimerase

p – nível de significância

pb – Pares de bases

pg – picograma

pmol – picomol

RNA - Ácido ribonucleico

rRNA - Ácido ribonucleico ribossômico

S.E. - Erro padrão

SNPs - Single-nucleotide-polymorphisms

T - Timina

U - Unidade

USP - Universidade de São Paulo

WGA - Whole-Genome-Amplification

WHO - World Health Organization

°C - Grau Celsius

μl - Microlitro

μM - Micro molar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Malária: aspectos gerais	18
1.2 A malária no mundo	20
1.3 A malária importada	22
1.3.1 Malária importada nos Estado Unidos	26
1.4 O genoma mitocondrial de <i>P. vivax</i>	27
1.5 O genoma mitocondrial em estudos filogenéticos e populacionais de <i>P. vivax</i>	28
1.6 Outros marcadores genéticos para estudo populacionais	30
1.6.1 <i>Microsatélites</i>	30
1.6.2 <i>Polimorfismos de base única (SNPs)</i>	31
2 OBJETIVOS	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Aspectos éticos	36
3.2 Área de estudo e amostras de DNA de <i>P. vivax</i>	36
3.2.1 <i>Amostras de infecção importada de <i>P. vivax</i> cedidas pelo CDC</i>	36
3.2.2 <i>Amostras de Pursat, Camboja</i>	39
3.2.3 <i>Amostras de Tricomalee, Sri Lanka</i>	40
3.2.4 <i>Amostras do Panamá</i>	40
3.2.5 <i>Amostras do Brasil</i>	40
3.3 Amplificação genômica de <i>P. vivax</i>	41
3.4 Sequenciamento do genoma mitocondrial completo de <i>P. vivax</i>	42
3.4.1 <i>Amplificação e purificação do genoma mitocondrial de <i>P. vivax</i></i>	42
3.4.2 <i>Sequenciamento de fragmentos de DNA mitocondrial</i>	43
3.4.3 <i>Precipitação das reações de sequenciamento</i>	45
3.4.4 <i>Montagem de "contigs"</i>	45
3.5 Origem de sequências adicionais de genoma mitocondrial de <i>P. vivax</i>	45

3.6 Análise de dados de genoma mitocondrial	47
3.7 Análise de dados de DNA microsatélite	49
3.7.1 <i>Tipagem de DNA microsatélite</i>	49
3.7.2 <i>Construção do banco de dados</i>	51
3.7.3 <i>Análise da estrutura populacional</i>	52
3.8 Análise de polimorfismos mitocondriais selecionados	53
3.8.1 <i>Seleção de polimorfismos e desenho dos ensaios de tipagem</i>	53
3.8.2 <i>Controle positivo – gene sintético</i>	54
3.8.3 <i>Padronização do ensaio de genotipagem</i>	56
3.8.4 <i>Obtenção de dados</i>	57
4 RESULTADOS	58
4.1 Análise do genoma mitocondrial de <i>P. vivax</i>	59
4.2 Análise de redes de haplótipos mitocondriais	59
4.3 Análise de variância molecular (AMOVA)	62
4.4 Análise da diversidade genética em genomas mitocondriais	63
4.5 Análise de DNA microsatélite	64
4.6 Genotipagem de SNPs por metodologia TaqMan®	74
4.7 Análise de tipagem molecular por microsatélites	79
5 DISCUSSÃO	82
5.1 Estrutura geográfica de <i>P. vivax</i>	83
5.1.1 <i>Estrutura populacional de <i>P. vivax</i> com base no genoma mitocondrial</i>	83
5.1.2 <i>Estrutura populacional com base em microsatélites</i>	84
5.1.3 <i>Origem das populações americanas de <i>P. vivax</i></i>	86
5.2 Origem geográfica de <i>P. vivax</i> baseado em marcadores moleculares.....	88
5.3 Polimorfismos do DNA mitocondrial e a diversidade genética.....	89
6 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária: aspectos gerais

A malária humana é provavelmente tão antiga quanto a humanidade. Ao longo da história, registros de febre periódica sugestivos de malária, bem como a identificação de material parasitário com sondas moleculares em ossos e outros tecidos de múmias, demonstram que a doença acometeu a civilização chinesa, egípcia e grega antes de Cristo. Há também evidência de malária no sudeste da Europa na época do Império Romano, com grande impacto na morbimortalidade da população (RETIEF; CILLIERS, 2006; SALLARES et al., 2004).

A malária é uma das principais doenças parasitárias da atualidade, com 130-400 milhões de casos anuais, sendo causada por parasitos do gênero *Plasmodium*. Há cinco agentes etiológicos causadores de infecção em seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). *Plasmodium falciparum* predomina na África, sendo a espécie encontrada em 80-90% das infecções nesse continente. *Plasmodium malariae* é a segunda espécie mais prevalente, e *P. ovale* é relativamente incomum. Nas Américas, *P. vivax* tornou-se a espécie predominante; as demais espécies prevalentes são *P. falciparum* e *P. malariae*. Uma quinta espécie, *P. knowlesi*, é um parasito típico de macacos do Velho Mundo que pode infectar seres humanos, especialmente no Sudeste Asiático (COX-SINGH et al., 2010).

Mais de 85% desses casos ocorrem nas áreas de savana e floresta equatorial da África ao sul do Saara; nessa região, cerca de um milhão de pessoas, principalmente crianças abaixo de cinco anos de idade e gestantes, morrem de malária a cada ano. Classicamente observa-se uma doença febril aguda, em que podem ocorrer os acessos palúdicos típicos. Os paroxismos iniciam-se com calafrios, acompanhados de mal estar, cefaléia e dores musculares e articulares. Náuseas e vômitos são sintomas frequentes, podendo também ocorrer dor abdominal intensa. Em algumas horas inicia-se febre alta, que produz adinamia e prostração. A esta fase segue-se um período de sudorese profusa, com melhora progressiva do

estado geral. Nas infecções por *P. ovale*, *P. malariae* e *P. vivax*, predomina a forma não-complicada da doença. Nas infecções por *P. falciparum*, as manifestações clínicas podem ser graves, caracterizando a forma complicada da doença, potencialmente letal (MILLER et al., 2002).

A transmissão natural da malária humana ocorre quando fêmeas de mosquitos anofelinos inoculam no hospedeiro vertebrado, durante seu repasto sanguíneo, as formas infectantes do parasito, denominadas esporozoítos. O mosquito inocula diferentes populações de esporozoítos, que migram para a corrente sanguínea e invadem os hepatócitos. Alguns esporozoítos alojados nos hepatócitos reproduzem-se rapidamente por esquizogonia, formando milhares de merozoítos que invadem hemácias; outros entram em estado de latência no fígado, originando os hipnozoítos, que são responsáveis pelas recaídas da doença após períodos variáveis de incubação (KROTOSKI, 1985).

O desenvolvimento eritrocitário do parasito segue duas vias distintas: (a) multiplicação assexuada por esquizogonia e (b) diferenciação em estágios sexuais, gametócitos e posteriormente gametas. Os primeiros estágios intra-eritrocitários são trofozoítos. No interior das hemácias ocorre nova esquizogonia; os esquizontes eritrocitários maduros apresentam entre 6 e 32 núcleos, cada um deles originando um merozoíto. Ao final da esquizogonia, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea, coincidindo temporalmente com os picos febris periódicos característicos da malária. Os gametócitos ingeridos durante o repasto sanguíneo, diferentemente dos demais estágios eritrocitários do parasito, não são digeridos no estômago dos mosquitos. Em poucos minutos cada gametócito masculino origina 6-8 gametas masculinos ou microgametas, enquanto os gametócitos femininos transformam-se em macrogametas. O zigoto formado pela fusão de microgametas e macrogametas transforma-se, em poucas horas, em um estágio móvel chamado oocineto. Ao penetrar na parede do estômago do mosquito, o oocineto transforma-se em oocisto, em cujo interior se formam esporozoítos. Com a ruptura do oocisto, milhares de esporozoítos livres

migram para as glândulas salivares dos mosquitos. A cada repasto sanguíneo, dezenas de esporozoítos são inoculadas no hospedeiro vertebrado. O ciclo esporogônico no mosquito dura 10-17 dias.

1.2 A malária no mundo

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011), aproximadamente 3,3 bilhões de pessoas estão expostas ao *Plasmodium* em todo mundo e 70-80 milhões de casos clínicos são reportados cada ano (GUERRA et al., 2010; MUELLER et al., 2009). Entre as mortes decorrentes da doença no ano de 2010, 91% ocorreram no continente africano, atingindo principalmente crianças menores de cinco anos de idade e gestantes (WHO, 2011). Neste mesmo ano (2010), estimou-se que a maioria (85%) dos casos de malária ocorreu na região Africana, 10% no Sudeste da Ásia e 4% nas regiões do Mediterrâneo Oriental (WHO, 2010).

Quanto à distribuição de casos por espécie, *P. vivax* é amplamente distribuída no mundo por tolerar uma grande variedade de temperatura, existindo relatos recentes sobre complicações e óbitos em infecções por esta espécie (SHARMA; KHANDURI, 2009). Na África há o predomínio de *P. falciparum*, sendo *P. vivax* endêmico nas populações do Sudão, Somália e Etiópia, onde a população é predominantemente Duffy positiva, ocorrendo também no Quênia, Tanzânia, Madagascar e Mauritânia, onde há um contingente significativo de população imigrante (CARTER; MENDIS; ROBERTS, 2000; ROSENBERG, 2007). No Oriente Médio, Ásia Central e América Central e do Sul, predomina *P. vivax*, enquanto que no Sudeste Asiático e Pacífico Oriental tanto *P. falciparum* como *P. vivax* são abundantes. *P. malariae* é comum na África subsaariana e no sudeste do Pacífico, sendo pouco frequente na Ásia, América Central e do Sul e Oriente Médio (MUELLER; ZIMMERMAN; REEDER, 2007). *Plasmodium ovale* é encontrado em áreas africanas e de forma limitada na Nova Guiné, Indonésia, Filipinas, Oriente Médio, Índia e Sudeste Asiático

(MUELLER; ZIMMERMAN; REEDER, 2007), enquanto que *P. knowlesi* é agora reconhecido como causa de malária fatal em humanos com predomínio em áreas de floresta do Sudeste da Ásia (COX-SINGH et al., 2010).

Atualmente, a doença é endêmica em 106 países e territórios, dos quais 45 estão no continente africanos (Figura 1; WHO, 2011). Entre os casos ocorridos fora da região africana os países mais afetados são Índia, Sudão, Mianma, Bangladesh, Indonésia, Papua Nova Guiné e Paquistão. O Brasil é um país que contribui com o maior número de casos de malária no continente americano, com 333.424 casos clínicos confirmados em 2010. Destes, 99,8% foram adquiridos na Amazônia Legal que é composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão (TAUIL, 2011).

Figura 1 - Distribuição das áreas sob risco de transmissão de malária no mundo, em 2010.

Fonte: WHO (2011)

Na tentativa de um controle mais efetivo da doença, diversas estratégias vêm sendo implementadas, embora de modo heterogêneo,

nos diversos locais onde a malária é motivo de preocupação por sua morbimortalidade: distribuição de mosquiteiros impregnados com inseticidas, novas combinações terapêuticas, uso de inseticidas de ação residual nos domicílios, tratamento preventivo intermitente para malária na gravidez entre outras (WHO, 2005).

1.3 A malária importada

Define-se malária importada como a infecção adquirida em área endêmica por viajante ou nativo que é diagnosticada, após o período de incubação, em uma área não-endêmica (LADHANI et al., 2007). Em estudo realizado nos Estados Unidos (NEWMAN et al., 2004), observou-se o maior número de casos de malária importada ocorre entre turistas que visitam países endêmicos de malária e entre refugiados provenientes de países endêmicos. Os militares, crianças e jovens representam cerca de 10-15% de todos os casos de malária importada (DRIESSEN et al., 2008; GUEDES et al., 2010; MASCARELLO et al., 2008; NEWMAN et al., 2004; REY et al., 2010) e compartilham com mulheres grávidas o risco de desenvolver a malária grave e complicada (WHO, 2010). Na Figura 2, apresentam-se os números anuais de mortes por malária importada registrada nos Estados Unidos entre 1963 e 2001 segundo categoria de exposição.

O risco de contrair a malária é determinado por diversos fatores. Destes, a intensidade da transmissão da malária na área visitada é a mais importante. Uma viagem à África subsaariana confere o maior risco, enquanto uma viagem para a América do Sul ou grande parte da Ásia traz risco substancialmente menor, embora essas regiões apresentem focos de alta transmissão (CARTER; MENDIS; ROBERTS, 2000). Em muitas regiões, existe um componente sazonal na transmissão, com aumento das notificações de malária clínica logo após o início das estações chuvosas (CRAIG et al., 1999; LANERI et al., 2010). A probabilidade de contrair a malária pode ser substancialmente menor quando o turista faz uso de

quimioprofilaxia adequada, e utiliza meios que proporcionam a proteção contra os mosquitos anofelinos (SVENSON et al., 1995). A maioria das infecções ocorre em viajantes que não usam profilaxia ou a utilizam de forma inadequada (MALI et al., 2010; SCHWARTZ et al., 2003). No entanto, é importante notar que estes meios não são 100% eficazes, mesmo quando utilizados adequadamente (BAIRD, 2005).

Figura 2 - Número de mortes por malária importada entre turistas, refugiados, militares, entre outros, registradas nos Estados Unidos entre os anos de 1963 a 2001.

Fonte: Newman et al. (2004)

A incidência de malária importada varia amplamente em países não endêmicos. Isto parece ser consequência da dificuldade no diagnóstico da doença, uma vez que esta pode apresentar um quadro clínico inespecífico e a falta de comunicação entre os profissionais da saúde pode acarretar um diagnóstico errôneo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, viajantes franceses que retornam da África Ocidental relatam os maiores números de casos de malária importados da Europa, com cerca de seis mil casos por ano (WHO/CISID, 2011). Os dados mais recentes dos Estados Unidos são a partir de 2009, quando foram relatados 1.484 casos (MALI et al., 2010). No entanto, a confiabilidade e consistência de

dados da vigilância são variáveis; a subnotificação é comum. Isto foi demonstrado em um estudo nos Estados Unidos, que evidenciou que 25% dos casos deixam de ser notificados (HWANG et al., 2009). Na Europa e América do Norte, a maior parte da malária importada é causada por *P. falciparum* (FREEDMAN et al., 2006), embora infecções por *P. vivax* também ocorrem com frequência.

O Programa de Malária gerenciado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na Região Europeia, que administra 51 países europeus, notificou um aumento de oito vezes no número de casos importados de malária entre 1972 e 1988 (a partir de 1.500 a 12.000 casos, respectivamente), seguidos por um aumento mais gradual de 15.500 casos em 2000 (SABATINELLI; EJOV; JOERGENSEN, 2001). A maioria dos casos foi importada para a Europa Ocidental, ocorrendo principalmente na França, Reino Unido, Alemanha e Itália. Em 2002, estes quatro países foram responsáveis por 78,5% de 13.227 casos notificados (LADHANI et al., 2007).

Entre 2001 e 2010, 45 países da Região Europeia demonstraram um declínio nos casos de malária importada. Até o presente momento não há estudos que evidenciam as razões dessa diminuição, mas há evidências que ocorreu o controle da malária em países endêmicos (ROMI et al., 2010; WHO, 2011). A Figura 3 apresenta os casos de malária importada na Europa entre os anos de 1980 e 2011.

A malária importada traz ao país onde a doença foi erradicada uma grande probabilidade de reintrodução. Os fatores climáticos são os principais meios que contribuem com o aumento da capacidade vetorial dos mosquitos. Em anos recentes houve o ressurgimento da doença em pontos isolados do Leste da Europa e países da América do Norte, enquanto que Sul da Europa e do Mediterrâneo estão sob risco do reaparecimento da malária (VINCENTE et al., 2011). O Sudeste da Europa está entre as regiões com maior risco, especialmente para *P. vivax*, devido a vários fatores, entre eles: (a) as características climáticas; (b) a proximidade da África, que promove a migração de malária de áreas

endêmicas, principalmente devido a oportunidades de trabalho em países europeus e (c) a presença de vetores anofelinos (SAINZ-ELIPE et al., 2010).

Figura 3 - Casos de malária importada na Europa entre os anos de 1980 e 2011.

Fonte: Odolini et al. (2012)

Métodos moleculares, como a amplificação de fragmentos de DNA do parasito mediante reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, PCR em tempo real e sequenciamento, são ocasionalmente utilizados para detectar e caracterizar os parasitos obtidos de malária importada (GARCIA-VILLARRUBIA et al., 2011; JEANNE et al., 2010; SEVERINI et al., 2002). Além de detectar parasitos, essas técnicas podem permitir a identificação da origem geográfica de casos importados de malária. Em 2002, Severini e colaboradores realizaram um estudo de malária importada na Itália, com o sequenciamento da região polimórfica do gene que codifica a proteína de superfície de merozoíto (MSP-1) de *P. vivax*. Com a análise das sequências, puderam inferir que os parasitos de uma infecção importada vieram da Índia (região endêmica de malária), pois o

gene analisado apresentava alta similaridade com alelos de parasitos desse país.

1.3.1 Malária importada nos Estados Unidos

Durante a década de 1950 com a melhoria da situação habitacional e das condições socioeconômicas, o controle de vetores e cura dos doentes, ocasionou a interrupção da transmissão da malária nos Estados Unidos, desde então quase todas as infecções são adquiridas fora do país (CAUSER et al., 2004).

Estudos realizados pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) entre 1978-1982 relataram 5.204 casos de malária importada nos Estados Unidos. Destes casos, 26% foram importados por cidadãos norte-americanos, 33% ocorreram entre refugiados do Sudeste Asiático e 41% foram importados por outros estrangeiros. Neste período um grande número de casos de malária foi importado do México e América Central (Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua e Panamá) e destes, 86% foram diagnosticados para *P. vivax*. Nos dias atuais o grupo de pessoas com maior número de diagnóstico de malária são os viajantes norte-americanos (MALI; TAN; ARGUIN, 2011).

