

**PRISCILA THIHARA RODRIGUES**

**Origem e rotas de introdução de  
*Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*  
nas Américas**

Tese 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 Doutor em Ciências.

São Paulo  
2017

**PRISCILA THIHARA RODRIGUES**

**Origem e rotas de introdução de  
*Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*  
nas Américas**

Tese 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 Doutor em Ciências.

Área de concentração:  
Biologia da Relação Patógeno-  
Hospedeiro

Orientador:  
Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira

São Paulo  
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Thihara Rodrigues, Priscila  
Origem e rotas de introdução de Plasmodium vivax  
e Plasmodium falciparum nas Américas / Priscila  
Thihara Rodrigues; orientador Marcelo Urbano  
Ferreira. -- São Paulo, 2017.  
167 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Plasmodium. 2. Malária. 3. Genoma. 4.  
Mitocondrial. I. Urbano Ferreira, Marcelo ,  
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Priscila Thihara Rodrigues

Título da Dissertação/Tese: Origem e rotas de introdução de *Plasmodium vivax*  
e *Plasmodium falciparum* nas Américas

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de  
Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

(    ) **Aprovado(a)**            (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

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, 05 de março de 2013.

PARECER 1102/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, na sessão realizada no dia 27.02.2013, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Origem e data de introdução de Plasmodium vivax nas Américas*" do pesquisador **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 **27.02.2014**.

Atenciosamente,

Profa. Dra. PAULO M.A.ZANOTTO  
Coordenador da Comissão de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP



Aos meus pais, Audenil e Maruta,  
pelo amor e dedicação nessa jornada de minha vida.

Ao meu irmão Flávio,  
pela amizade, fidelidade e cumplicidade.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. **Marcelo Urbano Ferreira**, meu orientador, exemplo imensurável de ética, simplicidade, humildade e inteligência. Obrigada por contribuir diariamente para a minha formação profissional, pela disponibilidade irrestrita, pelos ensinamentos diários, pela oportunidade de trabalhar com pesquisadores ilustres e por permitir conhecer a área endêmica de malária.

À Profa. Dra. **Ingrid Felger**, a quem aprendi a admirar pelo amor e dedicação incondicional a pesquisa. Obrigada pela amizade, pelos ensinamentos e principalmente por ter me acolhido de maneira tão agradável em seu laboratório junto a equipe do Swiss Tropical and Public Health Institute.

Ao Prof. Dr. **Daniel L. Hartl**, exemplo de pesquisador, por abrir as portas de seu laboratório junto a sua equipe do Department of Immunology in Infectious Diseases, Harvard T, H, Chan School of Public Health. Agradeço especialmente **Katelyn Durfee** e **Rachel Daniels** por ter me acolhido de maneira amigável e pelo tempo dedicado me auxiliando nos experimentos laboratoriais.

Aos pesquisadores colaboradores: Prof. Dr. **Crispim Cerutti Junior**, Profa. Dra. **Rosely Malafronte**, Dra. **Ana Maria Duarte**, Dra. **Karin Kirchgatter** e Profa. Dra **Cristiana Brito**, por ter cedido as amostras “tão valiosas” de *Plasmodium simium* e *P. vivax* utilizadas neste estudo. Além destes, agradeço de maneira muito especial ao Dr. **Hugo Valdivia**, Dra. **Susana Barbosa**, Prof. Dr. **João Alves (Jota)** e **Thais Crippa**, pela simpatia e prontidão com que me recebeu e me incluiu em suas agendas, pelos conhecimentos compartilhados, pelas discussões do dia-a-dia e por toda a ajuda com as análises de bioinformática.

Às colegas de laboratório **Melissa Bastos**, **Nathália Lima**, **Raquel Gonçalves**, **Pablo Fontoura**, **Danielle Vega**, **Jaques Franco**, **Anaclara Pincelli**, **Simone Ladeia Andrade**, **Thais Crippa** e **Rodrigo Corder** pelos bons momentos vividos no laboratório que tornaram meus dias mais agradáveis. Um agradecimento especial à **Maria José Menezes (Zezé)**, por

todo suporte prestado durante a execução deste projeto, à **Lais Salla**, minha dupla favorita de bancada e minha “pupila” de hoje e sempre, à **Vanessa Nicolete** pela amizade simples e verdadeira e pelos momentos de alegrias e descobertas vividos na área endêmica de malária, e pôr fim a **Susana Barbosa** que compartilhou comigo a alegria de vivenciar o estágio em Harvard e cativou o meu coração tornando-se uma grande amiga. Obrigada a todos pela amizade, por todo incentivo, ajuda e apoio.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Parasitologia e Departamento de Química, em especial à **Luci Navarro**, por sua imensa e boa disposição com o sequenciamento e ao Prof. Dr. **Giuseppe Palmisano** pelo acesso irrestrito ao seu laboratório.

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 e sucesso. Obrigada pelo apoio, amizade, 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!!!**



### **Agradecimento ao CNPq**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado (Processo 163261/2012-1) e doutorado-sanduiche (Processo 209860/2013-8) concedida que permitiram o desenvolvimento desta tese e o estágio doutoral na Universidade de Basel.

De tudo ficaram três coisas:  
A certeza de que estamos sempre a começar,  
A certeza de que é preciso continuar,  
E a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...  
Portanto, devemos fazer  
Da interrupção, um caminho novo,  
Da queda, um passo de dança,  
Do medo, uma escada,  
Do sonho, uma ponte,  
Da procura, um encontro.  
(Fernando Sabino)

## RESUMO

RODRIGUES, P. T. **Origem e data de introdução de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* nas Américas.** 2017. 167 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A origem geográfica e rotas de dispersão dos dois mais importantes parasitas da malária humana, *Plasmodium falciparum* e *P. vivax*, continuam controversos. A hipótese mais recente sugere que *P. falciparum* originou-se de uma transferência lateral dos macacos (principalmente gorilas) para os seres humanos na África, mas o momento preciso e vias de introdução deste parasita nas Américas continuam desconhecidos. Muito menos se sabe sobre a história de *P. vivax*. Estudos mais recentes indicam que *P. vivax* originou-se na África e migrou para a Ásia antes da disseminação Duffy negativo no continente africano. Como e quando *P. vivax* foi introduzido nas Américas permanece desconhecido. Para entender a história evolutiva destes parasitos propomos neste projeto inferir as vias e as datas de introdução de *P. vivax* e *P. falciparum* nas Américas, com base na análise do genoma mitocondrial completo de parasitos coletados em todas as regiões em que estas espécies estão presentes no mundo, além de analisar a existência da relação genética entre os isolados de *P. vivax* e *P. simium* e inferir a possível transmissão lateral. O alinhamento de 941 sequências de *P. vivax* e 1795 de *P. falciparum* permitiram agrupar os isolados em quatro regiões distintas. As rotas migratórias de *P. vivax* sugere que o continente americano foi colonizado em diferentes momentos e por parasitos de diferentes regiões – África, Sul da Ásia e Melanésia, explicando a alta diversidade genética existente neste continente, enquanto que *P. falciparum* foi introduzido nas Américas por duas regiões distintas, África e Sudeste Asiático. Já os 10 isolados de *P. simium* sequenciados neste estudo apresentaram uma menor diversidade genética quando comparado com os isolados de *P. vivax*, sugerindo que a direção da transmissão lateral foi de humanos para macacos.

Palavras chave: Plasmodium. Malária. Genoma. Mitocondrial.

## ABSTRACT

RODRIGUES, P.T. **Origin and date of introduction of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in the Americas.** 2017. 167 f. Ph. D. Thesis (Parasitology) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The geographical origin and dispersal routes of the two most important human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*, remain controversial. The most recent hypothesis suggests that *P. falciparum* originated from a lateral transfer of monkeys (mainly gorillas) to humans in Africa, but the precise timing and pathways of introduction of this parasite in the Americas remain unknown. Much less is known about the history of *P. vivax*. More recent studies indicate that *P. vivax* originated in Africa and migrated to Asia prior to the negative Duffy spread on the African continent. How and when *P. vivax* was introduced in the Americas remains unknown. To understand the evolutionary history of these parasites we propose in this project to infer the routes and dates of introduction of *P. vivax* and *P. falciparum* in the Americas, based on the analysis of the mitochondrial genome complete with parasites collected in all regions where these species are present in the world, besides analyzing the existence of the genetic relation between the isolates of *P. vivax* and *P. simium* and to infer the possible lateral transmission. The alignment of 941 sequences of *P. vivax* and 1795 of *P. falciparum* made it possible to group the isolates into four distinct regions. The migratory routes of *P. vivax* suggest that the American continent was colonized at different times by parasites from different regions - Africa, South Asia and Melanesia, explaining the high genetic diversity present in this continent, while *P. falciparum* was introduced in the Americas by two distinct regions, Africa and Southeast Asia. However, the 10 *P. simium* isolates sequenced in this study had a lower genetic diversity when compared to *P. vivax* isolates, suggesting that the direction of lateral transmission was from humans to monkeys.

Keywords: Plasmodium. Malaria. Genome. Mitochondrial.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Transmissão de malária no mundo .....	25
<b>Figura 2</b> – Distribuição de casos de malária na América Latina. Os dados demonstrados são referentes ao ano de 2014 e os países foram estratificados de acordo com a transmissão de malária .....	26
<b>Figura 3</b> – Esquema hipotético de interação entre a malária humana e simiana. O vetor ( <i>An. cruzii</i> ) apresenta dispersão vertical, ou seja, realiza o repasto sanguíneo tanto próximo a copa das árvores quanto ao nível do solo, possibilitando contato com ambos os tipos de parasitos e hospedeiros .....	31
<b>Figura 4</b> – Principais rotas do tráfico transatlântico de escravos e grandes impérios europeus entre os séculos 16 e 19 na América do Sul .....	36
<b>Figura 5</b> – Organização do genoma mitocondrial de <i>Plasmodium</i> ( $\approx$ 6kb) Genes que codificam proteínas mitocondriais (COXI, COXIII, CYTB). A direção da seta indica a direção da transcrição. A) representa o genoma de <i>P. falciparum</i> (representado de forma circular) e B) representa o genoma de <i>P. vivax</i> (representado de forma linear) .....	40
<b>Figura 6</b> – Localização geográfica das amostras de <i>P. vivax</i> , <i>P. simium</i> e <i>P. falciparum</i> sequenciadas neste estudo .....	49
<b>Figura 7</b> – Modelos de rotas migratórias de <i>P. vivax</i> . M é a taxa de imigração de cada modelo .....	64
<b>Figura 8</b> – Modelos de rotas migratórias de <i>P. falciparum</i> . M é a taxa de imigração de cada modelo .....	66
<b>Figura 9</b> – Análise de <i>mismatch distributions</i> para populações de <i>P. vivax</i> (A) e <i>P. falciparum</i> (B), através do número de diferenças de nucleotídeos entre pares de sequências de DNA. As colunas indicam a frequência observada e as linhas indicam a frequência esperada dos números de diferenças par-a-par .....	84
<b>Figura 10</b> – Análise de <i>mis match distributions</i> em países da América do Sul para populações de (A) <i>P. vivax</i> e (B) <i>P. falciparum</i> . As colunas indicam a frequência observada e as linhas indicam a frequência esperada dos números de diferenças par-a-par .....	88
<b>Figura 11</b> – Análise do <i>Bayesian Skyline Plot</i> em isolados de <i>P. vivax</i> mostrando as mudanças do tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) ao longo do tempo. O eixo Y representa o tamanho efetivo populacional, enquanto que o eixo X representa o tempo em milhares de anos atrás. O segmento de linha cor preta indica o valor médio da população e o intervalo de confiança está representado pelo espaço em roxo .....	90
<b>Figura 12</b> – Análise do <i>Bayesian Skyline Plot</i> em oito macrorregiões de <i>P. vivax</i> mostrando as mudanças do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo. O eixo Y representa o tamanho efetivo populacional, enquanto que o eixo X representa o tempo em milhares de anos atrás. O segmento de linha cor preta indica o valor médio da população e o intervalo de confiança está representado pelo espaço em roxo .....	91
<b>Figura 13</b> – Análise do <i>Bayesian Skyline Plot</i> em isolados de <i>P. falciparum</i> mostrando as mudanças do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo. O eixo Y representa o tamanho efetivo populacional, enquanto que o eixo X	

representa o tempo em milhares de anos atrás. O segmento de linha cor preta indica o valor médio da população e o intervalo de confiança está representado pelo espaço em roxo ..... 92

**Figura 14** – Análise do *Bayesian Skyline Plot* em cinco macrorregiões de *P. falciparum* mostrando as mudanças do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo. O eixo Y representa o tamanho efetivo populacional, enquanto que o eixo X representa o tempo em milhares de anos atrás. O segmento de linha cor preta indica o valor médio da população e o intervalo de confiança está representado pelo espaço em roxo ..... 94

**Figura 15** – Árvore filogenética gerada a partir da análise bayesiana mostrando a relação entre as populações de *P. vivax*. Os ramos bem suportados (probabilidade posterior  $\geq 0,70$ ) estão indicados por círculos. Os ramos são coloridos de acordo com a origem geográfica: azul escuro – América do Sul, azul claro – América Central/México, roxo – China/Coréia, verde escuro – Sudeste Asiático, laranja – Sul da Ásia, rosa- Melanésia, marrom – Oriente Médio/Ásia Central, vermelho – África, Amarelo – Mata Atlântica (MT - humanos e símios) ..... 100

**Figura 16** – Rede de haplótipos mostrando a relação entre as populações de *P. vivax*. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de haplótipos e cada cor representa a origem geográfica: azul escuro – América do Sul, azul claro – América Central/México, roxo – China/Coréia, verde escuro – Sudeste Asiático, laranja – Sul da Ásia, rosa- Melanésia, marrom – Oriente Médio/Ásia Central, vermelho – África e amarelo – representa isolados da Mata Atlântica (*P. vivax* e *P. simium*) ..... 105

**Figura 17** – Rede de haplótipos mostrando a relação entre as populações de *P. vivax* das Américas. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de haplótipos e cada cor representa a origem geográfica: azul escuro – Brasil, azul claro – América Central, laranja – Peru, verde – Colômbia, marrom – Equador, amarelo – Mata Atlântica e vermelho – Venezuela ..... 109

**Figura 18** – Rede de haplótipos mostrando a relação entre as populações de *P. vivax* provenientes da Mata Atlântica e *P. simium*. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de haplótipos e cada cor representa o tipo hospedeiro: azul escuro – humano e amarelo – macacos *Aloutta clamitans* e *Callicebus nigrifans*) ..... 110

**Figura 19** – Esquema do genoma mitocondrial completo de *P. vivax* e as posições dos SNPs encontrados na Mata Atlântica e Floresta Amazônica ... 115

**Figura 20** – Árvore filogenética gerada a partir da análise bayesiana mostrando a relação entre as populações de *P. falciparum*. Os ramos bem suportados (probabilidade posterior  $\geq 0,70$ ) estão indicados por círculos. Os ramos são coloridos de acordo com a origem geográfica: azul escuro – América do Sul, azul claro – América Central/México, verde escuro – Sudeste Asiático, laranja – Sul da Ásia, rosa- Melanésia, e vermelho – África ..... 117

**Figura 21** – Rede de haplótipos mostrando a relação entre as populações de *P. falciparum*. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de haplótipos e cada cor representa a origem geográfica: azul escuro – América do Sul, azul claro – América Central/México, verde escuro – Sudeste Asiático, laranja – Sul da Ásia, rosa- Melanésia, e vermelho – África ..... 122

**Figura 22** – Rede de haplótipos mostrando a relação entre as populações de *P. falciparum* das Américas. O tamanho do círculo é proporcional à frequência

de haplótipos e cada cor representa a origem geográfica: azul escuro – Brasil, azul claro – América Central, laranja – Peru, verde – Colômbia, marrom – Equador e vermelho – Venezuela ..... 126

**Figura 23** – Rota migratória de *P. vivax* gerada a partir do programa Migrate-n. As setas representam as rotas migratórias e os números representam o número efetivo de migrantes ..... 132

**Figura 24** - Rota migratória de *P. falciparum* gerada a partir do programa Migrate-n. As setas representam as rotas migratórias e os números indicam o número efetivo de migrantes ..... 133

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Amostras de <i>P. vivax</i> , <i>P. simium</i> e <i>P. falciparum</i> sequenciadas neste estudo .....	48
<b>Tabela 2</b> – Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação e sequenciamento do genoma mitocondrial de <i>P. vivax</i> , <i>P. simium</i> e <i>P. falciparum</i> .....	51
<b>Tabela 3</b> – Banco de dados com as sequências do genoma mitocondrial completo de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> disponíveis atualmente na literatura .....	52
<b>Tabela 4</b> – Hipóteses de rotas migratórias de <i>P. vivax</i> e seus respectivos modelos .....	62
<b>Tabela 5</b> – Hipóteses de rotas migratórias de <i>P. falciparum</i> e seus respectivos modelos .....	67
<b>Tabela 6</b> – Agrupamentos dos isolados de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> segundo sua origem geográfica. A letra n representa o número total de isolados pertencentes a cada macrorregião e/ou região .....	69
<b>Tabela 7</b> – Banco de dados com o número total de sequências e número de SNPs do genoma mitocondrial completo de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> disponíveis atualmente na literatura e sequenciados neste estudo .....	71
<b>Tabela 8</b> – Análise da diversidade de nucleotídeos a partir de 941 genomas mitocondriais de <i>P. vivax</i> agrupados em oito macrorregiões: África (AFR), Oriente Médio/Ásia Central (MDE), América do Sul (AMS), América Central (AMC), Sul da Ásia (SA), Sudeste Asiático (SEA), Melanésia (MEL) e China/Coréia (CKH) .....	72
<b>Tabela 9</b> – Análise da diversidade genética a partir do genoma mitocondrial de <i>P. vivax</i> provenientes da América do Sul: Venezuela, Colômbia, Peru e Brasil .....	73
<b>Tabela 10</b> – Análise da diversidade genética a partir do genoma mitocondrial de <i>P. falciparum</i> agrupados em seis macrorregiões: África (AFR), América do Sul (AMS), América Central/México (AMC), Sul da Ásia (SOA), Sudeste Asiático (SEA) e Melanésia (MEL) .....	74
<b>Tabela 11</b> – Análise da distância evolutiva a partir do genoma mitocondrial de <i>P. falciparum</i> provenientes da América do Sul: Venezuela e Brasil .....	75
<b>Tabela 12</b> – Análise de variância molecular (AMOVA) a partir do genoma mitocondrial de <i>P. vivax</i> agrupados em quatro continentes – África (com uma macrorregião, África), América (com duas macrorregiões, América Central/México, e América do Sul), Ásia (com quatro macrorregiões, Sul da Ásia, Sudeste Asiático, China/Coréia, e Oriente Médio/Ásia Central) e Melanésia (com uma macrorregião, Melanésia) .....	77
<b>Tabela 13</b> – Análise de variância molecular (AMOVA) a partir do genoma mitocondrial de <i>P. falciparum</i> agrupados em quatro continentes: África (com uma macrorregião, África), América (com duas macrorregiões, América Central/México e América do Sul), Ásia (com duas macrorregiões, Sul da Ásia e Sudeste Asiático) e Melanésia (uma macrorregião, Melanésia) .....	78



<b>Tabela 14</b> – Divergência das frequências alélicas entre duas populações estimada como índice de fixação de Wright FST, em populações de <i>P. vivax</i> .....	79
<b>Tabela 15</b> – Divergência das frequências alélicas entre duas populações estimada como índice de fixação de Wright FST, em populações de <i>P. falciparum</i> .....	80
<b>Tabela 16</b> – Teste de neutralidade D de Tajima e Fu a partir do genoma mitocondrial de <i>P. vivax</i> agrupados em África (AFR), América do Sul (AMS), América Central/México (AMC), Oriente Médio/ Ásia Central (MDE), China/Coréia (CKH), Sul da Ásia (SOA), Sudeste Asiático (SEA) e Melanésia (MEL) .....	81
<b>Tabela 17</b> – Teste de neutralidade D de Tajima a partir do genoma mitocondrial de <i>P. vivax</i> provenientes da América do Sul: Venezuela (n = 15), Colômbia (n = 17), Peru (n = 31), Brasil (n = 171) .....	81
<b>Tabela 18</b> – Teste de neutralidade D de Tajima e Fu a partir do genoma mitocondrial de <i>P. falciparum</i> agrupados em África (AFR), América do Sul (AMS), América Central/México (AMC), Sul da Ásia (SOA), Sudeste Asiático (SEA) e Melanésia (MEL) .....	82
<b>Tabela 19</b> – Teste de neutralidade D de Tajima e Fu a partir do genoma mitocondrial de <i>P. falciparum</i> provenientes da América do Sul: Venezuela (n = 21) e Brasil (n = 208) .....	83
<b>Tabela 20</b> – Teste de neutralidade e parâmetros do modelo de expansão súbita da distribuição <i>mismatch</i> e <i>goodness-of-fit</i> para cada macrorregião de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> .....	86
<b>Tabela 21</b> – Teste de neutralidade e parâmetros do modelo de expansão súbita da distribuição <i>mismatch</i> e <i>goodness-of-fit</i> nos países da América Central de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> .....	87
<b>Tabela 22</b> – Tempo para o ancestral comum mais recente estimado entre as macrorregiões, utilizando o genoma mitocondrial completo de 405 sequências únicas (não idênticas) de <i>P. vivax</i> e 325 sequências únicas de <i>P. falciparum</i> . O tempo foi estimado em milhares de anos atrás. Todos os valores são estatisticamente significantes com probabilidade superior = 1 .....	96
<b>Tabela 23</b> – Agrupamentos de isolados de <i>P. vivax</i> representados por clados na árvore filogenética gerada do com programa MrBayes. Os números representam o total de isolados pertencentes em cada clado e a percentagem encontrada .....	101
<b>Tabela 24</b> – Compartilhamento de haplótipos entre os isolados de <i>P. vivax</i> , baseado na comparação de haplótipos dois a dois entre as macrorregiões: África (AFR), América do Sul (AMS), América Central/México (AMC), Sul da Ásia (SOA), Sudeste Asiático (SEA), Melanésia (MEL), Oriente Médio/Ásia Central (MED), e China/Coréia (CKH) .....	107
<b>Tabela 25</b> – Localização geográfica, tipo de hospedeiro e haplótipo de amostras de <i>P. simum</i> e <i>P. vivax</i> coletadas na Mata Atlântica .....	111
<b>Tabela 26</b> – Identificação de SNPs exclusivos da Mata Atlântica em isolados de <i>P. vivax</i> . Os nucleotídeos em negrito são exclusivos da Mata Atlântica .....	114
<b>Tabela 27</b> – Agrupamentos de isolados de <i>P. falciparum</i> representados por clados na árvore filogenética gerada do com programa MrBayes. Os números	

representam o total de isolados pertencentes em cada clado e a percentagem encontrada .....	118
<b>Tabela 28</b> – Compartilhamento de haplótipos entre os isolados de <i>P. falciparum</i> , baseado na comparação de haplótipos dois a dois entre as macrorregiões: África (AFR), América do Sul (AMS), América Central/México (AMC), Sul da Ásia (SOA), Sudeste Asiático (SEA) e Melanésia (MEL) .....	124
<b>Tabela 29</b> – Resultado da comparação entre os modelos de rota migratória de <i>P. vivax</i> . O melhor modelo foi o G, segundo os valores de Bezier lnL .....	129
<b>Tabela 30</b> – Resultado da comparação entre os modelos de rota migratória de <i>P. falciparum</i> . O melhor modelo foi o C1, segundo os valores de Bezier lnL .....	132
<b>Tabela 31</b> – Relação existente entre os isolados de <i>P. vivax</i> e <i>P. simium</i> e diferentes hipóteses da direção da transmissão lateral, humanos para macacos ou vice-versa, disponíveis na literatura .....	149

## LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SÍMBOLOS

A	- Adenina
AFR	- África
AME	- América
AMS	- América do Sul
AMC	- América Central e México
AMOVA	- Análise de Variância Molecular
BSP	- Bayesian Skyline Plot
C	- Citosina
CDC	- Centers for Disease Control and Prevention
CHK	- China/Coréia
CoI	- Citocromo c oxidase subunidade I
CoIII	- Citocromo c oxidase subunidade III
CSP	- Proteína circunsporozoíta
Cyb	- Citocromo b
DARC	- Duffy antigen receptor for chemokines
DBP	- Duffy binding protein
DDT	- Diclorodifeniltricloroetano
dhfr-ts	- Dehidrofolato-redutase/timidilato-sintase
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
dNTP	- Desoxirribonucleotídeo trifosfato
G	- Guanina
g	- Gravidade
h	- Número de hapótipos
Hd	- Diversidade haplotípica
ICB	- Instituto de Ciências Biomédicas
l	- Litro
M	- Molaridade
MCMC	- Markov Chains Monte Claro
MDE	- Oriente Médio e Ásia Central
MEL	- Melanésia
MgCl <sub>2</sub>	- Cloreto de Magnésio
Mpb	- Megabases
MJ	- Median-joining
mtDNA	- DNA mitocondrial
n	- Tamanho amostral
ng	- Nanograma
OMS	- Organização Mundial de Saúde (do inglês, World Health Organization)
PAHO	- Pan American Health Organization
pb	- Pares de bases
PCR	- Reação em cadeia da polimerase (do inglês, Polymerase Chain Reaction)

pg	- Picograma
PGEM	- Programa Global de Erradicação do Malária
pH	- potencial hidrogeniônico
pmol	- Picomol
qPCR	- PCR quantitativo em tempo real (do inglês, Real Time Quantitative PCR)
RNA	- Ácido ribonucleico
rpm	- Rotação por minuto
rRNA	- Ácido ribonucleico ribossômico
SEA	- Sudeste Asiático
SNPs	- Polimorfismo de Base Única (do inglês, Single Nucleotide Polymorphism)
SOA	- Sul da Ásia
SP	- São Paulo
T	- Timina
TMRCA	- Tempo para o ancestral comum mais recente
U	- Unidade
USP	- Universidade de São Paulo
WGA	- Whole Genome Amplification

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	-	Grau Celsius
g	-	grama
kb	-	quilobase
km	-	quilômetro
Mb	-	Megabase
ng/μl	-	nanograma por microlitro
μl	-	Microlitro
μM	-	Micro molar
π	-	Diversidade nucleotídica
Θ <sub>w</sub>	-	Diversidade por sequências
≥	-	maior ou igual
≤	-	menor ou igual

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b> .....	23
<b>1.1 Malária: aspectos gerais</b> .....	24
<b>1.2 Malária no Novo Mundo</b> .....	26
<b>1.3 Malária no Brasil</b> .....	28
<b>1.4 Malária simiana no Novo Mundo</b> .....	31
<b>1.5 História evolutiva e rota migratória de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i></b> .....	33
1.5.1 Origem de <i>P. falciparum</i> e a chegada no continente americano .....	33
1.5.2 Origem de <i>P. vivax</i> e a chegada no continente americano .....	36
<b>1.6 O genoma mitocondrial de <i>Plasmodium</i></b> .....	39
<b>2 Objetivos</b> .....	42
<b>3 Material e Métodos</b> .....	44
<b>3.1 Aspecto éticos</b> .....	45
<b>3.2 Amostras de DNA</b> .....	45
3.2.1 Amostras de <i>P. simium</i> .....	46
3.2.2 Montagem de genomas mitocondriais de <i>P. falciparum</i> a partir de “short reads” .....	46
<b>3.3 Amplificação e sequenciamento do genoma mitocondrial completo de <i>Plasmodium</i></b> .....	50
<b>3.4 Banco de dados com sequências adicionais de genoma mitocondrial de <i>Plasmodium</i> depositados no GenBank</b> .....	54
3.4.1 <i>Plasmodium vivax</i> e <i>P. simium</i> .....	54
3.4.2 <i>Plasmodium falciparum</i> .....	54
<b>3.5 Análise de dados</b> .....	56
<b>4 Resultados</b> .....	67
<b>4.1 Análise do genoma mitocondrial de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i></b> .....	68
<b>4.2 Diversidade genética dos genomas mitocondriais</b> .....	71
4.2.1 Índice de diversidade genética em isolados de <i>P. vivax</i> .....	71
4.2.2 Índice de diversidade genética em isolados de <i>P. falciparum</i> .....	74
<b>4.3 Análise de variância molecular (AMOVA)</b> .....	74
4.3.1 Análise de variância molecular de <i>P. vivax</i> .....	74

4.3.2	<i>Análise de variância molecular de <u>P. falciparum</u></i> .....	77
<b>4.4</b>	<b>Índice de fixação de Wright FST</b> .....	78
<b>4.5</b>	<b>Teste de Neutralidade D de Tajima e Fu</b> .....	80
4.5.1	<i>D de Tajima e Fu em genoma mitocondrial de <u>P. vivax</u></i> .....	80
4.5.2	<i>D de Tajima e Fu em genoma mitocondrial de <u>P. falciparum</u></i> .....	81
<b>4.6</b>	<b>Mismatch Distributions em populações <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i></b> ..	83
4.6.1	<i>História demográfica global de <u>P. vivax</u> e <u>P. falciparum</u></i> .....	83
4.6.2	<i>História demográfica de <u>P. vivax</u> e <u>P. falciparum</u> provenientes da América do Sul</i> .....	87
<b>4.7</b>	<b>Tamanho efetivo populacional ao longo do tempo - Bayesian Skyline Plot (BSP)</b> .....	89
4.7.1	<i>Análise Bayesian Skyline Plot (BSP) em isolados de <u>P. vivax</u></i> .....	89
4.7.2	<i>Análise Bayesian Skyline Plot (BSP) em isolados de <u>P. falciparum</u></i> .....	92
<b>4.8</b>	<b>Tempo para o ancestral comum mais recente (TMRCA)</b> .....	95
<b>4.9</b>	<b>Análise filogenética e rede de haplótipos mitocondriais</b> .....	96
4.9.1	<i>Análise filogenética e rede de haplótipos de <u>P.vivax</u></i> .....	96
4.9.1.1	<i>Análise filogenética e rede de haplótipos de <u>P.vivax</u> provenientes das Américas</i> .....	108
4.9.2	<i>Análise filogenética e rede de haplótipos de <u>P.falciparum</u></i> .....	114
4.9.2.1	<i>Análise filogenética e rede de haplótipos de <u>P.falciparum</u> provenientes das Américas</i> .....	125
<b>4.10</b>	<b>Fluxo gênico e as rotas migratórias de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i></b> .....	126
<b>5</b>	<b>Discussão</b> .....	134
<b>5.1</b>	<b>Diversidade genética e estrutura populacional existente entre os isolados de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i></b> .....	135
<b>5.2</b>	<b>Malária nas Américas: introdução precoce ou tardia</b> .....	139
5.2.1	<i>Rotas migratórias e dispersão de <u>P. vivax</u> nas Américas</i> .....	140
5.2.2	<i>Rotas migratórias e dispersão de <u>P. falciparum</u> nas Américas</i> .....	142
<b>5.3</b>	<b>Relação genética entre isolados de <i>P. simium</i> e <i>P. vivax</i></b> .....	144
<b>6</b>	<b>Conclusão</b> .....	150
	<b>Referências</b> .....	152

# **1 INTRODUÇÃO**

---

---



## 1.1 Malária: aspectos gerais

Endêmica nas regiões tropicais e subtropicais do globo, onde se distribui de forma heterogênea, a malária constitui um dos maiores problemas de saúde pública, responsável pelas principais causas de morbidade e mortalidade no mundo. É causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida a seus hospedeiros vertebrados através da picada de mosquitos do gênero *Anopheles*. Cinco espécies são causadoras de infecção em seres humanos, *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2015). Dentre estas, *P. falciparum* pode evoluir para malária grave, porém relatos sobre complicações e óbitos em infecções por *P. vivax* e *P. knowlesi* foram registrados (COX-SINGH et al., 2008; SHARMA; KHANDURI, 2009).

Segundo o relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), são 95 países e territórios endêmicos para malária, dentre estes, 45 localizam-se no continente africano. São mais de três bilhões de pessoas vivendo em regiões de risco e cerca de 438 mil mortes foram relatadas em 2015, sendo 90% no continente africano, atingindo principalmente crianças menores de cinco. Neste mesmo ano, estimaram-se 214 milhões de novos casos em todo o mundo, dos quais 88% ocorreram na região africana, seguido pelo Sudeste Asiático (10%) e regiões do Mediterrâneo Oriental (2%) (WHO, 2015) (Figura 1).

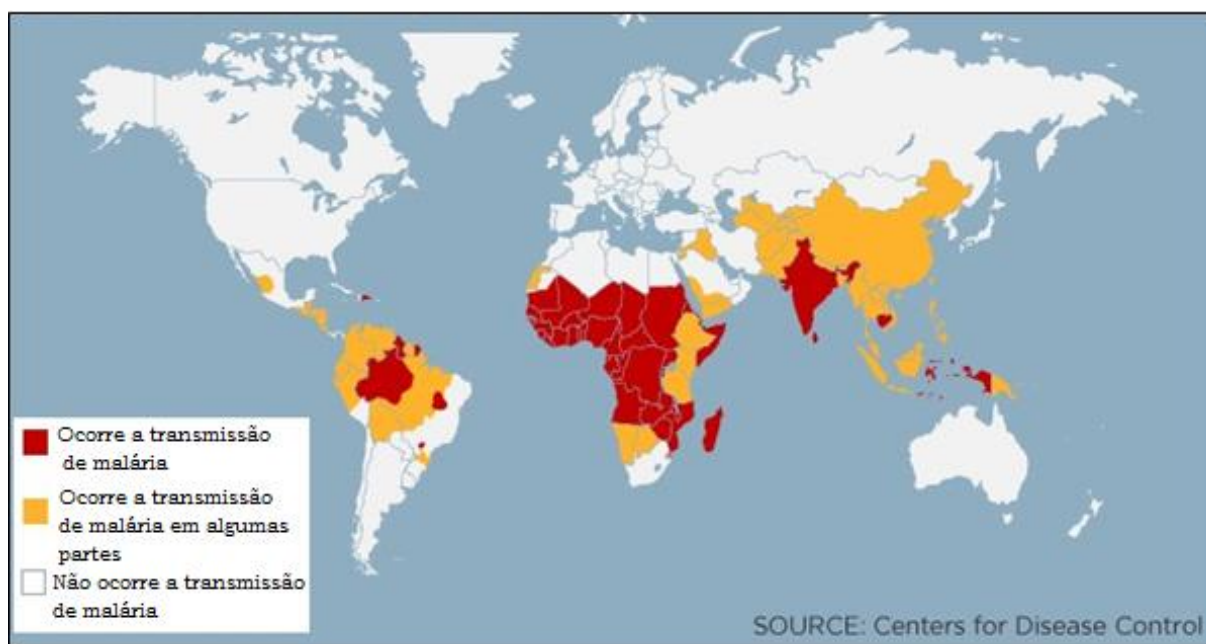
Embora a grande maioria das mortes causadas por malária *falciparum* ocorra na África, a doença encontra-se amplamente distribuída na América Latina, Sul e Sudeste Asiático e Oceania (Figura 1). A distribuição de casos quanto a população exposta à malária é bastante heterogênea. Enquanto *P. falciparum* é mais prevalente no continente africano, *P. vivax* apresenta uma distribuição geográfica mais ampla, uma vez que o vetor é capaz de tolerar grande variedade de temperaturas e sobreviver em altitudes mais elevadas, além disso, *P. vivax* tem uma fase dormente do fígado (hipnozoítos) que pode ser ativada meses após a infecção inicial, causando recaída (WHO, 2015).

Na África, *P. vivax* é endêmico no 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 migrante (CARTER; MENDIS; ROBERTS, 2000; ROSENBERG, 2000). 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.

Na Europa a malária foi erradicada em meados dos anos 70. No final do século XIX e início do século XX, a Grécia foi o país europeu com o maior número de casos reportados (1-2 milhões de novos casos por ano), seguido da Espanha (400 mil casos e 1700 mortes) e da Itália (300 mil casos e 20 mil mortes por ano). Ao fim da Primeira Guerra Mundial, a malária tornou-se extinta no norte e centro do continente, devido a melhoria das condições de drenagem e ao cultivo de zonas pantanosas e alagadas. No entanto, a malária permanecia endêmica no sul da Europa e a erradicação nesta região só foi possível com a campanha de erradicação antimalárica multifacetada, envolvendo o uso de diclorodifeniltricloroetano (DDT). Por isso, somente no ano de 1975 a OMS declarou a malária como erradicada na Europa (WHO, 1976).

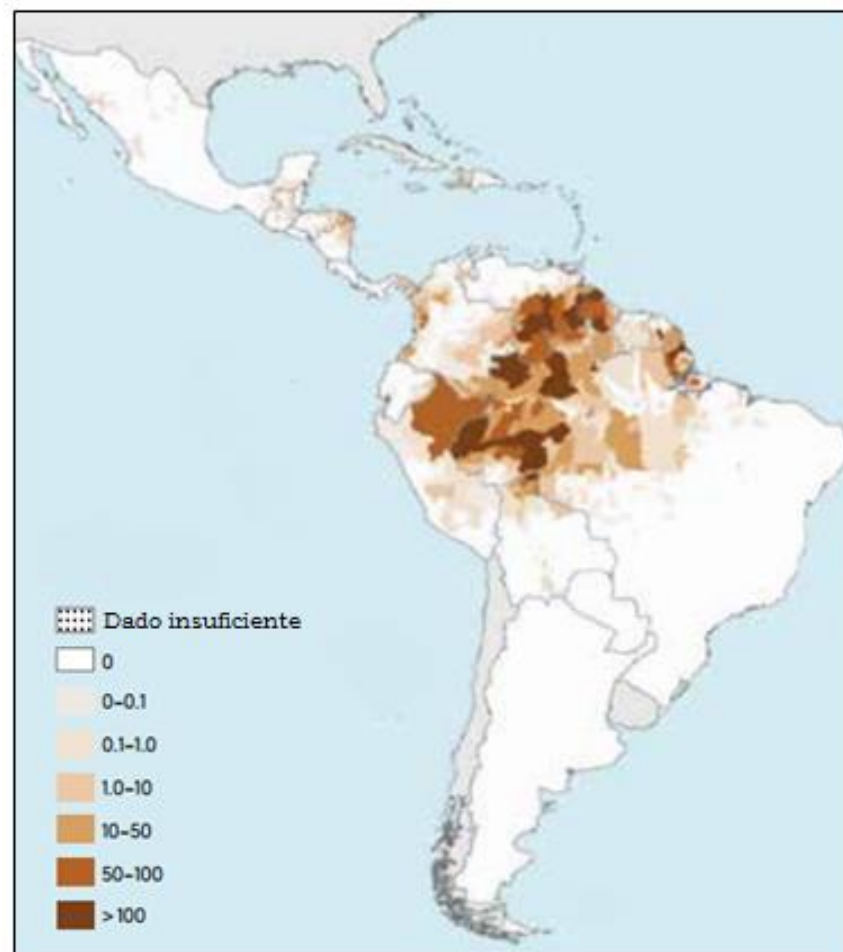
**Figura 1** - Transmissão de malária no mundo. Fonte: CDC, 2015.



## 1.2 Malária no Novo Mundo

A transmissão da malária nos países do Novo Mundo está localizada nas regiões tropicais e subtropicais, onde concentra-se populações mais pobres e vulneráveis a doença. Atualmente o paludismo ocorre em 21 países: Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guina Francesa, Guatemala, Guiana, Haiti, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, República Dominicana, Suriname e Venezuela, com aproximadamente 300 mil casos notificados a cada ano (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION – PAHO, 2016)(Figura 2).

**Figura 2** - Distribuição de casos de malária na América Latina. Os dados demonstrados são referentes ao ano de 2014 e os países foram estratificados de acordo com a transmissão de malária. Fonte: PAHO, 2014.



As características epidemiológicas são semelhantes em todos os países americanos, apresentando graus variados de risco de transmissão, ou seja, ascensão e queda de casos. *Plasmodium vivax* é a espécie predominante, responsável por mais de 70% dos casos de malária relatados, enquanto *P. falciparum* compreende mais de 50% dos casos notificados na Guiana Francesa e essencialmente 100% dos casos reportados na República Dominicana e Haiti (PAHO, 2014).

Apesar das medidas de controle implementadas, a incidência parasitária tem mostrado aumento anual em algumas regiões, com maior morbidade populacional acarretada por *P. vivax*, principalmente nos países que fazem parte da Amazônia, Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru e Suriname. Nos demais países, os casos autóctones registrados estão relacionados com a migração sazonal e com as lacunas deixadas no controle vetorial (ALVAREZ et al., 2010).

Nos últimos anos, os países da América Central (Belize, Guatemala, Honduras, Nicarágua e Panamá) apresentaram uma diminuição no número de casos notificados da doença. No entanto, países como a Venezuela, República Dominicana e Haiti, mostraram um aumento significativo de casos notificados, além disso, na Venezuela este fato estava acompanhado com crescentes casos diagnosticados por *P. falciparum*. Quadro semelhante a este ocorreu na Guiana, devido ao aumento da mineração do ouro nas áreas florestais da Amazônia. Alguns países, incluindo Costa Rica, El Salvador e México, estão em fase de pré-eliminação da doença, enquanto que Argentina e Paraguai estão em fase de eliminação (CARTER et al., 2015).

Na América do Sul, o Brasil e Colômbia, juntos, relataram mais de 50% dos casos de malária notificados nas Américas (CARTER et al., 2015). Atualmente, os casos de malária no Brasil ocorrem principalmente na Região Norte e nos estados que compõem a Amazônia Legal (Acre, Amazonas, Rondônia, Roraima, Amapá, Pará, Maranhão, Mato Grosso e Tocantins), representando 99,8% dos casos notificados neste país e com 143 mil novos casos reportados a cada ano (WHO, 2015).

### 1.3 Malária no Brasil

Até o final do século XIX, a malária estava presente em quase todo o território brasileiro, com exceção de algumas áreas da Região Sul. A Amazônia e todo o planalto central foram atingidos por uma grande epidemia no fim do século XIX durante o denominado “ciclo da borracha” quando este produto tornou-se uma matéria prima preciosa que atraiu legiões de nordestinos que invadiram regiões inteiras da Amazônia. Esta grande migração gerou a cultura do extrativismo seringalista e deu origem a primeira grande epidemia amazônica de malária (ALBURQUERQUE; SUAREZ-MUTIS, 1998). Na construção da estrada de ferro Madeira-Mamoré, iniciada em 1907 para transportar a borracha extraída dos seringais bolivianos e do Acre, a malária afetou entre 50% a 80% dos trabalhadores caribenhos, brasileiros e bolivianos que trabalhavam nas obras. A partir destes eventos, a malária no Brasil seguia avançando no século XX, estando presente nas grandes capitais. Na cidade do Rio de Janeiro foi confirmada microscopicamente a presença de casos de malária provenientes da Ilha do Governador e até da Praça da República no centro carioca. O mesmo ocorreu no estado de São Paulo, particularmente nas cidades de Santos, Campinas e nos vales dos rios Piracicaba e Tietê. Em geral a malária estava em todas as capitais brasileiras, ocorrendo como uma doença endêmica em todo o país (ALBURQUERQUE; SUAREZ-MUTIS, 1998).