Newman et al. (2004) analisaram casos de malária importada diagnosticados nos Estados Unidos entre 1963 a 2001. Neste estudo, foram observadas 185 mortes: 123 (66,5%) ocorreram entre os viajantes, 17 (9,2%) entre os militares e 14 (7,6%) em indivíduos não-classificados nesses grupos (Figura 2). O número de mortes por malária entre os viajantes dos Estados Unidos manteve-se relativamente constante ao longo do tempo, variando entre 0 e 10 mortes anuais. A maioria das mortes, 114 (92,7%) foi atribuída a *P. falciparum*, 4 (3,3%) foram atribuídas a *P. vivax*, 2 (1,6%) foram atribuídas a *P. malariae* e 1 (0,8%) foi atribuída a *P. ovale*.

Em 2007, o CDC diagnosticou 1505 casos de malária. Um total de 734 casos ocorreu entre os residentes dos Estados Unidos, 263 casos

entre os residentes estrangeiros e 508 casos entre pessoas com estatuto de residente desconhecido. Dos 734 casos notificados entre residentes dos Estados Unidos, 50% ocorreram entre os negros, 27% entre os brancos, 11% entre os asiáticos, e 4% entre os hispânicos. Os dados mais recentes são a partir de 2009, que relatam cerca de 1480 casos de malária confirmados no país (MALI; TAN; ARGUIN, 2011).

1.4 O genoma mitocondrial de *P. vivax*

O parasito da malária contém três genomas: o genoma nuclear com 14 cromossomos haplóides com aproximadamente 23 megabases (Mb) e duas moléculas de DNA extra-cromossômico: o DNA circular de 35 kilobases (kb), conhecido como genoma do plastídeo, e o elemento de 6 kb, que corresponde ao genoma mitocondrial (FEAGIN et al., 1997; WILSON et al., 1991).

Os genomas mitocondrial e nuclear possuem modos de evolução distintos. O genoma mitocondrial possui um modo direto de transmissão genética, sem recombinação ou outros rearranjos genéticos. Está presente em grande número de cópias, em torno de 20 ± 150 por célula, e evolui cerca de 5 a 10 vezes mais rapidamente que o genoma nuclear. Apresenta herança materna e possui poucos genes: citocromo c oxidase, subunidade I (CoI); citocromo c oxidase, subunidade III (CoIII); e citocromo b (Cyb) (WILSON; WILLIAMSON, 1997) (Figura 4). Apresenta 13 genes que codificam RNA ribossômico, sete correspondentes à subunidade maior e seis correspondentes à subunidade menor do RNA ribossômico.

Figura 4 - Organização do genoma mitocondrial de *P. vivax*. Genes que codificam proteínas mitocondriais (CoI, CoIII, Cby). A direção da seta indica a direção da transcrição. Os códigos LSU e SSU, indicam fragmento de subunidade maior e fragmento de subunidade menor respectivamente.

Nota: A direção da seta indica a direção da transcrição. As abreviações LSU e SSU indicam fragmento de subunidade maior e fragmento de subunidade menor do gene de RNA ribossômico, respectivamente.

Fonte: Sharma et al. (1998)

1.5 O genoma mitocondrial em estudos filogenéticos e populacionais de *P. vivax*

O genoma mitocondrial possui várias características distintivas de outros genomas que o tornam um marcador molecular adequado para estudos filogenéticos e populacionais. Estudos filogenéticos sugerem que *P. vivax* teve origem em um parasito de macacos asiáticos (ESCALANTE et al., 1998; ESCALANTE et al., 2005). A análise do genoma mitocondrial completo de cerca de 200 isolados de *P. vivax*, provenientes de dois estudos independentes (JONGWUTIWES et al., 2005; MU et al., 2005), sugere que o Sudeste Asiático (região em que os parasitos apresentam maior diversidade genética) seja o local de origem da espécie (CORNEJO; ESCALANTE, 2006). Comparações com o genoma mitocondrial de outras espécies de plasmódios indicam que *P. cynomolgi*, encontrado em macacos do Sudeste Asiático, é a espécie irmã de *P. vivax* (Figura 5). Por outro lado, a análise dos genomas mitocondriais confirma a identidade entre *P. vivax* e *P. simium*, parasito originalmente descrito em macacos do Novo Mundo e morfologicamente semelhante a *P. vivax* (CORNEJO;

ESCALANTE, 2006). Nas Américas, não está claro se os seres humanos adquiriram *P. vivax* de macacos do Novo Mundo ou se esses macacos se infectaram a partir do convívio em simpatria com seres humanos (TAZI; AYALA, 2011; COATNEY et al., 2003).

Figura 5 - Árvore filogenética construída a partir do genoma mitocondrial completo de parasito de primata do Sudeste Asiático, *P. simium* e *P. gonderi* (grupo externo).

Fonte: Cornejo e Escalante (2006)

Mu et al. (2005) analisaram 176 sequências do genoma mitocondrial completo de isolados *P. vivax* provenientes de quatro continentes, sugerindo que *P. vivax* originou-se no Sudeste Asiático e espalhou-se pela Índia e África. O genoma mitocondrial de 40 isolados africanos, originados da Angola, São Tomé, Ruanda, Níger e Tanzânia, foi analisado por Culleton et al. (2011). Esse estudo combinou os seus dados de sequências com os publicados na literatura (CORNEJO; ESCALANTE 2006; JONGWUSTIWES et al., 2005; MU et al., 2005) e demonstrou claramente que a Ásia Oriental e a Melanésia apresentaram uma maior diversidade de haplótipos, sugerindo-se que estas populações de parasitos seriam as mais antigas (CARTER, 2003; CORNEJO; ESCALANTE, 2006). Isolados da Turquia, Irã e os do continente indiano apresentaram uma diversidade comparável de haplótipos, mas inferior aos isolados da Ásia Oriental e Melanésia. Como esperado, a diversidade genética foi relativamente baixa na América do Sul, que é considerada o local mais recentemente

colonizado por *P. vivax*. Se aceitarmos a hipótese de que a população com maior polimorfismo é a mais antiga, os dados sugerem que houve uma migração de *P. vivax* da região leste para oeste, provindo do Sudeste da Ásia.

1.6 Outros marcadores genéticos para estudos populacionais

1.6.1 Microssatélites

Os microssatélites (MSATs) são regiões de DNA que contêm repetições em série de motivos (conservados ou degenerados) contendo de 1 a 6 nucleotídeos. As sequências repetitivas dos microssatélites podem ser classificadas em: (a) perfeitas, quando a sequência repetida não é interrompida por qualquer base que não pertença ao motivo, (por exemplo: TATATATATATATA); (b) imperfeitas, quando existem, entre os motivos, pares de bases que não correspondem a eles (por exemplo: TATATATAcTATATA); e (c): compostas, quando a sequência contém duas sequências repetidas distintas adjacentes (por exemplo: TATATATAGTGTGTGTGTGT) (WEBER, 1990). Os MSATs representam regiões instáveis do genoma, com uma taxa de mutação extremamente elevada (da ordem de 10^{-2} eventos por replicação). A instabilidade dos MSATs resulta em seu elevado grau de polimorfismo.

Centenas de marcadores de DNA microssatélite (MSAT) de *P. vivax*, supostamente neutros do ponto de vista evolutivo, foram descritos ao longo da última década (CARLTON et al., 2008; GÓMEZ et al., 2003; IMWONG et al., 2006; IMWONG et al., 2007; JOY et al., 2008; KARUNAWEEERA et al., 2007).

Os MSATs são úteis em estudos populacionais de diversidade genética de eucariotos, em função de sua neutralidade em termos evolutivos e seu alto grau de polimorfismo (SCHLOTTERER, 2004). De fato, os MSATs foram amplamente utilizados em estudos populacionais de *P. vivax*, realizados na segunda metade desta década por nosso grupo e

diversos outros pesquisadores (FERREIRA et al., 2007; GUNAWARDENA et al., 2010; IMWONG et al., 2006; IMWONG et al., 2007; JOY et al., 2008; KARUNAWEERA et al., 2008; ORJUELA-SÁNCHEZ et al., 2009). Embora os MSATs tenham permitido comparar parâmetros populacionais fundamentais, como níveis de diversidade e de desequilíbrio de ligação, em amostras de *P. vivax* da Ásia, África e das Américas, seu uso em larga escala tem sérias limitações. Em primeiro lugar, MSATs estão sujeitos à homoplasia (identidade de sequência na ausência de um ancestral comum), fato que viola os pressupostos de modelos clássicos de análise genética populacional. Além disso, os métodos de tipagem de MSATs estão muito sujeitos a variação entre laboratórios, reduzindo as possibilidades de comparação de resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa com o mesmo conjunto de marcadores.

1.6.2 Polimorfismos de base única (SNPs)

Os polimorfismos de base única (SNPs do inglês *single-nucleotide polymorphisms*) são variações genéticas que correspondem às alterações mais elementares da molécula de DNA, ou seja, mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas. As mutações mais comuns são as transições, quando há a troca de uma purina por outra purina ($A \leftrightarrow G$) ou uma pirimidina por outra pirimidina ($C \leftrightarrow T$). Ocorre também, porém com menor frequência, mutação do tipo transversão, quando há a troca de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa ($C/T \leftrightarrow A/G$).

Os marcadores de SNPs, geralmente são bi-alélicos, isto é, são encontradas duas bases nitrogenadas ao longo do alinhamento das sequências. Os SNPs podem ocorrer em regiões codificadoras de genes ou com função regulatória, porém são encontrados na maioria das vezes, em espaços intergênicos, sem função determinada. É considerado o marcador genético mais estável, com taxa de mutação da ordem de 10^{-9} eventos/replicação e de tipagem mais reprodutível.

Em *P. vivax*, a análise comparativa de 100 kb de sequência de DNA do cromossomo 8 em cinco isolados naturais do parasito, identificou em média um SNP a cada 530 pares de base (pb) de DNA (FENG et al., 2003). Esta abundância de SNPs torna possível o desenvolvimento de mapas gênicos de alta resolução dessa espécie, facilitando os estudos de associação, ao nível genômico, entre mutações e genótipos de interesse em populações de parasitos.

Orjuela-Sánchez et al. (2010) analisaram 85 SNPs ao longo do cromossomo 8 em 240 isolados de *P. vivax* provenientes do Brasil e da Ásia (Camboja e Sri Lanka), permitindo comparar as taxas de recombinação efetiva entre populações de parasitos com diferentes níveis de endemicidade.

2 OBJETIVOS

1. Investigar se a análise de genomas mitocondriais permite inferir a origem geográfica de isolados de *P. vivax* derivados de casos de malária importada diagnosticados nos Estados Unidos;
2. comparar o desempenho da análise de genomas mitocondriais e da análise de DNA microssatélite na determinação da origem geográfica de infecções importadas por *P. vivax*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspecto éticos

Os protocolos de pesquisa desta dissertação foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) (parecer 960/CEP em 27.09.2010).

3.2 Área de estudo e amostras de DNA de *P. vivax*

*3.2.1 Amostras de infecção importada de *P. vivax* cedidas pelo CDC*

Alíquotas de DNA purificado de 63 amostras provenientes de casos de malária vivax importada diagnosticados nos Estados Unidos entre 2004 e 2008 foram gentilmente cedidas por Alexandre Januário da Silva, pesquisador do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de Atlanta, EUA. A infecção por *P. vivax* foi confirmada por microscopia convencional de esfregaços e gotas espessas coradas com Giemsa, no próprio CDC, por solicitação de laboratórios de saúde pública regionais no território norte-americano. O local presumido de infecção foi determinado, com base em dados sobre viagens e migração recentes em 47 desses casos, essa informação, entretanto, não foi obtida para 16 infecções importadas (Figura 6; Tabela 1). Essas amostras foram utilizadas para sequenciamento do genoma mitocondrial completo e tipagem de DNA microssatélite.

Figura 6 - Localização geográfica presumida dos isolados com infecção importada de *P. vivax* cedidas pelo CDC.

Nota: O local presumido de infecção foi determinado, com base em dados sobre viagens e migração recentes.

Tabela 1- Localização geográfica presumida dos isolados coletado no CDC entre 2004 e 2008.

(continua)

Localização Geográfica	Isolados do CDC
México	11
México	34
México	20
América Central	12
América Central	13
América Central	14
América Central	15
América Central	16
América Central	17
América Central	19
América Central	21
América Central	23
América Central	29
América Central	30
América Central	31
América Central	33
América Central	35
América Central	41
América Central	42
América Central	51
América do Sul	5
América do Sul	8
América do Sul	22
Índia/Venezuela	2
Índia	6
Índia	7
Índia	9
Índia	26
Índia	27
Índia	36
Índia	44
Índia	47
Índia	52
África	10
África	18
África	28
África	37
África	38
África	39
África	46
Ásia Central	4
Ásia Central	48
Sudeste Asiático	49
Coréia	43
Melanésia	24
Melanésia	50

Tabela 1- Localização geográfica presumida dos isolados coletado no CDC entre 2004 e 2008.

(conclusão)

Localização Geográfica	Isolados do CDC
Melanésia	3
Desconhecido	32
Desconhecido	40
Desconhecido	53
Desconhecido	54
Desconhecido	55
Desconhecido	56
Desconhecido	57
Desconhecido	58
Desconhecido	59
Desconhecido	60
Desconhecido	62
Desconhecido	63
Desconhecido	64
Desconhecido	65
Desconhecido	66
Desconhecido	67

3.2.2 Amostras de Pursat, Camboja

Para ampliar o banco de dados sobre diversidade global de DNA microssatélite em *P. vivax*, analisamos um conjunto de 87 amostras de DNA procedentes de isolados do Camboja, gentilmente cedidas por Richard M. Fairhurst, pesquisador do *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*, Bethesda, Estados Unidos. Essas amostras foram coletadas na cidade de Pursat, na região ocidental do Camboja, entre junho e dezembro de 2008. Os pacientes contraíram malária vivax em áreas florestais do distrito Vitela Veng, na fronteira entre o Camboja e a Tailândia (ORJUELA-SANCHEZ et al., 2010). A infecção por *P. vivax* foi confirmada por microscopia convencional de gotas espessas coradas com Giemsa, bem como por PCR tendo como alvo o gene que codifica a subunidade menor (18S) do RNA ribossômico (18S rRNA) (SNOUNOU et al., 1993). Essas amostras foram utilizadas para a tipagem de DNA microssatélite, parte delas também foi utilizada para a análise de padrões regionais de distribuição de cinco polimorfismos selecionados no genoma mitocondrial de *P. vivax*.

3.2.3 Amostras de Tricomalee, Sri Lanka

Na análise de padrões regionais de distribuição de cinco polimorfismos selecionados no genoma mitocondrial de *P. vivax*, utilizamos também 12 amostras de DNA provenientes do Sri Lanka, gentilmente cedidas pela pesquisadora Nadira D. Karunaweera, da Universidade de Colombo, Colombo, Sri Lanka. Essas amostras foram coletadas durante um surto de malária em Tricomalee, Província Oriental, entre janeiro e agosto de 2007 (ORJUELA-SANCHEZ et al., 2010). A infecção por *P. vivax* foi confirmada por microscopia convencional de gotas espessas coradas com Giemsa. Todas essas amostras tiveram marcadores de DNA microssatélite previamente tipados (GUNAWARDENA et al., 2010).

3.2.4 Amostras do Panamá

Na análise de padrões regionais de polimorfismo no genoma mitocondrial completo de *P. vivax*, utilizamos também amostras de DNA provenientes do Panamá, gentilmente cedidas pelo pesquisador José E. Calzada, do Instituto Comemorativo Gorgas de Estudo da Saúde, da Cidade do Panamá, Panamá. Essas amostras foram coletadas em diferentes regiões do país entre 2005 e 2010, sendo a infecção por *P. vivax* confirmada por microscopia convencional de gotas espessas coradas com Giemsa. Seis amostras tiveram seu genoma mitocondrial sequenciado e sete tiveram marcadores de DNA microssatélite tipados.

3.2.5 Amostras do Brasil

Na análise de padrões regionais de distribuição de cinco polimorfismos selecionados no genoma mitocondrial de *P. vivax*, utilizamos também 12 amostras de DNA colhidas entre 2004 e 2006 em um assentamento agrícola conhecido como Granada, situado no município de Acrelândia, extremo leste do estado do Acre. Essas amostras foram

colhidas durante estudos prospectivos realizados por nossa equipe na região (DA SILVA-NUNES et al., 2008) e armazenadas em nosso laboratório em São Paulo. O diagnóstico de malária vivax foi confirmado por microscopia convencional de gotas espessas coradas com Giemsa, bem como por PCR tendo como alvo o gene 18S rRNA (KIMURA et al., 1997). Todas essas amostras tiveram marcadores de DNA microssatélite previamente tipados (ORJUELA-SANCHEZ et al., 2009).

Outro conjunto de sete amostras brasileiras foi utilizado para a análise de padrões regionais de polimorfismo no genoma mitocondrial completo de *P. vivax*. Trata-se de amostras colhidas entre 2010 e 2012 no assentamento agrícola conhecido como Remansinho, situado no município de Lábrea, sul do estado do Amazonas. Essas amostras foram colhidas durante estudos prospectivos em andamento na região (DA SILVA-NUNES et al., 2012) e armazenadas em nosso laboratório em São Paulo. O diagnóstico de malária vivax foi confirmado por microscopia convencional de gotas espessas coradas com Giemsa, bem como por PCR tendo como alvo o gene 18S rRNA (GONÇALVES et al., 2010).

3.3 Amplificação genômica de *P. vivax*

Os estudos de diversidade em *P. vivax* estão restritos pela disponibilidade de DNA genômico deste parasito devido às baixas parasitemias e a dificuldade da cultura contínua *in vitro*. Para contornar este obstáculo, foi utilizada estratégia de amplificação genômica conhecida com WGA (do inglês *Whole-Genome Amplification*). A pré-amplificação genômica foi realizada a partir de 5 µl de DNA genômico com a tecnologia de amplificação por deslocamento múltiplos (*multiple displacement amplification*) descrita por Dean et al. (2002), empregando-se mini-kits REPLI-g (Qiagen, Valencia, CA). O produto de amplificação resultante (50 µl) foi utilizado como DNA molde para PCR, sequenciamento e tipagem molecular.