Durante a Segunda Guerra Mundial, quando os japoneses ocuparam os seringais da Ásia tropical, o Brasil como país aliado recrutou nordestinos para trabalharem novamente nos seringais da Amazônia formando o “Exército da Borracha”. Essas pessoas recém-chegadas eram susceptíveis à malária e aconteceu uma nova epidemia da doença na Amazônia brasileira. Outra grande epidemia de malária no Brasil foi no final da década de 30 no Nordeste. Navios franceses, que faziam a rota postal França-Natal via Dakar, provavelmente trouxeram o transmissor da malária na África, o *Anopheles gambiae*. Considera-se que este foi um momento fundamental na institucionalização do combate à malária no país, originando pela primeira vez um serviço especificamente constituído para o controle da doença denominado “Serviço de Malária do Nordeste” (HOCHMAN; MELLO; SANTOS, 2002). Um

incrível trabalho de controle da malária foi gerado em todo o território nordestino juntando ações do estado brasileiro e a fundação Rockefeller, que já estava presente no país desde a década de 1910. Este importante sucesso na luta antimalárica foi conhecido mundialmente, marcando a história da malária ao introduzir na agenda sanitária internacional o debate sobre as possibilidades de erradicação da doença em uma perspectiva global (MARQUES, 1987). Depois da Segunda Guerra Mundial, com a descoberta das propriedades inseticidas residuais do DDT e da cloroquina como medicamento antimalárico, juntamente com medidas de saneamento ambiental, levaram a uma drástica redução da malária. Esta redução incentivou o desenvolvimento, por parte da OMS, do Programa Global de Erradicação da Malária (PGEM), baseado em três princípios: combate ao mosquito por meio do DDT, melhoria das condições sanitárias gerais e tratamento dos pacientes. O programa era bom, mas na prática não funcionou como se esperava. Na região amazônica, por exemplo, houve um incremento dos casos devido à colonização da região com as grandes migrações, a abertura de garimpos e diferentes atrativos econômicos que fizeram com que a malária retornasse como um grave problema de saúde pública (MARQUES, 1987).

O atual quadro de incidência da malária no Brasil deve-se, entre outros fatores, à colonização em áreas densamente florestadas da Amazônia que tem atraído agricultores imigrantes das regiões Sul e Sudeste livres de malária, dando origem a uma série de novas fronteiras de assentamentos agrícolas (CONFOLONIERI et al., 2014). O desmatamento inicial pode induzir grandes mudanças na biologia do vetor, através da criação e expansão de habitats de reprodução do mosquito *Anopheles darlingi*, o principal vetor da malária na América do Sul, transmitindo tanto *P. vivax* como *P. falciparum* no Brasil (CASTRO et al., 2006; LAPORTA et al., 2015).

Recentemente, foi observada uma clara mudança na distribuição das principais espécies de plasmódios que causam a malária no Brasil. Até meados de 1990, proporções semelhantes de infecções confirmadas devidas a *P. falciparum* e *P. vivax* eram observadas, já na década seguinte, o cenário mudou, *P. vivax* tornou-se a espécie predominante, enquanto que infecções por *P. falciparum* diminuíram de forma constante (OLIVEIRA-FERREIRA et al.,

2010). Em 2014, *P. vivax* foi responsável de 85% dos 142 mil casos de malária relatados no país (Ministério da saúde, dados não publicados, 2014). Estas tendências podem ser explicadas por alguns fatores, como a presença de estágios hepáticos dormentes (hipnozoítos) e a circulação precoce dos estágios sexuais (gametócitos) no sangue periférico, o que pode tornar *P. vivax* menos sensível do que *P. falciparum* às estratégias de controle disponíveis (SATTABONGKOT et al., 2004; SHANKS, 2012).

Apesar de não ser considerada área endêmica de malária, são registrados anualmente uma pequena porcentagem (cerca de 0,05%) de casos autóctones originados ao longo da Serra do Mar, que se estende através dos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, pertencentes à região de Mata Atlântica (DE PINA-COSTA et al., 2014). Nestas áreas, os principais vetores da malária são *An. cruzii* e *An. bellator* (subgênero *Kertessia*), que se reproduzem em água retida pelas axilas das folhas de plantas bromélias que são particularmente abundantes neste bioma (MARRELLI et al., 2007).

A malária extra-amazônica ficou conhecida inicialmente como "malária de floresta" e mais tarde descrita como "malária de bromélia" (DOWNS; PITTENDRIGH, 1946; GADELHA 1994). Atualmente a "malária de bromélia" está ausente na maior parte da Mata Atlântica, mas existe focos remanescentes na região Sul e Sudeste do país, os quais envolvem infecções por *P. vivax* e *P. malariae* em seres humanos (FERREIRA; CASTRO, 2016), além disso, macacos do gênero *Alouatta* são naturalmente infectados com estes parasitos (DEANE, 1992), uma vez que o vetor *An. cruzii* é capaz de realizar o repasto sanguíneo tanto próximo das copas das árvores quanto ao nível do solo (dispersão vertical), sugerindo que a malária na Mata Atlântica seja possivelmente uma zoonose, pois possibilita a transmissão entre humanos e símios (DUARTE et al., 2013; MARRELLI et al., 2007, NEVES et al., 2013; UENO; FORATINNI; KAKITANI, 2007). A Figura 3 representa o esquema hipotético de transmissão da malária simiana ao ser humano (vice-versa) em regiões de Mata Atlântica.

**Figura 3** - Esquema hipotético de interação entre a malária humana e simiana. O vetor (*An. cruzii*) apresenta dispersão vertical, ou seja, realiza o repasto sanguíneo tanto próximo a copa das árvores quanto ao nível do solo, possibilitando contato com ambos os tipos de parasitos e hospedeiros. Fonte: Pina-Costa et al., 2014.



#### 1.4 Malária simiana no Novo Mundo

Os mecanismos de mudança e adaptação dos plasmódios de primatas não-humanos para humanos ou vice-versa, ainda não são bem conhecidos. Entretanto, ao longo dos anos, já se comprovou que diversas espécies de *Plasmodium* de primatas não-humanos podem infectar experimentalmente (*P. schwetzi*, *P. rodhaini*, *P. inui*, *P. cynomolgy*, *P. brasilianum* e *P. simium*) ou naturalmente o ser humano (*P. cynomolgy*, *P. knowlesi* e *P. simium*). (COATNEY; COLLINS; CONTACOS, 1971).

Nas Américas, diversos estudos com primatas neotropicais e humanos coexistindo em áreas de florestas têm sugerido a importância destes como reservatório da malária humana (ARRUDA et al., 1989; CURADO et al., 1997; VOLNEY et al., 2002). Neste continente, duas espécies causadoras de malária simiana são conhecidas, *P. brasilianum* e *P. simium* (DEANE et al., 1992). Ambos os parasitos foram diagnosticados pela primeira vez em território



brasileiro, *P. brasilianum* descrito em macacos da Amazônia (*Cacajao calvus*), enquanto que *P. simium* foi identificado pelo pesquisador Flávio da Fonseca em 1951, quando examinava primatas não-humanos da floresta de Itapeirica da Serra (SP), Brasil (DEANE, 1992).

Infecções por *Plasmodium* em macacos no Brasil foram estudadas entre 1930 e 1990 por Deane, que examinou mais de 4.000 primatas não-humanos espalhados pelos estados brasileiros, mostrando que 14,3% (655) apresentaram infecções maláricas. Esses casos estavam distribuídos de maneira heterogênea no território nacional, 35,6% concentraram-se na região sudeste e 17,9% na região sul. Além disso, Deane sugeriu que a taxa de infecção por *P. brasilianum* (73,9%) foi maior quando comparada a *P. simium* (17,7%), uma vez que, a única espécie descrita na região amazônica foi o *P. brasilianum*, enquanto que na região sul e sudeste, ambas as espécies foram catalogadas, *P. brasilianum* (46,3%) e *P. simium* (37,5%) (DEANE, 1992).

Nos dias atuais, *P. brasilianum* está distribuído pelas Américas, Central e Sul (CHINCHILLA et al., 2006; DEANE, 1964; FAUNDER et al., 2000) e identificados em várias espécies de primatas neotropicais (Família *Cebidae*, exceto *Aotus* e raramente exemplares de *Saguinus midas niger* – Callithricinae (PERELMAN et al., 2011), enquanto que *P. simium* encontra-se restrito à Mata Atlântica na região Sul e Sudeste do Brasil, sendo relatado nos estados do Espírito Santo, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, infectando macacos *Alouatta fusca*, *Alouatta caraya*, *Brachyteles arachnoides* (DEANE et al., 1968; DEANE et al., 1992) e macacos da subfamília *Cebidae*, diagnosticado pela primeira vez no Rio de Janeiro (DE ALVARENGA et al., 2015).

Com o avanço dos estudos moleculares e imunológicos, pesquisadores têm sugerido que *P. brasilianum* e *P. simium* apresentam características morfológicas, genéticas e imunológicas semelhantes ao *P. malariae* e *P. vivax*, respectivamente (DEANE et al., 1992; DUARTE et al., 2006; LECLERC et al., 2004).

Existem evidências de que, as regiões não repetitivas do gene que codifica a proteína circumsporozoíta (CSP) de *P. malariae* e *P. vivax* sejam indistinguíveis de *P. brasilianum* e *P. simium*, respectivamente. Vários estudos

foram publicados relacionando *P. simium*/*P. vivax*. Goldman e colaboradores (1993) sequenciaram nove clones, com fragmentos de aproximadamente 1,2 Kb, do gene que codifica a proteína CSP de *P. simium* e afirmaram que a sequência repetitiva da proteína era idêntica à de *P. vivax*, sugerindo que *P. simium* poderia ser descendente de um ancestral comum a *P. vivax*. Além disso, Escalante e colaboradores (1995, 2005) ao estudar a mesma proteína de superfície (CSP), também demonstraram a identidade genética existente entre *P. vivax* e *P. simium*. O grupo sugere que os hospedeiros simianos podem ser reservatórios de plasmódios humanos, já que as similaridades entre ambos são fortes indicativos da ocorrência de especiação, ou seja, uma mesma espécie de plasmódio, ao longo do tempo, poderia ter se adaptado ao hospedeiro humano e simianos. Além disso, Escalante e colaboradores (2005) sugerem que a transmissão de plasmódios entre humanos e macacos do Novo Mundo ocorreu recentemente na escala evolutiva.

## **1.5 História evolutiva e rota migratória de *P. vivax* e *P. falciparum***

Estudar a história evolutiva das espécies de *Plasmodium* é fundamental para entender a variação genética dos parasitos, avaliar a distribuição geográfica dos genes que codificam antígenos candidatos a vacina e identificar genes associados a resistência aos medicamentos. Além disso, tais informações são essenciais para implementar métodos moleculares, para detectar casos de malária importada e verificar a eficácia no controle de malária local (CARLTON et al., 2008; JOY et al., 2008; RODRIGUES et al., 2014). Independente da sua importância clínica, a história evolutiva e os eventos que levam a uma ampla distribuição geográficas destes parasitos, ainda permanecem desconhecidos.

### *1.5.1 Origem de P. falciparum e a chegada no continente americano*

Até meados de 2010, considerava-se que *P. falciparum* teria sua origem em um ancestral comum a *P. reichenowi*, um parasito do chimpanzé africano. Estas espécies divergiram há cerca de 5-7 milhões de anos, coincidindo com

a separação de seus respectivos hospedeiros (seres humanos e chimpanzés) (ESCALANTE; AYALA, 1994; RICH et al., 1998).

Entretanto, estudos publicados nos últimos cinco anos mostraram a existência de plasmódios geneticamente semelhantes a *P. falciparum* (mas muito diversos entre eles) em chimpanzés (*Pan troglodytes*), gorilas ocidentais (*Gorilla gorilla*) e bonobos (*Pan paniscus*), sugerindo que os isolados de *P. falciparum* que hoje infectam seres humanos podem ter sido objeto de um ou mais episódios relativamente recentes de transmissão lateral (RICH et al., 2009). Uma crítica a essa interpretação vem do fato de que a maioria desses isolados foi obtida de animais mantidos em cativeiro, potencialmente expostos a parasitos de origem humana. Torna-se assim difícil, com base nesse tipo amostral, definir a direção da transferência lateral.

O debate tornou-se mais conclusivo com a publicação de novas sequências parciais do genoma mitocondrial de plasmódios de primatas não-humanos silvestres, coletados a partir de amostras de fezes de chimpanzés, gorilas e bonobos (selvagens e domésticos) na África Ocidental (LIU et al., 2010). Esse novo estudo mostrou que nenhuma sequência de DNA obtida de chimpanzés (e poucas sequências de bonobos) agrupava-se entre as sequências de *P. falciparum* de origem humana, embora algumas das sequências de parasitas de chimpanzés fossem relacionadas às de *P. reichenowi* (LOY et al., 2017). Entretanto, diversas sequências obtidas de gorilas agrupavam-se entre as sequências de *P. falciparum* humano, formando uma linhagem monofilética na análise filogenética. Estes resultados sugerem que sequências humanas existentes evoluíram a partir de um único evento de transmissão de parasitas de gorilas para humanos. Além disso, a análise filogenética mostrou algumas sequências obtidas de parasitos de bonobos (todos em contato próximo com seres humanos) estavam agrupadas entre as de *P. falciparum*. No entanto, os parasitos de bonobos apresentavam mutações no gene que codifica a enzima dehidrofolato-redutase/timidilato-sintase (*dhfr-ts*), que confere resistência aos antimaláricos (anti-folatos), sugerindo que os bonobos foram infectados com parasitas humanos enquanto alojados em área urbana.

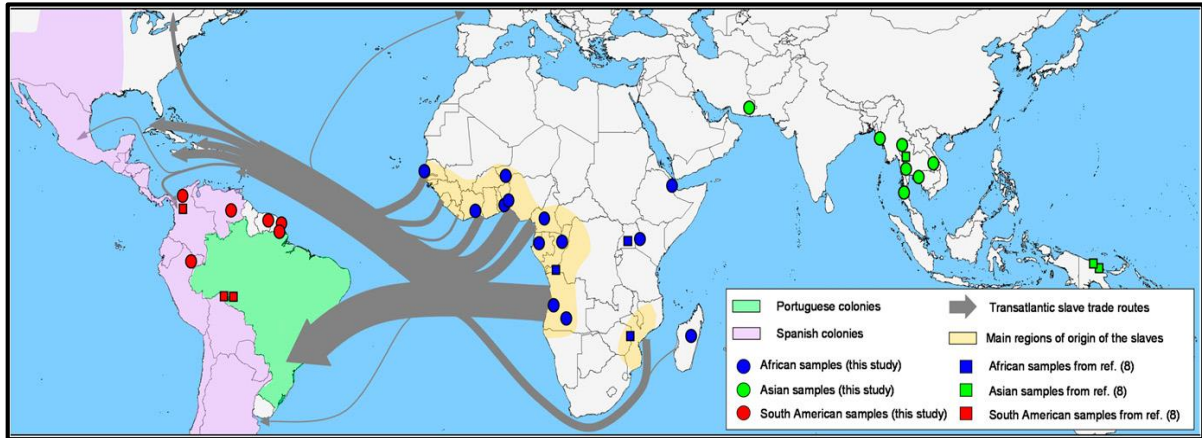
A origem africana de *P. falciparum* parece provável (KRIEF et al., 2010; SNOW et al., 2005), mas as rotas e o tempo de dispersão destes patógenos para fora da África e outras partes do mundo colonizado permanecem controversos (HARTL, 2004).

Há hipótese sugerindo que a propagação de *P. falciparum* ocorreu com os seres humanos, populações de *Homo sapiens*, que migraram da África para Ásia há cerca de 60 mil anos atrás em associação com o surgimento de sociedades agrícolas e o aumento da transmissão de mosquito (HUME; LYONS; DAY, 2003), seguindo para o Oriente Médio, Europa, Ilhas do Pacífico e finalmente para as Américas (HUGHES; VERRA, 2010; TANABE et al., 2010).

Outra hipótese sugere que a expansão de *P. falciparum* para as Américas pode ter ocorrido através da migração de europeus e do comércio transatlântico de escravos. O DNA mitocondrial mostrou uma clara ligação entre haplótipos africanos e sul-americanos (JOY et al., 2003), consistente com a introdução recente dos patógenos através do comércio de escravos.

Estudo baseado em marcadores microssatélites mostrou que a população de *P. falciparum* nas Américas está dividida em duas “subpopulações”, um aglomerado genético ao norte compreendendo a população da Colômbia e outro aglomerado ao sul, com predomínio de amostras do Brasil, Bolívia e Guiana Francesa (YALCINDAG et al., 2011). Alguns pesquisadores sugerem que o *P. falciparum* foi introduzido nas Américas múltiplas vezes, o que explicaria a heterogeneidade observada entre amostras ao norte e ao sul (ANDERSON et al., 2000; DE CASTRO; SINGER, 2005; 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 XVI e XIX a América do Sul e América Central foram amplamente divididas 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 (Figura 4).

**Figura 4** - Principais rotas do tráfico transatlântico de escravos e grandes impérios europeus entre os séculos 16 e 19 na América do Sul. Fonte: Yalcindag et al., 2011.



### 1.5.2 Origem de *P. vivax* e a chegada no continente americano

Estudos publicados nos últimos dez anos têm questionado a origem africana *P. vivax*, sugerindo que a população de *P. vivax* representada atualmente na Ásia é resultado de *bottleneck*, ou seja, uma linhagem que migrou para o continente asiático antes da disseminação fenótipo Duffy negativo na África (LIU et al., 2014; LOY et al., 2017).

A ausência do antígeno Duffy na superfície dos eritrócitos, é um evento marcante que ocorreu na população humana da África Central e Ocidental (CULLETON; CARTER, 2012). Nessas regiões ocorreu a fixação de um polimorfismo humano, uma mutação na região promotora do gene que abole a expressão do grupo sanguíneo Duffy em hemácias, gerando o fenótipo Duffy-negativo. Conhecida como antígeno Duffy/receptor de quimiocinas (DARC), essa molécula é utilizada pelos merozoítos de *P. vivax* para invadir as hemácias (especialmente os reticulócitos). A ausência de DARC na superfície de eritrócitos confere proteção contra a malária vivax (CULLETON; CARTER, 2012; LIVINGSTONE et al., 1984). A interação Duffy-vivax sugere que *P. vivax* poderia ter estado em contato com a população humana africana por longo tempo, permitindo a seleção desta mutação, apoiando a hipótese de uma origem africana de *P. vivax*.

Recentemente, parasitos semelhantes a *P. vivax* foram identificados em macacos africanos (LIU et al., 2014). A triagem foi realizada em mais de 5 mil amostras provenientes de comunidades de macacos silvestres de toda a África Central. Neste estudo foram encontrados gorilas ocidentais (*G. gorila*) e orientais (*G. beringei*) e chimpanzês (*P. troglodytes*), mas não bonobos (*P. paniscus*), com parasitos semelhantes a *P. vivax*, e além disso, as taxas de infecção em macacos selvagens foram semelhantes aos de populações humanas.

Analisando mais de 2.600 sequências do genoma mitocondrial, também foi possível mostrar que os parasitos de macacos apresentam uma maior diversidade genética quando comparados com os parasitos humanos. As sequências de genes nucleares (*ldh*) sugeriram que as estirpes de *P. vivax* na análise filogenética, estavam agrupados em uma linhagem monofilética junto com as sequências de parasitos de macacos. Consequentemente, estes resultados indicam que *P. vivax* surgiu de uma espécie de plasmódio que infecta os chimpanzês e gorilas selvagens e que todos os parasitos de *P. vivax* existentes evoluíram a partir de um único ancestral que se espalhou para fora da África (LIU et al., 2014). Além disso, os clones de *P. vivax* encontrados atualmente em Madagascar e partes da África são provavelmente resultados de uma reintrodução destes parasitos provenientes da Ásia (CULLETON; CARTER, 2012; LOY et al., 2017).

A rota de dispersão e a data da chegada de *P. vivax* nas Américas ainda permanecem desconhecidas. Alguns autores sugerem que a malária vivax nas Américas foi introduzida recentemente, a partir da colonização do continente pelos europeus e através do comércio transatlântico de escravos africanos.

Outra possível via de introdução de *P. vivax* nas Américas pode ter ocorrido antes da era colonial com a população humana migrante do Sudeste Asiático. A migração de povos asiáticos ocorreu via Estreito de Bering 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 morfológicamente 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 durante 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 XIX, 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 aproximadamente 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.

Assim, até o presente momento não há suporte científico para nenhuma hipótese da chegada dos plasmódios nas Américas, mas os dados genéticos sugerem que este continente foi provavelmente colonizado pelo parasito em momentos diferentes, explicando a divisão populacional existente dentro do continente (TAYLOR et al., 2013).

## 1.6 O genoma mitocondrial de *Plasmodium*

Os marcadores genéticos são ferramentas modernas e têm sido frequentemente utilizados em estudos de diversidade, estimativas de migração e dispersão nas populações, estrutura genética populacional, resistência a medicamentos, erradicação de doenças, entre outros. Nos últimos anos, a análise do genoma nuclear de *P. falciparum* (14 cromossomos com 23 Mbp e 19,1%CG), baseado em polimorfismos de base única (SNPs), foi utilizado para identificar *loci* candidatos a resistência de artemisinina, além de traçar a rota de migração de parasitos resistentes aos medicamentos. No entanto, os *barcoding* baseados em SNPs nucleares são limitados pela falta de especificidade geográfica e frequente recombinação genética. Para superar estas limitações, os genomas extra-nucleares, tais como, genoma mitocondrial e apicoplasto vem sendo cada vez mais explorados (PRESTON et al., 2014).

O apicoplasto é um plasmídeo não fotossintético presente na maioria dos Apicomplexa, incluindo todas as espécies de *Plasmodium*, plantas e algas vermelhas (LIM; McFADDEN, 2010; WILSON et al., 1996). Embora o apicoplasto tenha perdido qualquer capacidade fotossintética, esta organela é essencial para vias metabólicas e biossintéticas, além de ser um alvo atraente para antimaláricos (McFADDEN, 2011). O genoma é circular, com 35 mil pares de base (35 kb, 30 genes e 13,1% GC), apresenta herança uniparental (materna) e DNA conservado, o que o torna uma importante ferramenta para escrever histórias evolutivas (CREASEY et al., 1994).

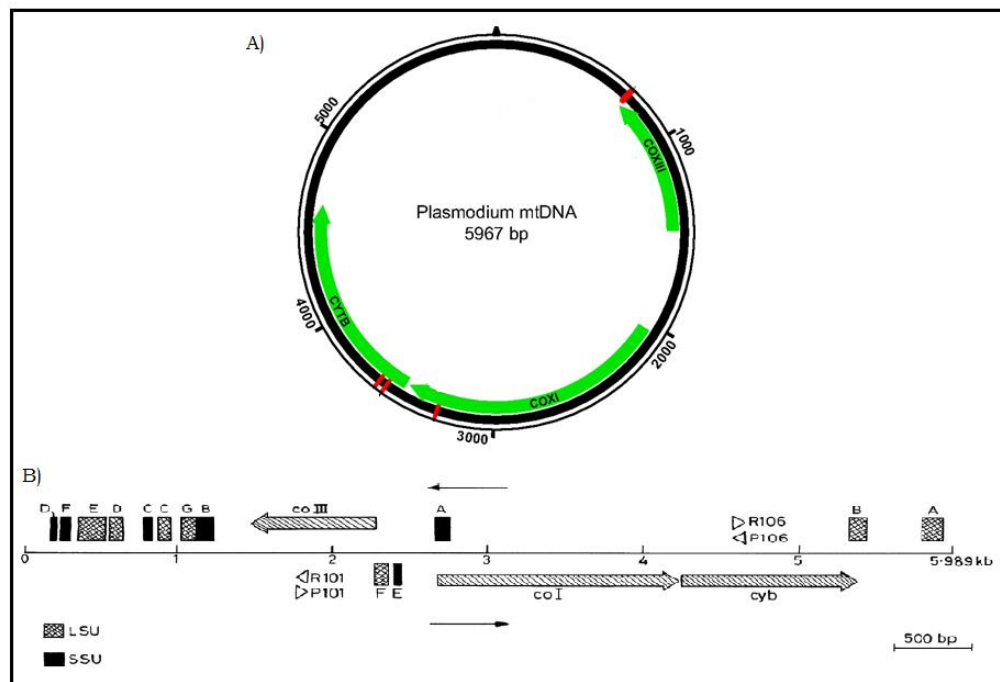
O DNA mitocondrial (mtDNA) é o material genético encontrado no interior das mitocôndrias, organelas produtoras de energia presentes no citoplasma das células. Em animais, na grande maioria dos casos, é constituído por uma molécula de DNA circular, com conteúdo genético conservado e estrutura gênica simples (não possui regiões repetitivas, transposons, introns ou pseudogenes) (WILSON et al., 1985).

Em *Plasmodium*, o genoma mitocondrial é circular, relativamente pequeno quando comparado com ao DNA nuclear (aproximadamente 6 kb e 31,6% GC, 23 Mbp respectivamente), está presente em múltiplas cópias na célula ( $\approx 20$  cópias em *P. falciparum*), apresenta herança materna e não sofre



recombinação (genoma haplóide), além de possuir três genes codificantes: citocromo c oxidase subunidade I (COXI); citocromo c oxidase subunidade III (COXIII); e citocromo b (CYTB) (PRESTON et al., 2014; WILSON; WILLIAMSON, 1997) (Figura 5). Essas características fazem do DNA mitocondrial uma fonte rica em informações para estudos filogenéticos, distribuição geográfica de linhagens, com ênfase em fatores históricos (Pena, 2000).

**Figura 5** - Organização do genoma mitocondrial de *Plasmodium* ( $\approx$  6kb) Genes que codificam proteínas mitocondriais (COXI, COXIII, CYTB). A direção da seta indica a direção da transcrição. A) representa o genoma de *P. falciparum* (representado de forma circular) e B) representa o genoma de *P. vivax* (representado de forma linear). Fonte: Sharma et al., (1998); Sundararaman et al., (2013).



Nos últimos anos, diversos estudos baseados no genoma mitocondrial de *Plasmodium* vem sendo publicados com o intuito de investigar o continente de origem, a diversidade genética existente e a rota de dispersão destes parasitos (principalmente *P. vivax* e *P. falciparum*). A análise do mtDNA completo de *P. vivax*, provenientes de estudos independentes (CULLETON et al., 2011; JONGWUTIWES et al., 2005; MU et al., 2005; TAYLOR et al., 2013) sugere que o Sudeste Asiático é a região em que os parasitos apresentam a maior diversidade genética, enquanto que a menor diversidade foi encontrada

entre os isolados do continente americano, sugerindo que as Américas foram os locais mais recentemente colonizado por *P. vivax* (CULLETON et al., 2011; TAYLOR et al., 2013). Em relação a *P. falciparum*, a diversidade genética mais elevada foi encontrada na África e além disto, o genoma mitocondrial sugere que este continente seja o local de origem da espécie e que *P. falciparum* se espalhou para o resto do mundo através da migração humana (JOY et al., 2013; TANABE et al., 2010).

## **2 OBJETIVOS**

---

---

O objetivo geral deste projeto é inferir as vias e as datas de introdução de *P. vivax* e *P. falciparum* nas Américas, com base na análise do genoma mitocondrial completo de parasitos coletados em todas as regiões em que estas espécies estão presentes no mundo. Com isso os objetivos específicos são:

1. Analisar a diversidade genética e a estrutura populacional de *P. vivax* e *P. falciparum* nas Américas, por meio do sequenciamento do genoma mitocondrial completo.

2. Avaliar os padrões de agrupamento e diferenciação geográfica dos genomas mitocondriais de isolados de *P. vivax* e *P. falciparum* provenientes de todas as regiões endêmicas para essas espécies, para comparar as vias de introdução dessas espécies nas Américas.

3. Inferir a origem geográfica de *P. vivax* e *P. falciparum*, combinando os dados deste estudo com os dados presentes na literatura.

4. Analisar a existência da relação genética entre isolados de *P. simium* e *P. vivax*, coletados em macacos neotropicais e humanos, respectivamente, e inferir a possível transmissão lateral, ou seja, inferir se 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.

## **3 Material e Métodos**

---

---

### 3.1 Aspecto éticos

Os protocolos de pesquisa desta tese de doutorado 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 1102/CEP em 05/03/2013).

### 3.2 Amostras de DNA

O DNA das amostras de *P. vivax*, *P. simium* e *P. falciparum* utilizadas neste estudo, foi isolado a partir de 200 µl de sangue venoso utilizando QIAamp DNA Mini Kit (Hilden, Alemanha), sendo a extração automatizada pelo equipamento QIAcube (Qiagen).

O diagnóstico de malária foi realizado por PCR em tempo real que tem como alvo o gene que codifica a subunidade menor (18S) do RNA ribossômico (rRNA) para diagnóstico e quantificação de parasitemias de *P. simium*, *P. vivax* e *P. falciparum*. Cada reação de 20 µl contém 2 µl de DNA, 10 µl de 2 × Maxima SYBR Green qPCR master mixture (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e 0,5 µM de cada primer. Foi utilizado o primer gênero-específico P1 (ACG ATC AGA TAC CGT CGT AAT CTT), combinado com o oligonucleotídeos iniciadores (primers) espécie-específicos, V1 (CAA AAT AAA AAG TCT CGA CTC AGA GAA A) ou F2 (TCT CAA AAA AGT CAC CTC GAA AGA TG), sendo V1 para diagnosticar *P. vivax* e *P. simium* e F2 para diagnosticar *P. falciparum*. Estes primers permitiram a amplificação de um fragmento espécie-específico de 100 pares de bases (pb) do gene 18S rRNA (KIMURA et al., 1997). As curvas padrão foram preparadas com as diluições em série de dez vezes da sequência alvo. A PCR foi realizada em um termociclador StepOnePlus (Applied) com as seguintes condições de clivagem: desnaturação a 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C. A Tabela 1 apresenta os isolados, a localidade e o número de amostras que foram amplificadas e sequenciadas neste estudo.

### 3.2.1 Amostras de *P. simium*

As amostras de *P. simium* foram coletadas de macacos dos gêneros *Alouatta* (bugios) e *Callicebus* (Sauá) obtidas por meio de trabalho em colaboração com o Departamento de Parques e Áreas Verdes, pertencente a Prefeitura Municipal de São Paulo (DEPAVE/SP). Os animais foram resgatados em diversas zonas da região metropolitana de São Paulo (áreas ao sul e norte). Além destas amostras, outras duas foram coletadas em diferentes estados brasileiros, a uma no Rio Grande do Sul (município de Viamão) e a outra foi coletada em Santa Catarina (Indaial). Esta última foi cedida gentilmente pela Cristiana Brito, pesquisadora da Fiocruz, Minas Gerais, Brasil (Tabela 1). A Figura 6 representa a localização geográfica dos isolados de *P. simium*, *P. vivax* e *P. falciparum* sequenciados neste estudo.

### 3.2.2 Montagem de genomas mitocondriais de *P. falciparum* a partir de “short reads”

Foram incluídas no banco de dados 812 sequências disponíveis no ENA (números de acesso: ERS010434-ERS010659; ERS041968-ERS041991) com o genoma completo de *P. falciparum*. O genoma mitocondrial foi montado, com auxílio de programas escritos por nós para automatização, de acordo com os seguintes passos: leituras mitocondriais presentes no conjunto de sequenciamento completo foram identificadas por similaridade usando o programa BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra sequência de referência de *P. falciparum* 3D7 (número de acesso AY282930), com um limite mínimo de similaridade de 80%. As sequências resultantes foram então recuperadas do banco completo com o programa cdbbank (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/software/>). Um filtro de qualidade foi aplicado pelo programa fastq\_quality\_filter do pacote FastX-Toolkit ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/index.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html)), com valor de qualidade de no mínimo 15 em todas as bases de cada leitura. A cobertura muito alta de sequenciamento pode levar a problemas de montagem, então, selecionamos aleatoriamente uma quantidade de leituras suficiente para ter cobertura de cerca de 200 X, que em nossa experiência tem sido suficiente

para montar completamente o genoma mitocondrial de *Plasmodium*. O conjunto de leituras mitocondriais selecionadas foi finalmente montado utilizando-se o programa Newbler (Roche, se as leituras tiverem pelo menos 50 bases de comprimento) ou o Velvet (se tiverem menos que 50 bases de comprimento, ZERBINO; BIRNEY, 2008), uma vez que o Newbler não trabalha com leituras menores que 50 bases.

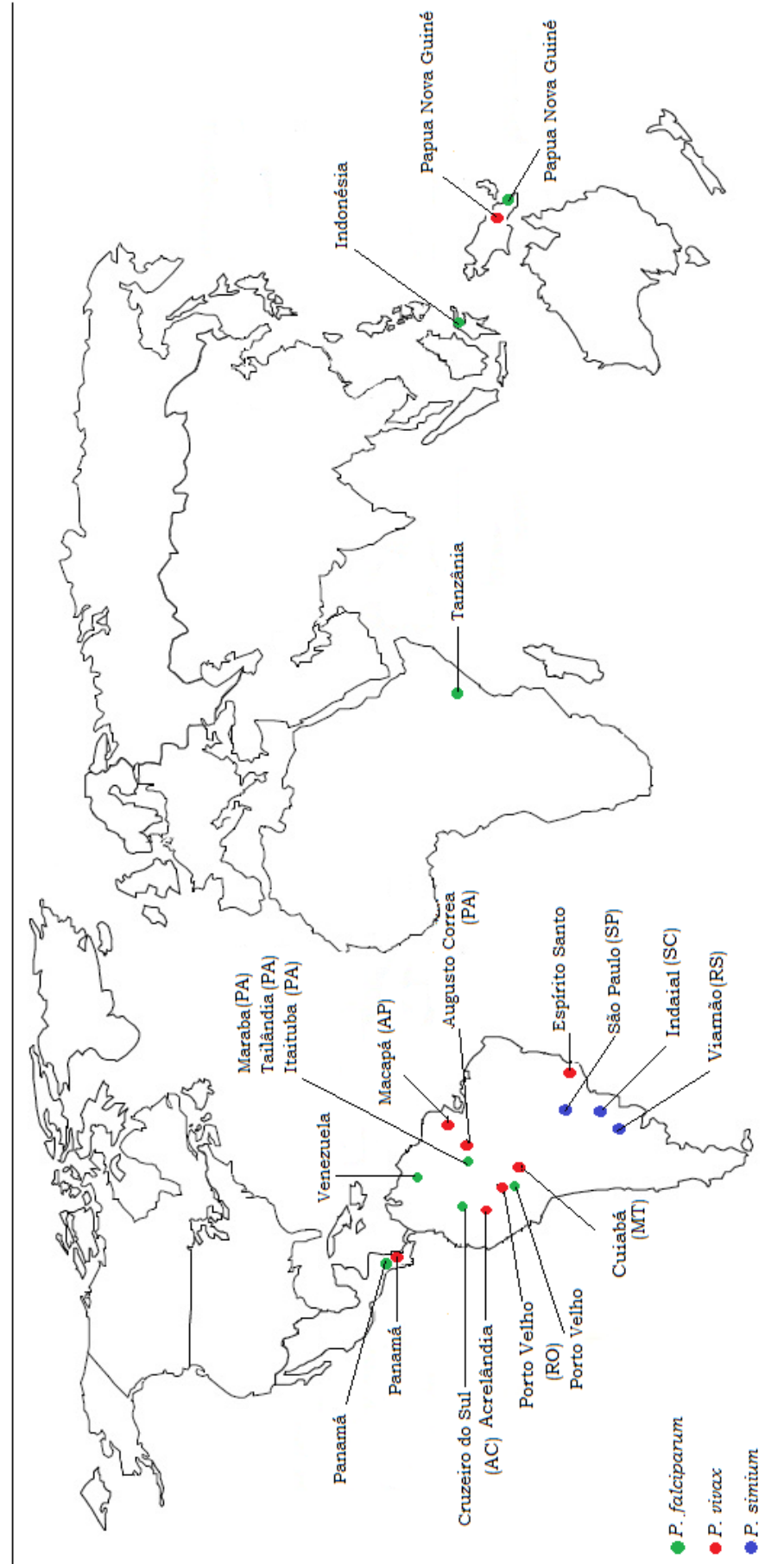
A análise de recombinação foi realizada com todas as sequências do genoma mitocondrial completo (aproximadamente 6 kb) capturadas do banco de dados ENA. Os eventos de recombinação foram analisados com diferentes métodos disponíveis no programa RDP3 (MARTIN et al., 2010). Os algoritmos analisados foram RDP, Chimaera, Maxchi, GENECONV, BootScan e SiScan para a busca e foi adotado o critério de que apenas eventos de recombinação detectados por mais de dois desses algoritmos fossem mostrados. Nas opções dos programas, todos os parâmetros utilizados foram o padrão *default*.



**Tabela 1:** Amostras de *P. vivax*, *P. simium* e *P. falciparum* sequenciadas neste estudo.

<b>Isolados de <i>P. vivax</i></b>					
<b>País</b>	<b>Localidade</b>	<b>n amostral</b>	<b>Ano de coleta</b>	<b>Referência</b>	
Brasil	Cuiabá (MT)	1	2004	Sousa et al. (2010)	
Brasil	Macapá (AP)	2	2004	Sousa et al. (2010)	
Brasil	Porto Velho (RO)	3	2004	Sousa et al. (2010)	
Brasil	Augusto Correa (PA)	1	2005	Sousa et al. (2010)	
Brasil	Acrelândia (AC)	14	2005	Orjuela-Sánchez et al. (2010)	
Brasil	Espirito Santo	22	2002-2003	Cerutti et al. (2007)	
Panamá	Provincia de Panamá, Kuna Yala, Dari	32	2003-2008	Obaldia et al. (2015)	
Papua Nova Guiné	Ilaita, Sigmaru, Alexishafen	52	2003-2008	Koepfli et al. (2015)	
<b>Isolados de <i>P. simium</i></b>					
<b>País</b>	<b>Localidade</b>	<b>n amostral</b>	<b>Ano de coleta</b>	<b>Referência</b>	
Brasil	São Paulo (SP)	6	2000-2009	Duarte et al. (2008)	
Brasil	São Paulo (SP)	1	2010	Sousa (2012)	
Brasil	Viamão (RS)	1	2003	Duarte, dados não-publicados	
Brasil	Indaial (SC)	1	2011	Costa et al. (2014)	
<b>Isolados de <i>P. falciparum</i></b>					
<b>País</b>	<b>Localidade</b>	<b>n amostral</b>	<b>Ano de coleta</b>	<b>Referência</b>	
Brasil	Marabá (PA)	17	1998-1999	Machado et al. (2004)	
Brasil	Tailandia (PA)	41	1998	Machado et al. (2004)	
Brasil	Porto Velho (RO)	25	1998	Machado et al. (2004)	
Brasil	Itaituba (PA)	25	1999	Machado et al. (2004)	
Brasil	Cruzeiro do Sul (AC)	39	2010-2013	Ladeia-Andrade et al. (2016)	
Venezuela	Bolivar	21	2003-2004	Escalante, dados não-publicados	
Panamá	Provincia de Panamá, Kuna Yala, Dari	6	2003-2008	Obaldia et al. (2015)	
Indonésia	Flores, Talibura	20	2001-2004	Kawamoto, dados não-publicados	
Papua Nova Guiné	Ilaita, Sigmaru, Alexishafen	23	2003-2008	Felger, dados não-publicados	
Tanzania	Morogoro	27	2013	Mwingira et al. (2014)	

**Figura 6** - Localização geográfica das amostras de *P. vivax*, *P. simium* e *P. falciparum* sequenciadas neste estudo.



### 3.3 Amplificação e sequenciamento do genoma mitocondrial completo de *Plasmodium*

Os estudos de diversidade em *P. vivax* e *P. simium* estão restritos pela disponibilidade de DNA genômico destes parasitos devido às baixas parasitemias e a dificuldade da cultura contínua *in vitro*. Para contornar este obstáculo, foi utilizada estratégia de pré-amplificação genômica conhecida como WGA (do inglês *Whole-Genome Amplification*). A pré-amplificação genômica foi realizada a partir de 1 µl de DNA genômico com a tecnologia de amplificação por deslocamento múltiplo (*multiple displacement amplification*), empregando-se mini-kits *Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit* (GE Technology). O produto de amplificação resultante (25 µl) foi utilizado como DNA molde para o diagnóstico por PCR em tempo real, bem como para a PCR convencional e sequenciamento.

O genoma mitocondrial completo (aproximadamente 6 kb) de *P. vivax*, *P. simium* e *P. falciparum* foram amplificados com a enzima PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara, Japão). A Tabela 2 relaciona um conjunto de iniciadores (*primers*) para amplificar e sequenciar o genoma mitocondrial completo. As amostras de *P. simium* foram sequenciadas com os conjuntos de *primers* de *P. vivax* e *P. simium* (Tabela 2), para obter a cobertura completa do genoma mitocondrial. Todas as reações de amplificação tiveram um volume final de 100 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 2 minutos. 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 foram purificados com o kit *illustra GFX PCR and Gel band purification* (GE Technology) seguindo as instruções do fabricante e o produto final foi eluído em 60 µl de água

ultrapura. A concentração de DNA foi quantificada no espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000).

**Tabela 2** - Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação e sequenciamento do genoma mitocondrial de *P. vivax*, *P. simium* e *P. falciparum*.