3.4 Sequenciamento do genoma mitocondrial completo de *P. vivax*

3.4.1 Amplificação e purificação do genoma mitocondrial de *P. vivax*

Neste estudo, o genoma mitocondrial (aproximadamente 6 kb) de *P. vivax* foi amplificado, sequenciado e analisado em 63 amostras de casos de malária importada diagnosticados nos Estados Unidos, 7 isolados brasileiros provenientes do assentamento agrícola conhecido como Remansinho e 6 isolados de diversas regiões do Panamá. A amplificação de DNA foi realizada utilizando a enzima PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara, Japão). Os oligonucleotídeos utilizados nesta reação foram descritos por Miao et al. (2012) e o tamanho dos fragmentos amplificados encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - *Primers* para a amplificação do genoma mitocondrial de *P. vivax*

Primer	Sequência (5´-3´)	Tamanho do Fragmento (kb)
PVMit1F	CGCTGACTTCCTGGCTAAAC	2911
PVMit1R	GTCAGGCGTTAAAAGCGTTC	
PVMit2F	TTGTACACACCGCTCGTCAC	3497
PVMit2R	CCGAACCTTGGACTCTTGAA	

Fonte: Miao et al. (2012)

Todas as reações de amplificação tiveram um volume final de 50 µl, compreendendo: 0,3 µM de cada *primer* (anterior e reverso), 2,5 U/µl de PrimeSTAR DNA, 10 µl de tampão PrimerSTAR 5×, 2,5 mM de cada dNTP, 6 µl de amostra de DNA pré-amplificada. A reação foi realizada em termociclador GeneAmp PCR 9700 (Applied Biosystems, EUA) com o seguinte programa: desnaturação inicial de 94 °C por 1 minuto; 30 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 segundos, seguido por anelamento das fitas de DNA a 55°C por 5 segundos; e extensão de 72 °C por 1 minuto. A

etapa final da extensão durou 10 minutos a 72 °C. A amplificação do fragmento de interesse foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Os fragmentos amplificados do DNA mitocondrial de *P. vivax* foram purificados com o kit *illustra GFX PCR and Gel band purification* (GE Technology), seguindo as instruções do fabricante. O produto final, eluído em 30 µl de água ultrapura, teve a concentração de DNA quantificada no espectrofotometro NanoDrop (ND-1000).

3.4.2 Sequenciamento de fragmentos de DNA mitocondrial

Os *primers* utilizados para sequenciamento do genoma mitocondrial foram desenhados com auxílio do programa Primer3 (disponível em: <http://biotools.umassmed.edu/bioapps/>); suas sequências e o tamanho dos fragmentos amplificados são apresentados na Tabela 3.

No sequenciamento, utilizamos 2 a 4 µl (aproximadamente 200 ng/µl) do produto de PCR purificado, 0,75 µl de Big Dye *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* v. 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3,25 µl de tampão Save Money (1 M Tris-HCl pH 9,0, 50 mM MgCl₂) e 5 µM de oligonucleotídeo, além de água ultrapura para completar um volume final de 10 µl. Cada fragmento foi sequenciado em ambas as direções, com os *primers* anterior e reverso correspondentes, em termociclador GeneAmp PCR 9700 (Applied Biosystems, EUA). A reação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96 °C por 1 min, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 96 °C por 15 segundos, anelamento a 50 °C por 15 segundos, extensão a 60 °C por 4 minutos.

Tabela 3- Sequências de *primers* para o sequenciamento do genoma mitocondrial completo de *P. vivax*

Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho
mtDNA1	F: 5' ACGCTGACTTCCTGGCTAAA3' R: 5' GGATGAAACCTTCCTGATCG3'	540pb
mtDNA2	F: 5' CACGAGTCGATCAGGAAGGT3' R: 5' GTGTTGGCTGGGCATTAGTC3'	536pb
mtDNA3	F: 5' GACTAATGCCCAGCCAACAC3' R: 5' GCTATCAAATGGCGAGAAGG3'	566pb
mtDNA4	F: 5' CCTTCTCGCCATTTGATAGC3' R: 5' GCATCATGTATGACAGCATGTTT3'	524pb
mtDNA5	F: 5' TGCTGTCATACATGATGCACTT3' R: 5' CAAGGCAACAATACACGCTAA3'	554pb
mtDNA6	F: 5' AGCGTGTATTGTTGCCTTGT3' R: 5' CATCCATGTCAGGCGTTAAA3'	303pb
mtDNA7	F: 5' TTGTACACACCGCTCGTCAC3' R: 5' AACTACCAAATAAAAAATGAAAACCA3'	495pb
mtDNA8	F: 5' CAAATTGCAATCATAAACTTTAGGTC3' R: 5' CTAGCAATACCAGATACTAAAAGACCA3'	460pb
mtDNA9	F: 5' TCATTGTTGGTCTTTTAGTATCTGG3' R: 5' CCAATTAAATATTTTTGTTCCAGTAGG3'	530pb
mtDNA10	F: 5' CCTACTGGAACAAAAATATTTAATTGG3' R: 5' TTTAATGGGCATGGGTAATTT3'	557pb
mtDNA11	F: 5' AAATTACCCATGCCCATTTAAA3' R: 5' CCCTAAAGGATTTGTGCTACC3'	562pb
mtDNA12	F: 5' TGGTAGCACAAATCCTTTAGGG3' R: 5' AAATGTTTGCTTGGGAGCTG3'	548pb
mtDNA13	F: 5' ACAGCTCCCAAGCAAACATT3' R: 5' GACCGAACCTTGGACTCTTG3'	539pb

3.4.3 Precipitação das reações de sequenciamento

O produto da reação de sequenciamento foi precipitado adicionando-se 90 µl de isopropanol a 66%. O homogeneizado foi incubado por 15 minutos, à temperatura ambiente, sob proteção da luz e centrifugado a 2464 *g* por 60 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão da placa e o sedimento lavado com 150 µl de isopropanol a 75%. A placa foi então centrifugada a 2464 *g* durante 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa colocada para um pulso de 45 *g* por 30 segundos, com a placa invertida sobre papel absorvente. Todo o etanol foi removido, pois qualquer etanol residual resultaria em manchas fluorescentes. As amostras foram secas em temperatura ambiente e protegida da luz. O produto foi ressuspensão a 10 µl de tampão de amostra contendo Formamida Hi-Di (Applied Biosystems, EUA). Após serem ressuspensas, as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos, rapidamente transferidas para o gelo e então colocadas no sequenciador capilar ABI310 (Applied Biosystems, EUA).

3.4.4 Montagem de "contigs"

As sequências de nucleotídeos anterior e reverso foram obtidas dos cromatogramas por meio do programa Sequence Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems, EUA), no qual permitiu visualizar a qualidade das sequências. Cada fragmento foi sequenciado em ambas as direções e montados em "contigs" com o programa DnaStar, com a cobertura mínima de duas leituras.

3.5 Origem de sequências adicionais de genoma mitocondrial de *P. vivax*

Para complementar o estudo de padrões regionais de polimorfismo no genoma mitocondrial completo de *P. vivax*, obtivemos todas as

sequências de genoma mitocondrial de *P. vivax* (335 isolados) e *P. simium* (1 isolado) disponíveis atualmente no GenBank (números de acesso: AY791517-AY791692, AY598035-AY598140, AB550270-AB550280, JN788737-JN788776, DQ396547-DQ396548).

Os 336 isolados de *P. vivax* são provenientes de diversas regiões geográficas: Américas (Brasil, Nicarágua, El Salvador, Honduras, Equador, República Dominicana, Panamá e Colômbia), Sudeste Asiático (Vietnã, Tailândia, Indonésia, Mianma, Filipinas e Malásia), Sul da Ásia (Índia, Bangladesh, Sri Lanka e Paquistão), África (Mauritânia, Etiópia, Madagascar, Tanzânia, São Tomé), Melanésia (Papua Nova Guiné, Vanuatu, Ilhas de Salomão) e Oriente Médio (Irã e Turquia). A origem geográfica dos isolados que tiveram seu genoma mitocondrial sequenciado é descrita na Tabela 4, que também reúne informações sobre as 76 novas amostras sequenciadas neste estudo. Todas as sequências (412) foram alinhadas inicialmente com o programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994), com ajustes manuais realizados com o programa MEGA v. 4.0,2 (TAMURA et al., 2007).

Tabela 4- Origem de sequências do genoma mitocondrial de *P. vivax* disponíveis atualmente no GenBank e sequenciadas neste estudo.

Autores	Origem	Nº de sequências
Mu et al. (2005)	África	12
	América do Sul	13
	América Central	10
	China	22
	Coreia	1
	Melanésia	68
	Oriente Médio	4
	Sudeste Asiático	22
	Sul da Ásia	23
Jongwutiwes et al. (2005)	América do Sul	24
	América Central	1
	China	12
	Melanésia	4
	Sudeste Asiático	64
	Sul da Ásia	1
Cox-Singh et al. (2006)	Sudeste Asiático	3
Iwagami et al. (2010)	Coreia	12
Culleton et al. (2011)	África	31
	Oriente Médio	9
Neste estudo	África	7
	América do Sul	10
	América Central	23
	Ásia Central	2
	Coreia	1
	Melanésia	3
	México	3
	Sudeste Asiático	1
	Sul da Ásia	9
	Origem desconhecida	17

3.6 Análise de dados de genoma mitocondrial

Para a análise inicial dos padrões regionais de polimorfismo no genoma mitocondrial de *P. vivax*, construímos uma rede de haplótipos

mitocondriais compreendendo os 336 genomas mitocondriais depositados no GenBank combinados com os 76 genomas sequenciados neste estudo. A rede de haplótipos foi construída com uso do programa Network 4.6 (Fluxus Technology; disponível em: www.fluxu-engineering.com), que utiliza o método *median-joining* (MJ) para estimar a posição de cada amostra na rede. A distância entre pares de haplótipos é diretamente proporcional ao número de substituições observadas na comparação de suas sequências. Na rede haplotípica, os isolados são identificados (com um código de cores) segundo a sua região de origem. Deste modo, é possível evidenciar a existência de grupos de haplótipos relacionados que podem ou não compartilhar a mesma origem geográfica e determinar se os isolados provenientes de casos de malária importada são agrupados segundo o local presumido de aquisição da infecção.

A análise de variância molecular (AMOVA) também foi utilizada para examinar os padrões geográficos de diversidade do genoma mitocondrial de *P. vivax*. Esse método, disponível no programa Arlequin 3.5.1.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), permite avaliar a estrutura geográfica da diversidade genética de amostras, estimando a proporção de variação existente na comparação entre indivíduos da mesma macrorregião, entre indivíduos de macrorregiões diferentes dentro do mesmo continente e entre todos os indivíduos que compõem a amostra (independentemente de sua origem). O nível de significância das partições observadas foi determinado com base em 1000 permutações. A AMOVA baseia-se na estatística ϕ , uma extensão do cálculo de F de Wright para sequências de nucleotídeos. Os cálculos se baseiam numa matriz de distância entre a diversidade de nucleotídeos dos haplótipos. A repartição dessa diversidade entre os continentes, macrorregiões e indivíduos revela a estruturação da espécie. A AMOVA estima a contribuição percentual de cada nível de análise (indivíduo, macrorregião e continente) para os níveis observados de diversidade genética.

Foi também analisada a diversidade dos genomas mitocondriais observada em parasitos provenientes de cada região geográfica, com base

no parâmetro π (número médio de substituições de nucleotídeos por sítio em comparações pareadas de sequências), calculado com o programa MEGA 4 (TAMURA et al., 2007); o erro padrão de π foi estimado pelo método *bootstrap* com 1000 repetições. Esse parâmetro foi calculado nas seguintes regiões: (a) África, (b) América (América Central e América do Sul), (c) Sudeste Asiático (Tailândia, Mianma, Indonésia, Vietnã, Filipinas e Malásia), (d) Sul da Ásia (Índia, Bangladesh, Sri Lanka e Paquistão), (e) Melanésia (Papua Nova Guiné, Vanuatu e Ilhas de Salomão), (f) Oriente Médio (Turquia e Irã) e (g) China e Coréia.

3.7 Análise de dados de DNA microsatélite

3.7.1 Tipagem de DNA microsatélite

Empregamos a tipagem de DNA microsatélite como uma segunda abordagem para determinar os padrões regionais de polimorfismo de amostras de *P. vivax* e inferir a origem geográfica de infecções importadas. Com esta finalidade, utilizamos 13 marcadores de DNA microsatélite descritos por Karunaweera et al. (2007) para caracterizar 57 das 63 amostras obtidas de casos de malária importada diagnosticados nos Estados Unidos, bem como 7 amostras adicionais provenientes do Panamá. Os oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos diferentes marcadores estão listados na Tabela 5.

A amplificação com do fragmento de DNA foi realizado a partir de 3 μ l do DNA genômico, 2 mmol/L de $MgCl_2$, 6 pmol/l de cada *primer* anterior e reverso, 0,1 mmol/l de cada dNTP, 1 U de *Taq polymerase* (Fermentas, Lituânia), 1,5 μ l de 10x *Taq polymerase buffer* e água ultrapura para completar um volume final de 15 μ l. Os parâmetros de ciclagem foram: 94 °C por 2 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 40 segundos, 72 °C por 50 segundos e um ciclo final de 72 °C por 5 minutos.

Tabela 5 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na tipagem de 13 MSTs de *P. vivax*.

MSTA	Cromossomo de <i>P. vivax</i>	Oligonucleotídeo (5' - 3')
MS1	3	F:6-FAMTCAACTGTTGGAAGGGCAAT R:ctgtcttTTGCTGCGTTTTTGTCTG
MS2	6	F:VICGAGCTAGCCAAAGGTTCAACA R:ctgtcttTGGGGAGAGACTCCCTTTTC
MS3	4	F:NEDGAAGATCCTGTGGAGGAGCA R:ctgtcttCTCCTTCGCTCCTTTCCTTT
MS4	6	F:6-FAMCGATTTACTGTTGACGCTGAA R:ctgtcttCAAAGGAACATGCTCGATGA
MS5	6	F:NEDCGTCCTCTATCGCGTACACA R:ctgtcttAAAGGGAGAGGAGCGAAAAC
MS6	11	F:VICGGTTCTTCGGTGATCTCTGC R:ctgtcttGGAGGACATCAACGGGATT
MS7	12	F:6-FAMTTGCAGAAAATGCAGAGAGC R:ctgtcttAGGGTCTTCAGCGTGTGTT
MS8	12	F:NEDAGAGGAGGCAGAAATGCAGA R:ctgtcttAGCCCCTTTGCGTTCTTTAT
MS9	8	F:6-FAMAGATGCCTACACGTTGACGA R:ctgtcttGAAGCTGCCCATGTGGTAAT
MS10	13	F:NEDTTATCCCTGCTGGATGTGAA R:ctgtcttTCCTTCAGGTGGGACTTGTT
MS12	5	F:6-FAMAATGCGCATCCTATGTCTCC R:ctgtcttCTGCTGTTGTTGTTGCTGCT
MS15	5	F:6-FAMTGTTTGCAAAGGAATCCACA R:ctgtcttCGGCCAGATGAAAAGGATAA
MS20	10	F:VICGCACAACAAATGCAAGATCC R:ctgtcttGTGGCAGTGGCTCATCTTCT

Fonte: Orjuela-Sánchez-et al. (2009)

Após a amplificação dos MSATs de *P. vivax*, cada produto de PCR foi diluído 10 vezes em água ultrapura. A partir desta diluição, 1 µl de cada marcador foi misturado em aproximadamente 15 µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, EUA). Os MSATs foram agrupados em conjuntos de 2 a 4 marcadores por tubo de corrida segundo sua fluorescência e seu

tamanho aproximado. Como marcador de peso molecular foram utilizados por reação 0,25 µl de Gene-Scan ROX 500 (Applied Biosystems, EUA). Finalmente o tamanho dos fragmentos foi avaliado com o uso do sequenciador automático ABI310 (Applied Biosystems, EUA).

O programa STRand (TOONEN; HUGHES, 2001) foi utilizado para medir o tamanho dos fragmentos amplificados e a altura dos picos (que corresponde aproximadamente à abundância relativa de parasitos com cada alelo na amostra), um parâmetro fundamental para a análise de infecções mistas. Para cada isolado foi atribuído um haplótipo correspondente ao conjunto de alelos encontrado a cada marcador. Uma infecção foi considerada geneticamente mista quando no cromatograma havia dois picos tais que o pico minoritário tivesse pelo menos um quarto da altura do pico majoritário (ANDERSON et al., 2000). Apenas os picos maiores a 200 unidades de fluorescência foram considerados nas análises. Nos casos de infecções geneticamente mistas, só os haplótipos predominantes foram utilizados nas análises populacionais.

3.7.2 Construção do banco de dados

Para complementar a análise dos padrões regionais de polimorfismo genético de *P. vivax* revelados pela análise de DNA microssatélite, compilamos dados da literatura referentes à tipagem dos mesmos 13 marcadores, realizada segundo o mesmo protocolo empregado neste estudo. Todos os dados referentes a DNA microssatélite foram incorporados a uma planilha Excel que inclui, além das amostras tipadas durante este estudo, os seguintes conjuntos de isolados: 176 amostras do Brasil (majoritariamente obtidas entre 2004 e 2007 no Granada, Acre; KARUNAWEERA et al., 2008; ORJUELA-SÁNCHEZ et al., 2009); 193 amostras do Sri Lanka (2003 a 2008), 167 amostras de Mianma (2008) e 119 amostras da Etiópia (2006-2008) (GUNAWARDENA et al., 2010); 87

amostras de Camboja (ORJUELA-SÁNCHEZ, artigo submetido¹); 11 amostras do Vietnã, 5 amostras da Tailândia e 5 da Indonésia, 2 amostras da Nicarágua, El Salvador e Papua Nova Guiné, 1 amostra da Índia, Mauritânia, Honduras, Equador, Malásia, Bangladesh e República Dominicana (KARUNAWEERA et al., 2008), além de uma amostra da Colômbia (dados não-publicados). A planilha Excel reúne, portanto, dados de tipagem de 779 amostras analisadas previamente. Esses dados foram combinados com aqueles, obtidos neste estudo, de 57 isolados provenientes de casos da malária importada (amostras provenientes do CDC) e em 7 amostras provenientes do Panamá. O banco de dados final totalizava 842 amostras com tipagem completa.