<b><i>P. vivax</i> - amplificação e sequenciamento</b>		
<b>Primer</b>	<b>Sequência (5' - 3')</b>	<b>Tamanho</b>
Pv mtDNA1amp	F:5'-CGCTGACTTCCTGGCTAC-3' R:5'-GTCAGGCGTTAAAAGCGTTC-3'	2911pb
Pv mtDNA2amp	F:5'-TTGTACACACCGCTCGTCAC-3' R:5'-CCGAACCTTGGACTCTTGAA-3'	3497pb
Pv mtDNA1seq	F:5'ACGCTGACTTCCTGGCTAAA-3' R:5'GGATGAAACCTTCCTGATCG-3'	540pb
Pv mtDNA2seq	F:5'CACGAGTCGATCAGGAAGGT-3' R:5'GTGTTGGCTGGGCATTAGTC-3'	536pb
Pv mtDNA3seq	F:5'GACTAATGCCAGCCAACAC-3' R:5'GCTATCAAATGGCGAGAAGG-3'	566pb
Pv mtDNA4seq	F:5'CCTTCTCGCCATTTGATAGC-3' R:5'GCATCATGTATGACAGCATGTTT-3'	524pb
Pv mtDNA5seq	F:5'TGCTGTCATACATGATGCACTT-3' R:5'CAAGGCAACAATACACGCTAA-3'	554pb
Pv mtDNA6seq	F:5'AGCGTGTATTGTTGCCTTGT-3' R:5'CATCCATGTCAGGCGTTAAA-3'	303pb
Pv mtDNA7seq	F:5'TTGTACACACCGCTCGTCAC-3' R:5'AACTACCAAATAAAAATGAAAACCA-3'	495pb
Pv mtDNA8seq	F:5'CAAATTGCAATCATAAACTTTAGGTC-3' R:5'CTAGCAATACCAGATACTAAAAGACCA-3'	460pb
Pv mtDNA9seq	F:5'TCATTGTTGGTCTTTTAGTATCTGG-3' R:5'CCAATTAATATTTTGTCCAGTAGG-3'	530pb
Pv mtDNA10seq	F:5'CCTACTGGAACAAAAATATTTAATTGG-3' R:5'TTTAATGGGCATGGGTAATTT-3'	557pb
Pv mtDNA11seq	F:5'AAATTACCCATGCCATTAAA-3' R:5'CCCTAAAGGATTTGTGCTACC-3'	562pb
Pv mtDNA12seq	F:5'TGGTAGCACAAATCCTTTAGGG-3' R:5'AAATGTTTGCTTGGGAGCTG-3'	548pb
Pv mtDNA13seq	F:5'ACAGCTCCCAAGCAAACATT-3' R:5'GACCGAACCTTGGACTCTTG-3'	539pb
<b><i>P. simium</i> - amplificação e sequenciamento</b>		
<b>Primer</b>	<b>Sequência (5' - 3')</b>	<b>Tamanho</b>
Amp1Ps	F:5'-TCCACACTTCAATTCGTA CTCC-3' R:5'-GCAAACACTAGCGGTGGAAT-3'	1147pb
Nest1_1Ps	F:5'-ACCAAAATATAATCTCCTGTTCTAATG-3' R:5'-CAAGTCACTGATAATTCCGATGA-3'	533pb
Nest1_2Ps	F:5'-CGGGCAGATGTCAGTAACTTG-3' R:5'-TTGTTTCATTCGATAGTAAACGCTAT-3'	635pb
Amp2Ps	F:5'-GCTCACGCATCGCTTCTAAC-3'	1287pb

**Tabela 2** – Continuação da página anterior.

<b><i>P. simium</i> - amplificação e sequenciamento</b>		
<b>Primer</b>	<b>Sequência (5'- 3')</b>	<b>Tamanho</b>
Nest2_1Ps	R:5'-GATGAGACGACATGGAGGTG-3'	665pb
	F:5'-TGGAACCTTGTTCAAGTTCAAAT-3'	
Nest2_2Ps	R:5'-TGCATCACTTCAAACAACCTGAA-3'	602pb
	F:5'-CCTGTAACACAATAAAATAATGTACCA-3'	
Amp3Ps	R:5'-CCCGGCGAACCTTCTTAC-3'	1221pb
	F:5'-GCCGGGGATAACAGGTTATAGT-3'	
Nest3_1Ps	R:5'-TCTCCAGCAAATGTAGGATCAA-3'	588pb
	F:5'-GCCGGGGATAACAGGTTATAGT-3'	
Nest3_2Ps	R:5'-CCTAAAGTTTTATGATTGCAATTTGT-3'	623pb
	F:5'-CAAATTGCAATCATAAACTTTAGGTC-3'	
Amp4Ps	R:5'-TGATAATAACATTAACACACCACCTG-3'	1326pb
	F:5'-TGCATCTAAGATCTAAAGGTTTAAACA-3'	
Nest4_1Ps	R:5'-TTTGTCCCCAAGGTAAAACG-3'	627pb
	F:5'-TGTTTTAACAGGTGGTGTTTTAAATG-3'	
Nest4_2Ps	R:5'-GAATTTTCACGTAAATGTTTACCAA-3'	674pb
	F:5'-AGGTGCAATTATTGGATTGTTTA-3'	
Amp5Ps	R:5'-AAGGTAAAACGTAACCTATAAAAGCTG-3'	1636pb
	F:5'-TGCTACAGGTGCATCTCTTGTATT-3'	
Nest5_1Ps	R:5'-CAAAATGGCTGCTGGAAGTA-3'	708pb
	F:5'-CGTTTTACCTGGGGACAAA-3'	
Nest5_2Ps	R:5'-TGAACAAGTGCAAATAATCCAC-3'	765pb
	F:5'-TTGGATGTCAGTTACCACAAGA-3'	
R:5'-ACGCGAAAAACCCTAGAACA-3'		
<b><i>P. falciparum</i> - amplificação e sequenciamento</b>		
<b>Primer</b>	<b>Sequência (5'- 3')</b>	<b>Tamanho</b>
PfmtDNA1amp	R:5'-CGGGCAGATGTCAGTAACTT-3'	2001pb
	F:5'-AGGGCTTAAACCAACAACAT-3'	
PfmtDNA2amp	R:5'-CACCTACCACTCCATAATTCTC-3'	2013pb
	F:5'-AGAACTCCAGGCGTTAACGT-3'	
PfmtDNA3amp	R:5'-GGCGCTTCCATTTATAAGAA-3'	2268pb
	F:5'-CAGGTGTATTTTTAGCAAGTCG-3'	
PfmtDNA1seq	R:5'-TGAGCTGGGTAAAGAACGTC-3'	505pb
	F:5'-CGGGCAGATGTCAGTAACTT-3'	
PfmtDNA2seq	R:5'-TTGGCATTGTTGAAATAGTC-3'	490pb
	F:5'-CAAACCTGCCTCAAGACGTTTC-3'	
PfmtDNA3seq	R:5'-TTATTCTTTACATATTTTTGGGGTAT-3'	495pb
	F:5'-TTTGGCATTGTTGAAATAGTC-3'	
PfmtDNA4seq	R:5'-AGGGCTTAAACCAACAACAT-3'	516pb
	F:5'-CAGAATAAAAACCTTCTCGAATAGAA-3'	
PfmtDNA5seq	R:5'-CATTTTCTTGTGCAATTATTCTT-3'	510pb
	F:5'-AGAACTCCAGGCGTTAACCT-3'	
PfmtDNA6seq	R:5'-TGTTAGCAATAACATTCCTGATG-3'	496pb
	F:5'-ACGTACTGAATTATATTCTTCATCTTT-3'	
PfmtDNA7seq	F:5'-TTATTGCTAACACTACCGGTTT-3'	512pb

**Tabela 2** – Continuação da página anterior.

<b><i>P. falciparum</i> - amplificação e sequenciamento</b>		
<b>Primer</b>	<b>Sequência (5'- 3')</b>	<b>Tamanho</b>
PfmtDNA8seq	R:5'-ACATCAATGGCAGCATTACC-3'	530pb
	F:5'-GGTAATGCTGCCATTGATGT-3'	
PfmtDNA9seq	R:5'-TGCATATGAAACATCTGGTG-3'	479pb
	F:5'-CAGGTGTATTTTATAGCAAGTCG-3'	
PfmtDNA10seq	R:5'-CCCTAAAGGATTTGTGCTACC-3'	450pb
	F:5'-TTCTTACATTTACATGGTAGCACAA-3'	
PfmtDNA11seq	R:5'-ATCTTGTGGTAATTGACATCCA-3'	495pb
	F:5'-TTGGATGTCAATTACCACAAGA-3'	
PfmtDNA12seq	R:5'-GCATGCAATACCGAACATTT-3'	482pb
	F:5'-GTATTGCATGCCTGGTGTTT-3'	
PfmtDNA13seq	R:5'-AAAAATGGCTGCTGGAAGTA-3'	486pb
	F:5'-TTCTACTTCCAGCAGCCATT-3'	
	R:5'-ATGGAGCACTGGATTGGATA-3'	

O sequenciamento foi realizado com aproximadamente 200 ng/ $\mu$ l do produto de PCR purificado e para cada reação utilizamos: 2  $\mu$ l de Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v. 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3  $\mu$ l de tampão Save Money (1 M Tris-HCl pH 9,0, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) e 5  $\mu$ M de oligonucleotídeo, além de água ultrapura para completar um volume final de 15  $\mu$ l. 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 2 minutos, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 96 °C por 40 segundos, anelamento a 50 °C por 30 segundos, extensão a 60 °C por 4 minutos.

O produto da reação de sequenciamento foi precipitado e levado ao sequenciador capilar ABI3130 (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos anterior e reverso foram obtidas dos cromatogramas por meio do programa Sequence Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems). Cada fragmento foi sequenciado em ambas as direções e a sequência consenso foi gerada com auxílio dos programas *Phred*, *Phrap* e *Consed* (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>) com cobertura mínima de duas leituras na plataforma Linux. Além disso, os cromatogramas foram revisados manualmente com o programa SeqMan (DNASTAR). As sequências

foram alinhadas e ajustadas manualmente no programa Mega v.6 (disponível em: <http://www.megasoftware.net/>).

### **3.4 Banco de dados com sequências adicionais de genoma mitocondrial de *Plasmodium* depositados no GenBank**

Para complementar a análise da estrutura geográfica das populações de *P. vivax*/*P. simium* e *P. falciparum*, foi utilizado um banco de dados com todas as sequências de genoma mitocondrial disponíveis na literatura.

#### *3.4.1 Plasmodium vivax e P. simium*

Atualmente estão disponíveis no GenBank 822 sequências do genoma mitocondrial completo de *P. vivax* e 1 sequência de *P. simium* (Tabela 3; números de acesso: AY791517-AY791692, AY598035-AY598140, AB550270-AB550280, JN788737-JN788776, DQ396547-DQ396548, KC330370-KC330678, JQ240429-JQ240331, KF668442-KF668430, KF668429-KF668361).

#### *3.4.2 Plasmodim falciparum*

Até o presente momento estão disponíveis no GenBank 739 sequências do genoma mitocondrial completo de *P. falciparum* (Tabela 3; números de acesso: AY283018-AY282924; AB570434-AB570542; AB570544-AB570765, AB570767-AB570951; KJ569502-KJ569459; AJ276845-AJ276847; KT119847-KT119883). Além destas sequências, foram adicionadas no banco de dados 812 sequências disponíveis no ENA (números de acesso: ERS010434-ERS010659; ERS041968-ERS041991).

**Tabela 3** - Banco de dados com as sequências do genoma mitocondrial completo de *P. vivax* e *P. falciparum* disponíveis atualmente na literatura.

<b>Isolados</b>	<b>Autores</b>	<b>Origem</b>	<b>n sequências</b>		
<i>P. simium</i>	Mu et al. (2005)	América do Sul	1		
<i>P. vivax</i>	Mu et al. (2005)	Melanésia	69		
		Sul da Ásia	25		
		China	22		
		Sudeste Asiático	21		
		América do Sul	13		
		África	12		
		América Central	10		
		Oriente Médio	2		
		Coréia	1		
		<i>P. vivax</i>	Jongwutiwes et al. (2005)	Sudeste Asiático	57
América do Sul	24				
Sul da Ásia	8				
China	7				
Melanésia	4				
América Central	1				
Sudeste Asiático	3				
<i>P. vivax</i>	Cox-Singh et al. (2008)	Sudeste Asiático	3		
<i>P. vivax</i>	Iwagami et al. (2010)	Coréia	12		
<i>P. vivax</i>	Culleton et al. (2011)	África	31		
		Oriente Médio	9		
<i>P. vivax</i>	Miao et al. (2012)	China	65		
		Sudeste Asiático	34		
<i>P. vivax</i>	Taylor et al. (2013)	América do Sul	137		
		Sul da Ásia	54		
		Sudeste Asiático	44		
		África	41		
		Coréia	17		
		Oriente Médio	16		
		América Central	23		
<i>P. vivax</i>	Rodrigues et al. (2014)	Sul da Ásia	15		
		América do Sul	11		
		África	7		
		Melanésia	3		
		México	3		
		Oriente Médio	2		
		Coréia	1		
		Sudeste Asiático	1		
		<i>P. falciparum</i>	Conway et al. (2003)	Sudeste Asiático	2
		<i>P. falciparum</i>	Joy et al. (2003)	América do Sul	1
África	30				
Sudeste Asiático	26				
América do Sul	25				
		Melanésia	11		



**Tabela 3** - Continuação da página anterior.

<b>Isolados</b>	<b>Autores</b>	<b>Origem</b>	<b>n sequências</b>
		América Central	2
<i>P. falciparum</i>	Mioto et al. (2013)*	África	366
		Sudeste Asiático	350
<i>P. falciparum</i>	Tanabe et al. (2013)	África	110
		Sudeste Asiático	134
		América do Sul	43
		Melanésia	274
<i>P. falciparum</i>	Mobegi et al. (2014)*	África	96
<i>P. falciparum</i>	Tyagi et al. (2014)	Sul da Ásia	44
<i>P. falciparum</i>	Tyagi et al. (2015)	Sul da Ásia	37

\*Genoma completo disponível no ENA

### 3.5 Análise de dados

A análise de variância (AMOVA) foi realizada com auxílio do programa Arlequin versão 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) com o objetivo de avaliar a estrutura genética das supostas populações e examinar os padrões geográficos de diversidade do genoma mitocondrial de *P. vivax* e *P. falciparum*. Esse método 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.

O grau de diferenciação entre as populações através da distância genética entre pares de populações, foi analisado com o índice de fixação,  $F_{st}$  (WRIGHT, 1951), calculado pelo programa Arlequin versão 3.5. A medida de  $F_{st}$  pode variar de 0 a 1, onde  $F_{st} = 1$ , indica subpopulação completamente homocigótica com a fixação de alelos distintos entre elas e  $F_{st} = 0$ , indica subpopulação com frequências alélicas idênticas, ou seja, não existe diferença genética entre as populações. HARTL, CLARK (2010) sugeriram as seguintes orientações qualitativas para interpretação dos valores de  $F_{st}$ : (a) 0 – 0,05,

pequena diferenciação genética; (b) 0,05 – 0,15, diferenciação genética moderada; (c) 0,15 – 0,25, grande diferenciação genética; e (d) > 0,25, diferenciação genética muito grande. No entanto, Wrigth (1951) observou que mesmo valores de  $F_{st}$  menores que 0,05 são significativos para a diferenciação entre as subpopulações.

O índice de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), a diversidade haplotípica ( $Hd$ ), número de haplótipo ( $h$ ) e o índice de diversidade por sequência ( $\theta_w$ ) foram calculados pelo programa DnaSP 5.0 (ROZAS et al., 2003). Todos os testes fornecem informações sobre a quantidade de variabilidade genética presente na amostra. O índice de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) corresponde ao número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre duas sequências, enquanto que o  $\theta_w$  estima a diversidade genética baseada no número de sítios polimórficos ( $S$ ) corrigida pelo tamanho amostral (Nei, 1987) e a diversidade haplotípica descreve o número de haplótipos diferentes existentes na população.

A neutralidade seletiva foi verificada através do teste de  $D$  de Tajima (TAJIMA, 1989) e Teste de  $F_u$  (FU et al., 1993), com o programa DnaSP v5. O teste  $D$  de Tajima é calculada pelo parâmetro  $\theta$ , através da quantidade de variação acumulada em uma sequência. Esse parâmetro pode ser estimado através de  $\pi$  que corresponde ao número médio de diferenças por nucleotídeo entre duas sequências, escolhidas aleatoriamente na amostra, ou através de  $S$ , que é o número de sítios polimórficos das sequências amostradas (TAJIMA, 1989). Na neutralidade, os valores de  $\theta$  baseados em  $\pi$  e  $S$  seriam aproximadamente os mesmos. Entretanto quando há seleção natural essas estimativas podem ser distintas, pois a seleção afeta diferentemente  $\pi$  e  $S$ . Assim, Tajima (1989) propôs que a diferença ( $D$ ) entre  $\theta$  baseados em  $\pi$  e  $S$ , serviriam como teste para detecção de desvios da neutralidade ( $D = 0$ , sob neutralidade e  $D \neq 0$ , sob seleção natural). Portanto, valores negativos e significativos deste teste sugerem que pode ter ocorrido seleção purificadora, efeito carona ou expansão populacional, enquanto valores positivos de  $D$  são indicativos de seleção balanceadora ou um recente gargalo de garrafa populacional.

O teste de Fu (FU et al., 1993) avalia causas de desvio de neutralidade, uma vez que esse teste é mais sensível a desvios decorrentes de seleção e não dos sinais de expansão populacional. Assim como o teste D de Tajima, valores negativos e significativos de Fu são indicativos de expansão populacional, dentre outros eventos.

A hipótese de expansão populacional foi testada através de *Mismatch Distribution* (ROGERS; HARPENDING 1992). Esta análise descreve um modelo de distribuição com diferenças nucleotídicas entre pares de sequências de DNA, neste caso de haplótipos de DNA mitocondrial, baseado no modelo de expansão populacional súbita (ROGERS; HARPENDING 1992). Através dela foi possível analisar a história demográfica das populações pois a forma das distribuições é afetada por assinaturas genéticas de expansão ou declínio populacional, o que pode ser utilizado para inferir sua dinâmica histórica usando modelos baseados na teoria da coalescência (ROGERS; HARPENDING 1992). De forma geral, populações que estão em equilíbrio demográfico a um longo tempo apresentam distribuições multimodais, enquanto que aquelas que passaram por expansão demográfica recente, resultado de efeito gargalo de garrafa (*bottlenecks*) ou de efeito fundador, apresentam distribuições unimodais. Intervalos de confiança ao redor do *Mismatch Distribution* foram calculados pelo método de percentil e baseados em 1.000 réplicas de *bootstrap* e nível de significância ( $\alpha$ ) de 0,050. Valores de  $p$  maiores que 0,05 conduzem à não rejeição da hipótese nula, ou seja, indicam que a distribuição das diferenças é compatível com a hipótese de expansão populacional súbita. Os gráficos da *Mismatch Distribution* foram gerados utilizando o pacote “pegas” (PARADIS, 2010) implementado no pacote estatístico R (R Development Core Team, 2010).

Para corroborar a análise demográfica citada acima, o genoma mitocondrial completo de *P. vivax* e *P. falciparum* foi utilizado na análise de *Bayesian Skyline Plot* (BSP), que estima a variação do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo (DRUMMOND et al., 2005). Esse método utiliza cadeias de Markov (MCMC – Markov Chain Monte Claro) para estimar a probabilidade posterior a partir de um modelo *a priori* calculado sobre as informações obtidas das sequências fornecidas, assim ele calcula a

probabilidade da distribuição do tamanho efetivo da população ao longo do tempo, dado um determinado modelo de relógio molecular e a taxa de mutação da sequência (DRUMMOND et al., 2007). A BSP foi realizada com o auxílio do programa BEAST v.1.7.2 (DRUMMOND et al., 2005), e apenas com sequências não idênticas, através uma abordagem coalescente, com 200 milhões de interações na MCMC, amostradas a cada 5.000 interações. As interações obtidas com o programa BEAST foram analisadas e plotadas em gráfico no programa TRACER 1.5 (DRUMMOND et al., 2005).

O tempo de divergência entre as macrorregiões (tempo para o ancestral comum mais recente - TMRCA) foi estimado utilizando o genoma mitocondrial completo (6 kb) e o modelo mais adequado foi o relógio molecular estrito disponível no programa BEAST (DRUMMOND et al., 2005). Os dados foram testados com dois modelos de relógio molecular, por meio de uma inferência Bayesiana, o modelo de relógio estrito e o relógio relaxado, uma vez que cada modelo assume uma diferente taxa de evolução nos ramos da árvore filogenética, sendo essa taxa constante em relógio estrito, enquanto que para o relógio relaxado as taxas são consideradas independentes nos diferentes ramos, sob uma distribuição exponencial ou lognormal. O relógio molecular foi calibrado seguindo os parâmetros descritos por Ricklefs e Outlaw (2010), com taxa de mutação de 0,013, usando o modelo de substituição HKY com todos os *priors* definidos como valor padrão. O uso dessa taxa nos permitiu fazer estimativas mais precisas da história demográfica do que os estudos anteriores com base nos tempos estimados de divergência (TAYLOR et al., 2013). A cadeia Markov Monte Claro (MCMC) foi de 200 milhões de gerações cada e a árvore filogenética amostradas a cada 5.000 gerações. Os valores efetivos das amostras e as densidades posteriores foram observadas para todos os parâmetros no TRACER. As corridas independentes foram combinadas no LogCombiner para cada conjunto de dados, com um *burnin* de 10% e a árvore consenso foi gerado TreeAnnotator. O tempo de divergência e o relógio molecular foram calibrados com sequências não idênticas.

Para a análise inicial da estrutura populacional de *P. vivax* e *P. falciparum*, foi construído uma rede de haplótipos mitocondriais compreendendo os genomas mitocondriais depositados no GenBank e

capturados no ENA, combinados com os genomas sequenciados neste estudo. A rede de haplótipos foi construída com uso do programa Network 4.6 (Fluxus Technology; disponível em: <http://www.fluxu-engineering.com>), que utiliza o método *median-joining* (MJ) para estimar a posição de cada amostra na rede. A distância evolutiva entre pares de haplótipos é diretamente proporcional ao número de substituições observadas na comparação de suas sequências.

Análise filogenética bayesiana foi realizada utilizando o software MrBayes v 3.2.1 (RONQUIST et al., 2012), com quatro corridas de duas cadeias cada (uma aquecida e uma fria), por sete milhões de gerações para *P. vivax* e 10 milhões de gerações para *P. falciparum*. A árvore filogenética foi gerada apenas com sequências não idênticas e as sequências idênticas foram adicionadas após as corridas por maneira automatizada (*script*). A árvore foi construída usando Dendroscope 3.4 e pequenas edições manuais foram feitas para fins estéticos.

O programa Migrate-n (v.3.6.11) (BEERLI; FELSENSTEIN, 2000, disponível em <http://popgen.sc.fsu.edu/Migrate/Migrate-n.html>) emprega a teoria da coalescência para simular diferentes cenários de fluxo gênico entre populações, e tem como finalidade estimar o tamanho populacional efetivo, taxas de migração ancestrais entre “n populações”, assumindo uma matriz de modelos de migração com taxas de mutação assimétricas e tamanhos populacionais diferentes. Neste trabalho as análises foram baseadas na Inferência Bayesiana para calcular o sentido da migração entre as localidades amostradas. As amostras de *P. vivax* foram agrupadas em seis macrorregiões, (1) América - AME (América Central e América do Sul), (2) África - AFR, (3) Sul da Ásia - SOA (Sul da Ásia e Oriente Médio e Ásia Central), (5) Sudeste Asiático - SEA, Melanésia - MEL e (6) China/Coréia - CHK, enquanto que as amostras de *P. falciparum* foram agrupadas em cinco macrorregiões, (1) América - AME (América Central e América do Sul), (2) África - AFR, (3) Sul da Ásia - SOA, (4) Sudeste Asiático - SEA e (5) Melanésia - MEL. O genoma mitocondrial completo de ambas as espécies (*P. vivax* e *P. falciparum*) foram utilizados para comparar 19 modelos com diferentes hipóteses de rotas migratórias, sendo 11 modelos para *P. vivax* (Figura 7) e 8 modelos para *P. falciparum* (Figura 8). Os modelos foram construídos levando em consideração que a América foi o

último continente a ser colonizado por *Plasmodium*, logo, foi considerada como fonte receptora de parasitos. A África, em todas as situações, é fonte doadora de parasitos para as Américas, pois é sabido que a colonização e o comércio transatlântico de escravos contribuíram com a migração dos parasitos para este continente. A Tabela 4 descreve as diferentes hipóteses de rota migratória de *P. vivax*, onde os modelos A e B são bases para os outros modelos, sendo o modelo A unidirecional, África → Sul da Ásia, ou seja, origem africana de *P. vivax* e migração unidirecional para outros continentes, enquanto que o B, migração bidirecional África ↔ Sul da Ásia, sugerindo que o parasito originou na África e migrou para os outros continentes (migração unidirecional). Após a migração, surgiu na África o fenótipo Duffy negativo, responsável pelo fim de malária vivax em populações humanas e mais tarde *P. vivax* recolonizou a África com os parasitos remanescentes do Sul da Ásia (AFR ↔ SOA) através da migração humana (Figura 7). A Tabela 5 apresenta os modelos e descreve as diferentes hipóteses de rotas migratórias de *P. falciparum*, onde os modelos A e A1 são bases para os outros modelos, sendo A com migração unidirecional África → Sul da Ásia e A1 migração bidirecional África ↔ Sul da Ásia (Figura 8). Nas análises de *P. vivax* foram utilizados os parâmetros *default* do manual de melhores práticas (disponível em: <http://popgen.sc.fsu.edu/migratedoc.pdf>), modificando apenas os seguintes parâmetros: *long-chains*: 4 (cadeias de Markov), *long-sample*: 5.000.000 (gerações), amostradas com *burn-in*: 30.000. Os valores de *Theta uniformprior* foi de 0,013 e o *Mig uniformprior* de 20.000. As análises de *P. falciparum* seguiu os mesmos parâmetros com exceção do *Mig uniformprior*, que foi de 40.000.

A escolha do melhor modelo foi baseada no valor *marginal likelihood* (*Log-Probability of the data given the model*). O *log Bayes factor* (LBF) (fórmula 1.a) e o modelo de probabilidade (fórmula 1.b) foi calculado entre todos os modelos com as seguintes fórmulas:

$$1.a \quad LBF = 2 \ln(mL(\text{model}_1)) - \ln(mL(\text{model}_2))$$

$$1.b \quad \text{Prob}(\text{model}_i) = \frac{mL_{\text{model}_i}}{\sum_j^n mL_{\text{model}_j}}$$

O passo-a-passo dos cálculos está disponível no endereço eletrônico: <http://evomics.org/learning/population-genetics/migrate-n/>.

**Tabela 4** - Hipóteses de rotas migratórias de *P. vivax* e seus respectivos modelos.

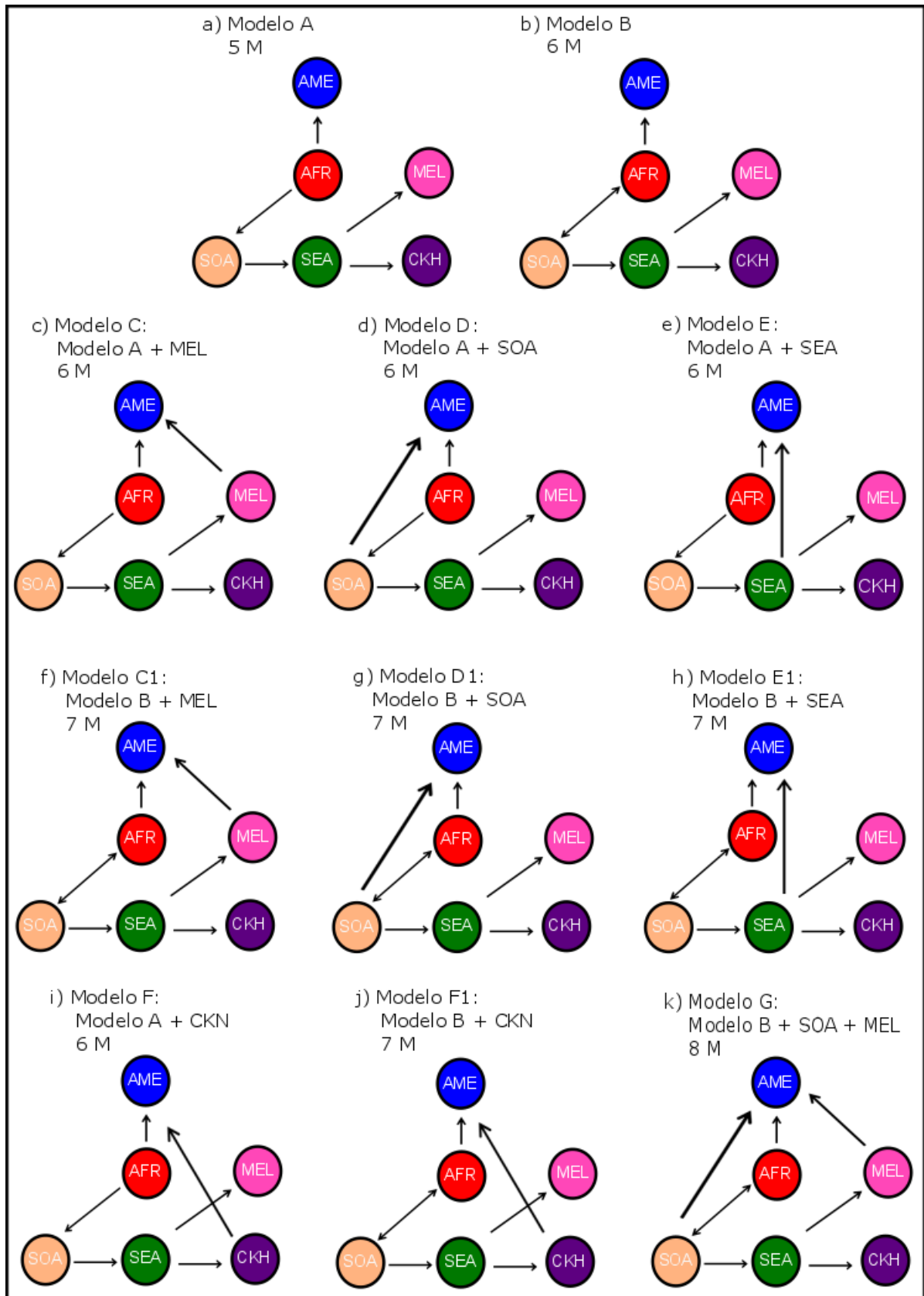
<b><i>P. vivax</i> --Hipóteses</b>	<b>Modelo</b>
1. Origem africana (LIU et al., 2014) com migração unidirecional da África para os outros continentes com as primeiras migrações humanas e foi introduzido nas Américas no pós-colombiano por isolados originados da África e da Europa (GELABERT et al., 2016).	A
2. Origem africana (LIU et al., 2014) com migração unidirecional da África como relatado anteriormente e foi introduzido nas Américas no período pré-colombiano com a migração humana da Melanésia (MEL → AME) seguido por migração mais recente da África e Europa (CARTER, 2003).	C
3. Origem africana (LIU et al., 2014) com migração unidirecional da África como relatado anteriormente e foi introduzido nas Américas no período pós-colombiano por isolados originados da África, Europa e Sul da Ásia.	D
4. Introdução nas Américas no período pré-colombiano através de <i>P. vivax</i> adaptados a macacos do Sudeste Asiático (SEA → AME) (LI et al., 2001) seguido por migração mais recente da África e Europa.	E
5. Origem africana (LIU et al., 2014) com migração unidirecional da África como relatado anteriormente e foi introduzido nas Américas no período pré-colombiano com a migração humana do Leste da Ásia (CHK → AME) seguido por migração mais recente da África e Europa (CARTER, 2003); ou foi introduzido nas Américas no período pós-colombiano com a migração humana da África e Europa e mais recentemente do Leste da Ásia (CHK → AME) (CORMIER, 2010).	F
6. Origem africana (LIU et al., 2014) com migração unidirecional da África para os outros continentes com as primeiras migrações humanas, mas foi extinto da África Ocidental devido ao fenótipo Duffy negativo em populações humanas e recolonizou a África com os parasitos remanescentes do Sul da Ásia (AFR ↔ SOA) e esta mistura de parasitos, África-Ásia, migrou para as Américas (CULLETON; CARTER, 2012).	B
7. Migração bidirecional África-Sul da Ásia (AFR ↔ SOA) como relatado anteriormente e foi introduzido nas Américas no período pré-colombiano com a migração humana da Melanésia (MEL → AME) seguido por migração mais recente da África e Europa (CARTER, 2003).	C1
8. Migração bidirecional África-Sul da Ásia (AFR ↔ SOA) como relatado anteriormente e foi introduzido nas Américas no período pós-colombiano por isolados originados da África, Europa e Sul da Ásia.	D1

**Tabela 4** - Continuação da página anterior.

<b><i>P. vivax</i> --Hipóteses</b>	<b>Modelo</b>
9. Migração bidirecional África-Sul da Ásia (AFR ↔ SOA) como relatado anteriormente e foi introduzido nas Américas no período pré-colombiano através de <i>P. vivax</i> adaptados a macacos do Sudeste Asiático (SEA → AME) (LI et al., 2001) seguido por migração mais recente da África e Europa.	E1
10. Migração bidirecional África-Sul da Ásia (AFR ↔ SOA) como relatado anteriormente e foi introduzido nas Américas no período pré-colombiano com a migração humana do Leste da Ásia (CHK → AME) seguido por migração mais recente da África e Europa (CARTER, 2003) ou foi introduzido nas Américas no período pós-colombiano com a migração humana da África e Europa e mais recentemente do Leste da Ásia (CHK → AME) (CORMIER, 2010).	F1
11. Migração bidirecional África-Sul da Ásia (AFR ↔ SOA) como relatado anteriormente e foi introduzido nas Américas no período pré-colombiano com a migração humana da Melanésia (MEL → AME) seguido por migração mais recente da África, Europa e Sul da Ásia.	G



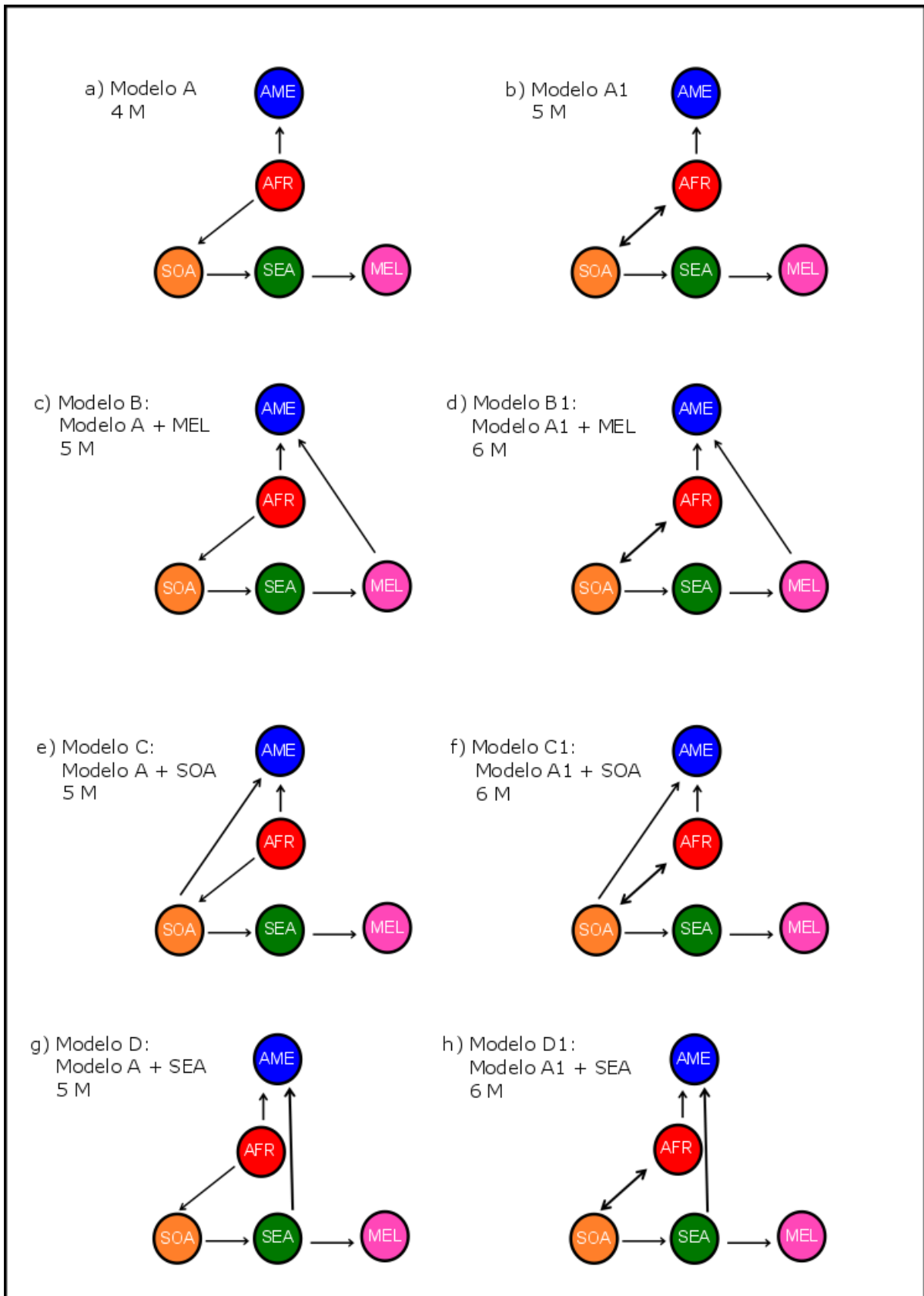
**Figura 7** - Modelos de rotas migratórias de *P. vivax*. M é a taxa de migração de cada modelo.



**Tabela 5** - Hipóteses de rotas migratórias de *P. falciparum* e seus respectivos modelos.

<b><i>P. falciparum</i> --Hipóteses</b>	<b>Modelo</b>
1. Origem africana (KRIEF et al., 2010) com migração unidirecional da África para os outros continentes com as primeiras migrações humanas e foi introduzido nas Américas no pós-colombiano por isolados originados da África e da Europa (GELABERT et al., 2016).	A
2. Origem africana (KRIEF et al., 2010) com migração unidirecional da África como relatado anteriormente e foi introduzido nas Américas no período pré-colombiano com a migração humana da Melanésia (MEL → AME) seguido por migração mais recente da África e Europa ).	B
3. Origem africana (KRIEF et al., 2010) com migração unidirecional da África como relatado anteriormente e foi introduzido nas Américas no período pós-colombiano por isolados originados da África, Europa e Sul da Ásia.	C
4. Origem africana (KRIEF et al., 2010) com migração unidirecional da África como relatado anteriormente e foi introduzido nas Américas no período pós-colombiano por isolados originados da África, Europa e Sudeste Asiático.	D
5. Origem africana (KRIEF et al., 2010) com migração unidirecional da África para os outros continentes junto as primeiras migrações humanas e foi reintroduzido na África com populações de parasitos do Sul da Ásia (AFR ↔ SOA) e esta mistura de parasitos, África-Ásia, migrou para as Américas.	A1
6. Migração bidirecional África - Sul da Ásia (AFR ↔ SOA) como relatado anteriormente e foi introduzido nas Américas no período pré-colombiano com a migração humana da Melanésia (MEL → AME) seguido por migração mais recente da África e Europa.	B1
7. Migração bidirecional África-Sul da Ásia (AFR ↔ SOA) como relatado anteriormente e foi introduzido nas Américas no período pós-colombiano por isolados originados da África, Europa e Sul da Ásia.	C1
8. Migração bidirecional África-Sul da Ásia (AFR ↔ SOA) como relatado anteriormente e foi introduzido nas Américas no período pré-colombiano por isolados originados da África, Europa e Sudeste Asiático.	D1

**Figura 8** - Modelos de rotas migratórias de *P. falciparum*. M é a taxa de migração de cada modelo.



## **4 Resultados**

---

---

#### 4.1 Análise do genoma mitocondrial de *P. vivax* e *P. falciparum*

Foi realizado o sequenciamento do genoma mitocondrial completo de 380 isolados de *P. vivax* e *P. falciparum*. O genoma mitocondrial apresenta aproximadamente 6 kb (5990 pb em *P. vivax* e *P. simium*, 5884 pb em *P. falciparum*) e é constituído de três genes codificantes, citocromo c oxidase, subunidade I (CoI); citocromo c oxidase, subunidade III (CoIII), citocromo b (Cyb) e pequenos fragmentos de RNA ribossômico.

Dentre os 380 isolados sequenciados neste estudo (Tabela 1), 127 foram de *P. vivax* supostamente representados por diversas regiões geográficas: (a) 77 isolados do Brasil (14 do Granada (AC), 1 Cuiabá (MT), 2 Macapá (AP), 3 Porto Velho (RO), 1 Augusto Correa (PA), 22 Espírito Santo); (b) 32 isolados do Panamá e (c) 52 isolados de Papua Nova Guiné provenientes de três regiões distintas, Ilaita, Sigmaru e Alexishafen. Além desses, foram sequenciados 9 isolados de *P. simium* provenientes de diferentes regiões do Brasil: São Paulo (SP) com 7 isolados e um isolado de Indaial (SC) e um de Viamão (RS).

Entre os isolados de *P. falciparum*, 244 tiveram o genoma mitocondrial completo sequenciados e representados pelas seguintes regiões: (a) 147 isolados do Brasil (17 Marabá (PA), 25 Porto Velho (PA), 42 Tailândia (PA), 24 Itaituba (PA) e 39 Cruzeiro do Sul (AC)); (b) 6 isolados do Panamá; (c) 21 isolados da Venezuela (Bolivar); (d) 20 isolados da Indonésia (Flores e Talibura); (e) 27 isolados da Tanzânia (Morogoro) e (f) 23 isolados de Papua Nova Guiné. Todos os isolados provenientes de Papua Nova Guiné e Tanzânia foram amplificados e sequenciados no instituto *Swiss Tropical and Public Health Institute*, localizado na cidade de Basileia, Suíça, em colaboração com a pesquisadora doutora Ingrid Felger.

A fim de analisar a diversidade genética, estrutura geográfica das populações e traçar a rota migratória de *P. vivax* e *P. falciparum*, foi utilizado um banco de dados combinando todas as sequências de genoma mitocondrial provenientes deste estudo e disponíveis na literatura. Os isolados foram agrupados segundo sua origem geográfica em oito macrorregiões: África (AFR), Sudeste Asiático (SEA), Melanésia (MEL), América do Sul (AMS), Sul da Ásia

(SOA), América Central/México (AMC), China/Coréia (CKH) e Oriente Médio/Ásia Central (MDE), representado na Tabela 6.

**Tabela 6** - Agrupamentos dos isolados de *P. vivax* e *P. falciparum* segundo sua origem geográfica. A letra n representa o número total de isolados pertencentes a cada macrorregião e/ou região.

Macrorregiões	<i>P. vivax</i> <i>P. falciparum</i>		Região	<i>P. vivax</i> <i>P. falciparum</i>	
	n	n		n	n
AFR	90	629	Angola	1	-
			Burquina Faso	-	40
			Etiópia	13	-
			Gambia	-	61
			Gana	-	262
			Libéria	-	1
			Madagascar	66	-
			Mali	-	46
			Mauritânia	2	4
			Namíbia	1	-
			Nigéria	1	-
			República Guiné	-	96
			Ruanda	1	-
			São Tomé	1	-
			Senegal	-	9
			Serra Leoa	-	1
			Sudão	1	5
África do Sul	-	2			
Tanzânia	1	101			
Uganda	1	-			
Não Identificado	1	1			
SEA	160	533	Camboja	19	267
			Filipinas	1	54
			Indonésia	52	20
			Myanmar	34	-
			Tailândia	45	182
			Vietnã	9	9
MEL	128	307	Ilhas Salomão	4	51
			Papua Nova Guiné	116	122
			Vanuatu	8	134
AMS	238	237	Brasil	171	208
			Colômbia	17	1
			Equador	2	2
			Guiana	1	-
			Peru	31	5
			Venezuela	15	21
			Não Identificado	1	-

**Tabela 6** - Continuação da página anterior.

Macrorregião	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	Região	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>
	n	n		n	n
SOA	102	81	Bangladesh	9	-
			Índia	35	81
			Paquistão	56	-
			Sri Lanka	2	-
AMC	68	8	Belize	1	-
			Costa Rica	1	-
			El Salvador	6	-
			Guatemala	2	-
			Haiti	-	2
			Honduras	10	-
			México	3	-
			Nicarágua	1	-
			Panamá	40	6
			República Dominicana	1	-
			Não Identificado	3	-
CKH	125	-	China	94	-
			Coréia	31	-
MDE	30	-	Turquia	26	-
			Afeganistão	2	-
			Irã	2	-
<b>Total</b>	<b>941</b>	<b>1795</b>	<b>Total</b>	<b>941</b>	<b>1795</b>

O alinhamento de 941 sequências do genoma mitocondrial de *P. vivax* identificou 348 polimorfismos de base única (SNP) distribuídos ao longo do genoma. A Tabela 7 apresenta o número total de isolados (disponíveis na literatura combinado com os sequenciados neste estudo) separados por macrorregiões e a quantidade de SNPs encontrada, vale ressaltar que os SNPs são compartilhados por mais de uma região, ou seja, não são únicos de uma determinada região. O sequenciamento do mtDNA de 136 isolados (Brasil, Panamá e Papua Nova Guiné) provenientes deste estudo, foi capaz de identificar 32 polimorfismos. Já o alinhamento de 1795 sequências do genoma mitocondrial de *P. falciparum* identificou 330 SPNs ao longo do genoma completo e 95 destes SNPs também estão presentes nos 244 isolados (Papua Nova Guiné, Tanzânia e Brasil) sequenciados pelo nosso grupo.

**Tabela 7** - Banco de dados com o número total de sequências e número de SNPs do genoma mitocondrial completo de *P. vivax* e *P. falciparum* disponíveis atualmente na literatura e sequenciados neste estudo.

População	<i>P. vivax</i>		<i>P. falciparum</i>	
	número de isolados	número de SNPs	número de isolados	número de SNPs
AMC	68	11	8	4
SOA	102	77	81	27
MEL	128	56	307	41
SEA	160	93	533	56
AMS	238	116	237	57
MDE	30	29	-	-
CKH	125	38	-	-
AFR	90	76	629	205
<b>Total</b>	<b>941</b>	<b>348</b>	<b>1795</b>	<b>330</b>

## 4.2 Diversidade genética dos genomas mitocondriais

### 4.2.1 Índice de diversidade genética em isolados de *P. vivax*

A diversidade genética de 941 genomas mitocondriais completos de *P. vivax* agrupados segundo sua origem geográfica em oito macrorregiões ((1) África, (2) América do Sul (AMS), (3) América Central/México (AMC), (4) Sul da Ásia (SOA), (5) Sudeste Asiático (SEA), (6) Melanésia (MEL), (7) Oriente Médio e Ásia Central (MDE), e (8) China/Coréia (CKH) - Tabela 6), foi analisada através de três parâmetros: índice de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), índice de diversidade por sequência ( $\theta_w$ ) e índice de diversidade haplotípica ( $Hd$ ). Os resultados destas análises estão apresentados na Tabela 8.

O índice de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) global encontrada entre as populações de *P. vivax* foi de 0,00085. O Sudeste Asiático, bem como China e Coréia apresentaram maior diversidade (maior tempo de divergência;  $\pi = 0,00087$  e  $\pi = 0,00082$ , respectivamente), seguido dos isolados do Oriente Médio ( $\pi = 0,00060$ ), o que pode sugerir estas populações de parasitos sendo as mais antigas. Isolados da América do Sul apresentaram uma diversidade de  $\pi = 0,00058$ , e o Sul da Ásia apresentou  $\pi = 0,00055$ . A Melanésia e a África apresentaram diversidades comparáveis entre elas ( $\pi = 0,00045$  e  $\pi =$



0,00043). Como esperado, foi encontrado uma diversidade menor entre os isolados da América Central/México ( $\pi = 0,00008$ ), sendo este continente considerado o local mais recentemente colonizado por *P. vivax* (Tabela 8).

**Tabela 8** - Análise da diversidade de nucleotídeos a partir de 941 genomas mitocondriais de *P. vivax* agrupados em oito macrorregiões: África (AFR), Oriente Médio/Ásia Central (MDE), América do Sul (AMS), América Central (AMC), Sul da Ásia (SA), Sudeste Asiático (SEA), Melanésia (MEL) e China/Coréia (CKH).

População	número de isolados	Diversidade de nucleotídeo		<i>Hd</i> (desvio padrão)
		$\pi$ (desvio padrão)	$\Theta_w$ (desvio padrão)	
AMC	68	0,00008 (0,00002)	0,00040 (0,00015)	0,3510 (0,076)
SOA	102	0,00055 (0,00005)	0,00255 (0,00067)	0,9440 (0,018)
MEL	128	0,00045 (0,00005)	0,00178 (0,00047)	0,8669 (0,023)
SEA	160	0,00087 (0,00003)	0,00280 (0,00068)	0,9700 (0,006)
AMS	238	0,00058 (0,00030)	0,00330 (0,00075)	0,9291 (0,012)
MDE	30	0,00060 (0,00008)	0,00126 (0,00044)	0,9490 (0,023)
CKH	125	0,00082 (0,00005)	0,00121 (0,00034)	0,9170 (0,015)
AFR	90	0,00043 (0,00005)	0,00254 (0,00068)	0,7930 (0,047)
<b>Total</b>	<b>941</b>	<b>0,00085 (0,00002)</b>	<b>0,00807 (0,00014)</b>	<b>0,9732 (0,0027)</b>

A diversidade genética dos isolados de *P. vivax*, também foi calculada através do índice de diversidade por sequência ( $\Theta_w$ ), ou seja, a diversidade foi estimada com base no número de sítios polimórficos corrigida pelo tamanho amostral. No genoma mitocondrial, a variabilidade genética global do  $\Theta_w$  (0,00807) foi muito superior quando comparado com o valor global de  $\pi$  (0,00085), indicando uma abundância de alelos raros nesta população (Tabela 8). Surpreendentemente, a maior diversidade genética encontrada foi entre os isolados da América do Sul ( $\Theta_w = 0,00330$ ), seguido do Sudeste Asiático ( $\Theta_w = 0,00280$ ). O Sul da Ásia e a África apresentaram diversidade comparável entre elas,  $\Theta_w = 0,00255$  e  $\Theta_w = 0,00254$ , respectivamente. Os isolados da Melanésia apresentaram uma variabilidade genética de  $\Theta_w = 0,00178$ , enquanto que o Oriente Médio/Ásia Central, e a China/Coréia apresentaram  $\Theta_w = 0,00126$  e  $\Theta_w = 0,00121$ , respectivamente. A América Central/México apresentou a menor diversidade encontrada,  $\Theta_w = 0,00040$ , assim como na análise de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ).

O índice de diversidade haplotípica descreve os diferentes haplótipos existentes na população, assim, o valor global encontrado entre as amostras

de *P. vivax* foi de  $Hd = 0,9732$ . O Sudeste Asiático foi a população que apresentou a maior diversidade de haplótipos ( $Hd = 0,9700$ ), seguido do Oriente Médio/Ásia Central ( $Hd = 0,9490$ ) e Sul da Ásia ( $Hd = 0,9440$ ). Isolados do Sul da América apresentaram uma diversidade haplotípica de  $Hd = 0,9291$ , enquanto que a China/Coréia e Melanésia apresentaram  $Hd = 0,9170$  e  $Hd = 0,8669$ , respectivamente. A América Central/México foi a população com menor diversidade de haplótipos,  $Hd = 0,3810$ , o que vai de encontro com as análises anteriores, Tabela 8.

Entre os isolados da América do Sul, a diversidade nucleotídica global foi de  $\pi = 0,0006$ . Além disso, foi calculado a diversidade nucleotídica em todas as populações com número amostral viável. A maior diversidade foi encontrada entre os isolados da Venezuela ( $\pi = 0,00090$ ), seguido da Colômbia ( $\pi = 0,0007$ ), Peru ( $\pi = 0,0006$ ) e Brasil ( $\pi = 0,0005$ ) (Tabela 9). O índice global da diversidade por sequência foi de  $0,0033$  e o Brasil foi o país que apresentou a maior diversidade ( $\theta_w = 0,0027$ ), enquanto que a Colômbia e o Peru apresentaram a menor ( $\theta_w = 0,0015$ ). A diversidade haplotípica foi comparável entre as populações da Peru e Colômbia ( $Hd = 0,974$  e  $Hd = 0,971$ ), entretanto a maior diversidade ocorreu entre os isolados da Venezuela ( $Hd = 1$ ) e a menor nos isolados do Brasil ( $Hd = 0,904$ ).

**Tabela 9** - Análise da diversidade genética a partir do genoma mitocondrial de *P. vivax* provenientes da América do Sul: Venezuela, Colômbia, Peru e Brasil.

População	número isolados	Diversidade de nucleotídeo		<i>Hd</i> (desvio padrão)
		$\pi$ (desvio padrão)	$\theta_w$ (desvio padrão)	
Venezuela	15	0,00090 (0,00014)	0,00159 (0,00063)	1 (0,024)
Colômbia	17	0,00066 (0,00015)	0,00148 (0,00058)	0,971 (0,032)
Peru	31	0,00058 (0,00006)	0,00151 (0,00052)	0,974 (0,020)
Brasil	171	0,00052 (0,00003)	0,00265 (0,00064)	0,904 (0,017)
<b>Total</b>	<b>234</b>	<b>0,00058 (0,00003)</b>	<b>0,00328 (0,00075)</b>	<b>0,9323 (0,019)</b>

#### 4.2.2 Índice de diversidade genética em isolados de *P. falciparum*

O alinhamento de 1795 genomas mitocondriais completos de *P. falciparum* permitiu analisar a diversidade genética existente com base nos agrupamentos segundo a origem geográfica dos isolados representados por seis macrorregiões: (1) África (AFR), (2) América do Sul (AMS), (3) América Central/México (AMC), (4) Sul da Ásia (SOA), (5) Sudeste Asiático (SEA) e (6) Melanésia (MEL) (Tabela 6). A Tabela 10 apresenta os resultados da diversidade genética estimada por três parâmetros: índice de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), índice de diversidade por sequência ( $\Theta_w$ ) e índice de diversidade haplotípica ( $Hd$ ).

O índice de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) global encontrada entre as populações de *P. falciparum* foi de 0,0036, menor quando comparado com *P. vivax* (0,00085). A Tabela 10 apresenta os resultados desta análise, sugerindo que a maior diversidade encontrada, ou seja, maior tempo de divergência está entre os isolados do Sul da Ásia ( $\pi = 0,00036$ ) e da América Central/México ( $\pi = 0,00035$ ). Os isolados da Melanésia e Sudeste Asiático apresentam divergência iguais entre eles,  $\pi = 0,00028$ , e os isolados africanos apresentam valores similares,  $\pi = 0,00026$ . Na América do Sul foi encontrado o menor valor de  $\pi$  (0,00018), o que pode ser indicativo de uma colonização recente ou de um efeito tipo gargalo de garrafa (*bottlenecks*) nesta população.

**Tabela 10** - Análise da diversidade genética a partir do genoma mitocondrial de *P. falciparum* agrupados em seis macrorregiões: África (AFR), América do Sul (AMS), América Central/México (AMC), Sul da Ásia (SOA), Sudeste Asiático (SEA) e Melanésia (MEL).

População	número isolados	Diversidade de nucleotídeo		<i>Hd</i> (desvio padrão)
		$\pi$ (desvio padrão)	$\Theta_w$ (desvio padrão)	
AMC	8	0,00035 (0,00007)	0,00027 (0,00017)	0,857 (0,108)
SOA	81	0,00036 (0,00004)	0,00094 (0,00029)	0,858 (0,027)
MEL	308	0,00028 (0,00002)	0,00113 (0,00028)	0,740 (0,019)
SEA	532	0,00028 (0,00001)	0,00139 (0,00031)	0,773 (0,015)
AMS	237	0,00018 (0,00002)	0,00160 (0,00039)	0,551(0,039)
AFR	629	0,00026 (0,00001)	0,00486 (0,00094)	0,775 (0,014)
<b>Total</b>	<b>1795</b>	<b>0,00036 (0,00002)</b>	<b>0,00708 (0,00118)</b>	<b>0,887 (0,0047)</b>

A diversidade genética dos isolados de *P. falciparum*, também foi calculada através do índice de diversidade por sequência ( $\theta_w$ ), apresentando uma variabilidade genética global do  $\theta_w$  de 0,00708, muito superior quando comparado com o valor global de  $\pi$ , 0,00036, indicando uma abundância de alelos raros nesta população (Tabela 10). Como esperado, maior diversidade genética encontrada foi entre os isolados da África ( $\theta_w = 0,00486$ ), sugerindo que esta população de parasitos é a mais antiga, apoiando a hipótese da origem africana. Surpreendentemente, a América do Sul foi o segundo continente com a maior diversidade ( $\theta_w = 0,0160$ ), seguido do Sudeste Asiático ( $\theta_w = 0,00139$ ), Melanésia ( $\theta_w = 0,00113$ ) e Sul da Ásia ( $\theta_w = 0,00094$ ). A América Central/México apresentou a menor diversidade quando comparada com as outras macrorregiões ( $\theta_w = 0,0027$ ), entretanto, o parâmetro  $\pi$  sugere que a maior diversidade genética foi encontrada entre os isolados provenientes desta região.

Os resultados do índice da diversidade haplotípica ( $Hd$ ), vão de encontro com os resultados da diversidade nucleotídica, ou seja, a maior diversidade haplotípica foi encontrado nos isolados do Sul da Ásia ( $Hd = 0,858$ ) e América Central/México ( $Hd = 0,857$ ). Os isolados da África e Sudeste Asiático apresentam uma variabilidade comparável entre eles  $Hd = 0,775$  e  $0,773$ , respectivamente, já a Melanésia apresentou  $0,740$  e a América do Sul  $0,551$ , ou seja, a menor diversidade encontrada (Tabela 10).

Entre os isolados da América do Sul, a Venezuela apresentou a maior diversidade genética nos três parâmetros analisados,  $\pi = 0,0006$ ,  $\theta_w = 0,00135$  e  $Hd = 0,900$ , enquanto o Brasil apresentou  $\pi = 0,0001$ ,  $\theta_w = 0,00079$  e  $Hd = 0,507$  (Tabela 11).

**Tabela 11** - Análise da distância evolutiva a partir do genoma mitocondrial de *P. falciparum* provenientes da América do Sul: Venezuela e Brasil.

População	número isolados	Diversidade de nucleotídeo		$Hd$ (desvio padrão)
		$\pi$ (desvio padrão)	$\theta_w$ (desvio padrão)	
Venezuela	21	0,00058 (0,00011)	0,00135 (0,00051)	0,900 (0,062)
Brasil	208	0,00014 (0,00002)	0,00079 (0,00022)	0,507 (0,041)
<b>Total</b>	<b>229</b>	<b>0,00018 (0,00002)</b>	<b>0,00153 (0,00038)</b>	<b>0,559 (0,039)</b>

### 4.3 Análise de variância molecular (AMOVA)

#### 4.3.1 Análise de variância molecular de *P. vivax*

Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) foram gerados a partir 941 genomas mitocondriais completos de *P. vivax* (compreendendo 348 polimorfismos) agrupados segundo sua origem geográfica em quatro continentes: (1) África (com uma macrorregião, África), (2) América (com duas macrorregiões, América Central/México, e América do Sul), (3) Ásia (com quatro macrorregiões, Sul da Ásia, Sudeste Asiático, China/Coréia e Oriente Médio/Ásia Central) e (4) Melanésia (com uma macrorregião, Melanésia). Os resultados demonstraram que 72,94% da variação genética global devem-se à variabilidade no interior de cada macrorregião, 15,75% devem-se à variabilidade entre macrorregiões dentro do mesmo continente e 11,31% devem-se à variabilidade entre os continentes. Os valores de  $\Phi_{SC}$  (índice de variação entre continentes),  $\Phi_{ST}$  (índice de variação entre macrorregiões) e  $\Phi_{CT}$  (índice de variação dentro das macrorregiões) foram todos significativos (Tabela 12), indicando a existência de estruturação em cada um dos níveis analisados.

**Tabela 12** - Análise de variância molecular (AMOVA) a partir do genoma mitocondrial de *P. vivax* agrupados em quatro continentes – África (com uma macrorregião, África), América (com duas macrorregiões, América Central/México, e América do Sul), Ásia (com quatro macrorregiões, Sul da Ásia, Sudeste Asiático, China/Coréia, e Oriente Médio/Ásia Central) e Melanésia (com uma macrorregião, Melanésia).

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Componentes de variação</b>	<b>Porcentagem de variação</b>
Entre continentes	283.249	0,25156	11,31
Entre macrorregiões dentro dos continentes	83.968	0,35042	15,75
Dentro das macrorregiões	1.265.860	162.290	72,94
<b>Total</b>	<b>1.633.077</b>	<b>222.488</b>	<b>100</b>
$\Phi_{SC}$ : 0,17758			
$\Phi_{ST}$ : 0,27057			
$\Phi_{CT}$ : 0,11307			

#### 4.3.2 Análise de variância molecular de *P. falciparum*

A análise de variância molecular (AMOVA) de *P. falciparum* foi gerada a partir 1795 genomas mitocondriais completos de *P. falciparum* (compreendendo 330 polimorfismos) agrupados segundo sua origem geográfica em quatro continentes: (1) África (com uma macrorregião, África), (2) América (com duas macrorregiões, América Central/México, e América do Sul), (3) Ásia (com duas macrorregiões, Sul da Ásia e Sudeste Asiático) e (4) Melanésia (com uma macrorregião, Melanésia). Os resultados demonstraram que 66,16% da variação genética global devem-se à variabilidade no interior de cada macrorregião, 33,43% devem-se à variabilidade entre macrorregiões dentro do mesmo continente e 0,41% devem-se à variabilidade entre os continentes. Os valores de  $\Phi_{SC}$  (índice de variação entre continentes),  $\Phi_{ST}$  (índice de variação entre macrorregiões) e  $\Phi_{CT}$  (índice de variação dentro das macrorregiões) foram todos significativos (Tabela 13), indicando a existência de estruturação em cada um dos níveis analisados.

**Tabela 13** - Análise de variância molecular (AMOVA) a partir do genoma mitocondrial de *P. falciparum* agrupados em quatro continentes: África (com uma macrorregião, África), América (com duas macrorregiões, América Central/México e América do Sul), Ásia (com duas macrorregiões, Sul da Ásia e Sudeste Asiático) e Melanésia (uma macrorregião, Melanésia).

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Componentes de variação</b>	<b>Porcentagem de variação</b>
Entre continentes	462.525	0,00474	0,41
Entre macrorregiões dentro dos continentes	61.958	0,38717	33,43
Dentro das macrorregiões	1.370.889	0,76629	66,16
<b>Total</b>	<b>1.895.372</b>	<b>115.820</b>	<b>100</b>
$\Phi_{SC}$ : 0,33566			
$\Phi_{ST}$ : 0,33838			
$\Phi_{CT}$ : 0,00410			

#### 4.4 Índice de fixação de Wright $F_{st}$

O índice de fixação ( $F_{st}$ ) permitiu avaliar a divergência das frequências alélicas entre duas populações. Os valores de  $F_{st}$  podem variar de zero, quando não há nenhuma divergência genética entre as macrorregiões, a um, representando macrorregiões extremamente divergentes.

Entre os isolados de *P. vivax* (941) os valores de  $F_{st}$  par-a-par menores/igual que 0,05 foram observados entre os isolados da África e Sul da Ásia (0,014), e entre os isolados da América do Sul e América Central/México (0,050), sugerindo que estas populações são mais parecidas geneticamente, ou seja, apresentam menor distância genética observada (Tabela 14). Já os maiores valores de  $F_{st}$  par-a-par foram observados entre a América Central/México e Oriente Médio/Ásia Central (0,400), África e Melanésia (0,406), América do Sul e China/Coréia (0,457) e Melanésia e China/Coréia (0,470), mostrando que estas macrorregiões apresentam uma diferenciação genética muito grande. Os isolados sul americanos como relatados anteriormente, são menos divergentes geneticamente quando comparados com os isolados da América Central/México, e mais divergentes quando

comparados com os da China/Coréia. A comparação com os isolados provenientes do Sul da Ásia, Sudeste Asiático, Melanésia e Oriente Médio/Ásia Central, apresentaram valores de  $F_{st}$  semelhantes a 0,245 (Tabela 14), sugerindo que estas populações são bem diferentes geneticamente, segundo a interpretação proposta por Harlt e Clark (2010), valores de  $F_{st}$  entre 0,15 – 0,25, grande diferenciação genética.

**Tabela 14** - Divergência das frequências alélicas entre duas populações estimada como índice de fixação de Wright  $F_{ST}$ , em populações de *P. vivax*.

	<b>AFR</b>	<b>AMS</b>	<b>AMC</b>	<b>SOA</b>	<b>SEA</b>	<b>MEL</b>	<b>MDE</b>	<b>CKH</b>
<b>AFR</b>								
<b>AMS</b>	0,262							
<b>AMC</b>	0,343	0,050						
<b>SOA</b>	0,014	0,228	0,260					
<b>SEA</b>	0,241	0,245	0,228	0,211				
<b>MEL</b>	0,406	0,242	0,345	0,360	0,320			
<b>MDE</b>	0,087	0,269	0,400	0,075	0,212	0,389		
<b>CKH</b>	0,345	0,457	0,414	0,343	0,203	0,470	0,305	

A Tabela 15 apresenta a divergência das frequências alélicas entre duas populações, par a par, estimada entre os isolados de *P. falciparum* (1795) de seis macrorregiões: África, América do Sul, América Central/México, Sul da Ásia, Sudeste Asiático e Melanésia. Os menores valores de  $F_{st}$  encontrados foram entre o Sul da Ásia e África (0,091) e Sudeste Asiático e Melanésia (0,097), enquanto que o maior valor está na comparação entre a América do Sul e América Central/México (0,669), sugerindo que estas macrorregiões são extremamente divergentes e que podem ter sido colonizadas por parasitos de diferentes regiões.

As comparações das frequências alélicas entre os isolados de *P. falciparum* oriundo da América do Sul com o Sul da Ásia, Sudeste Asiático e Melanésia são semelhantes, apresentando valores de  $F_{st}$  iguais a 0,537, 0,596 e 0,558 respectivamente, mostrando que estas macrorregiões são geneticamente diferentes (Tabela 15).



**Tabela 15** - Divergência das frequências alélicas entre duas populações estimada como índice de fixação de Wright  $F_{st}$ , em populações de *P. falciparum*.

	<b>AFR</b>	<b>AMS</b>	<b>AMC</b>	<b>SOA</b>	<b>SEA</b>	<b>MEL</b>
<b>AFR</b>						
<b>AMS</b>	0,468					
<b>AMC</b>	0,293	0,669				
<b>SOA</b>	0,091	0,537	0,234			
<b>SEA</b>	0,270	0,596	0,382	0,266		
<b>MEL</b>	0,130	0,558	0,292	0,147	0,097	

## 4.5 Teste de Neutralidade D de Tajima e Fu

### 4.5.1 D de Tajima e Fu em genoma mitocondrial de *P. vivax*

Os testes de neutralidade D de Tajima e Fu foram realizados com 941 sequências do genoma mitocondrial completo de *P. vivax*. Os resultados do teste D de Tajima apresentaram valores negativos (variou de -0,98766 a -2,73599) e estatisticamente significativos em todas as macrorregiões, com exceção de China/Coréia ( $p$ -value: 0,15), sugerindo que as macrorregiões (Oriente Médio/Ásia Central, Sudeste Asiático, América Central/México, Melanésia, Sul da Ásia, América do Sul e África), possivelmente, estão sob seleção purificadora, expansão populacional recente ou ainda sob o efeito carona (Tabela 16). Os resultados de Fu foram significativos (com exceção China/Coréia,  $p > 0,10$ ) e negativos para todas as macrorregiões (expansão populacional recente), com exceção da América do Sul (0,03668), indicando que esta população está sob seleção balanceadora (Tabela 16).

**Tabela 16** - Teste de neutralidade D de Tajima e Fu a partir do genoma mitocondrial de *P. vivax* agrupados em África (AFR), América do Sul (AMS), América Central/México (AMC), Oriente Médio/ Ásia Central (MDE), China/Coréia (CKH), Sul da Ásia (SOA), Sudeste Asiático (SEA) e Melanésia (MEL).

População	Teste de neutralidade			
	Tajima's D	p-value	Fu	p-value
AMC	-2,14553	0,00	-4,08699	<0,02
SOA	-2,55500	0,00	-5,32889	<0,02
MEL	-2,32606	0,00	-4,11114	<0,02
SEA	-2,16371	0,00	-6,61222	<0,02
AMS	-2,53550	0,00	0,03668	>0,10
MDE	-1,90704	0,01	-3,05478	<0,05
CKH	-0,98766	0,15	-1,74506	>0,10
AFR	-2,73599	0,00	-6,32855	<0,02
<b>Total</b>	-2,61983	0,001	-7,09593	<0,02

Na América do Sul, os resultados dos testes de neutralidade (D de Tajima e Fu) foram significativamente negativos, indicam que todas as populações originadas da Venezuela, Peru, Colômbia e Brasil apresentaram uma série de eventos como seleção purificadora ou alternativamente em expansão demográfica recente (Tabela 17).

**Tabela 17** - Teste de neutralidade D de Tajima a partir do genoma mitocondrial de *P. vivax* provenientes da América do Sul: Venezuela (n = 15), Colômbia (n = 17), Peru (n = 31), Brasil (n = 171).

População	Teste de neutralidade			
	Tajima's D	p-value	Fu	p-value
Venezuela	-1,84870	0,01	-2,46987	<0,05
Colômbia	-2,26611	0,00	-3,19186	<0,02
Peru	-4,76892	0,00	-3,90115	<0,02
Brasil	-2,50856	0,00	-6,25391	<0,02
<b>Total</b>	-2,52771	0,001	0,16976	>0,10

#### 4.5.2 D de Tajima e Fu em genoma mitocondrial de *P. falciparum*

Os resultados do teste de neutralidade D de Tajima e Fu foram gerados a partir 1795 genomas mitocondriais completos de *P. falciparum* agrupados segundo sua origem geográfica em seis macrorregiões: (1) África, (2) América Central/México, (3) América do Sul, (4) Sul da Ásia, (5) Sudeste Asiático e (6)

Melanésia. A Tabela 18 sugere que todas as macrorregiões, com exceção da América Central/México (para ambos os testes), apresentam uma expansão demográfica recente ou estão sob efeito de seleção purificadora, pois todos os valores de D de Tajima e Fu são negativos, variando entre -1,89148 e -2,78152 e -14,28997 e -2,88087, respectivamente. No entanto, o valor de D de Tajima e Fu referente a América Central/México são positivos, 1,29320 (mas estatisticamente insignificante, *p-value* = 0,889) e 1,31251 (*p-value* <0,1) sugerindo que esta população está sob seleção balanceadora ou sofreu um recente gargalo de garrafa (*bottleneck*).

**Tabela 18** - Teste de neutralidade D de Tajima e Fu a partir do genoma mitocondrial de *P. falciparum* agrupados em África (AFR), América do Sul (AMS), América Central/México (AMC), Sul da Ásia (SOA), Sudeste Asiático (SEA) e Melanésia (MEL).

População	Teste de neutralidade			
	D de Tajima	<i>p-value</i>	Fu	<i>p-value</i>
AMC	1,29320	0,889	1,31251	<0,1
SOA	-1,89148	0,008	-2,88087	<0,05
MEL	-2,10716	0,003	-4,63388	<0,02
SEA	-2,21823	0,000	-6,27935	<0,02
AMS	-2,61638	0,000	-8,87358	<0,02
AFR	-2,78152	0,000	-14,28997	<0,02
<b>Total</b>	-2,68819	0,000	-18,22034	<0,02

Na América do Sul, os valores negativos de D de Tajima e Fu indicam que todas as populações originadas da Venezuela e Brasil estão sob efeito de seleção purificadora ou alternativamente em expansão demográfica recente (Tabela 19).

**Tabela 19** - Teste de neutralidade D de Tajima e Fu a partir do genoma mitocondrial de *P. falciparum* provenientes da América do Sul: Venezuela (n = 21) e Brasil (n = 208).

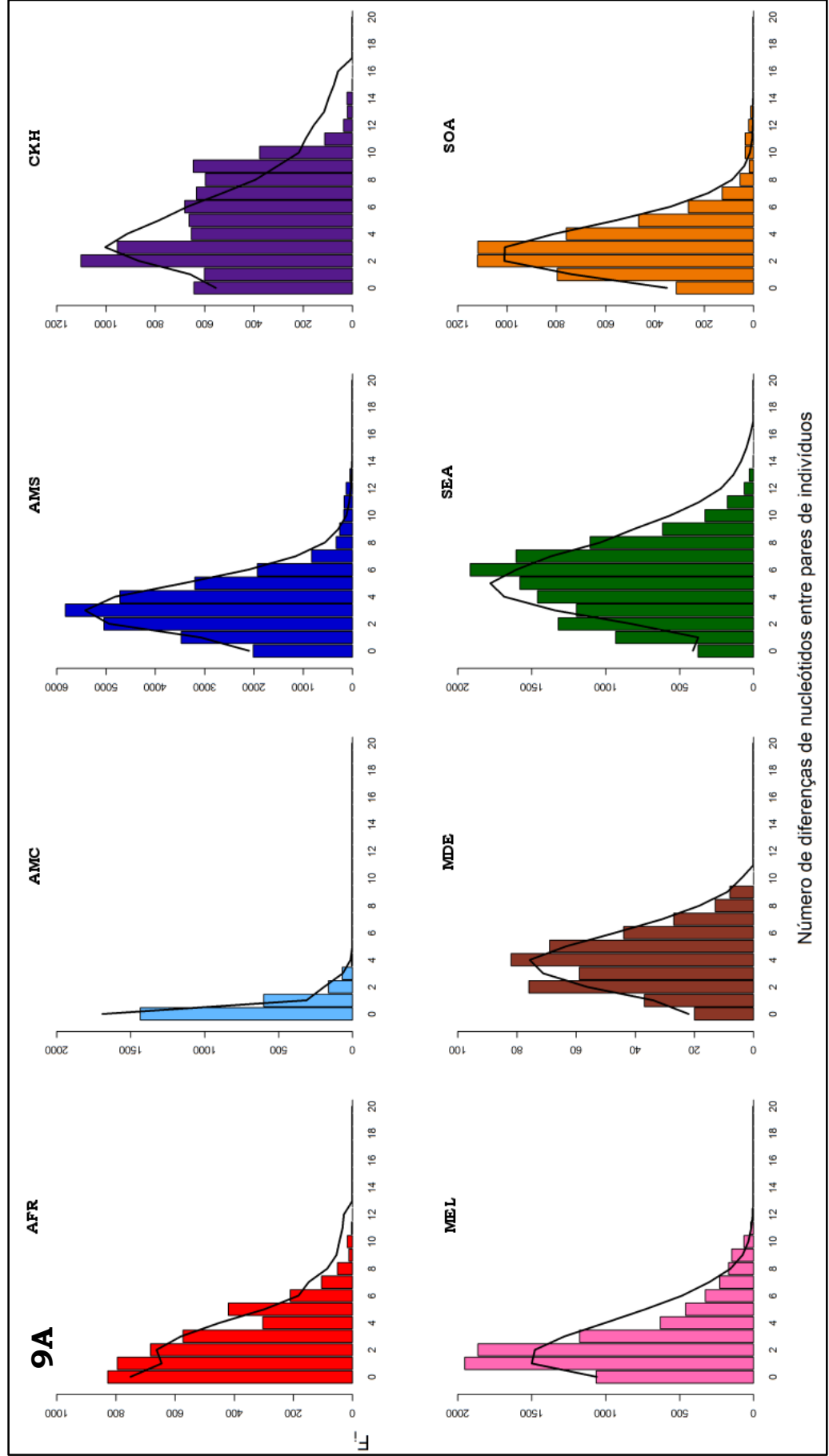
População	Teste de neutralidade			
	Tajima's D	p-value	Fu	p-value
Venezuela	-2,18761	0,006	-3,2007	<0,02
Brasil	-2,34520	0,000	-5,05091	<0,02
<b>Total</b>	-2,61249	0,001	-8,47147	<0,02

#### 4.6 *Mismatch Distributions* em populações *P. vivax* e *P. falciparum*

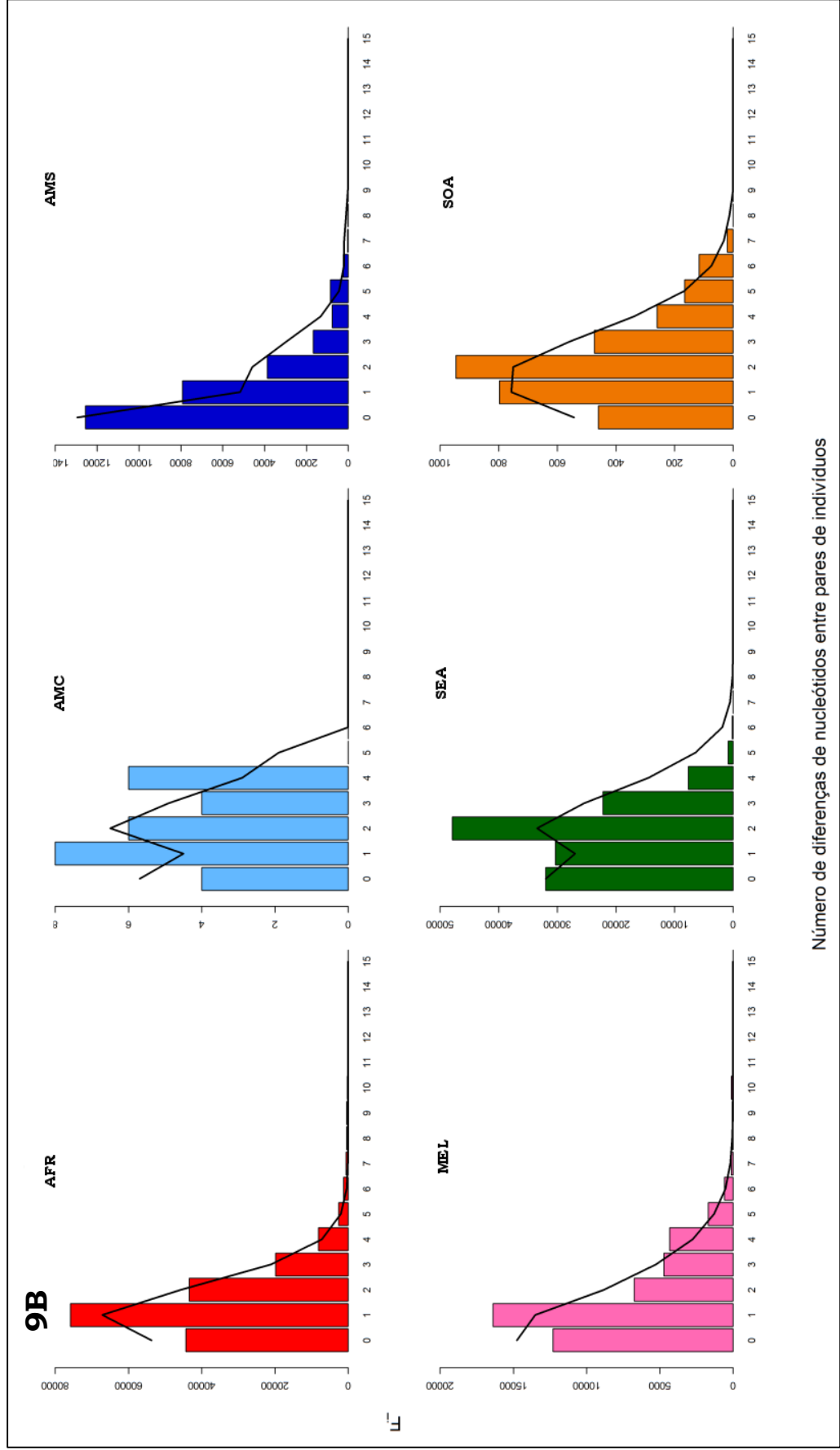
##### 4.6.1 *História demográfica global de P. vivax e P. falciparum*

A história demográfica (*Mismatch Distributions*) foi inferida baseada em 941 sequências do genoma mitocondrial completo de *P. vivax* e 1795 sequências de *P. falciparum*. Todas as macrorregiões (África, América do Sul, América Central e México, China/Coreia, Melanésia, Oriente Médio/Ásia Central, Sudeste Asiático e Sul da Ásia) em ambas as espécies exibiram um padrão de distribuição *mismatch* unimodal (Figura 9A e Figura 9B), sugerindo que as populações passaram por expansão demográfica recente, resultado de efeito gargalo de garrafa (*bottleneck*) ou de efeito fundador.

**Figura 9** – Análise de *mismatch distributions* para populações de *P. vivax* (A) e *P. falciparum* (B), através do número de diferenças de nucleotídeos entre pares de seqüências de DNA. As colunas indicam a frequência observada e as linhas indicam a frequência esperada dos números de diferenças par-a-par.



**Figura 9** – Análise de *mismatch distributions* para populações de *P. vivax* (A) e *P. falciparum* (B), através do número de diferenças de nucleotídeos entre pares de seqüências de DNA. As colunas indicam a frequência observada e as linhas indicam a frequência esperada dos números de diferenças par-a-par.



Número de diferenças de nucleotídeos entre pares de indivíduos

Para avaliar a significância das curvas da distribuição das diferenças pareadas foram estimadas *Sum of Square Deviation (SSD)* e *Raggedness (R)* para macrorregiões de *P. vivax* e *P. falciparum* e estão apresentados na Tabela 20. Os valores de *p* maiores que 0,05 conduzem à não rejeição da hipótese nula, ou seja, indicam que a distribuição das diferenças é compatível com a hipótese de expansão populacional súbita. Todas as macrorregiões representadas por isolados de *P. vivax* e *P. falciparum* foram compatíveis com a hipótese de expansão populacional súbita. O *Raggedness (R)* testa a homogeneidade da curva e valores significativos ( $p < 0,05$ ). Dentre todas as macrorregiões apresentadas, somente a África e Sul da Ásia constituídas de isolados de *P. falciparum*, apresentaram valor de  $p = 0$  e 0,03, respectivamente, indicando para o modelo de crescimento populacional.

**Tabela 20** - Teste de neutralidade e parâmetros do modelo de expansão súbita da distribuição *mismatch* e *goodness-of-fit* para cada macrorregião de *P. vivax* e *P. falciparum*.

<b><i>P. vivax</i> - Global</b>		
	<b>SSD (<i>p-value</i>)</b>	<b>R (<i>p-value</i>)</b>
AFR	0,00237 (0,88)	0,01068 (0,97)
AMS	0,00024 (0,95)	0,01488 (0,80)
AMC	0,00023 (0,52)	0,17341 (0,79)
SOA	0,00023 (0,78)	0,02336 (0,38)
SEA	0,00594 (0,17)	0,00852 (0,75)
CKH	0,00583 (0,64)	0,00866 (0,89)
MEL	0,00124 (0,68)	0,02483 (0,43)
MDE	0,00583 (0,64)	0,02112 (0,52)
<b><i>P. falciparum</i> - Global</b>		
	<b>SSD (<i>p-value</i>)</b>	<b>R (<i>p-value</i>)</b>
AFR	0,00043 (0,80)	0,07110 (0,00)
AMS	0,00043 (0,80)	0,05627 (0,81)
AMC	0,01577 (0,44)	0,08163 (0,56)
SOA	0,00287 (0,12)	0,04055 (0,03)
SEA	0,01135 (0,22)	0,06169 (0,28)
MEL	0,00916 (0,16)	0,05466 (0,26)

#### 4.6.2 História demográfica de *P. vivax* e *P. falciparum* provenientes da América do Sul

Os resultados das análises de *Mismatch Distribution* foram gerados a partir de 234 sequências do genoma mitocondrial de *P. vivax* provenientes da América do Sul (Venezuela (15), Colômbia (17), Peru (31), Brasil (171)) e 229 sequências de *P. falciparum* (Venezuela (21) e Brasil (208)), ambas espécies com sequências provenientes da América do Sul. A Figura 10 sugere que as populações passaram por expansão demográfica recente, resultado de efeito gargalo de garrafa (*bottleneck*) ou de efeito fundador, ou seja, ambas as espécies exibiram um padrão de distribuição *mismatch* unimodal.

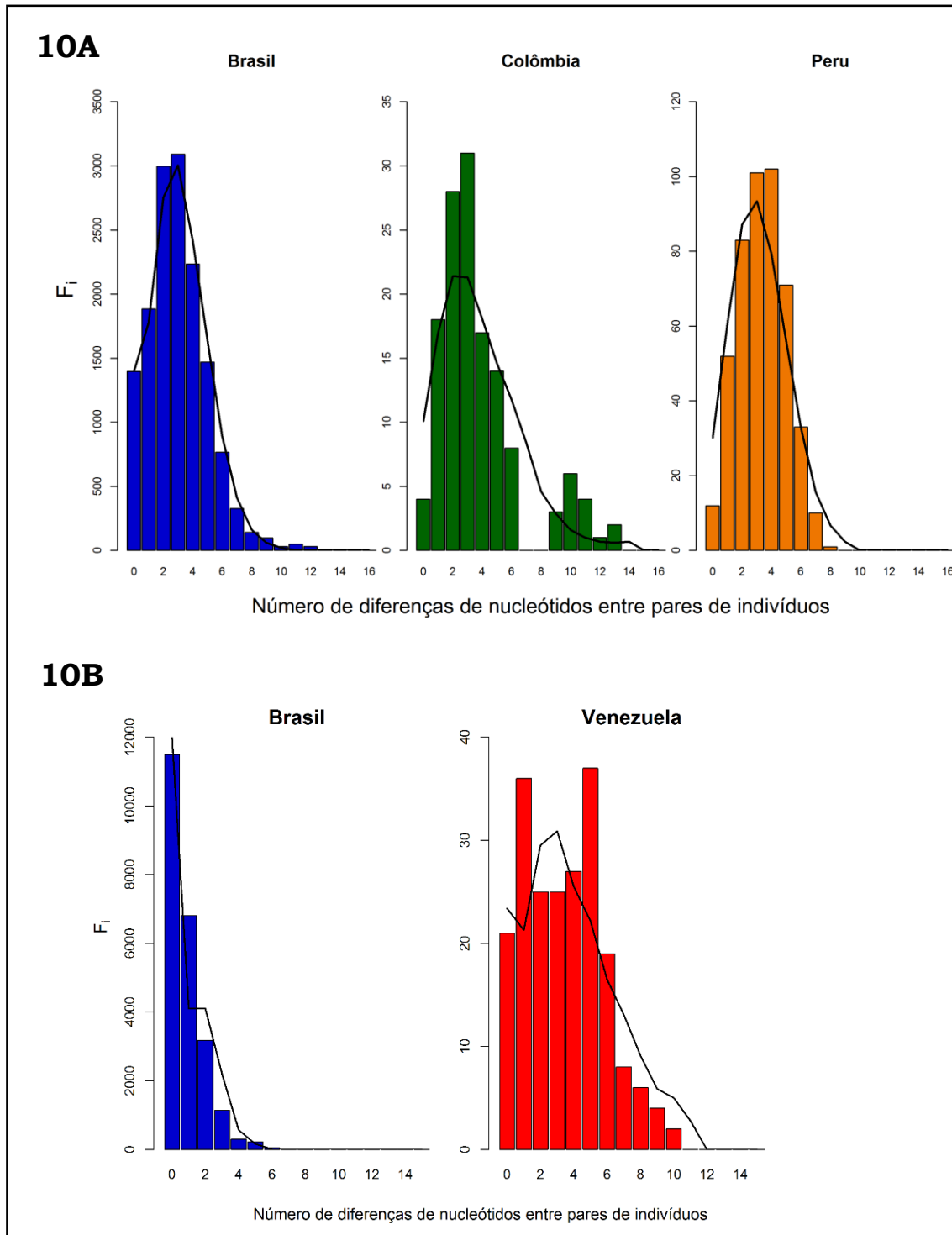
As curvas da distribuição das diferenças pareadas foram estimadas *Sum of Square Deviation (SSD)* e *Raggedness (R)* nos países da América do Sul em isolados de *P. vivax* e *P.falciparum* e estão apresentados na Tabela 21. Em todas as regiões, para ambas as espécies, os valores de *p* foram superiores a 0,05, sugerindo a não rejeição da hipótese nula, ou seja, indicam que a distribuição das diferenças é compatível com a hipótese de expansão populacional súbita.