3.7.3 Análise da estrutura populacional

O programa Structure v. 2.3.1 (PRITCHARD et al., 2000) foi utilizado na análise da estrutura genética de *P. vivax* com base nos dados de tipagem de microssatélite. Este programa permite caracterizar conglomerados ("clusters") genéticos, que definem "populações" distintas que compõem o conjunto de isolados analisados. Para cada amostra pode-se estimar a fração do genótipo que provém de cada uma dessas "populações". A estratégia bayesiana empregada pelo programa é utilizada para definir o número (K) de "populações" distintas existentes na amostra, com base nas frequências alélicas observadas em cada *locus*. A análise é repetida para cada valor de K escolhido pelo usuário. Cada análise envolve 100,000 interações, resultando no cálculo de probabilidades posteriores associadas a cada valor de K definido pelo usuário. Escolhe-se em geral o valor de K associado ao maior suporte estatístico como indicativo do número de "populações" existentes na

¹ ORJUELA-SANCHEZ, P.; SÁ, J. M.; BRANDI, M. C. C.; RODRIGUES, P. R.; BASTOS M. S.; AMARATUNGA, C.; DUONG, S.; FAIRHURST, R. S.; FERREIRA, M. U. Higher microsatellite diversity in *Plasmodium vivax* than in sympatric *Plasmodium falciparum* populations in Pursat, western Cambodia. 2012. Artigo submetido.

amostra. Se o valor de $K = 1$ tiver o maior suporte estatístico, não há evidência de estruturação genética na população.

Uma vez definido o número de “populações” existentes na amostra, é possível estimar a contribuição proporcional de cada uma das K populações na constituição genética de cada indivíduo. Quando é possível atribuir a cada “população” uma origem geográfica, pode-se teoricamente inferir a contribuição de características genéticas típicas de cada região geográfica na constituição genética de um isolado de origem desconhecida, como aqueles provenientes de infecções importadas.

3.8 Análise de polimorfismos mitocondriais selecionados

3.8.1 Seleção de polimorfismos e desenho dos ensaios de tipagem

A análise de genomas mitocondriais completos não é, necessariamente, uma alternativa prática e disponível em laboratórios de recursos limitados. Por isso, selecionamos um número restrito de polimorfismos no genoma mitocondrial para a padronização de ensaios de tipagem molecular relativamente simples, potencialmente utilizáveis em laboratórios de saúde pública. Com essa finalidade, analisamos o banco de dados que compreende 336 sequências de DNA mitocondrial de *P. vivax* depositadas no GenBank e identificamos 111 posições polimórficas (SNPs).

Para desenhar os iniciadores e as sondas marcadas para a tipagem de cada SNP, foi utilizado o software Primer Express, disponibilizado pela Applied Biosystems, (Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays - Primers and Probes Assay-by-Design). Para o desenho dos ensaios TaqMan®, foram adotados alguns critérios de seleção, entre eles: (a) tamanho do fragmento entre 18 a 30 pares de bases; (b) conteúdo de CG de 30 a 80%; (c) temperatura de anelamento em torno de 59 °C; (d) diferença de T_m entre os *primers* anterior e reverso menor que 4 °C; (e) ausência de nucleotídeos repetidos, especialmente para três ou mais Gs ou Cs, na

extremidade 3'; (f) ausência de complementaridade entre os dois *primers* para evitar anelamento entre eles; (g) ausência de complementaridade da sonda com ambos os *primers*; (h) ausência de nucleotídeo G no final 5' da sonda, pois a presença desse nucleotídeo inativa o desempenho do fluoróforo e (i) a posição do polimorfismo deve estar no centro da sonda.

Após submeter às sequências de nucleotídeos no software Primer Express, foi possível customizar sete ensaios do tipo TaqMan® com sonda MGB (Minor Groove Binder), porém foi possível padronizar a reação de cinco destes ensaios (Quadro 1).

Quadro 1 - Sequências de *primers* e sondas do tipo TaqMan® marcadas com VIC (P1) e FAM (P2) para tipagem de SNPs a partir do DNA mitocondrial de *P. vivax*.

Ensaio	Sequência do Primer (5' - 3')	Sequência da Sonda
TaqMan1	F: 5' ACCGTACAAGCCGTTAGCAAG3'	P1: AGTTCTGGTTTATA A TAGATACG
	R: 5' GGTGTAACAATTATCCCATACATCCTAA3'	P2: AGTTCTGGTTTATA G TAGATAC
TaqMan2	F: 5' CCTACTGGAACAAAAATATTTAATTGGA3'	P1: TGGTATAACTCAT A GTTTCAT
	R: 5' ACTCCTGTAGTACCACCAAAAGTAAATG3'	P2: TGGTATAACTCAT T GTTTCAT
TaqMan3	F: 5' AACACATTATGATTACAGCTCCCAAG3'	P1: CAAACATTT A AATTACAAGGC
	R: 5' CTTACGGTCTGTATTGTTCTGCTCAA3'	P2: CAAACATTT T AATTACAAGGC
TaqMan4	F: 5' AAGTTAGGATGTATGGGATAATTGTAGTACA3'	P1: CCTTAATTGGTTT A ACTTTATTTGG
	R: 5' TAAAAACACCAGGCATGCAATAC3'	P2: CCTAATTGGTTT C ACTTTATTTG
TaqMan5	F: 5' CGCAGAAAACCGTCTATATTCATG3'	P1: TGATTGACCTTTAACC C CTA
	R: 5' CCGAACCTTGGACTCTTGAAAT3'	P2: TGATTGACCTTTAACC G CTA

3.8.2 Controle positivo – gene sintético

Para validar os ensaios de genotipagem, foram utilizados como controles positivos quatro genes sintetizados *in vitro* cuja sequência de DNA é resultado da amplificação dos ensaios descrito na Tabela 6. Essa sequência foi clonada em vetor pUC57 e o produto foi purificado e liofilizado, contendo 4 µg do DNA plasmidial (Tabela 6).

Tabela 6 - Sequência de gene sintético utilizada nos ensaios TaqMan® como controle positivo.

Gene Sintético	Sequência	Tamanho
A1 15A16A17A18A	ACCGTACAAGCCGTTAGCAAGACATGATAGGGAGTTGACAAGTTAAAGAAGTTCTGGTTTATA A TAGATACGTTTTTAAAG TTAGGATGTATGGGATAATTGTAGTACACCCCTACTGGAACAAAAATATTTAATTGGATATGTACATATATGGGTAGTAATT TTGGTATAACTCAT A GTTTCATCTTTATTATCATTACTATTTATATGTACATTTACTTTTGGTGGTACTACAGGAGTAATAAACA CATTATGATTACAGCTCCCAAGCAAACATTTAA A TTACAAGGCTACGATAAGACGATATCTCTGAATATTGAGCAGAACAA TACAGACCGTAAGATTACCGTACAAGCCGTTAGCAAGACATGATAGGGAGTTGACAAGTTAAAGAAGTTCTGGTTTATA A T AGATACGTTTTTAAAGTTAGGATGTATGGGATAATTG	446 pb
A2 15G16T17T18G	ACCGTACAAGCCGTTAGCAAGACATGATAGGGAGTTGACAAGTTAAAGAAGTTCTGGTTTATA G TAGATACGTTTTTAAAG TTAGGATGTATGGGATAATTGTAGTACACCCCTACTGGAACAAAAATATTTAATTGGATATGTACATATATGGGTAGTAATT TTGGTATAACTCAT T GTTTCATCTTTATTATCATTACTATTTATATGTACATTTACTTTTGGTGGTACTACAGGAGTAATAAACA CATTATGATTACAGCTCCCAAGCAAACATTTTAA T TACAAGGCTACGATAAGACGATATCTCTGAATATTGAGCAGAACAA TACAGACCGTAAGATTACCGTACAAGCCGTTAGCAAGACATGATAGGGAGTTGACAAGTTAAAGAAGTTCTGGTTTATA G T AGATACGTTTTTAAAGTTAGGATGTATGGGATAATTG	446 pb
B1 19A20A21G	AAGTTAGGATGTATGGGATAATTGTAGTACACCTTAATTGGTTT A ACTTTATTTGGTTTATAGATATTATGTTCCGGTATTGCAT GCCTGGTGTTTTTATTTTACCATACAAGAGATCGCGTACTTTGGACTGAAA A AAGCTGTGAGGAACTACATTAAAGGAACT CGACTGGCCCGCAGAAAACCGTCTATATTCATGTTTGATTGACCTTTAACC G CTAATTACGAATCTCCAAGAATATTTCAAGA GTCCAAGGTTTCGG	262 pb
B2 19C20T21C	AAGTTAGGATGTATGGGATAATTGTAGTACACCTTAATTGGTTT C ACTTTATTTGGTTTATAGATATTATGTTCCGGTATTGCAT GCCTGGTGTTTTTATTTTACCATACAAGAGATCGCGTACTTTGGACTGAAA T AAGCTGTGAGGAACTACATTAAAGGAACT CGACTGGCCCGCAGAAAACCGTCTATATTCATGTTTGATTGACCTTTAACC C CTAATTACGAATCTCCAAGAATATTTCAAGA GTCCAAGGTTTCGG	262 pb

Nota: As bases em destaque representam o SNP encontrado no fragmento amplificado.

Os genes foram ressuspensos conforme as instruções do fabricante (GenScript, EUA). Os microtubos foram centrifugados a 6000 x *g* por 1 minuto a 4 °C. Após foi adicionado 20 µl de água estéril livre de DNA e RNA e aplicou-se um vortex durante 1 minuto. O material foi encubado a 50 °C por 15 minutos para certificar que todo o DNA liofilizado foi dissolvido. A solução mãe foi diluída para obter solução de trabalho com uma concentração de 200 pg/µl. Os controles foram utilizados na reação com a presença de apenas um dos alelos (homozigoto para o alelo 1 [1/1] e homozigoto para o alelo 2 [2/2]) ou com a presença de ambos os alelos para simular uma infecção mista (alelo 1 e alelo 2 homogeneizado [1/2]).

3.8.3 Padronização do ensaio de genotipagem

A padronização dos ensaios de genotipagem foi desenvolvida através da PCR em tempo real com a plataforma StepOnePlus v.2.1 (Applied Biosystems, EUA). As reações da PCR foram preparadas adicionando em cada ensaio um controle negativo, três diluições do controle positivo (10 pg/µl, 20 pg/µl e 30 pg/µl) homozigoto para o alelo 1 (alelo1/alelo1), homozigoto para o alelo 2 (alelo2/alelo2) e heterozigoto (alelo1/alelo2) simulando uma infecção mista (presença de duas cepas diferentes de *P. vivax* em um único indivíduo) e uma amostra de *P. falciparum* para garantir que os *primers* e sondas marcadas são específicas para amplificar apenas o genoma de *P. vivax*. O controle positivo foi usado na concentração que apresentou um melhor desempenho de genotipagem, ou seja, aquela que foi plotada no gráfico de discriminação alélica de maneira recomendada pelo fabricante.

Para a preparação da PCR, foram utilizados em cada amostra: 7,5 µl do master mix *TaqMan Genotyping Master Mix* (Applied Biosystems – EUA) conjunto de reagentes otimizados para a genotipagem de SNPs, incluindo AmpliTaq Gold DNA polimerase, dNTPs, referência passiva (ROX) e mix de componentes otimizados, 0,25 µM de cada sonda MGB alelo-

específicas marcadas com VIC e FAM, 0,9 μ M de cada *primer* anterior e reverso descrito na Tabela 6, 5 μ l de DNA pré-amplificado com a parasitemia quantificada (DNA do parasito variou entre 0,07 a 0,6 pg/ μ l) e água ultra pura para completar o volume final de 20 μ l. As condições iniciais de amplificação foram aplicadas utilizando o aparelho StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, EUA): 60 °C por 30 segundos, 95 °C por 10 minutos (ativação da AmpliTaq Gold), seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos (desnaturação), 60 °C por 1 minuto (anelamento/extensão).

A escolha desta metodologia de genotipagem foi devida à facilidade de reprodutibilidade destes ensaios em outros laboratórios de pesquisa que utilizem estes reagentes e marcadores, o que possibilitará também futuras comparações e o compartilhamento de dados obtidos de formas independentes.

3.8.4 Obtenção dos dados

A determinação dos alelos foi obtida através do software StepOne Software 2.2.2 (Applied Biosystems, EUA). O programa normaliza a fluorescência do *Reporter dye* com o fluorocromo da referência passiva (ROX) em cada amostra e em seguida adiciona as intensidades normalizadas (R_n) de VIC e FAM em um gráfico de discriminação alélica. Cada sonda (VIC e FAM) corresponde a um único alelo e quando há a presença das duas sondas em uma mesma amostra, esta é considerada infecção mista, ou seja, o individuo foi infectado por dois clones distintos de *P. vivax*.

4 RESULTADOS

4.1 Análise do genoma mitocondrial de *P. vivax*

Foi realizado o sequenciamento de aproximadamente 6 kb (5990 pares de bases) do genoma mitocondrial de *P. vivax*, constituído de três genes codificantes, CoI, CoIII e Cyb, e pequenos fragmentos de RNA ribossômico. Foram sequenciados 63 isolados de *P. vivax* supostamente representados por diversas regiões geográficas (América (Central e Sul), Ásia, África e Oceania) provenientes do estudo realizado pelo CDC entre os anos de 2004 e 2008, 7 amostras do Brasil, colhidas entre o anos de 2004 e 2007, e 6 amostras colhidas no Panamá, totalizando 76 amostras sequenciadas neste estudo.

O alinhamento desses genomas mitocondriais completos identificou 147 SNPs, sendo a maioria bi-alélicos. Dos 147 SNPs, 54 estão em regiões não-codificadoras e 93 estão em três região codificadora de genes, CoIII com 10 SNPs (4 sinônimos), CoI com 36 (10 sinônimos) e Cyb com 47 SNPs (18 sinônimos).

4.2 Análise de redes de haplótipos mitocondriais

Combinando os dados genéticos (correspondentes ao nível de similaridade entre haplótipos) com as informações sobre a origem geográfica de cada genoma mitocondrial. Analisamos se os agrupamentos de haplótipos coincidem com a sua origem geográfica. Ao incluir os isolados de casos de malária importada na rede de haplótipos, pode-se avaliar se a sua origem geográfica pode ser presumida segundo os padrões de agrupamento dessas amostras com os demais haplótipos presentes na rede.

Com base na análise de 412 sequências genômicas, foi possível encontrar 238 polimorfismos distribuídos ao longo do genoma mitocondrial completo de *P. vivax*. A rede de haplótipos foi construída através do programa Network 4.6, combinando os 336 isolados depositados no GenBank com os 63 do CDC, 7 do Brasil e 6 do Panamá

(Figura 7). Os isolados do GenBank foram classificados geograficamente como proposto por Culleton et al. (2011) e Iwagami et al. (2010).

Os isolados com genoma mitocondrial sequenciado neste estudo, provenientes do Brasil ($n = 7$) e do Panamá ($n = 6$), agruparam-se na rede de haplótipos junto com os isolados americanos, no agrupamento representado na parte G da Figura 7.

Dos 63 isolados de malária importada, 16 são de origem geográfica desconhecida e 47 têm origem geográfica presumida com base no histórico de viagem e migração relatado pelo paciente (Tabela 1). Desses 47 isolados, seis (18,8%) classificaram-se de modo não correspondente à sua origem geográfica (Figura 7). Esses isolados (isolados 8, 11, 14, 23, 34 e 41) correspondem a infecções adquiridas nas Américas, cujos haplótipos de DNA mitocondrial estão majoritariamente agrupados em uma região da rede (agrupamento C da Figura 7) em que predominam isolados africanos, representados em vermelho, e do Sul da Ásia, representados em laranja. A exceção é o isolado 23 (infecção adquirida na América Central), agrupado junto com haplótipos do Oriente Médio. Todos os isolados de infecções supostamente adquiridas na Índia estão agrupados nessa mesma região da rede haplotípica. Observa-se, portanto, que a análise de genomas mitocondriais não permite distinguir com precisão entre isolados africanos, indianos e do Oriente Médio; além disso, parte dos isolados americanos, especialmente aqueles da América Central e México (códigos 11, 14, 23, 34 e 41), são agrupados junto com os isolados africanos, indianos e do Oriente Médio.

Figura 7 - Rede de haplótipos mostrando a relação entre populações de *P. vivax*.

Nota: A rede foi construída a partir do genoma mitocondrial de 412 isolados, utilizando o método *median-joining* com valor de épsilon igual a zero. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência de haplótipos e cada cor indica a origem geográfica dos isolados e são codificadas da seguinte maneira: vermelho: África, azul: América (Central e do Sul) verde: Sudeste Asiático (Tailândia, Mianma, Indonésia, Vietnã, Filipinas e Malásia), laranja: Sul da Ásia (Índia, Bangladesh, Sri Lanka e Paquistão), rosa: Melanésia, marrom: Oriente Médio (Turquia e Irã), roxo: China e Coreia e amarelo: CDC. Os números indicam os isolados referentes ao CDC.

O isolado 2, que tem a Venezuela ou a Índia como origem presumida (Tabela 1), também está agrupado nessa região da rede, posição que não permite distinguir uma possível origem sul-americana de uma origem indiana. No entanto, as amostras de infecções adquiridas na Ásia e Oceania foram agrupadas de modo coerente com a sua origem geográfica.

Os isolados correspondentes às infecções adquiridas em local desconhecido agruparam-se na rede haplotípica em três diferentes regiões. O isolado 64 encontra-se em uma região da rede que compreende isolados predominantemente da Melanésia, enquanto que os isolados 32, 59, 40 e 63 se encontram entre os isolados americanos (agrupamento G da Figura 7). Os isolados 55, 56, 57, 58, 60, 62, 65, 66 e 67 localizam-se na região da rede que compreende majoritariamente isolados africanos e do sul da Ásia, dificultando a determinação precisa de sua origem. A posição dos isolados 53 e 54 também dificulta a determinação de sua origem: o primeiro está em posição equidistante de aglomerados de isolados americanos e africanos/asiáticos, enquanto o segundo está em posição equidistante entre isolados africanos/asiáticos e do Sudeste Asiático.

4.3 Análise de variância molecular (AMOVA)

Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) foram gerados a partir 336 genomas mitocondriais completos de *P. vivax* (compreendendo 122 polimorfismos) agrupados segundo sua origem geográfica em quatro continentes: África, América (com duas macrorregiões, América Central e América do Sul), Ásia (com quatro macrorregiões, Sul da Ásia, Sudeste Asiático, China e Coreia e Oriente Médio) e Melanésia. Os resultados demonstraram que 64,02% da variação genética global devem-se à variabilidade no interior de cada macrorregião, 19,66% devem-se à variabilidade entre macrorregiões dentro do mesmo continente e 16,30% devem-se à variabilidade entre os

continentes. Os valores de Φ_{SC} (índice de variação entre continentes), Φ_{ST} (índice de variação entre macrorregiões) e Φ_{CT} (índice de variação dentro das macrorregiões) foram todos significativos (Tabela 7), indicando a existência de estruturação em cada um dos níveis analisados.

Tabela 7 - Análise de variância molecular (AMOVA) a partir do genoma mitocondrial de *P. vivax* agrupados em quatro grupos – África, América, Ásia e Melanésia.

Fonte da Variação	Soma dos quadrados	Componentes da variação	Percentagem da variação
Entre continentes	167,619	0,38999	16,30279
Entre macrorregiões dentro dos continentes	70,564	0,47053	19,66935
Dentro das macrorregiões	520,768	1,53167	64,02786
Total	758,951	2,39219	
Φ_{SC} : 0,23501			
Φ_{ST} : 0,35972			
Φ_{CT} : 0,16303			

4.4 Análise de diversidade genética dos genomas mitocondriais

Analizou-se a diversidade genética de 349 genomas mitocondriais completos de *P. vivax* (336 genomas mitocondriais disponível no GenBank e 13 genomas sequenciados neste estudo, 6 isolados do Panamá e 7 do Brasil) agrupados segundo sua origem geográfica em sete macrorregiões: (1) África; (2) América (América Central e América do Sul); (3) Sudeste Asiático (Tailândia, Mianma, Indonésia, Vietnã, Filipinas e Malásia); (4) Sul da Ásia (Índia, Bangladesh, Sri Lanka e Paquistão); (5) Melanésia (Papua Nova Guiné, Vanuatu e Ilhas de Salomão); (6) Oriente Médio (Turquia e Irã) e (7) China e Coreia. Os resultados desta análise estão apresentados na Tabela 8 e sugeriram que China e Coreia, bem como Sudeste Asiático apresentaram maior diversidade (sugerindo maior tempo

de divergência; $\pi = 0,0007398$ para China e Coreia e $\pi = 0,0007239$ para o Sudeste Asiático), seguido dos isolados da Melanésia ($\pi = 0,0005957$), o que pode sugerir estas populações de parasitos sendo as mais antigas. Isolados do Sul da Ásia e Oriente Médio ($\pi = 0,0004612$ e $\pi = 0,0004388$) apresentaram divergência comparável entre eles. Como esperado, a diversidade média foi menor em isolados da América ($\pi = 0,0002401$), sendo este continente considerado o local mais recentemente colonizado por *P. vivax*. Curiosamente, a população da África apresentou diversidade ainda menor quando comparada com o restante do mundo ($\pi = 0,0002006$), o que pode ser indicativo de colonização recente ou de um efeito de tipo gargalo de garrafa nesta população.

Tabela 8 - Análise da distância evolutiva a partir do genoma mitocondrial de *P. vivax* agrupados em sete macrorregiões: África, Oriente Médio, América, Sul da Ásia, Sudeste Asiático, Melanésia e China e Coréia.

Macrorregiões	Valores de π	Erro padrão (S.E.)
China e Coréia	0,0007398	0,0002368
Sudeste Asiático	0,0007239	0,0001672
Melanésia	0,0005957	0,000129
Sul da Ásia	0,0004612	0,0001062
Oriente Médio	0,0004388	0,0001608
América	0,0002401	0,0000698
África	0,0002006	0,0000438

4.5 Análise de DNA microssatélite

Analizamos a seguir a capacidade de agrupar isolados de *P. vivax* segundo sua região geográfica de origem com base em tipagem de DNA microssatélite. Com esta finalidade, analisamos dados de tipagem de 13 marcadores de DNA microssatélite de 779 isolados de *P. vivax* provenientes de diversas regiões geográficas: Américas (Brasil, Nicarágua,

El Salvador, Honduras, Equador, República Dominicana, Panamá e Colômbia), Sudeste Asiático (Vietnã, Tailândia, Indonésia, Mianma e Camboja), Sul da Ásia (Índia, Bangladesh, Sri Lanka), África (Mauritânia, Etiópia) e Melanésia (Papua Nova Guiné).

Para definir se existe coincidência entre agrupamentos genéticos e a origem geográfica dos isolados, utilizou-se a estratégia bayesiana implementada pelo programa Structure v. 2.3.1 (PRITCHARD et al., 2000) para avaliar se o conjunto de amostras é composto por duas ou mais “populações” geneticamente distintas. Nessa análise, variamos os valores de K entre 1 e 7. O valor de $K = 5$ representou a estrutura genética com maior suporte estatístico. Os resultados obtidos podem ser resumidos do seguinte modo: (1) Na primeira população (“verde”), predominam isolados do Camboja, mas isolados do Vietnã, Tailândia e América Central estão presentes com menor percentagem. (2) Na segunda população (“amarela”), predominam isolados africanos (Etiópia), com menor participação de isolados de Sri Lanka e Mianma. (3) Na população “azul claro” predominam isolados brasileiros. (4) Na população “azul escuro”, predominam isolados de Mianma, com menor participação do Sri Lanka e Etiópia. (5) Na população “vermelha”, predominam isolados de Sri Lanka, com menor participação da América Central. Observamos, portanto, que os isolados do Sudeste Asiático dividem-se em dois agrupamentos genéticos distintos, um majoritariamente composto por isolados de Mianma (população “azul escuro”) e outro por isolados do Camboja (população “verde”).

Esses resultados foram reagrupados na Figura 8 de modo a mostrar a correspondência entre a origem geográfica dos isolados e sua composição genética (definida como a contribuição relativa das populações “verde”, “vermelha”, “azul escuro”, “azul claro” e “amarela” em sua constituição). Cada barra na Figura 8 representa uma amostra; as cores em que se dividem as barras representam cada população que contribuiu para a constituição genética daquele isolado.

Observe que a maioria dos isolados tem contribuição de duas ou mais populações (ou seja, a maioria das barras tem mais de uma cor), mas na maioria dos casos a contribuição de uma delas claramente predomina. Na Figura 8, as amostras foram agrupadas nas seguintes regiões: (a) Sul da Ásia (majoritariamente amostras do Sri Lanka), (b) Mianma, (c) Camboja e demais países do Sudeste Asiático (Vietnã, Tailândia, Indonésia); (d) África (majoritariamente da Etiópia), (e) Brasil e (f) América Central. Torna-se evidente que algumas dessas populações definidas com base em critérios geográficos são muito heterogêneas do ponto de vista genético. Por exemplo, as amostras do Sri Lanka apresentam diferentes proporções de contribuição das populações “vermelha”, “azul” e “amarela” e qualquer uma dessas populações pode predominar na constituição genética de um isolado em particular. Embora as amostras brasileiras tenham contribuição genética predominante da população “azul claro”, existem diversas amostras (colhidas entre 2004 e 2005) em que predomina a contribuição da população “vermelha” ou “verde”, padrão também observado entre as amostras da América Central. As populações do Sudeste Asiático (exceto Mianma) e África foram às menos heterogêneas geneticamente, com predomínio de contribuição das populações “verde” e “amarela”, respectivamente.

Figura 8 - Análise bayesiana com o programa Structure v. 2.3.1 contendo a tipagem de 13 marcadores de microssatélite com 779 isolados e com valor de $K = 5$.

Nota: Os isolados foram classificados em cinco regiões geográficas, a saber: Sul da Ásia, Sudeste Asiático, África, América do Sul (Brasil) e América Central. As letras representam a localização geográfica de cada isolado e pode ser codificado da seguinte forma: A- Sri Lanka, B- Índia, C- Bangladesh, D- Mianma, E- Camboja, F- Vietnã, G- Tailândia, H- Indonésia, I- Papua Nova Guiné, J- Mauritânia, K- Etiópia, L- Brasil (coletada em 1999), M- Brasil (coletada entre 2004 e 2005), N- Nicarágua, O- Honduras, P- Equador, Q- República Dominicana, R- El Salvador, S- Colômbia, T- Panamá.

Nas análises subsequentes, em que estabelecemos a correspondência entre similaridade genética e origem geográfica das amostras, utilizamos um valor de $K = 6$, dividindo os isolados do Sudeste Asiático em duas subpopulações geneticamente distintas (uma compreendendo amostras de Mianma e a segunda compreendendo amostras dos demais países da região) e os isolados americanos em dois grupos (um compreendendo amostras da América do Sul e outro da América Central). Na etapa seguinte de análise, classificamos as amostras de origem geográfica conhecida em um dos seguintes grupos: (a) Sul da Ásia ("vermelho"), (b) Sudeste Asiático I (Camboja, Vietnã, Tailândia e Indonésia; "verde"), (c) Sudeste Asiático II (Mianma "azul escuro"), (d) África ("amarelo"), (e) América do Sul ("azul claro") e (f) América Central ("laranja"). Esses dados foram utilizados pelo programa para definir as características genéticas de cada uma dessas populações. O próximo passo consistiu em classificar amostras de casos de malária importada, sem informar a sua origem presumida (quando essa informação estiver disponível) segundo a contribuição relativa de cada uma das seis populações definidas acima ("vermelho", "verde", "amarelo", "azul escuro", "azul claro" e "laranja") para a constituição genética de cada isolado. Nesta análise, cada população corresponde aproximadamente a uma origem geográfica.

A análise foi realizada com 57 isolados derivados de casos importados de malária por *P. vivax* provenientes do CDC (Atlanta, Estados Unidos) tipados neste estudo. Os seguintes parâmetros de análise foram utilizados: $K = 6$, valor 2 para GENSBACK ([G]; informações relacionadas com a imigração de ancestrais de um determinado indivíduo) e para MIGRPRIOR (diferentes taxas de migração) uma variação entre 0,001 a 0,1. A estrutura genética mais coerente com a origem geográfica das amostras foi encontrada com MIGRPRIOR igual a 0,001.

A Tabela 9 mostra a localização geográfica presumida dos isolados do CDC segundo o histórico de viagem/migração de área endêmica relatado pelos pacientes. Na mesma tabela apresentam-se os resultados

obtidos com o programa Structure v. 2.3.1, que atribuiu a cada amostra uma proporção p de participação de cada uma das seis populações em sua composição genética. Considerou-se que uma amostra pertencia a uma população (e, portanto, a uma área geográfica) quando o valor de p foi igual ou superior a 0,6.

Tabela 9 - Dados gerados pelo programa Structure v. 2.3.1 contendo a localização geográfica de cada isolado coletado no CDC entre os anos de 2004 e 2008.

(continua)

Localização geográfica	Isolados	Populações					
		Pop.1	Pop.2	Pop.3	Pop.4	Pop.5	Pop.6
México	34	0,242	0,220	0,140	0,039	0,031	0,329
América Central	12	0,048	0,017	0,026	0,017	0,017	0,875
América Central	13	0,158	0,339	0,040	0,026	0,337	0,100
América Central	14	0,147	0,557	0,043	0,027	0,027	0,199
América Central	15	0,021	0,295	0,015	0,015	0,051	0,603
América Central	16	0,028	0,033	0,022	0,021	0,173	0,723
América Central	17	0,058	0,168	0,368	0,016	0,202	0,188
América Central	19	0,048	0,045	0,029	0,025	0,035	0,819
América Central	21	0,027	0,090	0,023	0,017	0,121	0,722
América Central	29	0,055	0,059	0,056	0,029	0,043	0,759
América Central	30	0,057	0,033	0,060	0,019	0,350	0,482
América Central	31	0,177	0,028	0,105	0,020	0,357	0,314
América Central	41	0,024	0,200	0,025	0,025	0,042	0,684
América Central	42	0,067	0,087	0,026	0,016	0,044	0,761
América Central	51	0,023	0,048	0,023	0,013	0,060	0,834
América Central	72	0,019	0,031	0,018	0,028	0,171	0,734
América do Sul	2	0,116	0,046	0,044	0,041	0,027	0,725
América do Sul	5	0,017	0,049	0,017	0,016	0,070	0,830
América do Sul	8	0,057	0,100	0,058	0,034	0,136	0,616
Índia	6	0,115	0,091	0,031	0,030	0,081	0,652
Índia	9	0,077	0,521	0,024	0,021	0,115	0,242
Índia	26	0,351	0,170	0,053	0,067	0,063	0,296
Índia	27	0,131	0,091	0,045	0,017	0,077	0,637
Índia	36	0,411	0,094	0,072	0,050	0,021	0,352
Índia	47	0,057	0,802	0,017	0,013	0,067	0,043
África	10	0,072	0,317	0,135	0,037	0,039	0,399
África	18	0,077	0,315	0,049	0,018	0,035	0,507
África	28	0,128	0,609	0,113	0,042	0,029	0,079
África	37	0,026	0,194	0,053	0,013	0,174	0,539
África	38	0,106	0,254	0,036	0,022	0,378	0,203
África	39	0,035	0,707	0,022	0,036	0,011	0,190

Tabela 9 - Dados gerados pelo programa Structure v. 2.3.1 contendo a localização geográfica de cada isolado coletado no CDC entre os anos de 2004 e 2008.

(conclusão)

Localização geográfica	Isolados	Populações					
		Pop.1	Pop.2	Pop.3	Pop.4	Pop.5	Pop.6
África	46	0,092	0,796	0,021	0,020	0,021	0,049
Ásia Central	4	0,060	0,288	0,042	0,037	0,027	0,547
Ásia Central	48	0,035	0,608	0,021	0,025	0,049	0,263
Melanésia	24	0,059	0,141	0,042	0,053	0,056	0,649
Melanésia	50	0,030	0,584	0,081	0,043	0,169	0,093
Melanésia	73	0,033	0,292	0,057	0,014	0,015	0,589
Desconhecido	32	0,113	0,091	0,025	0,029	0,050	0,693
Desconhecido	40	0,038	0,029	0,033	0,015	0,016	0,868
Desconhecido	53	0,041	0,803	0,057	0,040	0,021	0,039
Desconhecido	55	0,222	0,408	0,090	0,024	0,142	0,114
Desconhecido	56	0,061	0,049	0,074	0,019	0,023	0,773
Desconhecido	57	0,053	0,530	0,043	0,129	0,069	0,177
Desconhecido	58	0,108	0,380	0,035	0,028	0,104	0,346
Desconhecido	60	0,190	0,124	0,075	0,032	0,021	0,558
Desconhecido	63	0,024	0,069	0,020	0,017	0,047	0,823
Desconhecido	64	0,164	0,093	0,086	0,025	0,043	0,589
Desconhecido	65	0,454	0,037	0,044	0,031	0,024	0,409
Desconhecido	66	0,177	0,537	0,049	0,032	0,040	0,164
Desconhecido	67	0,100	0,096	0,035	0,032	0,021	0,715
Desconhecido	68	0,048	0,805	0,028	0,022	0,057	0,040
Desconhecido	69	0,021	0,026	0,028	0,016	0,022	0,888
Desconhecido	70	0,234	0,185	0,143	0,206	0,146	0,086
Desconhecido	71	0,429	0,216	0,046	0,037	0,035	0,238
Desconhecido	74	0,122	0,132	0,071	0,037	0,580	0,057

Nota: Abreviaturas:

Pop 1: Sul da Ásia

Pop 2: Sudeste Asiático

Pop 3: Sudeste Asiático 2

Pop 4: África

Pop 5: América do Sul

Pop 6: América Central

Os números se referem à proporção que cada isolado pertence a uma dada população; aqueles em negrito indicam a contribuição genética predominante (quando houver) na constituição de cada isolado.

Dos 57 isolados analisados, 31 puderam ser localizados geograficamente com base na contribuição predominante ($p > 0,6$) de

uma das seis populações em sua constituição, enquanto 26 apresentaram-se divididos em mais de uma população. Dos 31 isolados classificados geograficamente, somente 11 (isolados 12, 15, 16, 19, 21, 29, 41, 42, 51, 72 e 49) foram classificados de modo coerente com a sua origem geográfica presumida (Figura 9). Entre os demais, 12 (isolados 2, 5, 8, 6, 27, 47, 28, 39, 46, 48, 43 e 24) foram classificados de modo incorreto e oito não tinham sua origem geográfica previamente conhecida (isolados 32, 40, 53, 56, 63, 67, 68 e 69).

Analizamos a seguir alguns exemplos particulares. O isolado 2 apresentou, como origem presumida, duas populações distintas: América do Sul (Venezuela) e Sul da Ásia (Índia). A análise de seu genoma mitocondrial havia sido inconclusiva quanto à sua origem geográfica. Entretanto, os dados gerados pelo programa Structure v. 2.3.1 sugerem sua origem geográfica na América Central ($p = 0,725$).