**Tabela 21** - Teste de neutralidade e parâmetros do modelo de expansão súbita da distribuição *mismatch* e *goodness-of-fit* nos países da América Central de *P. vivax* e *P.falciparum*

<b><i>P. vivax</i> - América do Sul</b>		
	<b>SSD (<i>p-value</i>)</b>	<b>R (<i>p-value</i>)</b>
Brasil	0,00013 (1,0)	0,01671 (0,87)
Colômbia	0,00894 (0,45)	0,03492 (0,43)
Peru	0,00362 (0,09)	0,02729 (0,26)
<b><i>P. falciparum</i> - América do Sul</b>		
	<b>SSD (<i>p-value</i>)</b>	<b>R (<i>p-value</i>)</b>
Venezuela	0,01168 (0,58)	0,02066 (0,92)
Brasil	0,00005 (0,88)	0,07416 (0,76)



**Figura 10** – Análise de *mismatch distributions* em países da América do Sul para populações de (A) *P. vivax* e (B) *P. falciparum*. As colunas indicam a frequência observada e as linhas indicam a frequência esperada dos números de diferenças par-a-par.



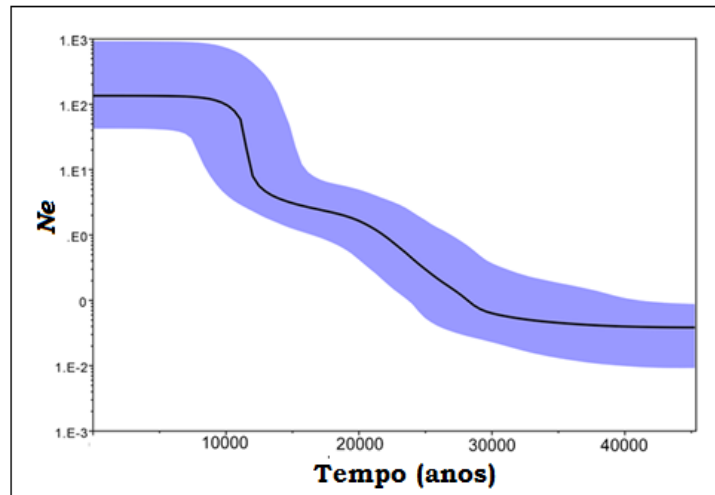
#### **4.7 Tamanho efetivo populacional ao longo do tempo - *Bayesian Skyline Plot* (BSP)**

A fim de estimar mudanças históricas do tamanho efetivo populacional em isolados de *P. vivax* e *P. falciparum* ao longo do tempo, foi utilizado o modelo de coalescência baseado na análise *Bayesian Skyline Plot* (BSP). Os resultados foram gerados com banco de dados reduzido, ou seja, foi utilizado para esta análise somente sequências únicas (por macrorregião) do genoma mitocondrial completo.

##### *4.7.1 Análise Bayesian Skyline Plot (BSP) em isolados de P. vivax*

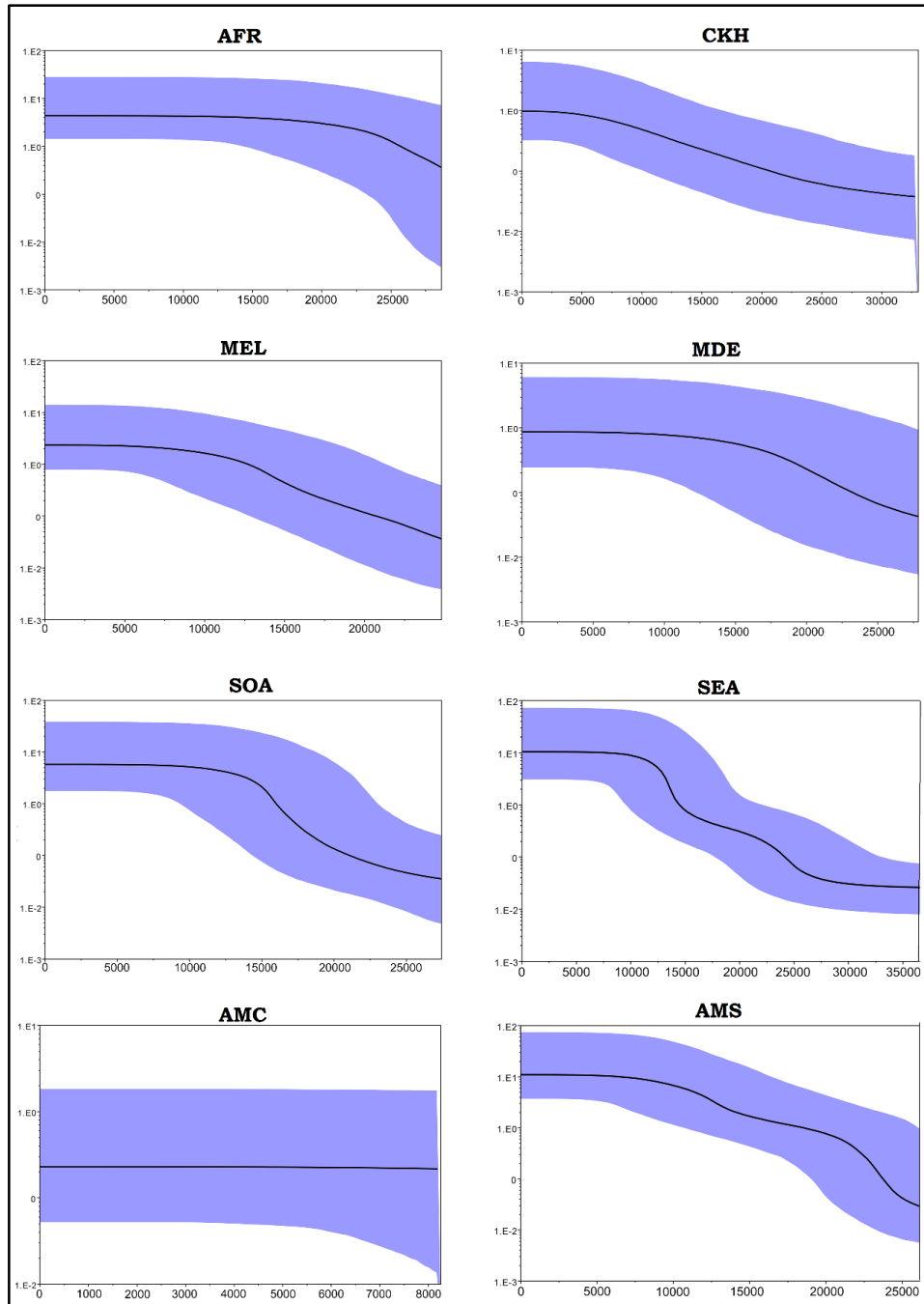
A variação do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo foi estimado por meio da análise de coalescência utilizando 405 sequências únicas (não idênticas) do genoma mitocondrial de *P. vivax*. A Figura 11 representa a análise global de *P. vivax* e mostra a relação entre o tamanho efetivo populacional ( $N_e$  – eixo Y) ao longo do tempo (eixo X), sugerindo que o tamanho populacional aumentou nos últimos 30 mil anos e nos últimos 10 mil anos ocorreu uma rápida expansão populacional que se tornou constante.

**Figura 11** - Análise do *Bayesian Skyline Plot* em isolados de *P. vivax* mostrando as mudanças do tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) ao longo do tempo. O eixo Y representa o tamanho efetivo populacional, enquanto que o eixo X representa o tempo em milhares de anos atrás. O segmento de linha cor preta indica o valor médio da população e o intervalo de confiança está representado pelo espaço em roxo.



A partir da análise global de *P. vivax*, não foi possível observar a variação do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo entre as macrorregiões deste parasito. Assim, realizamos um *Skyline Plot* com sequências únicas (não idênticas) de oito macrorregiões, África (AFR) (n = 39), América do Sul, AMS (n = 18), América Central/México, AMC (n = 8), Sul da Ásia, SOA (n = 57), Sudeste Asiático, SEA (n = 83), Melanésia, MEL (n = 47), Oriente Médio/Ásia Central, MDE (n = 18) e China/Coréia, CKH (n = 35). Os gráficos desta análise estão representados na Figura 12, onde o eixo Y representa o tamanho efetivo populacional e o eixo X o tempo em milhares de anos atrás. Todas as macrorregiões apresentaram um padrão de curva semelhante ao da população global de *P. vivax*, sugerindo uma expansão populacional, exceto a população da América Central/México, pois não apresentou mudança no tamanho efetivo populacional ao longo do tempo (constante). Nos últimos 20 mil anos, a população africana apresentou um crescimento populacional constante, enquanto que a América do Sul, Oriente Médio/Ásia Central, Sul da Ásia, Sudeste Asiático, e Melanésia apresentaram uma expansão populacional nos últimos 15 mil anos e a China/Coréia nos últimos 10 mil anos (Figura 12).

**Figura 12** - Análise do *Bayesian Skyline Plot* em oito macrorregiões de *P. vivax* mostrando as mudanças do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo. O eixo Y representa o tamanho efetivo populacional, enquanto que o eixo X representa o tempo em milhares de anos atrás. O segmento de linha cor preta indica o valor médio da população e o intervalo de confiança está representado pelo espaço em roxo.

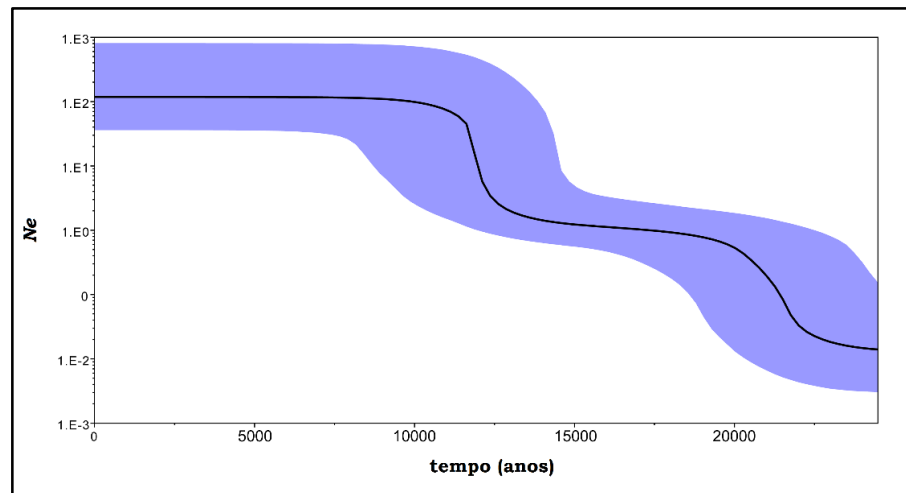


#### 4.7.2 Análise Bayesian Skyline Plot (BSP) em isolados de *P. falciparum*

O tamanho efetivo populacional ao longo de tempo em isolados de *P. falciparum* foi estimado através de 325 sequências únicas (não idênticas) disponíveis neste estudo combinando com as publicadas na literatura.

A Figura 13 representa a análise global de *P. falciparum* e sugere que nos últimos 20 mil anos houve um aumento no tamanho populacional e assim como em *P. vivax*, nos últimos 10 mil anos ocorreu uma rápida expansão populacional que se tornou constante ao longo do tempo.

**Figura 13** - Análise do *Bayesian Skyline Plot* em isolados de *P. falciparum* mostrando as mudanças do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo. O eixo Y representa o tamanho efetivo populacional, enquanto que o eixo X representa o tempo em milhares de anos atrás. O segmento de linha cor preta indica o valor médio da população e o intervalo de confiança está representado pelo espaço em roxo.

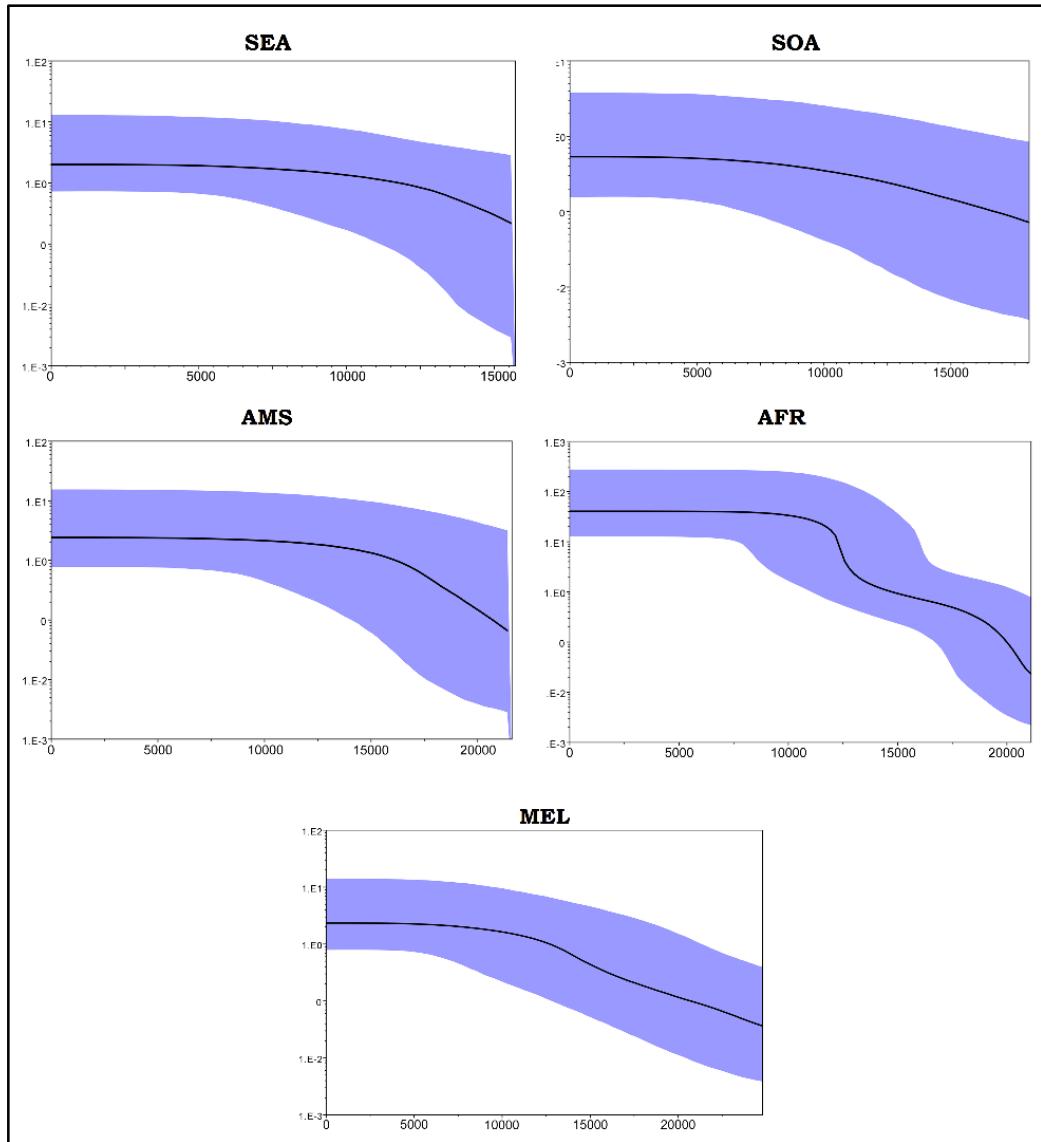


A análise global de *P. falciparum* não permitiu observar a variação do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo entre as macrorregiões deste parasito. Assim, realizamos um *Skyline Plot* com sequências únicas (não idênticas) de seis macrorregiões, África, AFR (n = 183), América do Sul, AMS (n = 38), América Central/México, AMC (n = 3), Sul da Ásia, SOA (n = 19), Sudeste Asiático, SEA (n = 48) e Melanésia, MEL (n = 34). Os gráficos desta análise estão representados na Figura 14, onde o eixo Y representa o tamanho efetivo populacional e o eixo X o tempo em milhares de anos atrás. Os gráficos

provenientes de diferentes macrorregiões, Sudeste Asiático, América do Sul, Sul da Ásia e Melanésia, apresentaram um padrão de curva semelhante entre elas, ou seja, nos últimos 15 mil anos é possível observar uma leve expansão populacional e que após este evento o tamanho efetivo populacional tornou-se constante. Já a África, apresentou um padrão de curva semelhante ao da população global de *P. falciparum*, sugerindo que nos 20 mil anos houve um aumento no tamanho populacional e nos últimos 15 mil anos ocorreu uma rápida expansão populacional que se tornou constante ao longo do tempo.

Devido ao tamanho amostral, não foi possível estimar o tamanho efetivo populacional ao longo do tempo nos isolados originados da América Central/México (n = 3).

**Figura 14** - Análise do *Bayesian Skyline Plot* em cinco macrorregiões de *P. falciparum* mostrando as mudanças do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo. O eixo Y representa o tamanho efetivo populacional, enquanto que o eixo X representa o tempo em milhares de anos atrás. O segmento de linha cor preta indica o valor médio da população e o intervalo de confiança está representado pelo espaço em roxo.



#### 4.8 Tempo para o ancestral comum mais recente (TMRCA)

O tempo de divergência foi estimado entre as macrorregiões, utilizando o genoma mitocondrial completo de 405 sequências únicas (não idênticas) *P. vivax* e 325 sequências únicas de *P. falciparum*. O relógio molecular foi calibrado seguindo os parâmetros descritos por Ricklefs e Outlaw (2010) com taxa de mutação de 0,013 e o modelo mais adequado foi o relógio molecular estrito disponível no programa BEAST (DRUMMOND et al., 2005).

A análise bayesiana estima que a idade do ancestral comum mais recente de *P. vivax* seja 70.915 anos atrás, enquanto que para *P. falciparum* seja 40.239 anos atrás (probabilidade posterior =1). A Tabela 22 representa o tempo para o ancestral comum mais recente para as ambas as espécies (*P. vivax* e *P. falciparum*) separadas em macrorregiões.

Dentre as macrorregiões representadas por *P. vivax*, o Sudeste Asiático (SEA) foi estimado ser o mais antigo, com 65.436 anos, seguidos do Sul da Ásia (SOA) (61.783) e China/Coréia (CKH) (57.493). Os isolados Sul Americanos (AMS), apresentaram um tempo de divergência mediano, 52.149, enquanto que os isolados da América Central/México (AMC) apresentaram o menor TMRCA, 21.194 (Tabela 22).

Dentre as macrorregiões de *P. falciparum*, a Melanésia (MEL) mostrou-se a mais antiga com TMRCA de 40.069 anos atrás, enquanto que o Sudeste Asiático (SEA) apresentou a idade mais recente (26.797). O tempo do ancestral recente mais comum não foi estimado para os isolados da América Central/México (AMC), pois o número amostral foi relativamente baixo (n=3), impossibilitando a análise, no entanto, a América do Sul (MAS) apresentou um tempo de divergência estimado 37.002 anos atrás (Tabela 22).



**Tabela 22** - Tempo para o ancestral comum mais recente estimado entre as macrorregiões, utilizando o genoma mitocondrial completo de 405 sequências únicas (não idênticas) de *P. vivax* e 325 sequências únicas de *P. falciparum*. O tempo foi estimado em anos atrás. Todos os valores são estatisticamente significantes com probabilidade superior =1.

Macroregião	TMRCA (anos)			
		<i>P. vivax</i>		<i>P. falciparum</i>
AFR	41.685	(28.630 - 57.563)	35.384	(21.101 - 54.974)
AMC	21.194	(8.267 - 36.069)	-	-
AMS	52.149	(29.896 - 60.659)	37.002	(21.385 - 56.606)
CKH	57.493	(32.879 - 85.461)	-	-
MEL	43.098	(24.761 - 66.538)	40.069	(22.776 - 61.268)
MDE	48.161	(27.846 - 72.074)	-	-
SEA	65.439	(39.780 - 94.425)	26.797	(15.674 - 40.224)
SOA	61.783	(27.437 - 108.264)	36.413	(18.442 - 59.785)
<b>Global</b>	<b>70.915</b>	<b>(44.000 - 100.000)</b>	<b>40.239</b>	<b>(24.000 - 60.000)</b>

#### 4.9 Análise filogenética e rede de haplótipos mitocondriais

##### 4.9.1 Análise filogenética e rede de haplótipos de *P. vivax*

Com base na análise de 941 sequências genômicas, foi possível encontrar 348 polimorfismos distribuídos ao longo do genoma mitocondrial completo de *P. vivax*. A árvore filogenética, Figura 15, foi construída através da análise bayesiana utilizando o software MrBayes v 3.2.1 (RONQUIST et al., 2012), enquanto que as redes de haplótipos, representadas na Figura 16, Figura 17 e Figura 18 foram construídas através do programa Network 4.6.

A árvore filogenética foi gerada apenas com sequências não idênticas (405) e as sequências idênticas foram adicionadas após as corridas de maneira automatizada (*script*). Os comprimentos dos ramos não são significativos, conseqüentemente não representam o tempo ou mudanças decorridas ao longo do tempo. Já as redes de haplótipos foram realizadas combinando os 805 isolados depositados no GenBank com os 136 sequenciados neste estudo (86 isolados do Brasil (9 isolados de *P. simium*), 32 isolados do Panamá e 52 isolados de Papua Nova Guiné). A origem geográfica dos isolados foi representada por código de cores, ou seja, cada agrupamento geográfico foi

codificado da seguinte forma: azul escuro – América do Sul, azul claro – América Central/México, roxo – China/Coréia, verde escuro – Sudeste Asiático, laranja – Sul da Ásia, rosa- Melanésia, marrom – Oriente Médio/Ásia Central, vermelho – África e amarelo – isolados provenientes da Mata Atlântica (MT), *P. vivax* e *P. simium* (coletados de primatas não-humanos do Novo Mundo).

A árvore consenso gerada a partir da análise filogenética bayesiana com isolados de *P. vivax* (Figura 15), apresentou clados com estimativa de probabilidade posterior  $\leq 0,70$ , muitos deles incluem amostras de diferentes origens geográficas. Entretanto, a maioria dos clados apresentaram-se bem suportados com 10 ou mais sequências com probabilidade posterior  $\geq 0,70$ .

Os clados C, D, U e V representados na árvore filogenética (Figura 15), não são estatisticamente significantes, pois apresentaram valores de probabilidade posterior inferior a 0,70. Os clados C, U e V são representados por isolados de origens díspares. Por exemplo, os clados C e D é representado exclusivamente por isolados da América do Sul provenientes do Brasil, da Colômbia, do Peru e da Venezuela, enquanto que o clado U é representado por isolados de várias regiões, África (Etiópia, Madagascar, Mauritânia e Ruanda), Sul da Ásia (Índia, Bangladesh, Paquistão e Sri Lanka), América do Central (México e Guatemala), Oriente Médio/Ásia Central (Turquia), Sudeste Asiático (Myanmar) e China/Coréia (China). Já o clado V é constituído por muitos isolados originados da América do Sul (Brasil, Peru, Colômbia), Melanésia (Papua Nova Guiné), Sudeste Asiático (Myanmar, Tailândia e Camboja), Sul da Ásia (Índia) e um da África (Etiópia).

Os clados A, B, E, F, G, H, J, K, L, M, O, Q, R, S e T, apresentaram suporte estatístico igual ou superior a 0,70 e foram particularmente informativos para o agrupamento de isolados de uma mesma região geográfica (Tabela 23). Por exemplo, os clados H, I e J são constituídos principalmente por isolados da Melanésia, sendo o clado H composto por isolados de Papua Nova Guiné (18), Vanuatu (6) e Ilhas Salomão (1), além de um isolado do Oriente Médio (Irã) e um do Sul da Ásia (Índia), enquanto que os clados I e J são constituídos por isolados de Papua Nova Guiné e apenas um isolado do Sudeste Asiático (Indonésia) se agrupou com o clado J (Tabela 23).

Os clados Q, R e S estão representados por sequências cuja origem é China/Coréia, entretanto os clados Q e S são constituídos principalmente por isolados da China, enquanto que o clado R, por isolados da Coréia (29% dos isolados coreanos estão agrupados neste clado).

Os clados L e T são constituídos por isolados de origens díspares, o clado L é representado principalmente pelo Sudeste Asiático (11 isolados, originados da Tailândia (5), Vietnã (4), Camboja (1) e Indonésia (1)), Sul da Ásia (com 6 isolados de Bangladesh e 1 da Índia) e Melanésia (1 de Papua Nova Guiné), enquanto que o clado T é composto por 70 isolados distribuídos entre as seguintes macrorregiões: (a) África, com 40 isolados (44,5%), provenientes de Madagascar (28), Etiópia (4) e um isolados das seguintes regiões: Sudão, Nigéria, Angola, Tanzânia, São Tomé, Uganda, Mauritânia; (b) Sul da Ásia com 25 isolados representados por 19 da Índia, sendo mais da metade dos isolados indianos (54,2%) agrupados neste clado, além de 6 isolados do Paquistão; (c) América do Central/México, com apenas dois isolados, um de El Salvador e o outro do México e por fim; (d) dois isolados do Oriente Médio/Ásia Central originado do Afeganistão (100% estão agrupados neste clado) (Tabela 23).

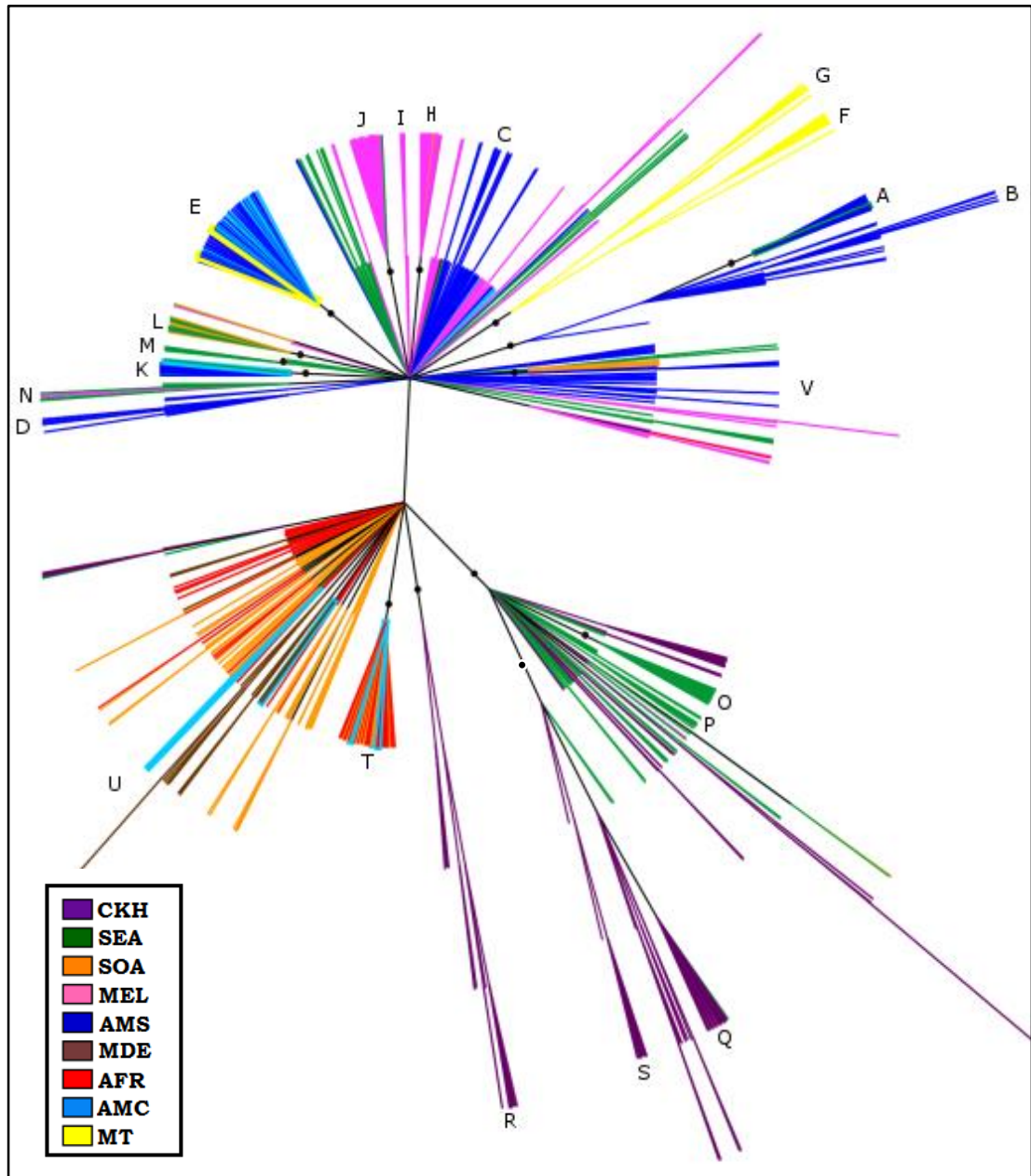
Os isolados provenientes do Sudeste Asiático estão agrupados em diferentes clados (principalmente nos K, M, N, O e P). No clado O, há o predomínio dos isolados da Indonésia (16), enquanto que o clado K é constituído predominantemente por isolados de Myanmar (12), mas também por isolados da América do Sul (2) e América Central (1). Já o clado M apresenta isolados originados da Tailândia (4), Camboja (1) e Vietnã (1) e o clado N com isolados de Camboja (4), Tailândia (1) e dois isolados da Melanésia, além do clado P que é representado por isolados da Indonésia (5), Tailândia (3) e Vietnã (1), Tabela 23.

Os isolados brasileiros (n=86), do Panamá (n=32) e de Papua Nova Guiné (n=52) sequenciados neste estudo estão representados principalmente pelos clados E, F, G, H, I e J. Todos esses clados são bem suportados estatisticamente, com probabilidade posterior  $\geq 0,99$ . Os isolados de Papua Nova Guiné estão representados pelos clados H, I e J, como explorados anteriormente, enquanto que os isolados americanos estão agrupados em diferentes clados (E, F e G).

O clado E é representado predominantemente por isolados das Américas (110): (a) América do Sul com 58 isolados (representado em azul escuro, sendo a grande maioria oriundos do Brasil (47 isolados, com 27,4% dos isolados brasileiros agrupados neste clado, sendo que 2 isolados são oriundos da Mata Atlântica, coletados em hospedeiros humanos no estado do Espírito Santo) seguido pelos isolados peruanos (5), colombianos (3) e do Equador (2, 100%) e (b) América Central/México com 54 isolados, constituído por 35 isolados do Panamá (87,5% dos isolados panamenhos estão inseridos neste clado), 10 isolados da Honduras (100% estão presentes neste clado), quatro isolados de El Salvador (66,7%), e um isolados das seguintes regiões: Nicarágua (100%), México (33,4%), Belize (100%) e Costa Rica (100%). Além dos isolados americanos, este clado também é constituído por dois isolados de Papua Nova Guiné e um do Sul da Ásia (Bangladesh).

Os isolados provenientes da América do Sul também estão representados nos cladogramas A e B, ambos com predomínio de isolados do Brasil, 18 e 5 isolados, respectivamente, e um isolado venezuelano presente nos dois cladogramas. Além disso, os cladogramas F e G são representados exclusivamente por isolados brasileiros oriundo da Mata Atlântica. O clado G é representado por isolados coletados em hospedeiros humanos (12), no estado do Espírito Santo e sequenciados pelo nosso grupo, além de 1 isolado originado de primata não-humano (*P. simium*), sequenciado por Mu e colaboradores (2005). O clado F contém isolados de ambos os hospedeiros, humanos (8) e macacos (9), sendo que os isolados de humanos (*P. vivax*) foram coletados no estado do Espírito Santo e os isolados de macacos (*P. simium*) foram coletados nos municípios de São Paulo (SP), Indaial (SC) e Viamão (RS).

**Figura 15** - Árvore filogenética gerada a partir da análise bayesiana mostrando a relação entre as populações de *P. vivax*. Os ramos bem suportados (probabilidade posterior  $\geq 0,70$ ) estão indicados por círculos. Os ramos são coloridos de acordo com a origem geográfica: azul escuro – América do Sul, azul claro – América Central/México, roxo – China/Coréia, verde escuro – Sudeste Asiático, laranja – Sul da Ásia, rosa- Melanésia, marrom – Oriente Médio/Ásia Central, vermelho – África, Amarelo – Mata Atlântica (MT - humanos e símios).



**Tabela 23** - Agrupamentos de isolados de *P. vivax* representados por clados na árvore filogenética gerada com programa MrBayes. Os números representam o total de isolados pertencentes em cada clado e a percentagem encontrada.

<b>Clado</b>	<b>Macrorregião</b>	<b>n</b>		<b>Região</b>	<b>n</b>	
<b>A</b>	AMS	19	8,0%	Brasil	18	10,5%
				Venezuela	1	6,7%
	SEA	2	1,3%	Tailândia	2	4,4%
<b>B</b>	AMS	6	2,5%	Brasil	5	2,3%
				Venezuela	1	6,7%
<b>C</b>	AMS	13	5,5%	Brasil	6	3,5%
				Colômbia	3	17,7%
				Peru	3	9,6%
				Venezuela	1	6,7%
<b>D</b>	AMS	7	3,0%	Peru	5	16,1%
				Brasil	1	0,6%
				Venezuela	1	6,7%
<b>E</b>	AMS	58	24,3%	Brasil	47	27,4%
				Peru	5	16,1%
				Colômbia	3	17,7%
				Equador	2	100,0%
				Não identificado	1	-
	AMC	54	22,6%	Panamá	35	87,5%
				Honduras	10	100,0%
				El Salvador	4	66,7%
				Belize	1	100,0%
				Costa Rica	1	100,0%
				México	1	33,4%
				Nicaragua	1	100,0%
				Não identificado	1	-
MEL	2	1,5%	Papua Nova Guiné	2	1,7%	
SOA	1	1,0%	Bangladesh	1	11,1%	
<b>F</b>	AMS	17	7,1%	Brasil	17	10,0%
<b>G</b>	AMS	13	5,4%	Brasil	13	7,6%
<b>H</b>	MEL	25	19,5%	Papua Nova Guiné	18	15,5%
				Vanuatu	6	75,0%
				Ilhas Salomão	1	25,0%
	MDE	1	3,3%	Irã	1	50,0%
SOA	1	1,0%	Índia	1	2,9%	
<b>I</b>	MEL	5	4,0%	Papua Nova Guiné	5	4,3%
<b>J</b>	MEL	39	30,5%	Papua Nova Guiné	39	33,7%
	SEA	1	0,6%	Indonésia	1	25,0%
<b>K</b>	SEA	12	7,5%	Myanmar	12	35,2%
	AMS	2	0,8%	Brasil	2	1,1%
	AMC	2	3,0%	El Salvador	1	16,7%
				Não identificado	1	-

**Tabela 23** - Continuação da página anterior.

<b>Clado</b>	<b>Macrorregião</b>	<b>n</b>		<b>Região</b>	<b>n</b>	
<b>L</b>	SEA	11	6,9%	Tailândia	5	11,1%
				Vietnã	4	44,4%
				Camboja	1	5,2%
	SOA	7	6,9%	Indonésia	1	2,0%
				Bangladesh	6	66,7%
				Índia	1	2,9%
MEL	1	0,8%	Papua Nova Guiné	1	0,9%	
<b>M</b>	SEA	6	3,8%	Tailândia	4	8,9%
				Camboja	1	5,2%
				Vietnã	1	11,1%
<b>N</b>	SEA	5	3,1%	Camboja	4	21,0%
				Tailândia	1	2,2%
	MEL	2	1,6%	Papua Nova Guiné	2	1,7%
<b>O</b>	SEA	19	11,8%	Indonésia	16	33,3%
				Tailândia	3	6,7%
	MEL	1	0,8%	Papua Nova Guiné	1	0,9%
<b>P</b>	SEA	9	5,7%	Indonésia	5	10,4%
				Tailândia	3	6,7%
				Vietnã	1	11,1%
<b>Q</b>	CHN	29	23,2%	China	29	30,8%
	SEA	1	0,6%	Myanmar	1	3,0%
<b>R</b>	CHN	10	8,0%	Coréia	9	29,0%
				China	1	1,0%
	MEL	1	0,8%	Vanuatu	1	12,5%
<b>S</b>	CHN	13	10,4%	China	13	13,8%
	AFR	40	44,5%	Madagascar	28	42,5%
Etiópia				4	30,8%	
Sudão				1	100,0%	
Nigéria				1	100,0%	
Angola				1	100,0%	
Tanzânia				1	100,0%	
São Tomé				1	100,0%	
Uganda				1	100,0%	
Mauritânia				1	50,0%	
Não identificado				1	-	
<b>T</b>	SOA	25	24,5%	Índia	19	54,2%
				Paquistão	6	10,7%
	AMC	3	4,4%	El Salvador	1	16,7%
México				1	33,3%	
Não identificado				1	-	
MDE	2	6,7%	Afganistão	2	100,0%	
<b>U</b>	SEA	67	41,8%	Myanmar	3	8,8%
	SOA	65	63,7%	Paquistão	49	87,5%
				Índia	13	37,2%

**Tabela 23** - Continuação da página anterior.

<b>Clado</b>	<b>Macrorregião</b>	<b>n</b>	<b>Região</b>	<b>n</b>	<b>n</b>
<b>U</b>	AFR	47 52,0%	Sri Lanka	2	100,0%
			Bangladesh	1	11,1%
			Etiópia	7	53,8%
			Madagascar	38	57,0%
			Mautirânia	1	50,0%
	MDE	26 86,7%	Ruanda	1	100,0%
			Turquia	26	100,0%
			CHN	7	5,6%
			China	7	5,6%
			AMC	3	4,5%
<b>V</b>	AMS	29 12,0%	México	1	33,4%
			Guatemala	2	50,0%
			Brasil	16	9,4%
			Peru	10	3,2%
			Colômbia	3	17,6%
	SEA	13 8,2%	Camboja	4	21,0%
			Tailândia	1	2,2%
			Myanmar	8	23,5%
			MEL	14	11,0%
			SOA	1	83,3%
AFR	1	1,1%	Índia	1	2,9%
			Etiópia	1	7,6%

A topologia da rede de haplótipos gerada pela metodologia de *median-joining* (Figura 16) é um espelho da árvore filogenética obtida por análise bayesiana (Figura 15). A grande maioria dos aglomerados de haplótipos estão unidos segundo a localização geográfica dos isolados.

Quase todos os isolados da Melanésia estão inseridos em dois grupos no canto superior direito da Figura 16, o que corresponde aos clados H, I e J da árvore filogenética (Figura 15).

Os isolados provenientes da África, Sul da Ásia e Oriente Médio/Ásia Central, ficaram agrupados na mesma região da rede de haplótipo (Grupo T) e compartilharam haplótipos com alguns isolados da América Central/México (México, El Salvador e Guatemala).

Os isolados do Sudeste Asiático ficaram subdivididos em seis grupos, segundo a suas origens geográficas, (a) Indonésia, representado pelo Grupo O, que está próximo geneticamente dos isolados da China/Coréia, (b) isolados do Vietnã, Tailândia e Camboja, Grupo L, que compartilham haplótipos com poucos isolados da Índia e Melanésia, (c) isolados de Myanmar que

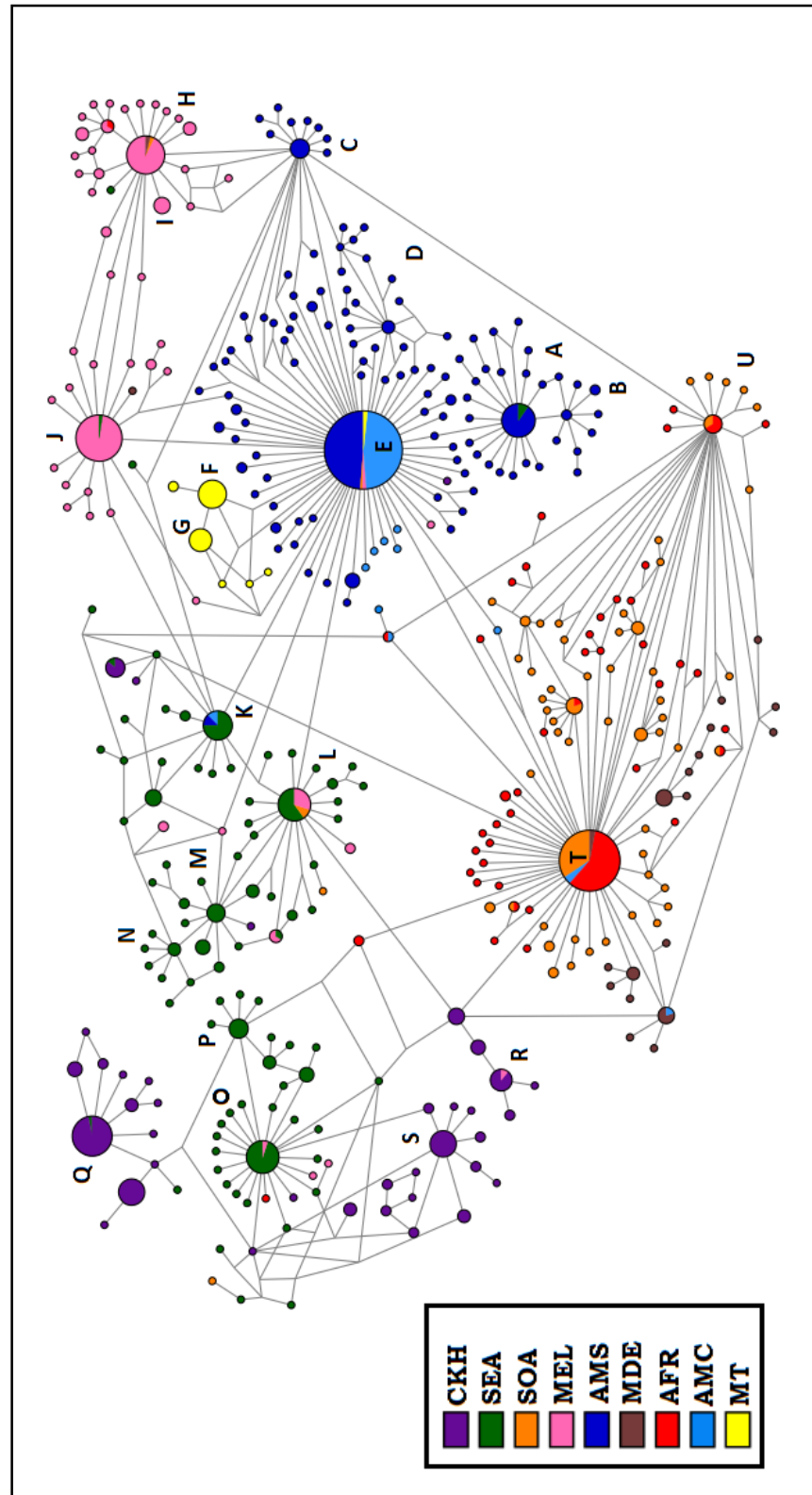


compartilham haplótipos com um isolado da América Central/México, e um da América do Sul (Grupo K), (d) isolados da Tailândia, Indonésia e Vietnã, Grupo P, e (e) isolados da Tailândia, Camboja e Vietnã que não compartilham haplótipos com nenhum isolado de outras macrorregiões (Grupo N e M).