Os isolados 5 e 8 foram classificados geneticamente na população da América do Sul, mas a história de viagens e migração sugere que as infecções tenham sido adquiridas na América Central. Como apresentado na Figura 8, a América do Sul (Brasil) apresentou alguns isolados com padrões genéticos similares com aqueles de isolados da América Central, dificultando a distinção entre esses dois grupos. Já os isolados 28, 39 e 46 apresentaram como origem geográfica presumida a África, mas agrupam-se entre as amostras do Sudeste Asiático 1 (Camboja, Vietnã, Tailândia e Indonésia). Os isolados 6, 27 e 47 foram agrupados com as amostras da América Central (6 e 27) e Sudeste Asiático 1 (47), mas a história de viagem sugere que as infecções tenham sido adquiridas na Índia. O isolado 48 apresentou como origem geográfica presumida a Ásia Central, porém foi classificado geneticamente no Sudeste Asiático 1. Finalmente, o isolado 43 (origem presumida: Coréia) classificou-se com as amostras do Sul da Ásia, enquanto o isolado 24 (origem presumida: Oceania) se agrupou com amostras da América Central. Portanto, a tipagem de microssatélites, mesmo quando sugeria uma possível origem geográfica

das amostras, mostrou-se incapaz de classificar com segurança a maioria dos isolados derivados de casos importados de malária.

Além disso, a análise genética mostrou-se incapaz de indicar uma possível origem geográfica (corretamente ou não) para 26 dos 57 isolados analisados (Figura 9). Por exemplo, o isolado 34 (infecção provavelmente adquirida no México, América do Norte) tem em sua composição genética contribuição equivalente de populações do Sul da Ásia (0,2), Sudeste Asiático 1 (0,2) e América Central (0,3). Os isolados com infecção adquirida na América Central, 13, 14 e 17 apresentaram-se divididos entre o Sudeste Asiático e as Américas, enquanto que os isolados 30 e 31 ficaram divididos entre duas populações, América do Sul e América Central. Os isolados 9, 26 e 30 (origem presumida: Índia) apresentaram-se divididos principalmente entre duas populações.

Neste estudo, 18 isolados correspondem a infecções adquiridas em local desconhecido. Os dados gerados pelo programa sugerem que seis dessas infecções tenham sido adquiridas na América Central e duas no Sudeste Asiático 1. Os 10 isolados restantes (55, 57, 58, 60, 64, 65, 66, 70, 71 e 74) não tiveram sua possível origem geográfica determinada, pois os dados genéticos não permitiram classificá-los como pertencentes a uma das seis populações definidas.

Figura 9 - Estrutura populacional de *P. vivax* construída com Strucuture 2.3.1 contendo a tipagem de 13 marcadores microssatélites de 842 isolados com $K=6$. No eixo X, estão respresentadas as 57 amostras do CDC tipadas com 13 marcadores de microssatélites e no eixo Y, a proporção estimada para cada população.

Nota: Os números de 1 a 10 representam a origem geográfica presumida: 1 = México, 2 = América Central, 3 = América do Sul, 4 = Índia, 5 = África, 6= Ásia Central, 7 = Sudeste Asiático, 8 = Coréia, 9 = Oceania e 10 = Origem geográfica desconhecida.

4.6 Genotipagem de SNPs por metodologia TaqMan®

A padronização dos ensaios de genotipagem de SNPs mitocondriais foi realizada com isolados de origens geográficas díspares (12 de cada um dos seguintes países: Brasil, Sri Lanka e Camboja) com o intuito de aumentar a probabilidade de encontro de haplótipos diferentes entre as amostras testadas. Incluímos também seis amostras de casos importados de malária vivax provenientes do CDC nesta análise como controles da reação, pois o seu genoma mitocondrial havia sido sequenciado neste estudo.

Foram inicialmente selecionados sete polimorfismos mitocondriais para a padronização de ensaios de tipo TaqMan®. Entretanto, dois desses ensaios não puderam ser padronizado, mesmo depois de variar diversos parâmetros de reação (concentrações dos *primers*, sondas e DNA, bem como a temperatura de anelamento). Os ensaios para a avaliação de cinco polimorfismos mitocondriais, entretanto, foram padronizados adequadamente, gerando dados confiáveis para análise. A Tabela 10 apresenta os cinco ensaios padronizados neste estudo. Dentre estes, três SNPs (Ensaio 1, Ensaio 4, Ensaio 5) encontram-se em regiões não-codificantes, e em dois (Ensaio 2 e Ensaio 3) em regiões codificantes (CoxI e Cyb, com SNP não- sinônimo e sinônimo, respectivamente).

Tabela 10 - Descrição dos cinco SNPs ao longo do genoma mitocondrial de *P. vivax* tipados neste estudo.

Ensaio	SNP	Região no genoma	Posição no Cromossomo	Tipo de SNP
Ensaio 1	A/G	Região não-codificante	181	-
Ensaio 2	T/A	CoxI	4354	Não sinônimo
Ensaio 3	A/T	Cyb	5913	Sinônimo
Ensaio 4	A/C	Região não-codificante	240	-
Ensaio 5	G/C	Região não-codificante	393	-

Nota: A posição no cromossomo foi estabelecida com base no genoma de referência AD80 com número de acesso no GenBank AY598074.

Todas as reações tiveram um volume final de 20 µl e com concentrações de DNA que variaram de 0,07 a 0,6 pg/µl. Todas as sondas foram testadas utilizando controles positivos (gene sintético descrito na metodologia 3.8.2) com homozigoto VIC (alelo 1), homozigoto FAM (alelo 2) e heterozigoto VIC/FAM (alelo 1/alelo 2), controle negativo (sem DNA) e controle com *P. falciparum* para garantir que os *primers* e as sondas são específicos para amplificar o genoma de *P. vivax*. Uma vez amplificados, os produtos foram analisados através do programa StepOnePlus v.2.2.2 (Applied Biosystems, EUA) com a função *Allelic Discrimination Plot* (Figura 10).

Figura 10 - Representação da discriminação alélica do ensaio 1 com sondas TaqMan®.

Nota: A cor vermelha representa sonda marcada com VIC (A/A), a cor azul sonda marcada com FAM (T/T), cor verde sondas marcadas com VIC e FAM (A/T), e cor preta amostras negativas.

O ensaio 1 (A/G) evidenciou um polimorfismo (G) e três infecções mistas nas amostras de Camboja. Todas as amostras do Brasil e de Sri Lanka hibridizaram apenas com sondas marcadas com VIC (alelo A) e uma amostra de Sri Lanka não pode ser genotipada, pois a concentração de DNA foi inferior a 0,07 pg/µl. Neste ensaio foi utilizado a amostra 43

CDC para confirmar se os dados de sequenciamento correspondiam com os dados de genotipagem, como apresentado na Tabela 11.

No ensaio 2 (A/T), todas as amostras do Brasil e Sri Lanka hibridizaram apenas com a sonda VIC. Uma amostra de Camboja e a amostra controle do CDC (43CDC) foram polimórficas para sonda T (hibridizaram com a sonda FAM).

Já no ensaio 3, todas as amostras de todas as localidades (Brasil, Sri Lanka, Camboja) com exceção dos controles do CDC (7CDC e 9CDC) hibridizaram apenas com a sonda VIC, e três amostras do Brasil não puderam ser genotipadas.

No ensaio 4, 10 amostras do Camboja, uma amostra do Sri Lanka e os controles do CDC (49CDC e 43CDC) hibridizaram com a sonda FAM (C), enquanto que todas as amostras do Brasil hibridizaram apenas com a sonda VIC (A). Duas amostras de Camboja são infecções mistas uma vez que hibridizou com as duas sondas.

Por fim, o ensaio 5 não se mostrou nenhum pouco polimórfico, todas as amostras hibridizaram apenas com a sonda FAM (G). Provavelmente este é um polimorfismo regional, que ao analisar o banco de dados com os genomas mitocondriais, observamos que este SNP esta presente principalmente na China.

Tabela 11 - Análises dos resultados dos ensaios de genotipagem com sondas marcadas (TaqMan®).

(continua)

Origem	Amostras	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Inf.Mista
		SNP - A/G	SNP - A/T	SNP - A/T	SNP - A/C	SNP - C/G	
Brasil	28V	A	A	A	A	G	N
Brasil	20V	A	A	A	A	G	N
Brasil	24V	A	A	A	A	G	N
Brasil	26V	A	A	INDET	A	G	N
Brasil	22V	A	A	INDET	A	G	N
Brasil	23V	A	A	INDET	A	G	N
Brasil	27V	A	A	A	A	G	N
Brasil	4V	A	A	A	A	G	N
Brasil	12V	A	A	A	A	G	N
Brasil	21V	A	A	A	A	G	N
Brasil	25V	A	A	A	A	G	N
Brasil	42V	A	A	A	A	G	N
Sri Lanka	SL12	INDET	INDET	A	INDET	G	N
Sri Lanka	SL16	A	A	A	A	G	N
Sri Lanka	SL27	A	A	A	A	G	N
Sri Lanka	SL29	A	A	A	A	G	N
Sri Lanka	SL32	A	A	A	A	G	N
Sri Lanka	SL33	A	A	A	A	G	N
Sri Lanka	SL34	A	A	A	A	G	N
Sri Lanka	SL35	A	A	A	A	G	N
Sri Lanka	SL36	A	A	A	A	G	N
Sri Lanka	SL40	A	A	A	A	G	N
Sri Lanka	SL41	A	A	A	A	G	N
Sri Lanka	SL44	A	A	A	C	G	N

Tabela 11 - Análises dos resultados dos ensaios de genotipagem com sondas marcadas (TaqMan®).

(conclusão)

Origem	Amostras	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Inf.Mista
		SNP - A/G	SNP - A/T	SNP - A/T	SNP - A/C	SNP - C/G	
Camboja	PV029	A	A	A	C	G	N
Camboja	PV030	A	A	A	C	G	N
Camboja	PV037	A	A	A	C	G	N
Camboja	PV045	A	A	A	C	G	N
Camboja	PV048	G	T	A	C	G	N
Camboja	PV050	A/G	A	A	A/C	G	S
Camboja	PV060	A/G	A	A	A/C	G	S
Camboja	PV0002	A/G	A	A	C	G	S
Camboja	PV016	A	A	A	C	G	N
Camboja	PV018	A	A	A	C	G	N
Camboja	PV020	A	A	A	C	G	N
Camboja	PV034	A	A	A	C	G	N
CDC	CONT.CDC	G	T	T	C	G	N
CDC	CONT.CDC	A	A	T	C	G	N
CDC	56CDC	A	A	A	A	G	N
CDC	13CDC	A	A	A	A	G	N
CDC	29CDC	A	A	A	A	G	N
CDC	30CDC	A	A	A	A	G	N

Nota: As bases nitrogenadas (A, G, T, C) representam os alelos presentes em cada indivíduo, a sigla INDET representa amostras com resultados indeterminados ou não amplificados. As amostras do CDC com as iniciais CONT, são amostras utilizadas como controle para verificar se os dados do sequenciamento e genotipagem são correspondentes. As infecções mistas foram identificadas com a letra S e as não mistas com N.

4.7 Análise de tipagem molecular por microssatélites

Os resultados obtidos com a tipagem dos polimorfismos mitocondriais sugeriam haver pouca variação genética no conjunto de amostras analisadas do Brasil, Camboja e Sri Lanka. No entanto, quando avaliamos os resultados previamente obtidos com a tipagem de MSAT dessas mesmas amostras, bem como com as 4 amostras de infecção importada, observamos grande diversidade genética nesse conjunto de amostras. Nenhum haplótipo de microssatélites foi compartilhado entre duas ou mais amostras (Tabela 12).

A Tabela 12 também mostra que a tipagem de DNA microssatélite evidenciou a presença de múltiplos clones nas amostras analisadas. Define-se a infecção como multiclonal quando pelo menos um dos marcadores testados (todos eles presentes em cópia única no genoma nuclear de *P. vivax*) apresenta mais de um alelo, indicando a co-existência de dois ou mais clones geneticamente distintos na amostra. Dentre as amostras, sete amostras do Brasil, 10 do Camboja e 1 do CDC apresentaram infecção mista, enquanto que nenhuma do Sri Lanka, apresentou infecção por múltiplos clones.

Tabela 12: Dados de tipagem molecular com 13 microssatélite em isolados de *P. vivax*.

(continua)

Origem	Amostras	Microssatélites													Inf. Mista
		MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6	MS7	MS8	MS9	MS10	MS12	MS15	MS20	
Brasil	4V	240	198	188	192	178	240	145	282	173	192	224	233	210	S
Brasil	12V	240	198	188	198	226	240	145	333	158	192	215	248	213	N
Brasil	20V	243	198	185	198	226	210	145	261	158	192	215	233	210	S
Brasil	21V	237	198	191	195	211	246	142	261	158	192	215	251	207	N
Brasil	22V	243	202	182	198	205	210	145	294	161	240	242	245	204	S
Brasil	23V	237	194	185	216	175	210	145	216	173	240	215	251	198	S
Brasil	24V	240	202	191	210	205	240	142	294	161	192	212	233	213	N
Brasil	25V	240	202	188	216	169	210	145	294	161	192	224	233	201	N
Brasil	26V	237	198	185	198	205	210	145	294	161	240	215	251	201	N
Brasil	27V	240	202	188	216	166	210	145	294	161	192	224	236	201	S
Brasil	28V	240	198	188	195	178	240	145	276	170	192	224	233	210	S
Brasil	42V	237	198	185	192	175	210	145	276	161	192	215	251	225	S
Sri Lanka	SL12	240	214	182	201	163	255	148	228	170	240	230	245	201	N
Sri Lanka	SL16	243	214	188	195	169	252	145	249	164	291	224	242	231	N
Sri Lanka	SL27	231	214	188	192	163	237	139	297	146	222	221	242	174	N
Sri Lanka	SL29	231	214	182	192	163	237	139	297	146	222	221	245	174	N
Sri Lanka	SL32	228	222	182	189	166	234	145	324	164	177	206	254	171	N
Sri Lanka	SL33	222	214	182	192	163	237	139	297	146	222	221	248	174	N
Sri Lanka	SL34	234	218	182	189	166	234	139	324	164	177	206	254	171	N
Sri Lanka	SL35	222	218	182	189	166	234	145	324	164	177	200	254	171	N
Sri Lanka	SL36	228	210	176	198	163	240	133	306	161	195	212	242	204	N
Sri Lanka	SL40	234	222	182	189	166	234	145	324	164	177	206	254	171	N
Sri Lanka	SL41	234	222	182	189	166	234	151	324	161	177	200	260	171	N

Tabela 12: Dados de tipagem molecular com 13 microssatélite em isolados de *P. vivax*.

(conclusão)

Origem	Amostras	Microssatélites													Inf. Mista
		MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6	MS7	MS8	MS9	MS10	MS12	MS15	MS20	
Sri Lanka	SL44	234	214	182	189	166	234	151	324	164	177	200	254	171	N
Camboja	PV 002	234	214	185	204	172	237	139	246	152	171	218	260	177	S
Camboja	PV 0016	234	182	188	222	166	210	154	234	152	201	212	242	213	S
Camboja	PV0018	231	182	185	192	181	249	145	297	158	204	203	242	216	S
Camboja	PV0020	234	182	188	198	172	246	157	285	152	198	210	242	243	S
Camboja	PV0029	237	222	185	207	172	210	160	279	158	168	206	242	204	S
Camboja	PV0030	237	198	197	198	175	246	157	210	176	195	218	254	216	S
Camboja	PV0034	237	186	191	198	169	252	151	252	167	168	215	242	210	S
Camboja	PV0037	225	226	191	198	175	258	157	273	152	201	212	239	210	S
Camboja	PV0045	237	202	191	186	163	240	148	249	167	186	206	242	189	S
Camboja	PV 0048	234	198	191	201	166	249	157	264	155	213	227	242	213	S
Camboja	PV0050	234	238	191	207	184	249	178	249	167	180	218	245	216	N
Camboja	PV0060	234	246	194	198	190	249	181	273	152	186	212	245	216	N
CDC	13 CDC	240	186	185	198	175	246	145	276	170	234	200	260	222	N
CDC	29 CDC	240	214	185	192	172	249	145	201	155	207	182	263	198	N
CDC	30 CDC	237	206	185	195	175	234	142	294	161	195	218	251	246	N
CDC	56 CDC	234	210	194	192	178	231	145	201	161	210	218	248	183	S

Nota: Cada número corresponde os valores dos picos de fluorescência. As infecções mistas foram identificadas com a letra S e as não mistas com N.

5 DISCUSSÃO

5.1 Estrutura geográfica de *P. vivax*

5.1.1 Estrutura populacional de *P. vivax* com base no genoma mitocondrial

Neste estudo, foi criado um banco de dados baseado no genoma mitocondrial completo de *P. vivax* presente em todas as áreas endêmicas do mundo e a partir destes dados foi construído uma rede de haplótipos combinando o genoma de 336 isolados de *P. vivax* depositados no GenBank (CORNEJO; ESCALANTE, 2006; CULLETON et al., 2011; IWAGAMI et al., 2010; JONGWUSTIWES et al., 2005; MU et al., 2005) com os 76 sequenciado neste estudo (63 isolados de malária importada coletados no CDC, EUA; 7 isolados do Brasil e 6 do Panamá). Com base na análise de 412 sequências genômicas, observou-se que os polimorfismos do genoma mitocondrial permitem agrupar as amostras de *P. vivax* de acordo com as seguintes regiões geográficas: (a) África, Sul da Ásia e Oriente Médio, (b) Melanésia, (c) Sudeste Asiático, (d) China e Coreia, (e) América. A rede haplotípica deste estudo apresenta um quadro semelhante ao previamente demonstrado por Cornejo e Escalante (2006), Culleton et al. (2011) e Mu et al. (2005), onde a população da Melanésia e Leste da Ásia demonstraram a maior diversidade de haplótipos, sugerindo que estas populações de *P. vivax* são as mais antigas e os possíveis ancestrais dos isolados encontrado em outras áreas endêmicas. No entanto, a diversidade de haplótipos diminui do leste da Ásia para o Sul da Ásia e África, correspondendo a uma migração leste-oeste de *P. vivax* (CORNEJO; ESCALANTE, 2006; CULLETON et al., 2011). A África apresentou uma população de *P. vivax* com a menor diversidade de haplótipos, quando comparada com todas as outras populações, inclusive menor do que a América, que é considerado como sendo o último continente colonizado por *P. vivax* (CULLETON et al., 2011). Até o presente momento não há conclusão definitiva sobre a data de chegada de *P. vivax* nas Américas, mas os dados genéticos sugerem que este

continente foi provavelmente colonizado pelo parasito em momentos distintos, o que poderia explicar o encontro de parasitos desse continente em dois grupos distintos de haplótipos na rede haplotípica. A hipótese mais aceita é que todas as formas de malária vivax no Novo Mundo têm como origem o Velho Mundo, sendo provavelmente trazidas por africanos e europeus durante a era colonial. Entretanto, existe a possibilidade de uma introdução muito mais antiga, simultânea com as primeiras migrações humanas para o continente americano.