A China/Coréia ficou dividida em três grupos, onde o Grupo S e Q são representados por isolados da China, porém o Grupo Q compartilha haplótipo com um isolado do Sudeste Asiático, enquanto que o Grupo R é representado por isolados da Coréia e compartilha haplótipo com um isolado da Melanésia.

Por fim, os isolados da América Central/México estão agrupados com os da América do Sul (Grupo E), no entanto há alguns isolados da América do Sul que não compartilham haplótipos com os de outra origem (Grupo B, C e D). Os isolados da Mata Atlântica estão representados no agrupamento F e G, próximos aos isolados americanos e aos isolados da Melanésia, enquanto que dois isolados de *P. vivax* provenientes de Mata Atlântica (40MT e 103\_03MT) encontram-se agrupados com isolados americanos (Grupo E). Na árvore filogenética não foi possível encontrar esta aproximação entre as macrorregiões (Figura 15), mas é possível observar que estes isolados estão em clados bem estruturados e únicos (representado em amarelo).

**Figura 16** – Rede de haplótipos mostrando a relação entre as populações de *P. vivax*. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de haplótipos e cada cor representa a origem geográfica: azul escuro – América do Sul, azul claro – América Central/México, roxo – China/Coréia, verde escuro – Sudeste Asiático, laranja – Sul da Ásia, rosa – Melanésia, marrom – Oriente Médio/Ásia Central, vermelho – África e amarelo – representa isolados da Mata Atlântica (*P. vivax* e *P. simium*).



Em conclusão, a rede de haplótipos e a árvore filogenética foram incapazes de separar os isolados provenientes da América Central e da América do Sul, o que sugere uma introdução recente de *P. vivax* nas Américas a partir da colonização do continente pelos europeus e através do comércio transatlântico de escravos africanos.

Para um melhor entendimento do compartilhamento de haplótipos entre os isolados de *P. vivax*, foi realizado uma análise baseada na comparação de haplótipos dois a dois entre todas as macrorregiões (África, América do Sul, América Central/México, Sul da Ásia, Sudeste Asiático, Melanésia, Oriente Médio/Ásia Central, e China/Coréia) deste estudo. Os resultados desta análise estão ilustrados na Tabela 24 e sugerem que a América do Sul foi a macrorregião com o maior número de haplótipos (119) e que três destes, são compartilhados com a América Central/México, Sul da Ásia, Sudeste Asiático e Melanésia. Entretanto, a América Central, foi a macrorregião com menor número de haplótipos, totalizando 12, sendo sete únicos e cinco compartilhados com o Sul da Ásia, Sudeste Asiático, Melanésia e Oriente Médio/Ásia Central. O Sudeste Asiático apresentou um total de 87 haplótipos, mas apenas sete são compartilhados com isolados da Melanésia e China/Coréia. Já o Sul da Ásia (total de 62 haplótipos) compartilha oito haplótipos com isolados da Melanésia, Oriente Médio e do Sudeste Asiático. A Melanésia (total de 51 haplótipos) e o Oriente Médio (total de 19 haplótipos) compartilham haplótipos com isolados de diferentes regiões, enquanto que a África (total de 45) compartilha seis haplótipos com a América Central, Sul da Ásia, Melanésia e Oriente Médio. Por fim, a China/Coréia contém 37 haplótipos, sendo três compartilhados com o Sudeste Asiático e Melanésia. Todos esses resultados vão de encontro aos dados anteriormente explorados na rede de haplótipos (Figura 16).

**Tabela 24** - Compartilhamento de haplótipos entre os isolados de *P. vivax*, baseado na comparação de haplótipos dois a dois entre as macrorregiões: África (AFR), América do Sul (AMS), América Central/México (AMC), Sul da Ásia (SOA), Sudeste Asiático (SEA), Melanésia (MEL), Oriente Médio/Ásia Central (MDE), e China/Coréia (CKH).

Macrorregiões	Haplótipos										
	total	único	compartilhado	AFR	AMS	AMC	SOA	SEA	MEL	MDE	CKH
AFR	45	39	6	0	2	5	0	0	1	1	0
AMS	119	116	3	2	2	1	2	1	1	0	0
AMC	12	7	5	2	1	2	1	1	1	2	0
SOA	62	54	8	1	1	3	1	3	2	2	0
SEA	87	80	7					4	0	0	2
MEL	51	43	8						1	1	1
MDE	19	16	3								0
CKH	37	34	3								

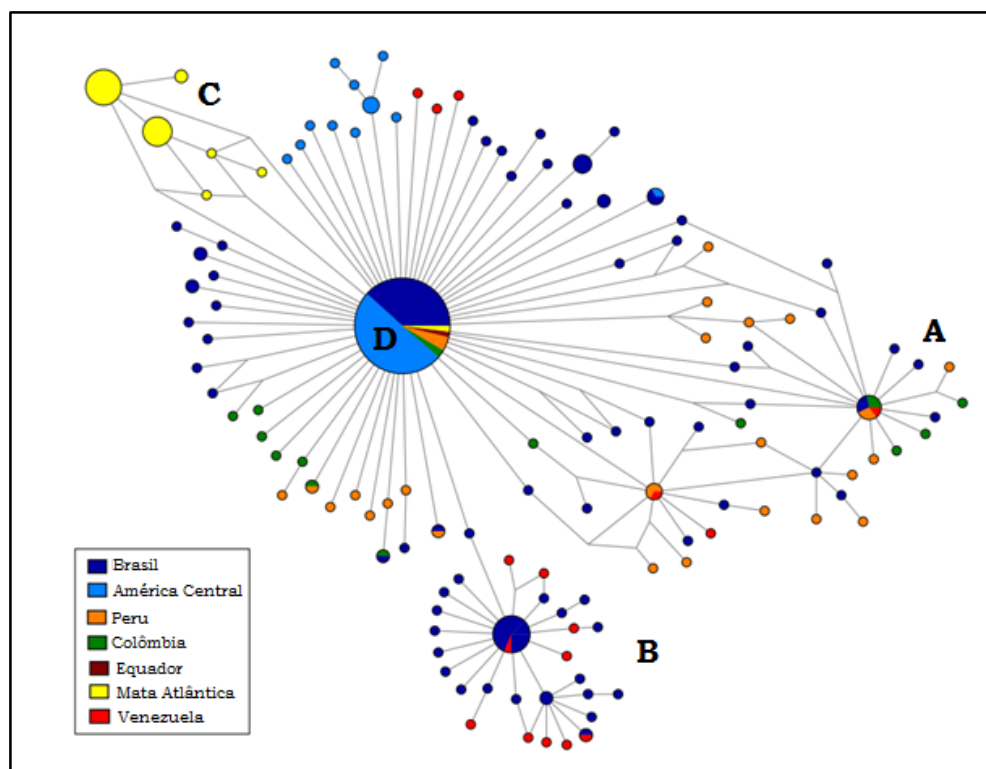
#### 4.9.1.1 Análise filogenética e rede de haplótipos de *P.vivax* e *P. simium* provenientes das Américas

Com base na análise de 304 sequências genômicas provenientes da América Central/México e do Sul, foi possível encontrar 126 polimorfismos distribuídos ao longo do genoma mitocondrial completo de *P. vivax* e *P. simium*. A rede de haplótipos, representada na Figura 17, foi construída através do programa Network 4.6, com todas as sequências americanas disponíveis no GenBank (220 isolados) combinando com as sequenciadas neste estudo (84 sendo, 52 isolados do Brasil (32 provenientes da Mata Atlântica, sendo 10 isolados de *P. simium*) e 32 isolados do Panamá). A origem geográfica dos isolados foi representada por código de cores, ou seja, cada agrupamento geográfico foi codificado da seguinte forma: azul escuro – Brasil, azul claro – América Central/México, laranja – Peru, verde – Colômbia, marrom – Equador, amarelo – Mata Atlântica e vermelho – Venezuela. Os isolados da América Central/México não foram separados, pois há muitos países com poucos isolados, o que dificultaria a representação por código de cores.

A grande maioria dos aglomerados de haplótipos estão unidos segundo a localização geográfica. Quase todos os isolados da América Central/México (54/68) estão inseridos no Grupo D e compartilham um mesmo haplótipo com isolados do Brasil (41/171), da Mata Atlântica (2/32), do Peru (2/31) e Equador (1/2), mas não com os venezuelanos.

Os isolados brasileiros compartilham haplótipos com todas as regiões (América Central/México, Peru, Venezuela, Colômbia, Equador e Mata Atlântica), no Grupo B, por exemplo, o Brasil (15/171) compartilha haplótipo com um isolado com a Venezuela (VE1082), e no Grupo A, o Brasil (2/171) compartilha haplótipo com isolados da Colômbia (2/17), Peru (2/31) e isolados venezuelanos (1/15), Figura 17.

**Figura 17** - Rede de haplótipos mostrando a relação entre as populações de *P. vivax* das Américas. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de haplótipos e cada cor representa a origem geográfica: azul escuro – Brasil, azul claro – América Central, laranja – Peru, verde – Colômbia, marrom – Equador, amarelo – Mata Atlântica e vermelho – Venezuela.

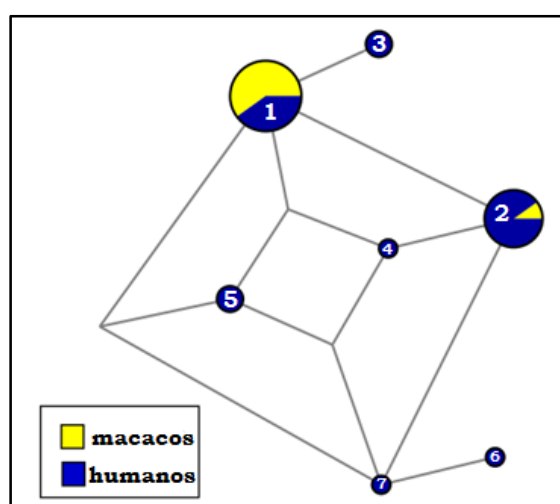


Os isolados da Mata Atlântica (32 sequências, sendo 22 de *P. vivax* e 10 de *P. simium*) foram inseridos nas análises com o intuito de investigar se os isolados de *P. simium*, provenientes de diferentes regiões do Brasil (São Paulo (9), Indaial (SC) (1) e Viamão (RS) (1)), compartilham haplótipos com os isolados de *P. vivax* brasileiros oriundo da Mata Atlântica e Floresta Amazônica, bem como, com os isolados das Américas, além de inferir se 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.

A Figura 17 sugere que todos os isolados da Mata Atlântica (representado em amarelo) estão agrupados principalmente, independente do hospedeiro, em duas subpopulações, como representados no Grupo C, com exceção de dois isolados, 40MT e 103\_03MT (hospedeiro humano), que estão agrupados no Grupo D, junto com isolados de origens díspares (América Central/México, Peru, Venezuela, Colômbia, Equador e Brasil).

A partir dos resultados acima relatados, construímos uma nova rede de haplótipos com amostras de diferentes hospedeiros, macacos e humanos, provenientes da Mata Atlântica (Figura 18). Com isso, foi possível afimar que todas as amostras de *P. simium* (10) compartilham haplótipos com os isolados brasileiros oriundo da Mata Atlântica (haplótipo 1 e 2, Figura 18), mas nem todos os isolados de *P. vivax* (hospedeiro humano, proveniente da Mata Atlântica) compartilham haplótipos com isolados de *P. simium* (haplótipos 3, 4, 5, 6 e 7). Além disso, foi possível observar que todas as amostras de *P. simium* sequenciadas pelo nosso grupo compartilham o mesmo haplótipo (1, haplótipo mais comum), ou seja, independente do local de coleta (Viamão (RS), Indaial (SC) e São Paulo (SP)) essas amostras são idênticas (Tabela 25). Ainda na Figura 18, o segundo haplótipo mais comum, 2, é representado por isolados de *P. vivax* (9) e apenas um isolado de *P. simium*, sequenciado por Mu e colaboradores (2005). O haplótipo 5 está presente nos dois isolados (40MT e 103\_03MT) que ficaram agrupados anteriormente com os isolados americanos (Grupo E, Figura 16 e Grupo D, Figura 17).

**Figura 18** - Rede de haplótipos mostrando a relação entre as populações de *P. vivax* provenientes da Mata Atlântica e *P. simium*. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de haplótipos e cada cor representa o tipo hospedeiro: azul escuro – humano e amarelo – macacos (*Alouatta clamitans* e *Callicebus nigrifans*).



**Tabela 25** - Localização geográfica, tipo de hospedeiro e haplótipo de amostras de *P. simum* e *P. vivax* coletadas na Mata

<b>Isolado</b>	<b>Local da coleta</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Haplótipo</b>	<b>Referência</b>
<i>P. simium</i>	Parque Estadual da Catarreira, São Paulo	Bugio ( <i>Alouatta clamitans</i> )	2	Mu et al., 2005
SS3Ps	Parque Estadual da Catarreira, São Paulo (2007)	Bugio ( <i>Alouatta clamitans</i> )	1	Duarte et al., 2008
139Ps	Parelheiros, São Paulo (2003)	Bugio ( <i>Alouatta clamitans</i> )	1	Duarte et al., 2008
BL65Ps	Indaial, Santa Catarina (2011)	Bugio ( <i>Alouatta clamitans</i> )	1	Costa et al., 2014
RSPs	Parque Estadual de Itapua, Rio Grande do Sul (2003)	Bugio ( <i>Alouatta clamitans</i> )	1	Duarte et al., não publicado
160Ps	Parque Estadual da Catarreira, São Paulo (2010)	Sauá ( <i>Callicebus nigrifans</i> )	1	Sousa, 2012
121Ps	Parque Estadual da Catarreira, São Paulo (2003)	Bugio ( <i>Alouatta clamitans</i> )	1	Duarte et al., 2008
95Ps	Parque Estadual da Catarreira, São Paulo (2009)	Bugio ( <i>Alouatta clamitans</i> )	1	Duarte et al., 2008
97Ps	Mariporã, São Paulo (2009)	Bugio ( <i>Alouatta clamitans</i> )	1	Duarte et al., 2008
45Ps	Parelheiros, São Paulo (2007)	Bugio ( <i>Alouatta clamitans</i> )	1	Duarte et al., 2008
1312MT	Santa Maria de Jetibá, Espírito Santo (2003)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	1	Cerutti et al., 2007
JSB62MT	Santa Teresa, Espírito Santo (2002)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	3	Cerutti et al., 2007
1565MT	Santa Leopoldina, Espírito Santo (2003)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	1	Cerutti et al., 2007
GAB847MT	Santa Maria de Jetibá, Espírito Santo (2002)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	2	Cerutti et al., 2007
RO54MT	Domingos Martins, Espírito Santo (2002)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	3	Cerutti et al., 2007
VC57MT	Santa Teresa, Espírito Santo (2002)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	1	Cerutti et al., 2007
1272MT	Alfredo Chaves, Espírito Santo (2003)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	2	Cerutti et al., 2007
OJA51MT	Santa Teresa, Espírito Santo (2002)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	1	Cerutti et al., 2007
1411MT	Santa Leopoldina, Espírito Santo (2003)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	2	Cerutti et al., 2007
1760MT	Espírito Santo	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	2	Cerutti et al., 2007
1451MT	Santa Teresa, Espírito Santo (2003)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	2	Cerutti et al., 2007
ACC54MT	Santa Teresa, Espírito Santo (2002)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	1	Cerutti et al., 2007
FW63MT	Santa Teresa, Espírito Santo (2002)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	2	Cerutti et al., 2007
MA5M61MT	Espírito Santo	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	7	Cerutti et al., 2007
SV555MT	Marechal Floriano, Espírito Santo (2002)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	1	Cerutti et al., 2007
143MT	Santa Teresa, Espírito Santo (2002)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	2	Cerutti et al., 2007
40MT	Santa Teresa, Espírito Santo (2002)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	5	Cerutti et al., 2007
103_03MT	Espírito Santo	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	5	Cerutti et al., 2007
111MT	Santa Teresa, Espírito Santo (2002)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	2	Cerutti et al., 2007
761MT	Santa Leopoldina, Espírito Santo (2002)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	4	Cerutti et al., 2007
ALNL53MT	Santa Teresa, Espírito Santo (2002)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	6	Cerutti et al., 2007
AJ54MT	Santa Teresa, Espírito Santo (2002)	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	2	Cerutti et al., 2007

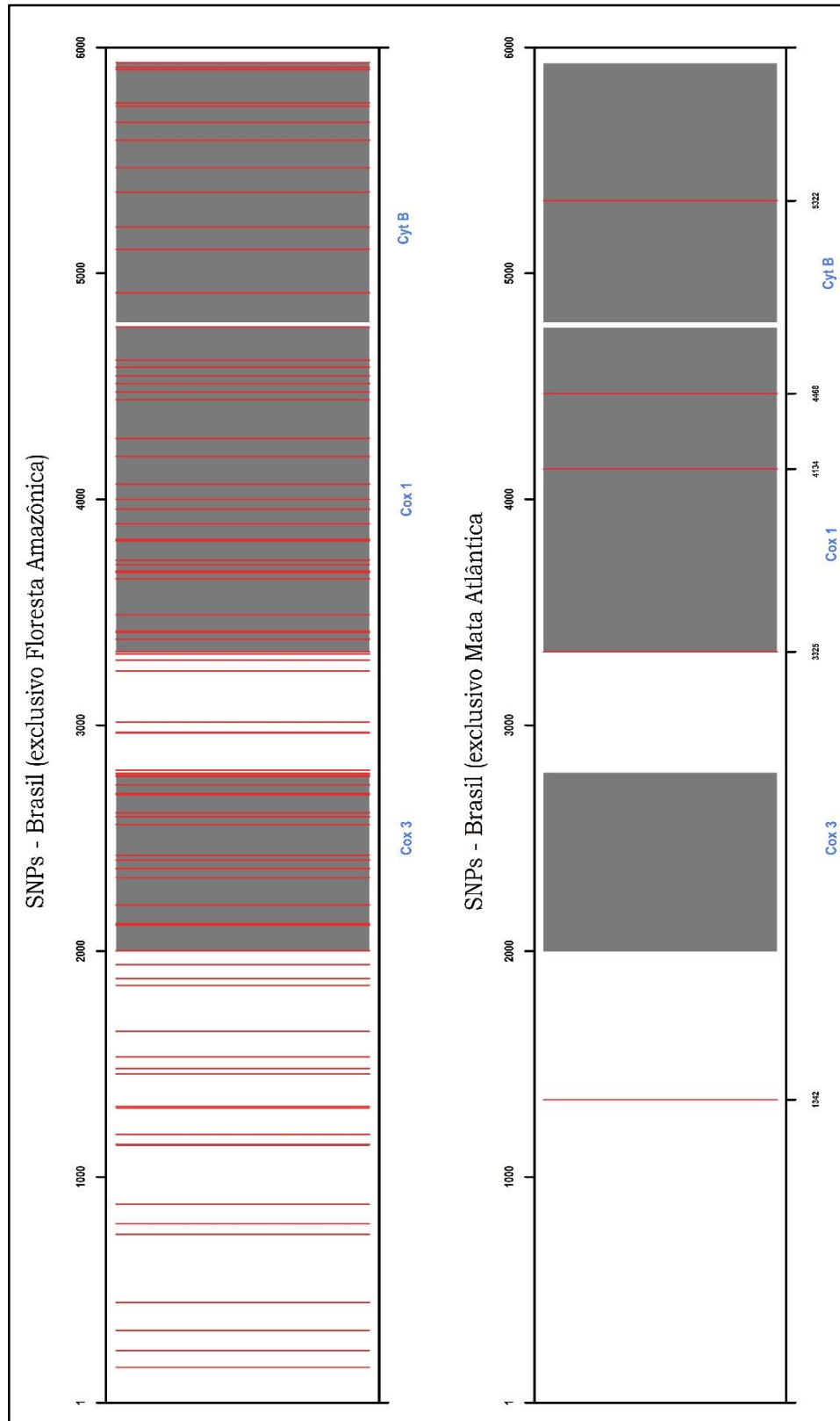


Baseado nestes resultados, o nosso próximo passo foi analisar as sequências brasileiras com o intuito de investigar quais SNPs estavam presentes somente nas sequências originadas da Mata Atlântica, mas não nos isolados provenientes da Floresta Amazônica. Com isso, realizamos o alinhamento do genoma mitocondrial completo de 171 isolados brasileiros disponíveis no GenBank (119) e sequenciados neste estudo (52) e identificamos 83 polimorfismos de base única exclusivos da Floresta Amazônica e 5 SNPs exclusivo da Mata Atlântica (G1342C, A3325T, T4134C, A4468G e A5322C, Tabela 26). A Figura 19 esquematiza o genoma mitocondrial completo e as posições dos SNPs encontrados na Mata Atlântica e Floresta Amazônica.

Depois destes resultados, o próximo objetivo foi identificar se estes cinco SNPs, exclusivos da Mata Atlântica, estavam presentes em isolados provenientes de todas as regiões endêmicas para *P. vivax* (banco de dados com 941 isolados). Esta comparação permitiu identificar apenas um SNP, A3325T, encontrado em um isolado proveniente de Papua Nova Guiné (ID: 97105), enquanto que os demais foram exclusivos da Mata Atlântica quando comparado com todas as sequências disponíveis atualmente no GenBank e sequenciadas neste estudo.

Portanto, os resultados relatados acima sugerem que os isolados de *P. vivax* provenientes da Mata Atlântica apresentaram uma maior diversidade genética (Figura 18) quando comparados com os isolados de *P. simium*, permitindo afirmar que a direção da transmissão lateral, baseados nestes dados, foi de humanos para macacos e não vice-versa.

**Figura 19** - Esquema do genoma mitocondrial completo de *P. vivax* e *P. simium* e as posições dos SNPs encontrados na Mata Atlântica e Floresta Amazônica.



**Tabela 26** - Identificação de SNPs exclusivos da Mata Atlântica em isolados de *P. vivax* e *P. simum*. Os nucleotídeos em negrito são exclusivos da Mata Atlântica.

Isolados	Posição/SNP				
	C1342G Intergênica	A3325T Cox1	T4134C Cox1	A4468G Cox1	A5322C CytB
Psimium	C	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	A
SS3Ps	C	A	<b>C</b>	<b>G</b>	A
139Ps	C	A	<b>C</b>	<b>G</b>	A
B165Ps	C	A	<b>C</b>	<b>G</b>	A
R5Ps	C	A	<b>C</b>	<b>G</b>	A
160Ps	C	A	<b>C</b>	<b>G</b>	A
121Ps	C	A	<b>C</b>	<b>G</b>	A
95Ps	C	A	<b>C</b>	<b>G</b>	A
97Ps	C	A	<b>C</b>	<b>G</b>	A
45Ps	C	A	<b>C</b>	<b>G</b>	A
1312MT	C	A	<b>C</b>	<b>G</b>	A
JSB62_MT	<b>G</b>	A	<b>C</b>	<b>G</b>	A
1565MT	C	A	<b>C</b>	<b>G</b>	A
GAB847_MT	C	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	A
RO54_MT	<b>G</b>	A	<b>C</b>	<b>G</b>	A
VC57MT	C	A	<b>C</b>	<b>G</b>	A
1272MT	C	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	A
OJA51_MT	C	A	<b>C</b>	<b>G</b>	A
1411MT	C	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	A
1760MT	C	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	A
1451MT	C	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	A
ACC54_MT	C	A	<b>C</b>	<b>G</b>	A
FW63MT	C	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	A
MA5M61_MT	C	<b>T</b>	T	<b>G</b>	A
SV555_MT	C	A	<b>C</b>	<b>G</b>	A
143MT	C	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	A
40MT	C	A	T	A	A
103_03MT	C	A	T	A	A
111MT	C	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	A
761MT	C	<b>T</b>	<b>C</b>	A	A
ALNL53MT	C	<b>T</b>	T	<b>G</b>	<b>C</b>
AJR54_MT	C	<b>T</b>	<b>C</b>	G	A

#### 4.9.2 Análise filogenética e rede de haplótipos de *P.falciparum*

A estrutura populacional de *P. falciparum* foi analisada através do alinhamento do genoma mitocondrial completo de 1795 sequências, sendo

244 sequenciadas neste estudo (147 do Brasil, 21 da Venezuela, 6 do Panamá, 20 da Indonésia, 23 de Papua Nova Guiné e 27 da Tanzânia), 812 sequências capturadas do genoma completo disponível no banco de dados ENA (462 sequências da África e 350 do Sudeste Asiático) e 739 sequências disponíveis no GenBank. O alinhamento do genoma mitocondrial permitiu identificar 330 SNPs.

A árvore filogenética foi gerada com o programa MrBayes a partir de sequências não idênticas (325) e as sequências idênticas foram adicionadas após as corridas de maneira automatizada (*script*), enquanto que a rede de haplótipos foi construída com 1795 isolados com o auxílio do programa Network 4.6. A origem geográfica dos isolados foi representada por código de cores, no qual, cada agrupamento geográfico foi codificado da seguinte forma: azul escuro – América do Sul, azul claro – América Central/México, verde escuro – Sudeste Asiático, laranja – Sul da Ásia, rosa- Melanésia, e vermelho - África.

A Figura 20 apresenta a árvore filogenética de *P. falciparum* gerada a partir da análise bayesiana e subdividida em clados bem estruturados, com estimativa de probabilidade posterior  $\geq 0,70$  (indicados por círculos, Figura 20) e clados com estimativas inferior a 0,70 (minoria), os quais incluem amostras de origens díspares, representado por exemplo, pelo clado R. Este clado é constituído por todos os isolados da América Central/México (5 amostras do Panamá, sequenciadas neste estudo e 2 amostras do Haiti) com exceção de um isolado do Panamá, que está agrupado no clado A. Neste clado, também está presente alguns isolados da América do Sul (representado pela Venezuela (4), Brasil (1) e Equador (1)), Sudeste Asiático (Camboja (18), Indonésia (4), Tailândia (3) e Vietnã (1)), Sul da Ásia (Índia (11)), Melanésia (5 isolados de Papua Nova Guiné) e isolados provenientes de diferentes países da África (Mali, Gana, Tanzânia, Burquina Faso, República Guiné e Gambia).

Os clados bem suportados estatisticamente são particularmente informativos para o agrupamento de isolados de uma mesma região geográfica. Os isolados da Melanésia são representados por diferentes clados, sendo os clados B e I são constituídos por amostras oriundas de Papua Nova Guiné, Ilhas Salomão e Vanuatu, além de poucas amostras do Sul da Ásia,

Sudeste Asiático e África agrupadas somente no clado I, enquanto que os cladogramas J e K somente os isolados de Papua Nova Guiné estão presentes (Tabela 27).

Os isolados do Sudeste Asiático estão agrupados nos seguintes cladogramas: o clado C, formado por vários isolados de Camboja (42), Tailândia (49), Filipinas (24), Vietnã (6) e Indonésia (1), além de isolados da Melanésia representados por Vanuatu (76) e Papua Nova Guiné (3), dois isolados da África (1 Burquina Faso e 1 Tanzânia) e um isolado da Colômbia. Os cladogramas M e N são representados por isolados da Tailândia e Camboja, enquanto que o clado L é representado pela Tailândia (84), Camboja (27) e Papua Nova Guiné (1). Os cladogramas O, P e Q, estão agrupados separadamente por isolados de Camboja (15), Filipinas (8) e Tailândia (12), respectivamente.

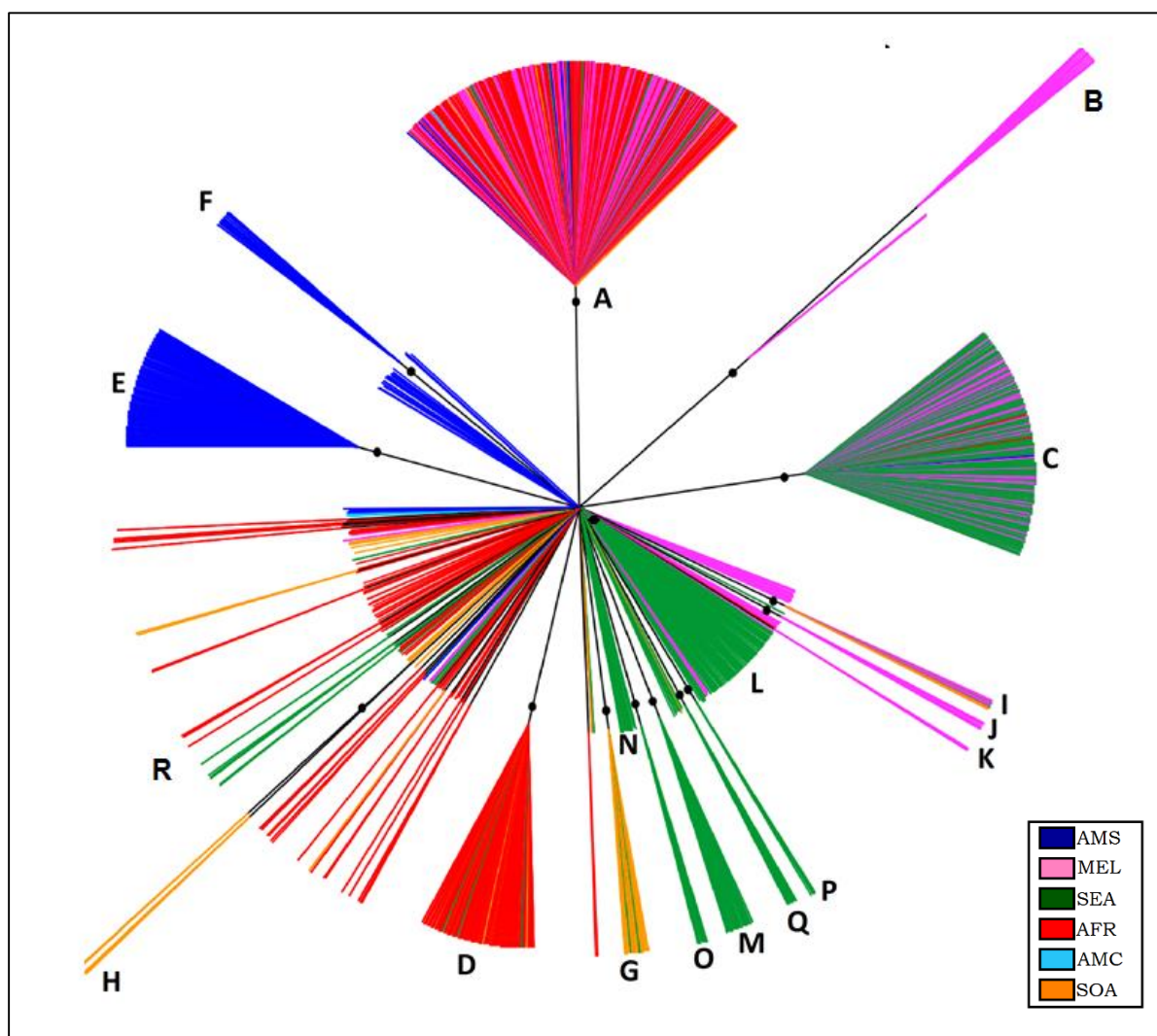
O Sul da Ásia, representado por isolados indianos (Tabela 4), estão aglomerados em dois cladogramas, G e H. O primeiro formado principalmente por isolados indianos (25), mas também, do Sudeste Asiático (4) e África (1) e segundo, constituído exclusivamente pela Índia (9,9% os isolados indianos estão neste clado), Tabela 27.

Já os isolados africanos estão agrupados em dois cladogramas principais, A e D, e são representados por diferentes regiões deste continente (Gana, Tanzânia, República Dominicana, Mali, Burquina Faso, Gambia, Mauritânia, Sudão, África do Sul, Serra Leoa e Senegal). O clado A é formado por 41,7% (263) dos isolados africanos representados neste estudo, além de 42,1% dos isolados da Melanésia, representado por 59 isolados da Papua Nova Guiné, 47 do Vanuatu e 22 provenientes de Ilhas Salomão. Dentre os isolados do Sudeste Asiático, apenas 5,4% (29) estão representados neste grupo. Além desses, também estão presente os isolados do Sul da Ásia (18,5%, 15), América do Sul (5,5%) representada por 13 isolados brasileiros e apenas 1 isolado do Panamá. Já o clado D, é constituído por uma amostra americana (Brasil), nove isolados da Índia, três do Camboja e 133 (21,1%) isolados africanos representados por diferentes países deste continente.

Por fim os isolados americanos estão espalhados pela árvore filogenética. Os isolados da América Central/México estão alocados no clado R, sem suporte estatístico, sendo que 5 isolados (83,3%) são do Panamá e 2

(100%) do Haiti. Os isolados da América do Sul são representados por clados únicos e bem estruturados, ou seja, não há mistura de isolados de outras regiões endêmicas para *P. falciparum*, com exceção de uma amostra proveniente de Gana (África) no clado E. Neste clado, 69,2% (144) das brasileiras estão aqui representadas por diferentes estados, Acre, Pará, Manaus e Rondônia. Além destas, estão presentes sete (33,3%) amostras da Venezuela, todas as amostras do Peru (5) e uma (50%) do Equador, enquanto que no clado F (22 amostras, 10,6,3%), somente as amostras do Pará (município de Tailândia) estão presentes.

**Figura 20** - Árvore filogenética gerada a partir da análise bayesiana mostrando a relação entre as populações de *P. falciparum*. Os ramos bem suportados (probabilidade posterior  $\geq 0,70$ ) estão indicados por círculos. Os ramos são coloridos de acordo com a origem geográfica: azul escuro – América do Sul, azul claro – América Central/México, verde escuro – Sudeste Asiático, laranja – Sul da Ásia, rosa- Melanésia, e vermelho - África.



**Tabela 27** - Agrupamentos de isolados de *P. falciparum* representados por clados na árvore filogenética gerada do com programa MrBayes. Os números representam o total de isolados pertencentes em cada clado e a percentagem encontrada.

<b>Clado</b>	<b>Macrorregião</b>	<b>n</b>		<b>Região</b>	<b>n</b>	
<b>A</b>	AFR	263	41,7%	Gana	108	41,2%
				Tanzânia	48	47,5%
				República Guiné	44	45,8%
				Mali	20	43,4%
				Gambia	18	29,5%
				Burquina Faso	17	42,5%
				Senegal	3	33,3%
				Sudão	2	40,0%
				África do Sul	2	100,0%
				Mauritânia	1	25,0%
	MEL	129	42,1%	Papua Nova Guiné	59	48,4%
				Vanuatu	47	35,0%
				Ilhas Salomão	22	43,1%
	SEA	29	5,4%	Indonésia	11	55,0%
				Filipinas	9	16,7%
Tailândia				5	2,7%	
Camboja				3	1,1%	
SOA	15	18,5%	Índia	15	18,5%	
AMS	13	5,5%	Brasil	13	6,2%	
AMC	1	12,5%	Panamá	1	16,6%	
<b>B</b>	MEL	25	8,2%	Ilhas Salomão	12	23,5%
				Vanuatu	11	8,2%
				Papua Nova Guiné	2	1,6%
<b>C</b>	SEA	218	50,0%	Camboja	42	51,6%
				Tailândia	49	26,9%
				Filipinas	24	44,4%
				Vietnã	6	66,7%
				Indonésia	1	5,0%
	MEL	79	25,7%	Vanuatu	76	56,8%
				Papua Nova Guiné	3	2,5%
	AFR	2	0,3%	Burquina Faso	1	2,5%
				Tanzânia	1	1,0%
	AMS	1	0,4%	Colômbia	1	100,0%
<b>D</b>	AFR	133	21,1%	Gana	58	22,1%
				Gambia	23	37,7%
				República da Guiné	20	20,8%
				Mali	10	21,7%
				Tanzânia	10	10,0%
				Burquina Faso	8	20,0%
				Mauritânia	2	50,0%

**Tabela 27** - Continuação da página anterior.

<b>Clado</b>	<b>Macrorregião</b>	<b>n</b>		<b>Região</b>	<b>n</b>	
				Senegal	1	11,1%
	SOA	9	11,1%	Índia	9	11,1%
	SEA	3	0,6%	Camboja	3	1,1%
	AMS	1	0,4%	Brasil	1	0,5%
	AMS	157	66,2%	Brasil	144	69,2%
<b>E</b>				Venezuela	7	33,3%
				Peru	5	100,0%
				Equador	1	50,0%
	AFR	1	0,2%	Gana	1	0,3%
<b>F</b>	AMS	22	9,3%	Brasil	22	10,6%
	SOA	25	30,8%	Índia	25	30,9%
<b>G</b>	SEA	4	0,8%	Tailândia	2	1,1%
				Camboja	2	0,7%
	AFR	1	0,2%	Burquina Faso	1	2,5%
<b>H</b>	SOA	8	9,9%	Índia	8	9,9%
	MEL	7	2,3%	Papua Nova Guiné	6	4,5%
				Ilhas Salomão	1	2,0%
<b>I</b>	SOA	4	5,0%	Índia	4	5,0%
	SEA	2	0,4%	Tailândia	2	1,1%
	AFR	1	0,2%	Gana	1	0,3%
<b>J</b>	MEL	11	3,6%	Papua Nova Guiné	11	9,0%
<b>K</b>	MEL	5	1,6%	Papua Nova Guiné	5	4,0%
	SEA	111	20,9%	Tailândia	84	46,1%
<b>L</b>				Camboja	27	10,1%
	MEL	1	0,3%	Papua Nova Guiné	1	0,8%
<b>M</b>	SEA	36	6,7%	Camboja	35	13,1%
				Tailândia	1	0,5%
<b>N</b>	SEA	16	3,0%	Camboja	11	4,1%
				Tailândia	5	2,7%
<b>O</b>	SEA	15	2,8%	Camboja	15	5,6%
<b>P</b>	SEA	8	1,5%	Filipinas	8	14,9%
<b>Q</b>	SEA	12	2,2%	Tailândia	12	6,5%
	AFR	115	18,3%	Tanzânia	27	26,7%
				Mali	6	13,0%
				República Guiné	14	14,5%
				Gana	36	13,7%
				Gambia	23	37,7%
<b>R</b>				Burquina Faso	8	20,0%
				Não Identificado	1	-
	SEA	26	4,9%	Camboja	18	6,7%
				Indonésia	4	20,0%
				Tailândia	3	1,6%
				Vietnã	1	11,0%
	SOA	14	13,6%	Índia	11	13,5%



**Tabela 27** - Continuação da página anterior.

<b>Clado</b>	<b>Macrorregião</b>	<b>n</b>	<b>Região</b>	<b>n</b>		
AMC		7	87,5%	Panamá	5	62,5%
				Haiti	2	100,0%
AMS		6	2,5%	Venezuela	4	19,0%
				Brasil	1	0,5%
				Equador	1	50,0%
MEL		5	1,6%	Papua Nova Guiné	5	4,0%

A rede de haplótipos gerada pela metodologia de *median-joining* (Figura 19) apresentou resultados similares aos da árvore filogenética obtida por análise bayesiana (Figura 21). A grande maioria dos aglomerados de haplótipos estão unidos segundo a localização geográfica dos isolados. Quase todos os isolados do Sudeste Asiático estão inseridos em seis grupos principais (representados em L, M, N, O, P e Q Figura 21). Os grupos M, N e O são representados predominantemente por isolados de Camboja, enquanto que o grupo P e Q é formado por isolados originados das Filipinas e Tailândia, respectivamente. Já o Grupo L apresenta uma mistura de isolados do Vietnã, Tailândia e Camboja.

As sequências da Melanésia estão espalhadas por toda a rede, compartilhando haplótipos com os isolados do Sudeste Asiático (grupo C) e África (grupo A, o mais diversificado geograficamente). As sequências dos agrupamentos J e K são provenientes de uma única origem geográfica, Papua Nova Guiné e Ilhas Salomão, respectivamente, enquanto que o agrupamento B apresenta sequências de origens díspares, Papua Nova Guiné, Ilhas Salomão e Vanuatu.

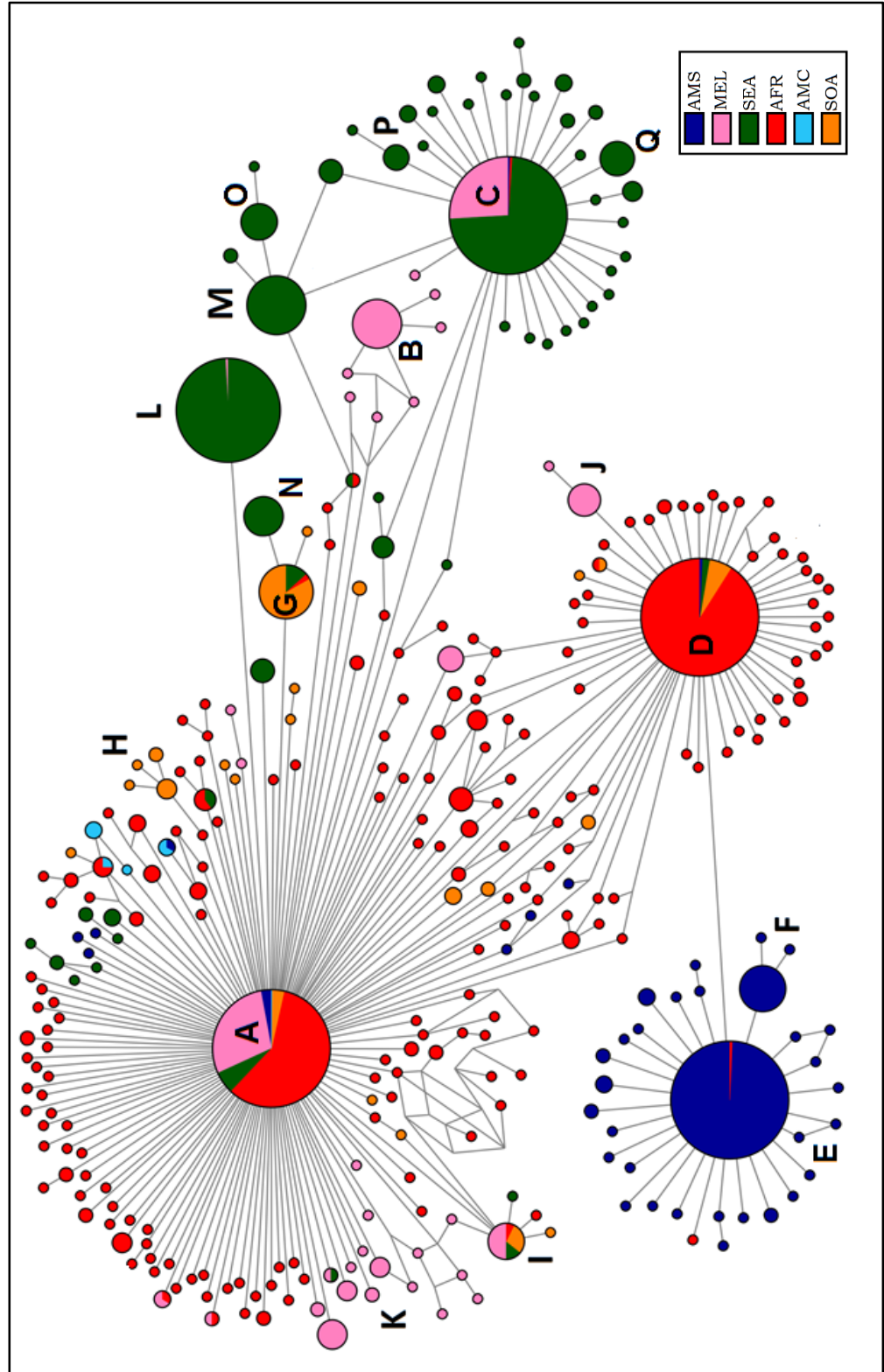
Os isolados africanos estão representados em dois grupos principais, o Grupo A e o Grupo D. O primeiro é constituído de isolados de todas as origens, África, Sul da Ásia, Sudeste Asiático, Melanésia, América do Sul (5 isolados brasileiros) e América Central (1 do Panamá), além de muitos isolados “satélites” provenientes de África, Sul da Ásia, Sudeste Asiático, Melanésia, América Central (5 isolados do Panamá e 2 do Haiti) e América do Sul (1 do Equador, 1 do Brasil e 5 da Venezuela), sugerindo que este Grupo seja o centro de irradiação de haplótipos, e o segundo (Grupo D), localizado a um passo

mutacional do Grupo brasileiro (E), formado por isolados de diferentes países da África, como também da Índia, Camboja e um do Brasil.