5.1.2 Estrutura populacional com base em microsatélites

Neste estudo, empregamos a tipagem de DNA microsatélite para determinar os padrões regionais de polimorfismos de amostras de *P. vivax* e inferir a origem geográfica de infecções importadas. Com esta finalidade analisamos o genoma nuclear de 836 isolados de *P. vivax* através da tipagem com 13 marcadores de DNA microsatélites.

Com base em nossos resultados, podemos sugerir que os isolados do Sul da Ásia, são os mais polimórficos e compartilham características genéticas com os isolados do Sudeste Asiático, África e América Central. Os isolados do Sudeste Asiático se dividiram em duas estruturas populacionais, ou seja, os isolados de Mianma e Camboja (representado em “azul escuro” e “verde”, respectivamente na Figura 8) apresentaram na sua composição genética, haplótipos distintos, dividindo a população em duas estruturas. Os isolados africanos são bem característicos e não apresentam divisão populacional, talvez isto ocorra pelo fato de incluirmos na análise um grande número de amostras da Etiópia. Os isolados da América dividiram-se claramente em duas populações. A América Central apresentou uma combinação genética característica dos isolados do Sul da Ásia e do Sudeste Asiático (com predomínio dos isolados de Camboja), enquanto que os isolados da América do Sul (Brasil) apresentaram duas estruturas populacionais o que vai de encontro com os resultado de Karunaweera et al., 2008 e Orjuela-Sánchez et al., 2010.

Estes resultados são similares àqueles obtidos por *P. vivax* no Sri Lanka, Mianma e Etiópia onde foi observada a existência de uma grande diferença genética entre os isolados da Ásia e da África, porém não houve clara diferenciação entre os isolados de Sri Lanka e Mianma (GUNAWARDENA et al., 2010).

As análises com microssatélites (KARUNaweera et al., 2008) e polimorfismos de base única (ORJUELA-SÁNCHEZ et al., 2010) revelaram que as populações de *P. vivax* não estão claramente agrupado de acordo com a sua origem geográfica. Karunaweera e colaboradores (2008) analisaram isolados de campo proveniente de três regiões distintas, Sri Lanka, Brasil e Vietnã, e linhagens de *P. vivax* adaptados a macacos originados de quatro continentes, América, África, Ásia e Oceania. Neste estudo, realizaram a tipagem molecular com 14 marcadores de microssatélites com o objetivo de estudar a diversidade genética de *P. vivax*. A análise de um modo geral relata que a América Central, África, Sudeste Asiático e Oceania apresentaram uma fração de semelhança entre os conglomerados ("clusters"), enquanto que aqueles coletados na mesma área, Acre/Brasil, foram claramente diferenciados. Em outras palavras, a maior diferenciação genética foi encontrada no Brasil, ao longo de um período de 5 a 6 anos. Outro estudo realizado por Orjuela-Sánchez et al. (2010) baseado em um conjunto de 85 SNPs no cromossomo 8 de *P. vivax* com isolados de campo do Brasil, Camboja, Vietnã e Sri Lanka. Este conjunto amostral clusterizou três populações: Camboja, Vietnã e Sri Lanka, agrupados em uma população, enquanto que o Brasil apresentou duas populações distintas, demonstrado a existência de duas estruturas populacionais entre os isolados brasileiros, o que vai de encontro com os resultados apresentados nesta dissertação.

Análises com isolados de *P. falciparum* envolvendo a tipagem com microssatélites também revelaram que as populações africanas são as mais diversificadas geneticamente, seguidas pelas populações asiáticas e por último, as populações sul-americanas. A população de *P. falciparum* na América do Sul divide-se em dois grupos, um compreendendo a

população da Colômbia (“norte”) e outro compreendendo amostras do Brasil, Bolívia e Guiana Francesa (“sul”) (YALCINDAG et al., 2011). Estes dados sugerem que *P. falciparum* foi introduzido nas Américas múltiplas vezes, o que explicaria a heterogeneidade observada entre amostras do norte e do sul (ANDERSON et al., 2000; DE CASTRO; SINGER, 2005; NEAFSEY et al., 2008).

5.1.3 Origem das populações americanas de *P. vivax*

A hipótese mais aceita de introdução recente de *P. vivax* nas Américas é a partir da colonização do continente pelos europeus e através do comércio transatlântico de escravos africanos. As adaptações genéticas humanas para a malária é uma evidência convincente em favor de uma introdução recente da malária para o Novo Mundo, a falta de polimorfismos genéticos que conferem alguma forma de resistência à malária, como por exemplo a presença do genótipo Duffy negativo (ALLISON, 2009).

Outra possível via de introdução de *P. vivax* nas Américas seriam as migrações, através do Estreito de Bering, de populações do Sudeste Asiático ocupando o território do norte ao sul da América, onde a malária poderia ter sido introduzida a macacos neotropicais. Concorda com esta hipótese o fato de parasitos que infectam macacos neotropicais junto ao Atlântico serem geneticamente idênticos aos que causam malária humana, como possível consequência de transferência lateral de seres humanos aos macacos. Existem evidências de que o parasito vivax-símile da malária de macacos sul-americanos, *P. simium*, é geneticamente e morfolologicamente indistinguível de *P. vivax* (ESCALANTE et al., 1995; MCCUTCHAN et al., 1996). Porém, é improvável que *P. vivax* consiga completar o seu ciclo de vida em mosquitos anofelinos cuja temperatura corporal é inferior a 15 °C. Por essa razão, Carter (2003) sugeriu que *P. vivax* atingiu as Américas através do oceano, em populações que cruzaram o Oceano Pacífico. A passagem pelo mar teria de ter sido

concluída duração uma única infecção por *P. vivax*, ou seja, provavelmente dentro de um ou dois anos, permitindo as infecções por recaídas de hipnozoítos.

Outra hipótese sugerida é que *P. vivax* poderia ter sido introduzido nas Américas no século 19, a partir da migração de chineses aos arredores do Rio de Janeiro, para trabalhar na agricultura, no cultivo do chá como um bem exótico. Em 1814, Dom João trouxe uma colônia de 200 chineses para o Rio de Janeiro para receber instruções sobre o preparo e cultivo do chá no Jardim Botânico Real (CORMIER, 2010). Ao longo de um século, cerca de 3000 trabalhadores de Macau, uma colônia portuguesa no sul da China, foram trazidos para trabalhar no Rio de Janeiro (CORMIER, 2010). A origem chinesa da malária Neotropical poderia ter sido um cenário alternativo viável para explicar grande parte dos dados relacionados com a malária vivax em humanos e macacos. Este é um cenário muito mais simples, onde a malária foi trazida diretamente do sul da China no final da era colonial, em vez de ter tido a necessidade de atravessar o Oceano Pacífico em embarcações primitivas.

Este mesmo padrão de “subestrutura” presente nos isolados de *P. vivax* das Américas foi encontrado para populações de *P. falciparum*. Alguns pesquisadores sugerem que o *P. falciparum* foi introduzido nas Américas múltiplas vezes, o que explicaria a heterogeneidade observada entre amostras do norte e do sul (ANDERSON et al., 2000; DE CASTRO; SINGER, 2005; NEAFSEY et al., 2008). A hipótese mais aceita é que o *P. falciparum* foi introduzida nas Américas pelos imigrantes europeus e pelo comércio transatlântico de escravos durante o período de colonização (ANDERSON et al., 2000; NEAFSEY et al., 2008). Esta hipótese é fundamental para compreender a origem dos eventos independentes de introdução *P. falciparum* nas Américas, já que durante os séculos 16 e 19 a América do Sul e América Central foram amplamente dividida em dois impérios, o império espanhol que incluía grande parte do Caribe, América Central, Venezuela, Argentina e Chile; e o império português, restrito à costa leste, desde o norte do Rio Amazonas ao sul do atual Brasil. Esta

hipótese foi confirmada pela análise genética (ANDERSON et al., 2000; NEAFSEY et al., 2008) e por estudos arqueológicos (DE CASTRO; SINGER, 2005).

Estudos baseado no genoma mitocondrial de *P. falciparum* sugerem uma clara ligação genética entre sul-americanos e africanos (JOY et al., 2003), consistente com uma recente introdução do agente patogénico através do comércio de escravos. No entanto, alguns estudos arqueológicos e históricos são inconsistentes com uma introdução recente e sugerem que malária por *P. falciparum* estava presente nas Américas muito antes da colonização europeia e o comércio de escravos (DE CASTRO; SINGER, 2005).

Assim, até o presente momento não há evidência conclusiva a favor de uma dessas hipóteses sobre a chegada de *P. vivax* na Américas, mas os dados genéticos sugerem que este continente foi provavelmente colonizado pelo parasito em momentos distintos, explicando a divisão populacional que há dentro deste continente.

5.2 Origem geográfica de *P. vivax* baseada em marcadores moleculares

Neste estudo foram analisados casos de infecção de malária importada por *P. vivax* baseado em um conjunto de marcadores moleculares (sequenciamento do DNA mitocondrial e marcadores de DNA microssatélites) para determinar as origens geográficas destas infecções.

A análise do genoma mitocondrial permitiu agrupar corretamente isolados cuja origem geográfica presumida foi a América do Sul, Coréia, Sudeste Asiático e Melanésia. No entanto, alguns isolados cuja origem geográfica presumida foi a América Central, Sul da Ásia e África agruparam-se em uma região da rede de haplótipos onde predominam os isolados africanos, seguidos do Sul da Ásia; deste modo não puderam ser classificados geograficamente. Por outro lado, a análise bayesiana dos dados de tipagem de microssatélites não permitiu classificar os isolados

de *P. vivax* de acordo com a sua origem geográfica presumida. Dos 57 isolados analisados, somente 11 se classificaram de maneira correspondente a essa informação. A possível explicação para este método não ser eficiente para identificar casos de malária importada é que as sequências de microssatélites têm uma taxa de mutação extremamente elevada (da ordem de 10^{-2} eventos por replicação). Consequentemente, novos haplótipos são frequentemente introduzidos em populações, não somente por migração de novas linhagens de parasitos, mas por recombinação entre haplótipos existentes, ou também por mutação nos alelos que os constituem, dificultando as análises temporais. Como resultado das altas taxas de mutação, diferenças significantes entre isolados e populações reveladas por marcadores hipervariáveis que nem sempre têm algum significado biológico (HENDRICK, 1999). Além disso, os métodos de tipagem de microssatélites estão muito sujeitos a variação entre laboratórios, reduzindo as possibilidades de comparação de resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa com o mesmo conjunto de marcadores.

5.3 Polimorfismos do DNA mitocondrial e a origem geográfica dos isolados

Neste estudo, a genotipagem de um número limitado de SNPs mitocondriais em ensaios de tipo TaqMan[®] não permitiu inferir na origem geográfica de infecções. A quantidade de marcadores foi um fator importante na construção de diferentes haplótipos. Notou-se que, com microssatélites (13 marcadores), houve uma grande quantidade de haplótipos diferentes, enquanto que com SNPs (cinco marcadores) foram encontrados somente sete haplótipos distintos dentre as 42 amostras analisadas. Assim, os SNPs mitocondriais não foram capazes, neste grupo amostral, de agrupar geneticamente as amostras de mesma origem geográfica.

Conway et al. (2000) desenvolveram uma técnica simples de genotipagem com quatro SNPs mitocondriais, para investigar a origem geográfica de 104 isolados de *P. falciparum* provenientes do Brasil, África e Tailândia. A análise de dados sugeriu a presença de cinco haplótipos distintos nestas populações e os marcadores foram capazes de diferenciar geneticamente os isolados de diferentes regiões geográficas, por serem altamente informativo do ponto de vista genético.

6 CONCLUSÕES

Com os resultados deste trabalho podemos concluir que:

A análise de genomas mitocondriais permite inferir a origem geográfica de isolados de *P. vivax* provenientes de algumas regiões geográficas, entre casos de malária importada diagnosticados nos Estados Unidos. Entretanto, com base nos dados atualmente disponíveis essa análise não permite distinguir entre isolados provenientes da África, Sul da Ásia, Oriente Médio e América Central.

A análise de DNA microssatélite não foi eficiente para identificar a origem geográfica dos casos de malária vivax importada, diagnosticados nos Estados Unidos. Dos 57 isolados analisados, somente 11 se classificaram geneticamente de maneira correspondente com sua origem geográfica presumida. A maioria das infecções com origem geográfica desconhecida não pode ser classificada geograficamente por nenhum dos dois métodos apresentados (*median-joining* e método bayesiano).

Ensaio para a tipagem de cinco SNPs mitocondriais foram padronizados com sucesso, mas estes marcadores não foram capazes de agrupar geneticamente as amostras de mesma origem geográfica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS²

ALLISON, A. A. Genetic control of resistance to human malaria. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 21, p. 499-505, 2009.

ANDERSON, T. J. C.; HAUBOLD, B.; WILLIAMS, J. T.; ESTRADA-FRANCO, J. G.; RICHARDSON, L.; MOLLINEDO, R.; BOCKARIE, M.; MOKILI, J.; MHARAKURWA, S.; FRENCH, N.; WHIWORTH, J.; VELEZ, I. D.; BROCKMAN, A. H.; NOSTEN, F.; FERREIRA, M. U.; DAY, K. P. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 17, p. 1467-1482, 2000.

BAIRD, J. K. Effectiveness of antimalarial drugs. **N. Engl. J. Med.**, v. 15, p. 1565-1577, 2005.

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.; 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.; KOIJ, T. W.; KORSINCZKY, M.; MEYER, E. V.; 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, p. 757-763, 2008.

CARTER, R. Speculations on the origins of *Plasmodium vivax* malaria. **Trends Parasitol.**, v. 19, p. 214-219, 2003.

CARTER, R.; MENDIS, K. N.; ROBERTS, D. Spatial targeting of interventions against malaria. **Bull. World Health Organ.**, v. 78, p. 1401-1411, 2000.

CAUSER, L. M.; FILLER, S.; WILSON, M.; PAPAGIOTAS, S.; NEWMAN, R. D. Evaluation of reported malaria chemoprophylactic failure among travelers in a US University Exchange Program, 2002. **Clin. Infect. Dis.**, v. 39, p. 1583-1588.

COATNEY, G. R.; COLLINS, W. E.; WARREN, M.; CONTACOS, P. G. **The primate malarias**. Atlanta: CDC, 2003. Ga [original book CD-ROM published 1971, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.]. 1 CD-ROM.

² De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CONWAY, D. J.; FANELLO, C.; LLOYD, J. M.; AL-JOUBORI, B. M. A. S.; BALOCH, A. H.; SOMANATH, S. D.; ROPER, C.; ODUOLA, A. M. J.; MULDER, B.; POVOA, M. M.; SINGH, B.; THOMAS, A. W. Origin of *Plasmodium falciparum* malaria is traced by mitochondrial DNA. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 111, p. 163-171, 2000.

CORMIER, L. A. The historical ecology of human and wild primate malarias in the new world. **Diversity**, v. 2, p. 256-280, 2010.

CORNEJO, O. E.; ESCALANTE, A. A. The origin and age of *Plasmodium vivax*. **Trends Parasitol.**, v. 22, p. 558-563, 2006.

COX-SINGH, J.; HIU, J.; LUCAS, S. B.; DIVIS, P.C.; ZULKARNAEN, M.; CHANDRAN, P.; WONG, K. T.; ADEM, P.; ZAKI, S. R.; SINGH, B.; KRISHNA, S. Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. **Malar. J.**, v. 11, p. 9-10, 2010.

CRAIG, M. H.; SNOW, R. W.; LE SUEUR, D. A climate-based distribution model of malaria transmission in sub-Saharan Africa. **Parasitol. Today**, v.15, p. 105-111, 1999.

CULLETON, R.; COBAN, C.; ZEYREK, F. Y.; CRAVO, P.; KANEKO, A.; RANDRIANARIVELOJOSIA, 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, p. e29137, 2011.

DA SILVA-NUNES, M.; CODEÇO, C. T.; MALAFRONTTE, R. S.; DA SILVA, A.; SILVA, N. S.; JUNCANSEN, C.; MUNIZ, P. T.; FERREIRA, M. U. Malaria on the Amazonian frontier: transmission dynamics, risk factors, spatial distribution, and prospects for control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, p. 624-635, 2008.

DA SILVA-NUNES, M.; MORENO, M.; CONN, J. E.; GAMBOA, D.; ABELES, S.; VINETZ, J. M.; FERREIRA, M. U. Amazonian malaria: asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. **Acta Trop.**, v. 121, p. 281-291, 2012.

DE CASTRO, M. C.; SINGER, B. H. Was malaria present in the Amazon before the European Conquest? Available evidence and future research agenda. **J. Archaeol Sci.**, v. 32, p. 334-340, 2005.

DEAN, F. B.; HOSONO, S.; FANG, L.; WU, X.; FARUGI, A. F.; BRAY-WARD, P.; SUN, Z.; ZONG, Q.; DU, Y.; DU, J.; DRISCOLL, M.; SONG, W.; KINGSMORE, S. F.; EGHOLM, M.; LASKEN, R. S. Comprehensive human genome amplication using multiple displacement amplification. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 99, p. 5261-5266, 2002.