Por fim, as amostras americanas estão agrupadas no canto inferior a esquerda da Figura 21, e são representadas principalmente por dois Grupos, F e G. O agrupamento desses isolados é idêntico ao encontrado na árvore filogenética (Figura 20), ou seja, o grupo F é constituído predominantemente por isolados provenientes da Tailândia (Pará, BR), enquanto que o Grupo E é representado por isolados provenientes de várias regiões do Brasil, Acre, Pará, Manaus e Rondônia. Além dos brasileiros, também estão presentes neste Grupo isolados da Venezuela (7), do Peru (5) e um do Equador. Além disso, há alguns isolados “satélites” representados por nove amostras da Venezuela e algumas brasileiras. O isolado da Colômbia está localizado no Grupo C.

Até o presente momento, não há estudos científicos que expliquem a baixa diversidade genética encontrada entre os isolados americanos, porém estudos sugerem que *P. falciparum* se originou na África, dispersou-se por todo o mundo como resultado da migração humana e foi introduzido nas Américas provendo de uma única região, o que explicaria o fato de não haver uma grande mistura genética com os de outra localidade.

**Figura 21** - Rede de haplótipos mostrando a relação entre as populações de *P. falciparum*. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de haplótipos e cada cor representa a origem geográfica: azul escuro – América do Sul, azul claro – América Central/México, verde escuro, verde claro – Sudeste Asiático, laranja – Sul da Ásia, rosa – Melanésia, e vermelho – África.



Assim como anteriormente apresentado para os resultados de *P. vivax*, realizamos também para *P. falciparum* uma análise baseada na comparação de haplótipos dois a dois entre todas as macrorregiões (África, América do Sul, América Central, Sul da Ásia, Sudeste Asiático e Melanésia) deste estudo.

A Tabela 28 ilustra os resultados e sugere que a África foi a macrorregião com o maior número de haplótipos (191), sendo 179 únicos e 12 são compartilhados com todas as macrorregiões. Entretanto, a América Central, foi a macrorregião com menor número de haplótipos, totalizando 5, sendo dois únicos e três compartilhados com o Sul da Ásia, Sudeste Asiático, Melanésia. O Sudeste Asiático apresentou 56 haplótipos, sendo 48 únicos e oito compartilhados, enquanto que o Sul da Ásia, contém 23, sendo 18 únicos e cinco haplótipos compartilhados. Já a América do Sul (total de 41 haplótipos) compartilha cinco haplótipos com isolados da Melanésia, América Central, Sul da Ásia e Sudeste Asiático. Por fim, a Melanésia contém 35 haplótipos, sendo seis compartilhados entre todas as macrorregiões. Todos esses resultados vão ao encontro dos dados explorados na rede de haplótipos (Figura 21).

**Tabela 28** - Compartilhamento de haplótipos entre os isolados de *P. falciparum*, baseado na comparação de haplótipos dois a dois entre as macrorregiões: África (AFR), América do Sul (AMS), América Central/México (AMC), Sul da Ásia (SOA), Sudeste Asiático (SEA) e Melanésia (MEL).

Macrorregiões	Haplótipos									
	total	único	compartilhado	AFR	AMS	AMC	SOA	SEA	MEL	
AFR	191	179	12		4	2	5	7	5	
AMS	41	36	5			2	2	3	2	
AMC	5	2	3				1	1	1	
SOA	23	18	5					4	2	
SEA	56	48	8							4
MEL	35	28	6							

#### 4.9.2.1 Análise filogenética e rede de haplótipos de *P.falciparum* provenientes das Américas

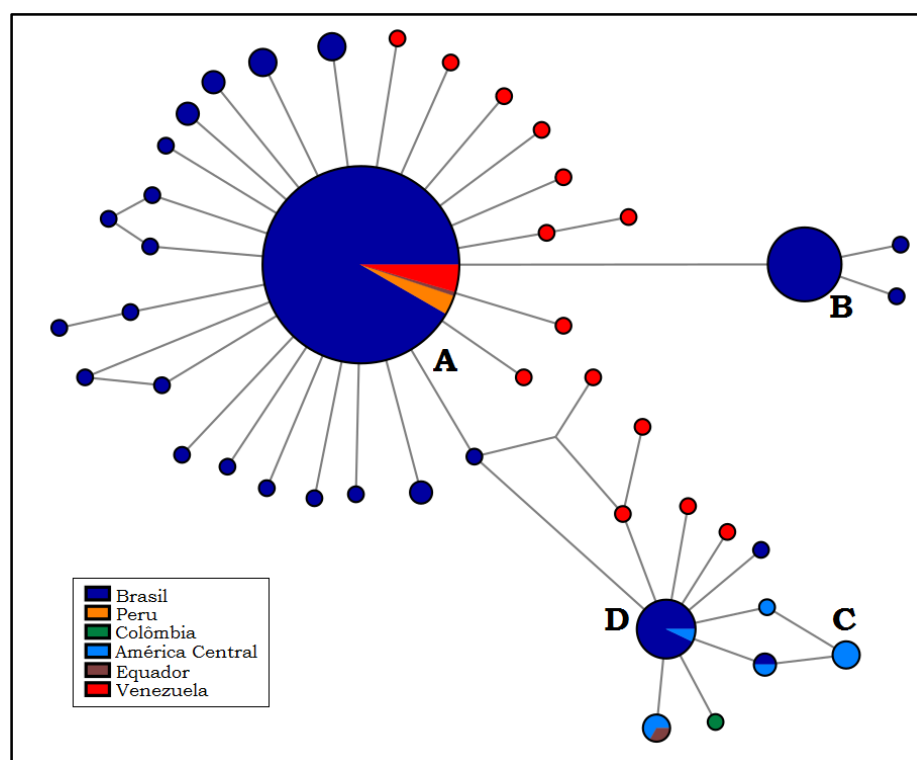
A rede de haplótipos representada na Figura 22, foi contruída com base na análise de 245 sequências do genoma mitocondrial provenientes da América do Sul (208 do Brasil, 21 da Venezuela, 5 do Peru, 2 do Equador e 1 da Colômbia) e América Central (6 do Panamá e 2 do Haiti). Com o alinhamento foi possível encontrar 58 SNPs distribuídos ao longo do genoma mitocondrial completo de *P. falciparum*. A origem geográfica dos isolados foi representada por código de cores da seguinte forma: azul escuro – Brasil, azul claro – América Central, laranja – Peru, verde – Colômbia, marrom – Equador e vermelho – Venezuela. Os isolados da América Central não foram separados para melhorar comparar com a rede de *P. vivax*.

Todos os isolados do Peru estão inseridos no Grupo A e compartilham o mesmo haplótipo com muitos isolados do Brasil (143 isolados de diferentes estados, Acre, Pará, Manaus e Rondônia), além de sete isolados da Venezuela e um do Equador.

O Grupo B, é formado predominantemente por isolados provenientes do município de Tailândia, localizado no estado do Pará (BR), enquanto que o Grupo D, contém um isolado do Panamá que compartilha haplótipo de isolados brasileiros de diferentes estados do país.

Por fim, o Grupo C é formado exclusivamente por isolados do Panamá (3). O único isolado da Colômbia, encontra-se próximo a este agrupamento, e não compartilha haplótipo com nenhum outro isolado, entretanto o segundo isolado do Equador, compartilha haplótipo com os dois isolados do Haiti (Figura 22).

**Figura 22** - Rede de haplótipos mostrando a relação entre as populações de *P. falciparum* das Américas. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de haplótipos e cada cor representa a origem geográfica: azul escuro – Brasil, azul claro – América Central, laranja – Peru, verde – Colômbia, marrom – Equador e vermelho – Venezuela.



#### 4.10 Fluxo gênico e as rotas migratórias de *P. vivax* e *P. falciparum*

As rotas migratórias de *P. vivax* e *P. falciparum* foram geradas a partir do programa Migrate-n descrito por Beerli e Felsenstein (2000). O programa emprega a teoria de coalescência para simular diferentes cenários de fluxo gênico entre as populações. Neste estudo, a análise da rota migratória foi baseada na Inferência Bayesiana para calcular a direção da migração entre as localidades amostradas. As amostras de *P. vivax* foram agrupadas em seis macrorregiões, (1) América - AME (América Central e América do Sul), (2) África - AFR, (3) Sul da Ásia - SOA (Sul da Ásia e Oriente Médio e Ásia Central), (5) Sudeste Asiático - SEA, Melanésia - MEL e (6) China/Coréia - CHK, enquanto que as amostras de *P. falciparum* foram agrupadas em cinco macrorregiões, (1) América - AME (América Central e América do Sul), (2) África - AFR, (3) Sul da Ásia - SOA, (4) Sudeste Asiático - SEA e (5) Melanésia

- MEL. As macrorregiões foram reagrupadas nesta análise, pois a análises utiliza-se do método Monte Carlo e Cadeia de Markov (Markov Chain Monte Carlo), o qual demanda um grande poder computacional quando se utiliza mais localidades.

Os genomas mitocondriais completos de ambas as espécies (*P. vivax* e *P. falciparum*) foram utilizados para comparar 19 modelos com diferentes hipóteses de rotas migratórias, sendo 11 modelos para *P. vivax* (Figura 7) e 8 modelos para *P. falciparum* (Figura 8). Todos os modelos foram gerados com diferentes parâmetros, até chegar no parâmetro ideal comum para todos os modelos, apresentado neste trabalho (ver Material e Métodos). Os modelos foram construídos levando em consideração que a América foi o último continente a ser colonizado por *Plasmodium*, logo foi considerada como fonte receptora de parasitos. A África, em todas as situações, é fonte doadora de parasitos para as Américas, pois é sabido que a colonização e o comércio transatlântico de escravos contribuíram com a migração dos parasitos para este continente (CULLETON et al., 2011; TAYLOR et al., 2013; YALCINDAG et al., 2011).

A escolha do melhor modelo foi baseada no *marginal likelihood* (*Log-Probability of the data given the model*), usando a integração termidinâmica 1b e nos valores de modelo de probabilidade (próximo a 1). Dentre os 11 modelos testados para *P. vivax*, o modelo G, foi o que melhor se ajustou aos nossos dados com o valor de integração termodinâmica (1b) igual a -15930,88 (Bezier lnL, maior valor), representado na Tabela 29. Este modelo sugere que ocorreu migração unidirecional da África (local de origem deste parasito) para os outros continentes com as primeiras migrações humanas (Figura 7, modelo G) e uma migração bidirecional África ↔ Sul da Ásia, sugerindo que a população de *P. vivax* representada atualmente na Ásia seja o resultado de *bottleneck*, ou seja, uma linhagem que migrou para o continente asiático antes da disseminação fenótipo Duffy negativo na África. Mais tarde, estes parasitos da Ásia foram re-introduzidos na África e esta miscigenação, África – Sul da Ásia, migrou para as Américas. Além disso, este modelo também sugere que as Américas foram colonizadas por parasitos da Melanésia (Figura 23).

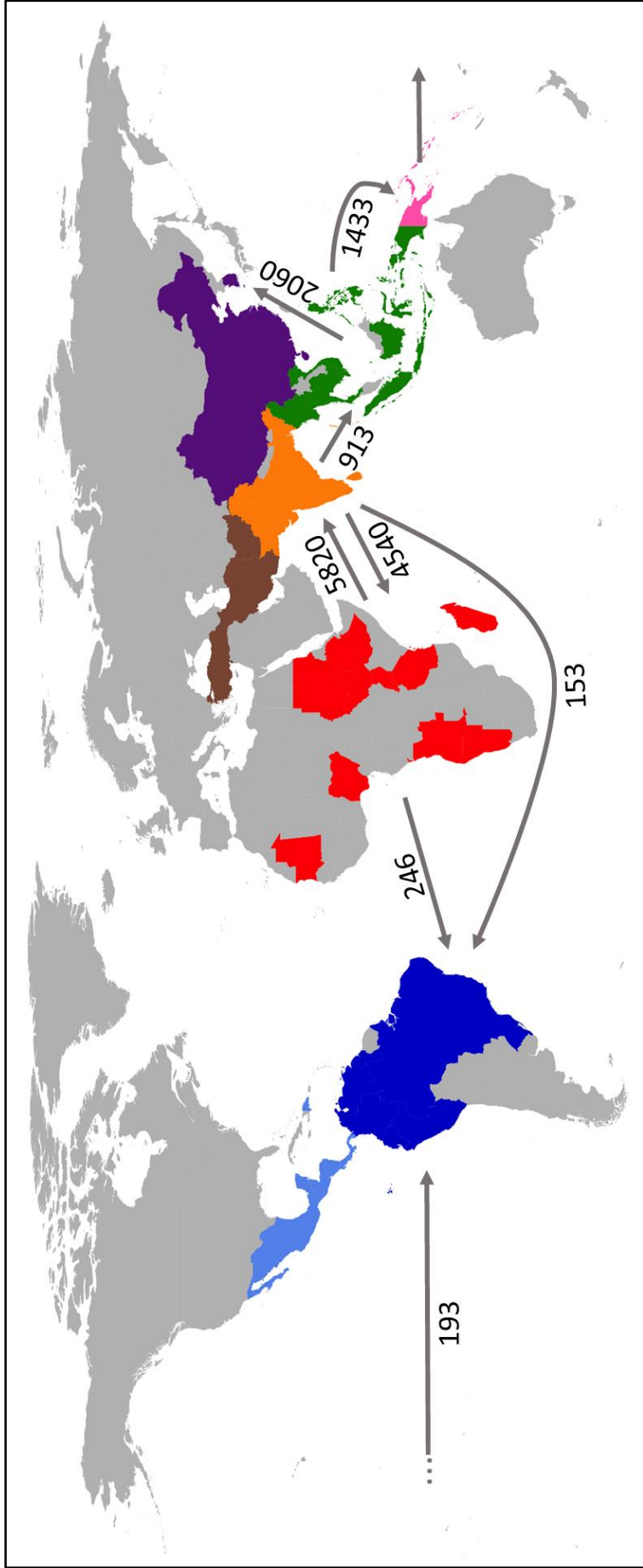


A taxa de imigração efetiva ( $M$ , que significa: taxa de imigração dividida pela taxa de mutação) foi calculada para todas as rotas migratórias (oito, Figura 7, modelo G) apresentadas neste modelos. A Figura 23 apresenta a direção e a taxa de migração, sugerindo que a África foi o continente que mais contribuiu com a colonização das Américas ( $M_{\text{África} \rightarrow \text{América}}$  246,7), seguido da Melanésia ( $M_{\text{Melanésia} \rightarrow \text{América}}$  193) e Sul da Ásia ( $M_{\text{Sul da Ásia} \rightarrow \text{América}}$  153,3).

**Tabela 29** - Resultado da comparação entre os modelos de rota migratória de *P. vivax*. O melhor modelo foi o G, segundo os valores de Bezier InL.

<b>Modelo</b>	<b>Descrição do Modelo</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>Bezier InL</b>	<b>LBF</b>	<b>Probabilidade</b>
A	Modelo A (AFR → SOA)	5 M, 6 θ	-15984,80	-53,92	0,0000000
B	Modelo B (AFR ↔ SOA)	6 M, 6 θ	-15933,73	-2,850	0,0533535
C	Modelo A + MEL →AME	6 M, 6 θ	-15958,54	-27,66	0,0000000
D	Modelo A + SOA →AME	6 M, 6 θ	-15969,08	-38,20	0,0000000
E	Modelo A + SEA →AME	6 M, 6 θ	-15980,13	-49,25	0,0000000
F	Modelo A + CKH →AME	6 M, 6 θ	-15957,98	-27,10	0,0000000
C1	Modelo B + MEL →AME	7 M, 6 θ	-15934,53	-3,65	0,0239896
D1	Modelo B + SOA →AME	7 M, 6 θ	-15938,62	-7,74	0,0003817
E1	Modelo B + SEA →AME	7 M, 6 θ	-16001,45	-70,57	0,0000000
F1	Modelo B + CKH →AME	7 M, 6 θ	-15964,90	-34,02	0,0000000
G	Modelo B + SOA →AME + MEL →AME	8 M, 6 θ	-15930,88	0,00	0,9223650

**Figura 23** - Rota migratória de *P. vivax* gerada a partir do programa Migrate-n. As setas indicam as rotas migratórias e os números representam o número efetivo de migrantes.



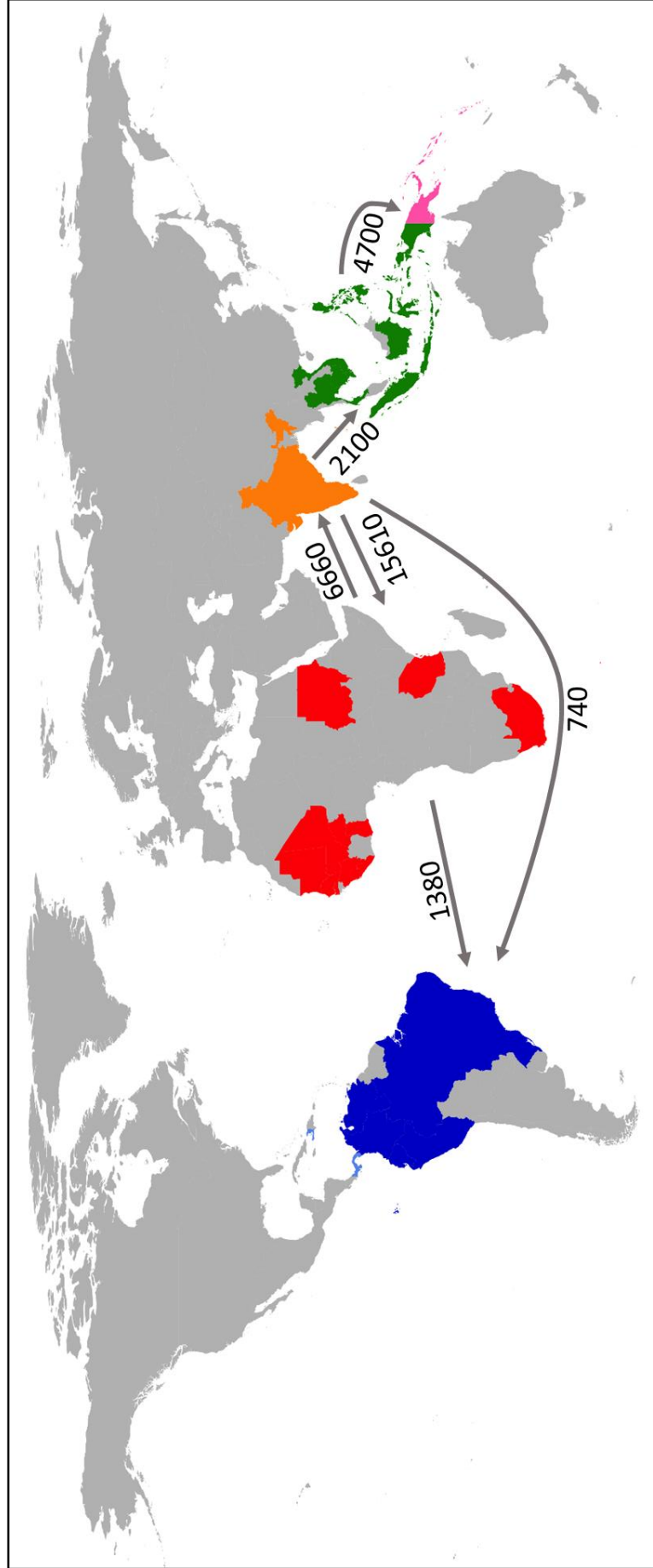
Dentre os 8 modelos testados para *P. falciparum*, o modelo C1, foi o que melhor se ajustou aos nossos dados, com o valor de integração termodinâmica (1b) igual a -14643,68 (Bezier lnL, maior valor) e modelo de probabilidade igual a 0,75143332, representado na Tabela 30. Este modelo sugere que ocorreu migração unidirecional da África (local de origem deste parasito) para os outros continentes com as primeiras migrações humanas (Figura 8, modelo C1) e uma migração bidirecional África ↔ Sul da Ásia, como relatado anteriormente.

A rota migratória, apresentada na Figura 24, sugere que a América foi colonizada por isolados de *P. falciparum* provenientes de duas regiões: África, com a maior taxa de imigração efetiva, M ( $M_{\text{África} \rightarrow \text{América}}$ : 1380,0) e Sul da Ásia, com a menor taxa de migração ( $M_{\text{Sul da Ásia} \rightarrow \text{América}}$ : 740,0). A Figura 24 apresenta a direção e a taxa de migração de todas as macrorregiões.

**Tabela 30** - Resultado da comparação entre os modelos de rota migratória de *P. falciparum*. O melhor modelo foi o C1, segundo os valores de Bezier lnL.

<b>Modelo</b>	<b>Descrição do Modelo</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>Bezier lnL</b>	<b>LBF</b>	<b>Probabilidade</b>
A	Modelo A (AFR → SOA)	4 M, 5 $\theta$	-14736,87	-93,19	0,00000000
B	Modelo A + MEL →AME	5 M, 5 $\theta$	-14782,59	-138,91	0,00000000
C	Modelo A + SOA →AME	5 M, 5 $\theta$	-14732,10	-88,42	0,00000000
D	Modelo A + SEA →AME	5 M, 5 $\theta$	-14740,11	-96,43	0,00000000
A1	Modelo A1 (AFR ↔ SOA)	5 M, 5 $\theta$	-14644,82	-1,14	0,24030838
B1	Modelo A1 + MEL →AME	6 M, 5 $\theta$	-14648,19	-4,51	0,00825825
C1	Modelo A1 + SOA →AME	6 M, 5 $\theta$	-14643,68	0	0,75143332
D1	Modelo A1 + SEA →AME	6 M, 5 $\theta$	-14660,09	-16,41	0,00000005

**Figura 24** - Rota migratória de *P. falciparum* gerada a partir do programa Migrate-n. As setas indicam as rotas migratórias e os números representam o número efetivo de migrantes.



## **5 Discussão**

---

---

### 5.1 Diversidade genética e estrutura populacional existente entre os isolados de *P. vivax* e *P. falciparum*

Para compreender diferentes aspectos da malária, é fundamental estudar e estimar a diversidade genética e inferir a história evolutiva dos genes e das populações destes parasitas. Estes estudos fornecem indícios importantes relacionados a estrutura populacional, que descrevem e quantificam como os alelos estão espacialmente dispersos e como a diversidade genética global está organizada, além de identificar antígenos candidatos a vacina e genes associados a resistência a medicamentos. Além disso, essas informações são importantes para detectar casos importados de malária e para verificar a eficácia de medidas de controle local da doença.

Neste estudo, analisamos a diversidade genética global, baseado em genoma mitocondrial, existente entre os isolados de *P. vivax* (941) e *P. falciparum* (1795) através de três diferentes índices de diversidade: nucleotídica ( $\pi$ ), haplotípica ( $Hd$ ), e por sequência ( $\theta_w$ ). Em todos os testes, os isolados de *P. vivax* apresentaram-se mais diversos quando comparado com os isolados de *P. falciparum*, o que vai ao encontro com os dados previamente demonstrado por Neafsey et al. (2012), Jennison et al. (2015) e Hupaló et al., (2016). Todos os pesquisadores comparam a diversidade genética existente entre as duas espécies através de diferentes marcadores moleculares. O primeiro, sugeriu que *P. vivax* era mais diverso geneticamente que *P. falciparum* ao analisar o sequenciamento do genoma completo de seis isolados de *P. vivax* e seis de *P. falciparum* provenientes de diferentes regiões do mundo, América Latina, Sul da Ásia, Leste da Ásia e África, enquanto que o segundo, sugeriu tal diversidade, através de dados de microssatélites provenientes de isolados circulantes em uma mesma região, Papua Nova Guiné. Já o terceiro, realizou o sequenciamento do genoma nuclear completo de 182 isolados de *P. vivax* de 11 países diferentes e comparou com os isolados de *P. falciparum* disponíveis na literatura. Tal fenômeno pode ter duas explicações: a taxa de mutação do *P. vivax* é maior que a do *P. falciparum* ou *P. vivax* adaptou-se aos seres humanos há mais tempo e, portanto, acumulou ao longo dos anos de evolução um maior número de polimorfismos.



A estrutura populacional de *P. vivax* foi analisada combinando o genoma mitocondrial completo de 805 isolados depositados no GenBank (CORNEJO; ESCALANTE, 2006; CULLETON et al., 2011; IWAGAMI et al., 2010; JONGWUSTIWES et al., 2005; MU et al., 2005, TAYLOR et al., 2013) com os 136 sequenciados neste estudo. A topologia da rede de haplótipos gerada pela metodologia de *median-joining* (Figura 16) é um espelho da árvore filogenética obtida por inferência bayesiana (Figura 15), onde foi possível observar que os polimorfismos do genoma mitocondrial permitem agrupar as amostras de *P. vivax* de acordo com as seguintes regiões: (a) África, Sul da Ásia e Oriente Médio/Ásia Central, (b) Sudeste Asiático, (c) Melanésia, (d) América (América Central/México e do Sul) e (e) China/Coréia. A rede de haplótipo deste estudo apresenta um quadro semelhante previamente observado por Mu et al. (2005), Cornejo; Escalante (2006) e Taylor et al. (2013), 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. 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).

Estudos publicados nos últimos dez anos baseados em genoma mitocondrial de *P. vivax*, tem questionado a origem africana deste parasito, sugerindo que a população de *P. vivax* representada atualmente na Ásia seja o resultado de *bottleneck*, ou seja, uma linhagem que migrou para o continente asiático antes da disseminação fenótipo Duffy negativo na África (LIU et al., 2014; LOY et al., 2017). Estes parasitos agora asiáticos poderiam ter sido re-introduzidos na África, principalmente na região de Madagascar e na África Oriental através da migração humana, por comerciantes indianos (CULLETON et al., 2011). Esta hipótese parece viável uma vez que os isolados africanos e do Sul da Ásia compartilham o mesmo haplótipo (Figura 16), tornando-se difícil a separação geográfica com base nas informações genéticas. Além disso,

explicaria a baixa diversidade genética presente na África, pois a re-introdução de malária vivax na África Oriental por imigrantes do Sul da Ásia, ocorreu em algumas centenas de anos, não havendo tempo hábil para acumular mutações e gerar uma alta diversidade genética (CULLETON et al., 2011).

Curiosamente, a América apresentou uma diversidade genética relativamente alta, comparada com a Melanésia e Sul da Ásia, o que vai ao encontro com os dados previamente publicado por Taylor et al. (2013). Até o presente momento não há suporte científico que explique esta alta diversidade, mas há especulações de que a malária vivax foi introduzida neste continente em momentos distintos e de diferentes regiões, sendo provavelmente trazidas por africanos junto com o comércio transatlântico de escravos e europeus durante a era colonial. Entretanto, existe a possibilidade de uma introdução muito mais antiga, simultânea com as primeiras migrações humanas (CARTER, 2003; GELABERT et al., 2016; LLAMAS et al., 2016). Logo, a alta diversidade genética no continente americano pode ser consequência de múltiplas introduções de *P. vivax*.

Em *P. falciparum*, a estrutura populacional apresenta um padrão semelhante quando comparado com *P. vivax*, onde os polimorfismos presentes no genoma mitocondrial completo permitiram agrupar os isolados de acordo com as seguintes regiões: (a) África, (b) América do Sul, (c) Sudeste Asiático e (d) Melanésia. Entretanto, existem dois agrupamentos que compartilham haplótipos com isolados de diferentes regiões, o primeiro, Sudeste Asiático e Melanésia (Grupo C, Figura 20 e 21) e o segundo, que parece ter sido o centro de irradiação (Grupo A, Figura 20 e 21), com predomínio dos isolados africanos, mas também de as outras regiões, Melanésia, Sudeste Asiático, Sul da Ásia e América. A disposição dos isolados na rede de haplótipo deste estudo foi muito similar ao publicado por Tyagi e colaboradores (2014), no entanto, o número amostral usado na análise de Tyagi foi muito inferior ao nosso, 141 *versus* 1.795 sequências. Em ambos estudos, a maior diversidade genética encontrada foi entre os isolados do Sul da Ásia (todos representados pela Índia) e a menor entre os isolados da América do Sul, sugerindo que este foi o último continente a ser colonizado por *P. falciparum*. Além disso, a rede de haplótipos, sugere que na espécie de *P. falciparum*, há uma clara divergência

entre os parasitos do Velho Mundo e os do Novo Mundo, já que os isolados americanos são representados quase que exclusivamente por dois haplótipos e não há uma mistura genética com outras regiões.

Algumas hipóteses têm sido propostas para explicar a baixa diversidade genética encontrada nos isolados de *P. falciparum* do Novo Mundo, sugerindo que este parasito pode ter sido selecionado em ambos hospedeiros, humanos e mosquito. Chamou a atenção dos pesquisadores um gene localizado no cromossomo 13 e identificado como *Pfs47*. Os resultados do sequenciamento deste gene mostram que, enquanto há uma grande variedade de polimorfismos para o gene *Pfs47* nos parasitos africanos, nos espécimes do Novo Mundo praticamente não há variação nesse gene. Tal dado indica que ocorreu um fenômeno que chamamos de *selective sweep*. Ao chegar às Américas, a espécie teve de se adaptar aos vetores aqui existentes e apenas os parasitos que tinham um determinado polimorfismo, que permitia escapar da resposta imune desse novo mosquito, sobreviveram (MOLINA-CRUZ et al., 2013; MOLINA-CRUZ; BARILLAS-MURY, 2014; RAMPHUL et al., 2015). Mas há muitos cientistas que não acreditam que um único gene seja responsável por todo um processo biológico complexo como a adaptação a um vetor completamente diferente. É provável que o *Pfs47* não seja o fator crucial para esta seleção.

Outra hipótese esta relacionada ao uso generalizado da droga cloroquina e uma combinação de dose fixa sulfadoxina-pirimetamina (SP), sugerindo que a resistência a estes medicamentos pode ter reduzido a diversidade genética de *P. falciparum* (MITA et al., 2011; WOOTTO et al., 2002). Na década de 40, durante a Segunda Guerra Mundial, a cloroquina foi introduzida, pois era capaz de eliminar as quatro espécies de plasmódios que causavam malária em seres humanos. Nesta época os pesquisadores acreditavam que a doença estava sob controle, já que a droga não apresentava efeitos colaterais e era capaz de curar. Na década de 60 entrou em prática no Brasil o método do “sal cloroquinado”, no estado do Pará e Amazonas, cujo o consumo deveria ser generalizado pela população como medida profilática contra a malária. Pouco tempo depois, começou-se a observar, principalmente na América do Sul e no Sudeste Asiático a resistência a cloroquina, e então a

medida profilática foi suspensa no Brasil. O primeiro relato da falha de cloroquina na eliminação de infecções por *P. falciparum* no Brasil, apresentado em uma conferência médica nacional em 1954, atraiu relativamente pouca atenção (de SOUZA, 1992), mas publicações posteriores documentaram a resistência à cloroquina no Brasil (RODRIGUES, 1961; SILVA, 1961) e na Colômbia (MOORE; LANIER, 1961). No início dos anos 60 foram identificadas pelo menos duas populações fundadoras resistentes a cloroquina nesta região, uma que circula na Bacia Amazônica do Brasil e Peru e a segunda no Equador e na Colômbia (WOOTTON et al., 2002). A resistência à cloroquina tornou-se generalizada em toda a Bacia Amazônica em meados da década de 1980 (CORTESE et al., 2002), quando os casos de malária estavam em ascensão associados a projetos de colonização e mudanças ambientais na região.

A sulfadoxina-pirimetamina (SP), estava disponível no Brasil desde os anos 60 para tratar a malária falciparum resistente a cloroquina (WALKER; LOPEZ-ANTUNANO, 1968). As cepas de *P. falciparum* resistentes ao SP emergiram dentro de alguns anos, sendo documentadas pela primeira vez na região Centro-Oeste em 1972 (ALMEIDA-NETTO, OLIVEIRA, SAMPAIO, 1972). No final da década de 1980, SP não conseguia curar mais de 90% das infecções por *P. falciparum* na Amazônia (de SOUZA, 1992) e, desde 1990, a SP já não é recomendada para a quimioterapia da malária no Brasil (de SOUZA, 1992).

Baseado nestas informações, até o presente momento não há suporte científico que evidencie a verdadeira hipótese relacionada a baixa diversidade genética de *P. falciparum*, mas pode ser que ambas as hipóteses, relatadas a cima, tenham contribuído para este fenômeno.

## **5.2 Malária nas Américas: introdução precoce ou tardia**

Por várias décadas, estudiosos tem-se questionado se a malária humana estava presente nas Américas antes ou depois da colonização européia (BRUCE-CHWATT, 1965; CARTER; MENDIS, 2002; de CASTRO; SINGER, 2005; CORMIER, 2010). Existem hipóteses que afirmam que a introdução deste parasito no continente americano aconteceu em

diferentes momentos, pré-colonização juntamente com a migração humana e pós-colonização, com a vinda dos europeus para as Américas e com o comércio transatlântico de escravos africanos.

Neste estudo analisamos o genoma mitocondrial completo de *P. vivax* e *P. falciparum* provenientes de todas as regiões endêmicas para essas espécies, para comparar as vias e rotas de introdução destes parasitos nas Américas.

### 5.2.1 Rotas migratórias e dispersão de *P. vivax* nas Américas

Dada a recente evidência da origem de *P. vivax* na África (LIU et al., 2014; LOY et al., 2017), tem sido proposto que as populações de *P. vivax* do Novo Mundo foram fundadas na era colonial por uma população de parasitos europeus que agora estão erradicados (CULLETON et al., 2011). No entanto, os dados genéticos mostram que nas Américas existe uma grande diversidade genética quando comparada com os outros continentes, sugerindo que este continente foi provavelmente colonizado pelo parasito em momentos diferentes, explicando a diversidade genética existente (TAYLOR et al., 2013).

Com base no alinhamento de 941 isolados de *P. vivax*, construímos uma rede de haplótipos com o intuito de estimar a distância evolutiva entre os haplótipos e analisar a proximidade genética entre as regiões geográficas onde esta espécie é endêmica, principalmente nas Américas. A Figura 16 apresentada neste estudo, sugere que a população americana de *P. vivax* tem uma grande proximidade genética com os isolados da África, Sul da Ásia e Melanésia, sendo impossível distinguir geneticamente os isolados do Sul da Ásia e África, assim como os da América Central e América do Sul. Os valores de  $F_{st}$  apresentados neste estudo, estão de acordo com esses achados, sugerindo que estas populações (África e Sul da Ásia, e América Central e do Sul) são parecidas geneticamente e com frequências alélicas idênticas.

A proximidade genética dos isolados americanos com os africanos, sul asiáticos e melanésios, foi confirmada com a rota migratória traçada a partir da teoria da coalescência simulada com diferentes cenários de fluxo gênico entre as populações. A rota migratória apresentada na Figura 23, afirma que *P. vivax* presente atualmente na África é resultado de uma possível re-

introdução do Sul da Ásia, explicando a baixa diversidade genética do continente africano, além da identidade entre os isolados destas regiões. Além disso, a rota migratória sugere que o continente americano foi colonizado em diferentes momentos (pré e pós colombianos) e por parasitos de diferentes regiões – África, Sul da Ásia e Melanésia – explicando a alta diversidade genética existente neste continente (CULLETON, et al., 2011; KRIEF et al., 2010; TAYLOR et al., 2013).

Infelizmente, em nossas análises não há nenhum isolados de *P. vivax* proveniente da Europa, no entanto, Gelabert e colaboradores (2016) publicaram um estudo baseado no genoma mitocondrial, mostrando a relação genética existente entre os isolados americanos e o isolado europeu, coletado na Espanha, sequenciado pelo seu grupo. Segundo os autores, o isolado europeu apresentou um único SNP que o diferenciou dos demais isolados americanos. Ao comparar este resultado com o encontrado em nosso estudo, é possível sugerir que o isolado europeu agruparia-se próximo aos isolados americanos na rede de haplótipos (Figura 16, Grupo D e E). Este achado nos leva a acreditar que a Europa foi uma provável fonte de parasitos para as Américas durante o período colonial, onde Portugal e Espanha certamente teriam disseminado *P. vivax* para onde quer que em suas viagens houvessem vetores *Anopheles* competentes, como *An. freeborni* na América do Norte, *An. albimanus* na América Central e *An. darlingi* na América do Sul (LAPORTA et al., 2015).

Vale a pena ressaltar que a colonização européia foi a principal responsável pelo comércio transatlântico de escravos africanos. Desta forma, durante a colonização muito escravos de diferentes países da África chegaram as Américas e conseqüentemente trouxeram consigo o *P. vivax*. O ciclo de vida do parasito pode ter sido crucial para o sucesso na viagem, pois no organismo hospedeiro, o protozoário se instala inicialmente nas células do fígado, nas quais amadurece e se multiplica, antes de ganhar a corrente sanguínea. Também no fígado alguns exemplares do *P. vivax* entram em estágio dormente, com baixa atividade metabólica, podendo permanecer nesse estágio por meses, até despertar, multiplicar-se e ganhar a corrente sanguínea

novamente. Isso lhe daria tempo suficiente para fazer a travessia do Atlântico e chegar em plena atividade ao novo continente (CARTER, 2003).

Além destas rotas descritas acima, é possível que *P. vivax* chegou nas Américas muito antes da era colonial, com a migração humana, vindo da Melanésia. Raghavan e colaboradores (2015) afirmam que os primeiros humanos chegaram às Américas em duas levas migratórias. A primeira, sugere que os humanos teriam partido do leste da Ásia e alcançado o Novo Mundo depois de ter permanecido por um longo período na Beríngia, uma vasta extensão de terras (hoje submersa) que conectava a Sibéria, na Ásia, ao Alasca, na América do Norte. A segunda leva, sugere que os humanos migraram da Austrália e Melanésia e foram miscigenados com populações asiáticas, que mais tarde, teriam entrado nas Américas a partir das ilhas Aleutas. O grupo chegou a esta conclusão depois de sequenciar o genoma de 31 indivíduos americanos nativos da Sibéria e da Oceania e comparar com os genomas de 23 indivíduos extintos das Américas do Norte e do Sul.

Baseado na hipótese de uma introdução pré-colombiana, Carter em 2003, sugeriu que a introdução de *P. vivax* nas Américas pode ter acontecido antes da era colonial, trazida com a população humana migrante da Ásia. Além disto, o pesquisador sugeriu que *P. vivax* atingiu as Américas através do oceano, em populações que cruzaram o Oceano Pacífico, na qual a passagem pelo mar teria de ter sido concluída durante uma única infecção por *P. vivax*, ou seja, provavelmente dentro de um ou dois anos, permitindo as infecções por recaídas de hipnozoítos.

### 5.2.2 Rotas migratórias e dispersão de *P. falciparum* nas Américas

Estudos publicados nos últimos anos têm confirmado que *P. falciparum* originou-se na África e dispersou-se por todo o mundo com a migração humana (KRIEF et al., 2010; LIU et al., 2010; LOY et al., 2017; SNOW et al., 2005). Até o presente momento, não há suporte científico que evidencie a chegada de *P. falciparum* nas Américas, mas há hipóteses de que este parasito foi introduzido neste continente durante a colonização dos europeus e do comércio transatlântico de escravos africanos.

Neste estudo, para inferir a rota migratória e a origem de *P. falciparum* nas Américas, sequenciamos o genoma mitocondrial completo de 1.795 isolados de todos os continentes onde a malária falciparum é endêmica – África, Sul da Ásia, Sudeste Asiático, Melanésia e Américas. A rede de haplótipos, apresentada na Figura 21, sugere que a população americana de *P. falciparum* está próxima geneticamente da população africana, no entanto os isolados provenientes da América Central estão alocados junto com os isolados de origem díspares e os isolados da América do Sul estão todos agrupados, formando uma população única e diferente das demais, ou seja, a população da América do Sul (predomínio dos isolados brasileiros e pouco venezuelanos) e América Central são diferentes geneticamente, ao contrário do que foi encontrado com os isolados de *P. vivax*. A diferença encontrada entre a maioria dos os isolados de *P. falciparum* da América do Sul, é suportado pelos valores de *Fst* analisados neste estudo, no qual a população sul-americana é muito distante geneticamente das demais.

A proximidade genética dos isolados sul-americanos com os africanos, descrita a rede de haplótipos, também foi confirmada com a rota migratória (Figura 24), que sugere que os isolados de *P. falciparum* foram introduzidos nas Américas por duas regiões distintas, África e Sul da Ásia.

Há hipótese sugerindo que a propagação de *P. falciparum* ocorreu com os seres humanos, populações de *Homo sapiens*, que migraram da África para Ásia em associação com o surgimento de sociedades agrícolas e o aumento da transmissão de mosquito (HUME; LYONS; DAY KP, 2003), seguindo para o Oriente Médio, Europa, Ilhas do Pacífico e finalmente para as Américas (TANABE et al., 2010).

O cenário mais aceito da origem de *P. falciparum* nas Américas postula a introdução do parasito através da colonização dos europeus e do comércio transatlântico de escravos africanos, que ocorreu durante 300 anos seguintes a primeira colonização européia (HUME; LYONS; DAY KP, 2003). Vários estudos genéticos apoiam esta hipótese, no entanto, todos os estudos apresentaram evidências limitadas, número limitado de isolados, poucas áreas amostradas na América do Sul, ou pequeno número de marcadores genéticos (ANDERSON et al., 2000; NEAFSEY et al., 2008). O DNA



mitocondrial mostrou uma clara ligação entre haplótipos africanos e sul-americanos (JOY et al., 2003), consistente com a introdução recente dos patógenos através do comércio de escravos.