DRIESSEN, G. J.; PEREIRA, R. R.; BRABIN, B. J.; HARTWIG, N. G. Imported malaria in children: a national surveillance in the Netherlands and a review of European studies. **Eur. J. Public. Health.**, v. 18, p. 184-188, 2008.

ESCALANTE, A. A.; BARRIO, E.; AYALA, F. J. Evolutionary origin of human and primate malarias: evidence from the circumsporozoite gene. **Mol. Biol. Evol.**, v. 2, p. 616-626, 1995.

ESCALANTE, A. A.; CORNEJO, O. E.; FREELAND, D. E.; POE, A. C.; DURREGO, E.; COLLINS, W. E.; LAL, A. A. A monkey's tale: the origin of *Plasmodium vivax* as a human malaria parasite. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 102, p. 1980-1985, 2005.

ESCALANTE, A. A.; FREELAND, D. E.; COLIINS W. E.; LAL A. A. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 95, p. 8124-8129, 1998.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: A new sries of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Mol. Ecol. Resour.**, v. 10, p. 564-567, 2010.

FEAGIN, J. E.; MERICLE, B. L.; WERNER, E.; MORRIS, M. Identification of additional rRNA fragments encoded by the *Plasmodium falciparum* 6kb element. **Nucleic. Acid. Res.**, v. 25, p. 438-446, 1997.

FENG, X.; CARLTON, J. M.; JOY, D. A.; MU, J.; FURUYA, T.; SUH, B. B.; WANG, Y.; BARNWELL, J. W.; SU, X. S. Single-nucleotide polymorphism and genome diversity in *Plasmodium vivax*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 100, p. 8502-8507, 2003.

FERREIRA, M. U.; KARUNaweera, N. K.; DA SILVA-NUNES, M.; SILVA, N. S.; WIRTH, D. F.; HARTL, D. L. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. **J. Infect. Dis.**, v. 195, p. 1218-1226, 2007.

FREEDMAN, D. O.; WELD, L. H.; KOZARSKY, P. E.; FISK, T.; VON SONNENBURG F.; KEYSTONE J. S.; PANDEY P.; CENTRO, M. S. Spectrum of disease and relation to place of exposure among ill returned travelers. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, p. 119-130, 2006.

GARCIA-VILLARRUBIA, M.; MILLET, J. P.; OLALLA, P. G.; GASCÓN, J.; FUMADÓ, V.; PRAT, J. G.; TREVINÑO, B.; PINAZO, M. J.; CABEZOS, J.; MUÑOZ, J.; ZARZUELA, F.; CAYLÀ, J. Epidemiology of imported malaria among children and young adults in Barcelona (1990-2008). **Malar. J.**, v. 10, p. 347-353, 2011.

GÓMEZ, J. C.; MCNAMARA, T.; BOCKARIE, M. J.; BAIRD, J. K.; CARLTON, J. M.; ZIMMERMAN, P. A. Identification of a polymorphic *Plasmodium vivax* microsatellite marker. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 69, p. 377-389, 2003.

GONÇALVES, R. M.; SALMAZI, K. C.; SANTOS, B. A. N.; BASTOS, M. S.; ROCHA, S. C.; BOSCARDIN, S. B.; SILBER, A. M.; KALLÁS, E. G.; FERREIRA, M. U.; SCOPEL, K. K. G. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? **Infect. Immun.**, v. 78, n.11, p. 4763-4772, 2010.

GUEDES, S.; SIIKAMAKI, H.; KANTELE, A.; LYYTIKAINEN, O. Imported malaria in Finland 1995 to 2008: an overview of surveillance, travel trends, and antimalarial drug sales. **J. Travel Med.**, v. 17, p. 400-404, 2010.

GUERRA, C. A.; HOWES, R. E.; PATIL, A. P.; GETHING, P. W.; VAN BOECKEL, T. P.; TEMPERLEY, W. H.; KABARIA, C. W.; TATEM, A. J.; MANH, B. H.; ELYAZAR, I. R. F.; BAIRD, J. K.; SNOW, R. W.; HAY, S. I. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 8, p. e774, 2010.

GUNAWARDENA, S.; KARUNaweera, N. D.; FERREIRA, M. U.; PHONE-KYAW, M.; POLLACK, R. J.; ALIFRANGIS, M.; RAJAKARUNA R. S.; KONRADSEN, F.; AMERASINGHE, P. H.; SCHOUSBOE, M. L.; GALAPPATHTHY, G. N. L.; ABEYASINGHE, R. R.; HARTL, D. L.; WIRTH, D. F. Geographic structure of *Plasmodium vivax*: microsatellite analysis of parasite populations from Sri Lanka, Mianma and Ethiopia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, p. 235-242, 2010.

HWANG, J.; MCCLINTOCK, S.; KACHUR, S. P.; SLUTSKER, L.; ARGUIN, P. Comparison of national malaria surveillance system with the national notifiable diseases surveillance system in the United States. **J. Public. Health Manag. Pract.**, v. 15, p. 345-351, 2009.

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. Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America. **Int. J. Parasitol.**, v. 37, p. 1013-1022, 2007.

IMWONG, M.; SUDIMACK, D.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; OSÓRIO, L.; CARLTON, J. M.; DAY, N. P. J.; WHITE, N. J.; ANDERSON, T. J. C. Microsatellite variation, repeat array length and population history of *Plasmodium vivax*. **Mol. Biol. Evol.** v. 23, p. 1016-1018, 2006.

IWAGAMI, M.; HWANG, S. Y.; FUKOMOTO, M.; HAYAKAWA, T.; TANABE, K.; KIM, S. H.; KHI, W. G.; KANO, S. Geographical origin of *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea: haplotype network analysis based on the parasite's mitochondrial genome. **Malar. J.**, v. 9, p. 184-188, 2010.

JEANNE, L. D.; BERRY, A.; DUTOIT, E.; LECLERC, F.; BEAUDOU, J.; LETEURTRE, S.; CAMUS, D.; BENOIT-VICAL, F. Molecular method for the diagnosis of imported pediatric malaria. **Med. Mal. Infect.**, v. 40, p. 115-118, 2010.

JONGWUTIWES, S.; PUTAPORNTIP, C.; IWASAKI, T.; FERREIRA, M. U.; KANBARA, H.; HUGHES, A. Mitochondrial Genome Sequences Support Ancient Population Expansion in *Plasmodium vivax*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 22, p. 1733-1739, 2005.

JOY, D. A.; FENG, X.; UM, J.; FURUYA, T.; CHOTIVANICH, K.; KRETTLI, A. U.; HO, M.; WANG, A.; WHITE, N. J.; SUH, E.; BEERLI, P.; SU, X. Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. **Science**, v. 300, p. 318-321, 2003.

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. **Mol. Biol. Evol.**, v. 25, p. 1245-1252, 2008.

KARUNAWEERA, N. D.; FERREIRA, M. U.; HARTL, D. L.; WIRTH, D. F. Fourteen polymorphic microsatellite DNA markers for the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Mol. Ecol. Notes**, v. 7, p. 172-175, 2007.

KARUNAWEERA, 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, p. 105-112, 2008.

KIMURA, M.; KANEKO, O.; QING, L.; MIAN, Z.; KAWAMOTO, F.; WATAYA, Y.; OTANI, S.; YAMAGUCHI, Y.; TANABE, K. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasitol. Int.**, v. 46, p. 91-95, 1997.

KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoite a new theory of malaria relapse. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, p. 1-11, 1985.

LADHANI, S.; AIBARA, R. J.; RIORDAN, F. A.; SHINGADIA, D. Imported malaria in children: a review of clinical studies. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 7, p. 349–357, 2007.

LANERI, K.; BHADRA, A.; IONIDES, E. L.; BOUMA, M.; DHIMAN, R. C.; YADAV, R. S.; PASCUAL, M. Forcing versus feedback: epidemic malaria and monsoon rains in northwest India. **PLoS Comput. Biol.**, v. 6, p. e1000898, 2010.

MALI, S.; STEELE, S.; SLUTSKER, L.; ARGUIN, P. M. Malaria surveillance — United States, 2008. **MMWR Surveill Summ.**, v. 59, p. 1-15, 2010.

MALI, S.; TAN, K. R.; ARGUIN, P. M. Malaria surveillance-United States, 2009. **MMWR Surveill Summ.**, v. 60, p. 1-15, 2011.

MASCARELLO, M.; ALLEGRANZI, B.; ANGHEBEN, A.; ANSELMINI, M.; CONCIA, E.; LAGANA, S.; MANZOLI, L.; MAROCCO, S.; MONTEIRO, G.; BISOFFI, Z. Imported malaria in adults and children: epidemiological and clinical characteristics of 380 consecutive cases observed in Verona, Italy. **J. Travel Med.**, v.15, p. 229–236, 2008.

MCCUTCHAN, T. F.; KISSINGER, J. C.; TOURAY, M. G.; ROGERS, M. J.; LI, J.; SULLIVA, M.; BRAGA, E. M.; KRETTLI, A. U.; MILLER, L. H. Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarias: Biological and phylogenetic implications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.93, p. 11889–11894, 1996.

MIAO, M.; YANG, Z.; PATCH, H.; HUANG, Y.; ESCANTE, A. A.; CUI, L. *Plasmodium vivax* populations revisited: mitochondrial genomes of temperate strains in Asia suggest ancient population expansion. **Mol. Biol. Evol.**, v. 12, p. 22, 2012.

MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, p. 673-679, 2002.

MU, J.; DUAN, J.; HUANG, Y.; CARLTON, J. Host switch leads to emergence of *Plasmodium vivax* malaria in humans. **Mol. Biol. Evol.**, v. 22, p. 1686-1693, 2005.

MUELLER, I.; GALINSKI, M.R.; BAIRD, J. K.; CARLTON, J. M.; KOCHAR, D. K.; ALONSO, P. L.; DEL POTILLO, H. A. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 9 p. 55-566, 2009.

MUELLER, I.; ZIMMERMAN, P. A.; REEDER, J. C. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* – the ‘bashful’ malaria parasites. **Trends Parasitol.**, v. 23, p. 278-283, 2007.

NEAFSEY, D. E.; SCHAFFNER, S. F.; VOLKMAN, S. K.; PARK, D.; MONTGOMERY, P.; MILNER, D. A. J. R.; 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. O. 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 Biol.**, v. 9, p. R171, 2008.

NEWMAN, R. D.; PARISE, M. E.; BARBER, A. M.; STEKETEE, R. W. Malaria-related deaths among U.S. travelers, 1963–2001. **Ann. Intern. Med.**, v. 141, p. 547–555, 2004.

ODOLINI, S.; GAUTRET, P.; PAROLAP. Epidemiology of imported malaria in the Mediterranean region. **Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.**, v. 4, p. e2012031, 2012.

ORJUELA-SÁNCHEZ, P.; DA SILVA, N. S.; DA SILVA-NUNES, M.; FERREIRA, M. U. Recurrences parasitemias and population dynamics of *Plasmodium vivax* polymorphisms in rural Amazonia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, p. 961-968, 2009.

ORJUELA-SÁNCHEZ, P.; KARUNAWEEERA, N. K.; DA SILVA-NUNES, M.; DA SILVA, N. S.; SCOPEL, K. K. G.; GONÇALVES, R. M.; AMARATUNGA, C.; SÁ, J. M.; SOCHEAT, D.; FAIRHUST, R. M.; GUNAWARDENA, S.; THAVAKODIRASAH, T.; GALAPPATHTHY, G. N. L.; ABEYASINGHE, R. 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. 65-76, 2010.

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

RETIEF, F.; CILLIERS, L. Periodic pyrexia and malaria in Antiquity. **S. Afr. Med. J.**, v. 96, p. 586-688, 2006.

REY, S.; ZUZA, I.; MARTÍNEZ-MONDÉJAR, B.; RUBIO, J. M.; MERINO, F. J. Imported malaria in an area in southern Madrid, 2005-2008. **Malar. J.**, v. 9, p. 290, 2010.

ROMI, R.; BOCCOLINI, D.; D'AMATO, S.; CENCI, C.; PERAGALLO, M.; D'ANCONA, F.; POMPA, M. G.; MAJORI, G. Incidence of malaria and risk factors in Italian travellers to malaria endemic countries. **Travel Med. Infect. Dis.**, v. 8, p. 144-154, 2010.

ROSENBERG, R. *Plasmodium vivax* in Africa: hidden in plain sight? **Trends Parasitol.**, v. 23, p. 193-196, 2007.

SABATINELLI G.; EJOV M.; JOERGENSEN P. Malaria in the WHO European Region (1971–1999). **Euro Surveill.**, v. 6, p. 61-65, 2001.

SAINZ-ELIPE, S.; LATORRE, J. M.; ESCOSA, R.; MASIÀ, M.; FUENTES, M. V.; MAS-COMA, S.; BARGUES, M. D. Malaria resurgence risk in southern Europe: climate assessment in an historically endemic area of rice fields at the Mediterranean shore of Spain. **Malar. J.**, v. 9, p. 221-236, 2010.

SALLARES, R.; BOUWMAN, A.; ANDERUNG, C. The spread of malaria to Southern Europe in antiquity: new approaches to old problems. **Med. Hist.**, v. 48, p. 311-328, 2004.

SCHWARTZ, E.; PARISE, M.; KOZARSKY, P.; CETRON, M. Delayed onset of malaria—implications for chemoprophylaxis in travelers. **N. Engl. J. Med.**, v. 349, p. 1510-1516, 2003.

SCHLÖTTERER, C.; KAUER, M.; DIERINGER, D. Allele excess at neutrally evolving microsatellites and the implications for tests of neutrality. **Proc. Biol. Sci.**, v. 271, p. 869-874, 2004.

SEVERINI, C.; MENEGON, M.; GRADONI, L.; MAJORI, G. Use of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 gene sequence analysis in the investigation of an introduced malaria case in Italy. **Acta Tropica**, v. 84, p. 151-157, 2002.

SHARMA, A.; KHANDURI, U. How benign is benign tertian malaria? **J. Vector Borne Dis.**, v. 46, p. 141-144, 2009.

SHARMA, I.; PASHA, S. T.; SHARMA, Y. D. Complete nucleotide sequence of the *Plasmodium vivax* 6 kb element. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 97, p. 259-263, 1998.

SNOUNOU, G.; VIRIYAKOSOL, S.; ZHU, X. P.; JARRA, W.; PINHEIRO, L.; DO ROSARIO, V. E.; THAITHONG, S.; BROWN, K. N. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 61, p. 315-320, 1993.

SVENSON, J. E.; MACLEAN, J. D.; GYORKOS, T. W.; KEYSTONE, J. Imported malaria: Clinical presentation and examination of symptomatic travelers. **Arch. Intern. Med.**, v. 155, p. 861-868, 1995.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KAMUR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Mol. Bio. Evol.**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAUIL, P. L. The prospect of eliminating malaria transmission in some regions of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 105-106, 2011. Suppl. 1.

TAZI, L.; AYALA, F. J. Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. **Infect. Genet. Evol.**, v. 11, p. 209-211, 2011.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOONEM, R.; HUGHES, S. Increased throughput for fragment analysis on ABI Prism 377 automated sequencer using a membrane comb and STrand software. **Biotechniques**, v. 31, p. 1320-1324, 2011.

VINCENTE, J. L.; SOUSA, C. A.; ALTEN, B.; CAGLAR, S. S.; FACULTÁ, E.; LATORRE, J. M.; TOTY, C.; BARRÉ, H.; DEMIRCI, B.; DI LUCA, M.; TOMA, L.; ALVES, R.; SALGUEIRO, P.; SILVA, T. L.; BARGUES, M. D.; MASCOMA, S.; BOCCOLINI, D.; ROMI, R.; NICOLESCU, G.; DO ROSÁRIO, V. E.; OZER, N.; FONTENILLE, D.; PINTO, J. Genetic and phenotypic variation of the malaria vector *Anopheles atroparvus* in southern Europe. **Malar. J.**, v. 10, p. 5, 2011.

WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, v. 7, p. 524-530, 1990.

WILSON, R. J. M.; GARDENER, M. J.; FEAGIN, J. E.; WILLIAMSON, D. H. Have malaria parasites three genomes? **Parasitol. Today**, v. 7, p. 134-136, 1991.

WILSON, R. J. M.; WILLIAMSON, D. H. Extrachromosomal DNA in the *Apicomplexa*. **Microbiol. Mol. Biol. Reviews**, v. 61, p. 1-16, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World malaria report 2005**. Geneva, 2005. Available from: <who.int/malaria/publications/atoz/9241593199/en/index.html>. Acesso em: 21 Dec 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Ten facts on malaria.** Geneva, 2011. Available from:
 <<http://www.who.int/features/factfiles/malaria/en/index.html>>. Acesso em: 10 Jan 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World malaria report 2010.** Geneva, 2010. Available from:
 <http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/en/index.html> Acesso em: 12 Feb 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Centralized information system for infectious diseases (CISID)/-malaria.** Geneva, Regional Office for Europe, 2011.

YALCINDAG, E.; ELGUERO, E.; ARNATHAU, C.; DURAND, P.; AKIANA, J.; ANDERSON, T. J.; AUBOUY, A.; BALLOUX, F.; BESNARD, P.; BOGREAU, H.; CARNEVALE, P.; D'ALESSANDRO, U.; FONTENILLE, D.; GAMBOA, D.; JOMBART, T.; LE MIRE, J.; LEROY, E.; MAESTRE, A.; MAYXAY, M.; MÉNARD, D.; MUSSET, L.; NEWTON, P. N.; NKOGHÉ, D.; NOYA, O.; OLLOMO, B.; ROGIER, C.; VERON, V.; WIDE, A.; ZAKERI, S.; CARME, B.; LEGRAND, E.; CHEVILLON, C.; AYALA, F. J.; RENAUD, F.; PRUGNOLLE, F. Multiple independent introductions of *Plasmodium falciparum* in South America. **PNAS**, v. 109, p. 511-516, 2011.