Estudo baseado em marcadores microssatélites mostrou que a população de *P. falciparum* nas Américas é derivada da população da África. Além disso, o grupo afirma que a população americana está dividida em duas “subpopulações”, um aglomerado genético ao norte compreendendo a população da Colômbia e outro aglomerado ao sul, com predomínio de amostras do Brasil, Bolívia e Guiana Francesa (YALCINDAG et al., 2011). Estas divisões nas Américas sugerem fortemente que os agrupamentos do Norte e Sul foram introduzidos durante o tráfico transatlântico de escravos em eventos independentes de introdução de *P. falciparum* nas Américas, já que entre os séculos XVI e XIX, a América foi 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. Durante este período, quase cinco milhões de escravos africanos foram trazidos para o Brasil e desembarcados em dois portos principais: Rio de Janeiro e Bahia. O império Espanhol transportou a maioria dos escravos para as colônias da Índias Ocidentais (Jamaica, Cuba e outras ilhas), mas alguns também foram desembarcados na América Central e do Sul (YALCINDAG et al., 2011).

### **5.3 Relação genética entre isolados de *P. simium* e *P. vivax***

O impacto e a interação da malária de primatas não humanos na dinâmica de transmissão da malária humana em áreas onde ambos hospedeiros coexistem ainda não são bem esclarecidas. No Brasil, os estudos de malária simiana iniciaram-se a partir da década de 60, logo após o primeiro relato de infecção humana por um parasito natural de macacos, o *P. cynomolgi* (DEANE, 1992; DUARTE et al., 2006). Dois parasitos das florestas brasileiras, o *P. brasilianum*, na região amazônica e o *P. simium*, nas regiões de Mata Atlântica do sudeste e sul do país, causam infecção malárica em primatas neotropicais, sendo capazes de infectar macacos das famílias *Cebidae* e

*Atelidae*. Das espécies que circulam no país, *P. simium* é semelhante ao parasito que infecta os humanos, *P. vivax*, e o *P. brasilianum* semelhante ao *P. malariae*, tanto em nível morfológico e imunológico, quanto genético (ARAÚJO et al., 2013; COATNEY, 1971; DEANE, 1992; DE ARRUDA et al., 1989; DUARTE et al., 2006; ESCALANTE et al., 1995; YAMASAKI et al., 2011).

Neste estudo foi sequenciado o genoma mitocondrial completo de nove isolados de *P. simium* coletados em diferentes regiões da Mata Atlântica brasileira, nos municípios de São Paulo (SP), Indaial (SC), e Viamão (RS). Além destes, 22 isolados de *P. vivax* provenientes do estado do Espírito Santo, região de Mata Atlântica (Tabela 25), tiveram o genoma mitocondrial completo sequenciado e foram combinados com os publicados na literatura. O principal objetivo foi investigar a existência da relação genética entre isolados de *P. simium* e *P. vivax*, coletados em macacos neotropicais e humanos, respectivamente, e inferir a direção da transmissão lateral, ou seja, inferir se 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.

O alinhamento do genoma mitocondrial de 931 isolados de *P. vivax* e 10 isolados de *P. simium* (9 sequenciados neste estudo e 1 disponível no GenBank), apresentou alta similaridade genética entre as duas espécies, vista pela rede de haplótipos (Figura 16 e Figura 17), onde *P. vivax* e *P. simium* compartilham o mesmo haplótipo (Figura 18). Estes resultados concordam com outros achados na literatura, sugerindo que estas espécies são muito próximas do ponto de vista genético e evolutivo (ESCALANTE et al., 1995, 1998; FANDEUR et al., 2000; GOLDMAN et al., 1993; LECLERC et al., 2004; LI et al., 2001; TAZI; AYALA, 2011). Tazi e Ayala (2011) estudaram as relações filogenéticas entre os parasitos humanos geneticamente próximos dos parasitos que infectam primatas neotropicais (*P. vivax* e *P. simium*, respectivamente). Estes autores utilizaram dois genes nucleares e um gene mitocondrial em suas análises, CSP, 18S e cytb, sugerindo que o *P. simium* é geneticamente semelhante ao *P. vivax*. Além disso, Lim e colaboradores (2005) estudaram duas cepas de *P. simium* e sugeriram que as sequências do gene CSP são geneticamente indistinguíveis das 24 cepas de *P. vivax*.

A similaridade genética entre os isolados de *P. simium* e *P. vivax*, também foi observado em estudos relacionados ao gene *Duffy Binding Protein* (*dbp*). Costa e colaboradores (2015) realizaram análises filogenéticas com haplótipos de *P. simium* e *P. vivax* e demonstraram que *P. simium* foi agrupado em um clado único, devido a três sítios segregantes conservados nesta espécie. Porém, mesmo com alguns sítios segregantes, *P. simium* apresentou alta similaridade genética com *P. vivax*. Este grupo também demonstrou que ao comparar as sequências de *P. vivax* e *P. simium*, a diversidade nucleotídica entre as sequências foi menor para *P. simium*.

Neste estudo, a rede de haplótipos (Figura 16), sugere que os isolados de *P. simium* apresentaram uma menor diversidade genética quando comparado com os isolados de *P. vivax*. A comparação foi feita em nível global, ou seja, as sequências de *P. simium* foram alinhadas e agrupadas com todas as sequências de *P. vivax* disponíveis até o presente momento. A rede de haplótipos sugere que todos os isolados *P. simium* compartilham haplótipos com os isolados de *P. vivax* provenientes da Mata Atlântica, mas nem todos os isolados da Mata Atlântica compartilham haplótipos com *P. simium* (Figura 18), ou seja, alguns isolados de *P. vivax* provenientes da Mata Atlântica são diferentes geneticamente quando comparado com *P. simium*.

Além disso, o agrupamento do genoma mitocondrial permitiu observar que dois isolados de *P. vivax* da Mata Atlântica (40MT e 103\_03MT) são geneticamente idênticos aos coletados na América do Sul e América Central (Grupo E, Figura 16), sugerindo que estas duas amostras da mata Atlântica são resultados de infecção importada.

O alinhamento do genoma mitocondrial completo dos isolados brasileiros permitiu observar que apenas cinco polimorfismos foram únicos entre os isolados da Mata Atlântica, isto é, cinco SNPs não são compartilhados com isolados provenientes da região Amazônica, enquanto que, 83 SNPs foram exclusivos da Floresta Amazônica (Figura 19). Assim, é possível afirmar que os isolados de *P. vivax* provenientes da Floresta Amazônica são mais diversos geneticamente quando comparados com os isolados da Mata Atlântica e os isolados de Mata Atlântica coletados em hospedeiros humanos apresentaram

maior diversidade genética do que os coletados em primatas não humanos (*P. simium*).

O tempo do ancestral comum mais recente (TMRCA) foi estimado entre os principais clados brasileiros com suporte estatístico, Figura 15, (Mata Atlântica, clado F e G e Floresta Amazônica, clado A e B), sugerindo que o clado da Floresta Amazônica (isolados de *P. vivax*), apresentou o maior TMRCA (32.487), enquanto que o clado da Mata Atlântica (isolados de *P. vivax* e *P. simium*) o menor (23.440).

Baseados nestes dados, é possível afirmar que *P. vivax* apresenta uma grande diversidade genética nas Américas, sugerindo que este continente foi provavelmente colonizado pelo parasito em momentos diferentes, infectando primeiramente os seres humanos (maior diversidade genética) e transmitindo *P. vivax* aos macacos do Novo Mundo (a direção da transmissão lateral foi de humanos para macacos) a partir do convívio em simpatia, uma vez que o vetor *An. cruzii* é capaz de realizar o repasto sanguíneo tanto próximo das copas das árvores quanto ao nível do solo (dispersão vertical), sugerindo que a malária na Mata Atlântica seja possivelmente uma zoonose, pois possibilita a transmissão entre humanos e símios (DUARTE et al., 2013; MARRELLI et al., 2007, NEVES et al., 2013; UENO et al., 2007).

Estudos publicados nos últimos quinze anos mostraram a relação existente entre os isolados de *P. vivax* e *P. simium* e discutiram diferentes hipóteses da direção da transmissão lateral, humanos para macacos ou vice-versa (Tabela 31).

Li e colaboradores (2001) publicaram um estudo baseado em análise filogenética afirmando que *P. simium*, parasita de macacos americanos, não se agrupa com *P. vivax* das Américas, mas com populações de *P. vivax* da África e Ásia. Além disso, Li e colaboradores (2001) sugerem que a introdução de *P. vivax* nas Américas parece ter acontecido pelo menos em duas ocasiões distintas. Uma dessas entradas provavelmente teria sido via Ásia (Sudeste Asiático), atualmente representando as populações de *P. simium* que infectam macacos do Novo Mundo, sugerindo que a direção transmissão lateral ocorreu de macacos para humanos. No entanto, o *P. vivax* das populações humanas americanas atuais parece ser de uma fonte diferente. Por razões geográficas e

históricas recentes, um candidato provável para essa fonte é a Europa Ocidental, já que Portugal e Espanha eram endêmicos para malária vivax durante o período colonial americano (CARTER et al., 2003; LI et al., 2001).

Outra hipótese sugerida é que *P. vivax* poderia ter sido introduzido nas Américas no século XIX, a partir da migração de chineses aos arredores do Rio de Janeiro, coincidindo com a distribuição geográfica de macacos na Mata Atlântica, sugerindo que pode ter sido introduzida primeiramente em macacos neotropicais e transmitida aos seres humanos, através da picada do mosquito *An. cruzii*. Este é um cenário 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 (COMIER, 2010).

Em 2011, Tazi e Ayala, publicaram um estudo afirmando que *P. simium* pode ter sido originado de *P. vivax* e que este foi introduzido nas Américas no século XVI com a colonização dos europeus, onde a transferência de hospedeiro entre humanos e macacos no Novo Mundo pode ter ocorrido duas vezes, com o cenário plausível que *P. vivax* foi introduzido primeiramente em macacos do Novo Mundo e depois transmitido aos seres humanos a partir do convívio em simpatria, através do repasto sanguíneos do mosquito anofelino.

Baseado em nossos resultados, podemos afirmar que todas as hipóteses acima mencionadas não estão de acordo com os fatos abordados pelo nosso grupo. Vale a pena ressaltar que os nossos dados foram gerados a partir do genoma mitocondrial completo e o número amostral para comparar as duas “espécies” foi maior do que os trabalhos previamente publicados.

**Tabela 31** - Relação existente entre os isolados de *P. vivax* e *P. simium* e diferentes hipóteses da direção da transmissão lateral, humanos para macacos ou vice-versa, disponíveis na literatura.

<b>Autor</b>	<b>Hipóteses</b>
Li et al. (2001)	<i>P. simium</i> que infectam macacos neotropicais, são geneticamente idênticos a parasitas que infectam humanos ( <i>P. vivax</i> ) no Sudeste Asiático, sugerindo que os isolados presente nos macacos do Novo Mundo foi resultado de uma transmissão lateral durante a evolução de <i>P. simium</i> (humanos (Velho Mundo) → macacos (Novo Mundo)). <i>P. vivax</i> do Novo Mundo e <i>P. simium</i> são diferentes geneticamente e não foram originados de uma mesma fonte de introdução, portanto os parasitas presentes hoje nas Américas são resultados de duas introduções distintas de diferentes localidades geográficas.
Comier, (2010)	<i>P. vivax</i> foi introduzido primeiramente aos macacos do Novo Mundo no século 19, durante a migração de chineses aos arredores do Rio de Janeiro, sugerindo que a malária-vivax pode ter infectado primeiro os macacos e transmitida aos seres humanos através da picada do mosquito <i>An. cruzii</i> .
Tazi e Ayala (2011)	<i>P. vivax</i> foi introduzido aos macacos do Novo Mundo com a colonização dos Europeus e transmitida para os seres humanos durante o repasto sanguíneo do mosquito anofelino.

## **6 Conclusão**

---

---

Com os resultados deste trabalho podemos concluir que:

1. Com base nos genomas mitocondriais dos isolados de *P. vivax* (941) e *P. falciparum* (1795) podemos concluir que os isolados de *P. vivax* apresentaram-se mais diversos geneticamente quando comparado com os isolados de *P. falciparum*.

2. Os polimorfismos do genoma mitocondrial de *P. vivax* permitiram agrupar as amostras de acordo com as seguintes regiões: (a) África, Sul da Ásia e Oriente Médio/Ásia Central, (b) Sudeste Asiático, (c) Melanésia, (d) América (América Central/México e do Sul) e (e) China/Coréia, enquanto que os polimorfismos de *P. falciparum* permitiram agrupar os isolados nas seguintes regiões: (a) África, (b) América do Sul, (c) Sudeste Asiático e (d) Melanésia.

3. As rotas migratórias de *P. vivax* sugere que o continente americano foi colonizado em diferentes momentos (pré e pós-colombianos) e por parasitos de diferentes regiões – África, Sul da Ásia e Melanésia – explicando a alta diversidade genética existente neste continente, enquanto que *P. falciparum* foi introduzido nas Américas por duas regiões distintas, África e Sul Ásia.

4. O alinhamento do genoma mitocondrial de 931 isolados de *P. vivax* e 10 isolados de *P. simium* (9 sequenciados neste estudo e 1 disponível no GenBank), apresentou alta similaridade genética entre as duas espécies, no entanto os isolados de *P. simium* apresentaram uma menor diversidade genética quando comparado com os isolados de *P. vivax*, sugerindo que este continente foi provavelmente colonizado por estes parasitos em momentos diferentes, infectando primeiramente os seres humanos (maior diversidade genética) e transmitindo o *P. vivax* aos macacos do Novo Mundo (a direção da transmissão lateral foi de humanos para macacos) a partir do convívio em simpatia, uma vez que o vetor *An. cruzii* é capaz de realizar o repasto sanguíneo tanto próximo das copas das árvores quanto ao nível do solo (dispersão vertical), sugerindo que a malária na Mata Atlântica seja possivelmente uma zoonose, pois possibilita a transmissão entre humanos e símios.



## **Referências<sup>1</sup>**

---

---

ALBUQUERQUE, B. C. J.; SUÁREZ-MUTIS, M. C. A malária no Amazonas. In: **Espaço e doença: um olhar sobre o Amazonas**. FIOCRUZ. v. 20, n. 5, p. 2-10, 1998.

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.

ALMEIDA-NETTO, J. C.; OLIVEIRA, G. S. C.; SAMPAIO, J. A. A. Resistência do *Plasmodium falciparum* à associação sulfamidicos-antifólicos na Região Centro-Oeste do Brasil. Dados referentes ao estudo de 104 casos. **Rev. Patol. Trop.**, v. 1, p. 385-393, 1972.

ARAÚJO, M. S.; MESSIAS, M. R.; FIGUEIRÓ, M. R.; GIL, L. H.; PROBST, C. M.; VIDAL, N. M.; KATSURAGAWA, T. H.; KRIEGER, M. A.; SILVA, L. H.; OZAKI, L. S. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infection? **Acta Trop.**, v. 2, n. 1, p. 179-185, 2008.

ARRUDA, M.; NARDIN, E. H.; NUSSENZWEIG, R. S.; COCHRANE, A. H. Sero-epidemiological studies of malaria in indian tribes and monkeys of the Amazon basin of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.41, n. 4, p. 379-385, 1989.

BEERLI, P.; FELSENSTEIN, J. Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. **Genetics**, v. 152, p. 763-773, 2000.

BRUCE-CHWATT, L. J. Malaria research for malaria eradication. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 105-144, 1965.

BUENO, M. G. **Pesquisa de *Leishmania* ssp. e *Plasmodium* ssp. em primatas neotropicacos provenientes de regiões de Mata Atlântica e Amazônica impactadas por ações antrópicas: investigação *in situ* e *ex situ***. 2012. 298f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CARLTON, J. M.; ADAMS, J. H.; SILVA, J. C.; BIDWELL, S. L.; LORENZI, H.; CALER, E.; CRABTREE, J.; ANGIUOLI, S. V.; MERINO, E. F.; AMEDEO, P.; <sup>1</sup>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.; KOOLJ, T. W.; KORSINCZKY, M.; MEYER, E. V.; NENE, V.; PAULSEN, I.; WHITE, O.; RALPH, S. A.; REN, Q.; SARGEANT, T. J.;

---

<sup>1</sup> De acordo com:

Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

SALZBERG, S. L.; STOECKERT, C. J.; SULLIVAN, S. A.; YAMAMOTO, M. M.; HOFFMAN, S. L.; WORTMAN, J. R.; GARDNER, M. J.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W.; FRASER-LIGGETT, C. M. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Nature**, v. 455, n. 8 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. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 4, p. 564-594, 2002.

CARTER, R.; MENDIS, K. N., ROBERTS, D. Spatial targeting of interventions against malaria. **Bull. World Health Organ.**, v. 78, n.12, p. 1401-1411, 2000.

CARTER, K. H.; SINGH, P.; MUJICA, O. J.; ESCALADA, R. P.; ADE, M. P.; CASTELLANOS, L. G.; ESPINAL, M. A. Malaria in the Americas: Trends from 1959 to 2011. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 92, n. 2, p. 302–316, 2015.

CERUTTI, C. JR.; BOULOS, M.; COUTINHO, A. F.; HATAB, M. D. O. C.; FALQUETO, A.; REZENDE, H. R.; DUARTE, A. M.; COLLINS, W.; MALAFRONTA, R.S. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. **Malar. J.**, v. 16, n. 6, p. 33, 2007.

CHINCHILLA, M.; GUERRERO, O. M.; GUTIÉRREZ, G.; SÁNCHEZ, R. Presencia de *Plasmodium brasilianum* (Apicomplexa, Plasmodidae) en el mono congo (*Alouatta palliata*, Primates: Cebidae) de Costa Rica. Importancia epidemiológica en relación con el ser humano. **Parasitología Latinoamericana**, v.61 n.3-4, p. 192-196, 2006.

COATNEY, G. R.; COLLINS, W. E.; CONTACOS, P. G. **The primate malarias**. Mariland. 1971.

CONFALONIERI, U. E.; MARGONARI, C.; QUINTÃO, A. F. Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. **Acta Trop.**, v. 33, n. 5, p. 33-41, 2014.

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.

COSTA, D. C.; DA CUNHA, V. P.; DE ASSIS, G. M.; DE SOUZA JUNIOR, J. C.; HIRANO, Z. M.; DE ARRUDA, M. E.; KANO, F. S.; CARVALHO, L. H.; DE BRITO, C.F. *Plasmodium simium/Plasmodium vivax* infections in southern

brown howler monkeys from the Atlantic Forest. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 109, n. 5, p. 641-653, 2014.

COSTA, D. C.; PEREIRA DE ASSIS, G. M.; DE SOUZA SILVA, F. A.; ARAÚJO, F. C.; DE SOUZA, J. C.; BRAGA HIRANO, Z. M.; KANO, F. S.; DE SOUSA, T. N.; CARVALHO, L. H.; DE BRITO, C. F. A. *Plasmodium simium*, a *Plasmodium vivax*-related malaria parasite: Genetic variability of Duffy binding protein II and the Duffy antigen/receptor for chemokines. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1-16, 2015.

CORNEJO, O. E.; ESCALANTE, A. A. The origin and age of *Plasmodium vivax*. **Trends Parasitol.**, v. 22, n. 12, p. 558-563, 2006.

CORTESE, J. F.; CARABALLO, A.; CONTRERAS, C. E.; PLOWE, C. V. Origin and dissemination of *Plasmodium falciparum* drug-resistance mutations in South America. **J. Infect. Dis.**, v. 186, n. 3, p. 999-1006, 2002.

COX-SINGH, J.; DAVIS, T. M. E.; LEE, K. S.; SHASUL, S. S. G.; MATUSOP, A.; RATNAM, S.; RAHMAN, H. Á.; CONWAY, D. J.; SINGH, B. *Plasmodium knowlesi* malaria in human is widely distributed and potentially life threatening. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, n. 2, p. 165-171, 2008.

CREASEY, A.; MENDIS, K.; CARLTON, J.; WILLIAMSON, D.; WILSON, I.; CARTER, R. Maternal inheritance of extrachromosomal DNA in malaria parasites. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 65, n. 1, p. 95-98, 1994.

CULLETON, R.; CARTER, R. African *Plasmodium vivax*: distribution and origins. **Int. J. Parasitol.**, v. 42, n. 12, p. 1091-1097, 2012.

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. 29137, 2011.

CURADO, I.; DUARTE, A. M. R. C.; LAL, A. A.; OLIVEIRA, S. G.; KLOETZEL, J. K. Antibodies anti-bloodstream and circumsporozoites antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae/brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 92, p. 235-243, 1997.

DE ALVARENGA, D. A.; DE PINA-COSTA, A.; DE SOUSA, T. N.; PISSINATTI, A.; ZALIS, M. G.; SUARÉZ-MUTIS, M. C.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; BRASIL, P.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; DE BRITO, C. F. Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. **Malar. J.**, v. 14, n. 2, p. 81-90, 2015.

DE CASTRO, M. C.; MONTE\_MÓR, R. L.; SAWYER, D. O.; SINGER, B. H. Malaria risk on the Amazon frontier. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, n. 5, p. 2452-2457, 2006.

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, n. 3, p. 334-340, 2005.

DE SOUZA, J. M. Epidemiological distribution of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Brazil and its relevance to the treatment and control of malaria. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 87, p. 343-348, 1992.

DEANE, L. M. Studies on simian malaria in Brazil. **Bull. World Health Organ.**, v. 31, p. 752-753, 1964.

DEANE LM. Simian malaria in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 87, n. 5, p. 1-20, 1992.

DEANE, L. M.; FERREIRA NETO, J. A.; SITÔNIO, J. G. Novo hospedeiro natural de *Plasmodium simium* e do *Plasmodium brasilianum*: o mono *Brachytheles arachnoides*. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v. 10, n. 5, p. 287-288. 1968.

DE PINA-COSTA, A.; BRASIL, P.; DI SANTI, S. M.; DE ARAUJO, M. P.; SUÁREZ-MUTIS, M. C.; SANTELLI, A. C.; OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 109, n.5, p. 618-633, 2014.

DOWNS, W. G.; PITTENDRIGH, C. S. Bromeliad malaria in Trinidad, British West Indies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 26, n.7, p. 47-66, 1946.

DRUMMOND, A.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evol. Biol.**, v. 7, n. 1, p. 214, 2007.

DRUMMOND, A.; RAMBAUT, A.; SHAPIRO, B.; PYBUS, O. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. **Mol. Biol. Evol.**, v. 22, n. 5, p. 1185, 2005.

DUARTE, A. M.; MALAFRONTTE, R. D. O. S. S.; CERUTTI, C. JR.; CURADO, I.; DE PAIVA, B. R.; MAEDA, A. Y.; YAMASAKI, T.; SUMMA, M. E.; NEVES, D. D. O. V.; DE OLIVEIRA, S. G.; GOMES, A. D. E. C. Natural Plasmodium infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? **Acta Trop.**, 107, n. 2, p. 179-185, 2008.

DUARTE, A. M.; PEREIRA, D. M.; DE PAULA, M. B.; FERNANDES, A.; URBINATTI, P. R.; RIBEIRO, A. F.; MELLO, M. H.; MATOS, M. O. JR.; MUCCI, L. F.; FERNANDES, L. N.; NATAL, D.; MALAFRONTTE, R. S. Natural infection

in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic Forest in Brazil. **Parasit. Vectors.**, v. 6, n.7, p. 58-69, 2013.

DUARTE, A. M.; PORTO, M. A.; CURADO, I.; MALAFRONTTE, R. S.; HOFFMANN, E. H.; DE OLIVEIRA, S. G.; DA SILVA, A. M.; KLOETZEL, J. K.; GOMES, A. C. Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. **J. Med. Primatol.**, v. 35, n. 2, p. 87-96, 2006.

ESCALANTE, A. A.; AYALA, F. J. Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, n. 6, p. 11373–11377, 1994.

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, n. 6, p. 1980-1985, 2005.

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.

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

FANDEUR, T.; VOLNEY, B.; PENEAU, C.; DE THOISY, B. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae* malaria. **Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 11-21, 2000.

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malária elimination in Brazil. **Malar. J.**, v. 15, n. 1, p.284-171, 2016.

FU, Y.; LI, W. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, v. 133, n. 3, p. 693-695, 1993.

GADELHA P. From, “forest malaria” to “bromeliad malaria”: a case study of scientific controversy and malaria control. **Parassitologia**, v. 36, n. 5, p. 175-195, 1994.

GELABERT, P.; SANDOVAL-VELASCO, M.; OLALDE, I.; FREGEL, R.; RIEUX, A.; ESCOSA, R.; ARANDA, C.; PAAIJMANS, K.; MUELLER, I.; GILBERT, M. T.; LALUEZA-FOX, C. Mitochondrial DNA from the eradicated European *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* from 70-year-old slides from the Ebro Delta in Spain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 41, n.2, p. 11495-11500, 2016.

GOLDMAN, I. F.; QARI, S. H.; MILLET, P. G.; COLLINS, W. E.; LAL, A. A. Circumsporozoite protein gene of *Plasmodium simium*, a *Plasmodium vivax*-like monkey malaria parasite. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 57, n. 1, p. 177-180, 1993.

HARTL, D. L. The origin of malaria: Mixed messages from genetic diversity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, n. 1, p. 15-22, 2004.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4<sup>a</sup> ed. Editora Artmed: Porto Alegre, 2010, 659p.

HOCHMAN, G.; MELLO, M. T.; SANTOS, P. R. Malaria in pictures: images from Brazil's public health campaigns in the first half of the twentieth century. **Hist. Cienc. Saude Manguinhos.**, v.9, n.3, p. 233-273, 2002.

HUME, J. C.; LYONS, E. J.; DAY, K. P. Human migration, mosquitoes and the evolution of *Plasmodium falciparum*. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 3, p. 144-149, 2003.

HUPALO, D. N.; LUO, Z.; MELNIKOV, A.; SUTTON, P. L.; ROGOV, P.; ESCALANTE, A.; VALLEJO, A. F.; HERRERA, S.; ARÉVALO-HERRERA, M.; FAN, Q.; WANG, Y.; CUI, L.; LUCAS, C. M.; DURAND, S.; SANCHEZ, J. F.; BALDEVIANO, G. C.; LESCANO, A. G.; LAMAN, M.; BARNADAS, C.; BARRY, A.; MUELLER, I.; KAZURA, J. W.; EAPEN, A.; KANAGARAJ, D.; VALECHA, N.; FERREIRA, M. U.; ROOBSOONG, W.; NGUITRAGOOL, W.; SATTABONKOT, J.; GAMBOA, D.; KOSEK, M.; VINETZ, J. M.; GONZÁLEZ-CERÓN, L.; BIRREN, B. W.; NEAFSEY, D. E.; CARLTON, J. M. Population genomics studies identify signatures of global dispersal and drug resistance in *Plasmodium vivax*. **Nat. Genet.**, v. 48, n. 8, p. 953-958, 2016.

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.

JENNISON, C. I.; ARNOTT, A.; TESSIER, N.; TAVUL, L.; KOEPFLI, C.; FELGER, I.; SIBA, P. M.; REEDER, J. C.; BAHLO, M.; MUELLER, I.; BARRY, A. E. *Plasmodium vivax* populations are more genetically diverse and less structured than sympatric *Plasmodium falciparum* populations. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 4, p. 1-20, 2015.

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, n. 2, 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, n. 3, p. 1245-1252, 2008.

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.

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.

KOEPFLI, C.; RODRIGUES, P. T.; ANTAO, T.; ORJUELA-SÁNCHEZ, P.; VAN DEN EEDE, P.; GAMBOA, D.; VAN HONG, N.; BENDEZU, J.; ERHART, A.; BARNADAS, C.; RATSIMBASOA, A.; MENARD, D.; SEVERINI, C.; MENEGON, M.; NOUR, B. Y.; KARUNAWEERA, N.; MUELLER, I.; FERREIRA, M. U.; FELGER, I. *Plasmodium vivax* diversity and population structure across four continents. **PloS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 6, p. 1-15, 2015.

KRIEF, S.; ESCALANTE, A. A.; PACHECO, M. A.; MUGISHA, L.; ANDRÉ, C.; HALBWAX, M.; FISCHER, A.; KRIEF, J. M.; KASENENE, J. M.; CRANFIELD, M.; CORNEJO, O. E.; CHAVATTE, J. M.; LIN, C.; LETOURNEUR, F.; GRÜNER, A. C.; MCCUTCHAN, T. F.; RÉNIA, L.; SNOUNOU G. On the diversity of malaria parasites in African apes and the origin of *Plasmodium falciparum* from Bonobos. **PloS Pathog.**, v. 12, n. 6, p. 1-12, 2010.

LADEIA-ANDRADE, S.; DE MELO, G. N.; DE SOUZA-LIMA, R. D. E. C.; SALLA, L. C.; BASTOS, M. S.; RODRIGUES, P. T.; LUZ, F. D.; FERREIRA, M. U. No Clinical or Molecular Evidence of *Plasmodium falciparum* Resistance to Artesunate-Mefloquine in Northwestern Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, n. 1, p. 148-154, 2016.

LAPORTA, G. Z.; LINTON, Y. M.; WILKERSON, R. C.; BERGO, E. S.; NAGAKI, S. S.; SANT'ANA, D. C.; SALLUM, M. A. M. Malaria vectors in South America: current and future scenarios. **Parasit. Vectors.**, v. 8, n. 1, p. 426, 2015.

LLAMAS, B.; FEHREN-SCHMITZ, L.; VALVERDE, G.; SOUBRIER, J.; MALLICK, S.; ROHLAND, N.; NORDENFELT, S.; VALDIOSERA, C.; RICHARDS, S. M.; ROHRLACH, A.; ROMERO, M.; ESPINOZA, I. F.; CAGIGAO, E. T.; JIMÉNEZ, L. W.; MAKOWSKI, K.; REYNA, I. S.; LORY, J. M.; TORREZ, J. A.; RIVERA, M. A.; BURGER, R. L.; CERUTI, M. C.; REINHARD, J.; WELLS, R. S.; POLITIS, G.; SANTORO, C. M.; STANDEN, V. G.; SMITH, C.; REICH, D.; HO, S. Y.; COOPER, A.; HAAK, W. Ancient mitochondrial DNA provides high-resolution time scale of the peopling of the Americas. **Sci. Adv.**, v. 2, n. 4, p. 1-10, 2016.

LECLERC, M.; HUGOT, J.; DURAND, P.; RENAUD, F. Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from new and old world



primates (including humans): an 18S rDNA cladistic analysis. **Parasitology.**, v. 129, n. 6, p. 677-684, 2004.

LI, J.; COLLINS, W. E.; WIRTZ, R. A.; RATHORE, D.; LAL, A.; MCCUTCHAN, T. F. Geographic subdivision of the range of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, n. 1, p. 35-42, 2001.

LIM, L.; McFADDEN, G.I. The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 365, p. 749-763, 2010.

LIM, C. S.; TAZI, L., AYALA, F. J. *Plasmodium vivax*: recent world expansion and genetic identity to *Plasmodium simium*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 43, n. 5, p. 15523-15528, 2005.

LIVINGSTONE, F.B. The Duffy blood groups, vivax malaria, and malaria selection in human populations: a review. **Hum. Biol.**, v. 56, p. 413-25, 1984.

LIU, W.; LI, Y.; LEARN, G. H.; RUDICELL, R. S.; ROBERTSON, J. D.; KEELE, B. F.; NDJANGO, J. B.; SANZ, C. M.; MORGAN, D. B.; LOCATELLI, S.; GONDER, M. K.; KRANZUSCH, P. J.; WALSH, P. D.; DELAPORTE, E.; MPOUDI-NGOLE, E.; GEORGIEV, A. V.; MULLER, M. N.; SHAW, G. M.; PEETERS, P. P. M.; RAYNER, J. C.; HAHN, B. H. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. **Nature**, v. 23, n. 2, p. 420-425, 2010.

LIU, W.; LI, Y.; SHAW, K. S.; LEARN, G. H.; PLENDERLEITH, L. J.; MALENKE, J. A.; SUNDARARAMAN, S. A.; RAMIREZ, M. A.; CRYSTAL, P. A.; SMITH, A. G.; BIBOLLET-RUCHE, F.; AYOUBA, A.; LOCATELLI, S.; ESTEBAN, A.; MOUACHA, F.; GUICHET, E.; BUTEL, C.; AHUKA-MUNDEKE, S.; INOGWABINI, B. I.; NDJANGO, J. B.; SPEEDE, S.; SANZ, C. M.; MORGAN, D. B.; GONDER, M. K.; KRANZUSCH, P. J.; WALSH, P. D.; GEORGIEV, A. V.; MULLER, M. N.; PIEL, A. K.; STEWART, F. A.; WILSON, M. L.; PUSEY, A. E.; CUI, L.; WANG, Z.; FÄRNERT, A.; SUTHERLAND, C. J.; NOLDER, D.; HART, J. A.; HART, T. B.; BERTOLANI, P.; GILLIS, A.; LEBRETON, M.; TAFON, B.; KIYANG, J.; DJOKO, C. F.; SCHNEIDER, B. S.; WOLFE, N. D.; MPOUDI-NGOLE, E.; DELAPORTE, E.; CARTER, R.; CULLETON, R. L.; SHAW, G. M.; RAYNER, J. C.; PEETERS, M.; HAHN, B. H.; SHARP, P. M. African origin of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Nat. Commun.**, v. 21, n. 3, p. 3346, 2014.

LOY, D. E.; LIU, W.; LI, Y.; LEARN, G. H.; PLENDERLEITH, L. J.; SUNDARARAMAN, S. A.; SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Out of Africa: origins and evolution of the human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. **Int. J. Parasitol.**, v. 47, p. 87-97, 2017.

MACHADO, R. L. D.; CALVOSA, V. S. P.; FERREIRA, M. U.; ROSSIT, A. R. B.; DOS SANTOS, E. J. M.; CONWAY, D. J. Genetic structure of *Plasmodium*

*falciparum* populations in the Brazilian Amazon region. **J. Infect. Dis.**, v. 9, n. 4, p. 1547-1555, 2004.

MARQUES, A. C. Human migration and the spread of malaria in Brazil. **Parasitol. Today.**, v.3, n. 6, p. 166-70, 1987.

MARRELLI, M. T.; MALAFRONTI, R. S.; SALLUM, M. A.; NATAL, D. *Kerteszia* subgenus of *Anopheles* associated with the Brazilian Atlantic rainforest: current knowledge and future challenges. **Malar. J.**, v. 6, n.1, p. 127, 2007.

MARTIN, D. P.; LEMEY, P.; LOTT, M.; MOULTON, V.; POSADA, D.; LEFEUVRE, P. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. **Bioinformatics.**, v. 26, n. 19, p. 2462-2463, 2010.

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.**, v. 93, p. 11889-11894, 1996.

McFADDEN G. I. The apicoplast. **Protoplasma**, v. 248, n. 4, p. 641-650, 2011.

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. **BMC Evol. Biol.**, v. 12, p. 22, 2012.

MIOTTO, O.; ALMAGRO-GARCIA, J.; MANSKE, M.; MACINNIS, B.; CAMPINO, S.; ROCKETT, K. A.; AMARATUNGA, C.; LIM, P.; SUON, S.; SRENG, S.; ANDERSON, J. M.; DUONG, S.; NGUON, C.; CHUOR, C. M.; SAUNDERS, D.; SE, Y.; LON, C.; FUKUDA, M. M.; AMENGA-ETEGO, L.; HODGSON, A. V.; ASOALA, V.; IMWONG, M.; TAKALA-HARRISON, S.; NOSTEN, F.; SU, X. Z.; RINGWALD, P.; ARIEY, F.; DOLECEK, C.; HIEN, T. T.; BONI, M. F.; THAI, C. Q.; AMAMBUA-NGWA, A.; CONWAY, D. J.; DJIMDÉ, A. A.; DOUMBO, O. K.; ZONGO, I.; OUEDRAOGO, J. B.; ALCOCK, D.; DRURY, E.; AUBURN, S.; KOCH, O.; SANDERS, M.; HUBBART, C.; MASLEN, G.; RUANO-RUBIO, V.; JYOTHI, D.; MILES, A.; O'BRIEN, J.; GAMBLE, C.; OYOLA, S. O.; RAYNER, J. C.; NEWBOLD, C. I.; BERRIMAN, M.; SPENCER, C. C.; MCVEAN, G.; DAY, N. P.; WHITE, N. J.; BETHELL, D.; DONDORP, A. M.; PLOWE, C. V.; FAIRHURST, R. M.; KWIATKOWSKI, D. P. Multiple populations of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia. **Nat. Genet.**, v. 45, n. 6, p. 648-655, 2013.

Ministério da Saúde. **Situação Epidemiológica da Malária no Brasil**, 2000 a 2011. Boletim Epidemiológico. Brasília, DF, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Vol. 44 n. 1, 2013.

MITA, T.; VENKATESAN, M.; OHASHI, J.; CULLETON, R.; TAKAHASHI, N.; TSUKAHARA, T.; NDOUNGA, M.; DYSOLEY, L.; ENDO, H.; HOMBHANJE, F.; FERREIRA, M. U.; PLOWE, C. V.; TANABE, K. Limited geographical origin and global spread of sulfadoxine-resistant dhps alleles in *Plasmodium falciparum* populations. **J. Infect. Dis.**, v. 12, n. 5, p. 1980-1988, 2011.

MOBEGI, V. A.; DUFFY, C. W.; AMAMBUA-NGWA, A.; LOUA, K. M.; LAMAN, E.; NWAKANMA, D. C.; MACINNIS, B.; ASPELING-JONES, H.; MURRAY, L.; CLARK, T. G.; KWIATKOWSKI, D. P.; CONWAY, D. J. Genome-wide analysis of selection on the malaria parasite *Plasmodium falciparum* in West African populations of differing infection endemicity. **Mol. Biol. Evol.**, v. 6, n. 2, p. 1490-1499, 2014.

MOLINA-CRUZ, A.; BARILLAS-MURY, C. The remarkable journey of adaptation of the *Plasmodium falciparum* malaria parasite to New World anopheline mosquitoes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 109, n. 5, p. 662-667, 2014.

MOLINA-CRUZ, A.; GARVER, L. S.; ALABASTER, A.; BANGIOLO, L.; HAILE, A.; WINIKOR, J.; ORTEGA, C.; VAN SCHAIJK, B. C. L.; SAUERWEIN, R. W.; TAYLOR-SALMON, E.; BARILLAS-MURY, C. The human malaria parasite *Pfs47* gene mediates evasion of the mosquito immune system. **Science**, v. 340, p. 984-987, 2013.

MOORE, D. V.; LANIER, J. E. Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 10, p. 5-9, 1961.

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. 686-1693, 2005.

MUELLER, I.; FERREIRA, M. U.; FELGER I. *Plasmodium vivax* Diversity and Population Structure across Four Continents. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 6, p. 1-23, 2015.

MWINGIRA, F.; GENTON, B.; KABANYWANYI, A. N.; FELGER, I. Comparison of detection methods to estimate asexual *Plasmodium falciparum* parasite prevalence and gametocyte carriage in a community survey in Tanzania. **Malar. J.**, v. 18, n.13, p. 433, 2014.

NEAFSEY, D. E.; GALINSKY, K.; JIANG, R. H.; YOUNG, L.; SYKES, S. M.; SAIF, S.; GUJJA, S.; GOLDBERG, J. M.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; CHAPMAN, S. B.; DASH, A. P.; ANVIKAR, A. R.; SUTTON, P. L.; BIRREN, B. W.; ESCALANTE, A. A.; BARNWELL, J. W.; CARLTON, J. M. The malaria parasite *Plasmodium vivax* exhibits greater genetic diversity than *Plasmodium falciparum*. **Nat. Genet.**, v. 44, n. 9, p. 1046-1050, 2012.

NEAFSEY, D. E.; SCHAFFNER, S. F.; VOLKMAN, S. K.; PARK, D.; MONTGOMERY, P.; MILNER, D. A. JR.; LUKENS, A.; ROSEN, D.; DANIELS, R.; HOUDE, N.; CORTESE, J. F.; TYNDALL, E.; GATES, C.; STANGETHOMANN, 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, n. 12, p. R171, 2008.

Nei, M. Molecular Evolutionary Genetics: Columbia University Press, New York, 1987.

NEVES, A.; URBINATI, P. R.; MALAFRONTI, R. S.; FERNANDES, A.; PAGANINI, W. S.; NATAL, D. Malaria outside the Amazon region: Natural Plasmodium infection in anophelines collected near and indigenous village in the Vale do Rio Branco, Intanhaém, SP. **Acta Tropica**, v. 125, n. 2, p. 102-106, 2013.

OBALDIA, N. Determinants of low socio-economic status and risk of Plasmodium vivax malaria infection in Panama (2009-2012): a case-control study. **Malar. J.**, v. 21, n. 14, p. 1-10, 2015

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. **Malar. J.**, v.9, n. 115, p. 1-15.

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.

Pan American Health Organization. Interactive malaria statistics. Washington, DC: PAHO; 2014. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index>. Acessado em: 1 Fev 2016.

Pan American Health Organization. Interactive malaria statistics. Washington, DC: PAHO; 2016. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index>. Acessado em: 1 Fev 2016.

PARADIS, E. Peas: na R package for population genetics with na integrated-modular approach. **Bioinformatics**, v. 26, p. 419-420, 2010.

PERELMAN, P.; JOHNSON, W. E.; ROOS, C.; SEUÁNEZ, H. N.; HORVATH, J. E.; MOREIRA, M. A. M.; KESSING, B.; PONTIUS, J.; ROELKE, M.; RUMPLER,

Y.; SCHNEIDER, M. P. C.; SILVA, A.; O'BRIEN, S. J.; PECONSLATTERY, J. A. Molecular phylogeny of living primates. **PLoS Genetics**, v.7, n.3, p.1-17, 2011.

PRESTON, M. D.; CAMPINO, S.; ASSEFA, S. A.; ECHEVERRY, D. F.; OCHOLLA, H.; AMAMBUA-NGWA, A.; STEWART, L. B.; CONWAY, D. J.; BORRMANN, S.; MICHON, P.; ZONGO, I.; OUÉDRAOGO, J.-B.; DJIMDE, A. A.; DOUMBO, O. K.; NOSTEN, F.; PAIN, A.; BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C. J.; FAIRHURST, R. M.; SUTHERLAND, C. J.; ROPER, C.; CLARK, T. G. A barcode of organellar genome polymorphisms identifies the geographic origin of *Plasmodium falciparum* strains. **Nature Commun.**, v. 5, p. 4052, 2014.

R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Viena, Australia, 2010.

RAGHAVAN, M.; STEINRÜCKEN, M.; HARRIS, K.; SCHIFFELS, S.; RASMUSSEN, S.; DEGIORGIO, M.; ALBRECHTSEN, A.; VALDIOSERA, C.; ÁVILA-ARCOS, M. C.; MALASPINAS, A. S.; ERIKSSON, A.; MOLTKE, I.; METSPALU, M.; HOMBURGER, J. R.; WAL, L. J.; CORNEJO, O. E.; MORENO-MAYAR, J. V.; KORNELIUSSEN, T. S.; PIERRE, T.; RASMUSSEN, M.; CAMPOS, P. F.; DAMGAARD PDE, B.; ALLENTOFT, M. E.; LINDO, J.; METSPALU, E.; RODRÍGUEZ-VARELA, R.; MANSILLA, J.; HENRICKSON, C.; SEGUIN-ORLANDO, A.; MALMSTRÖM, H.; STAFFORD, T. JR.; SHRINGARPURE, S. S.; MORENO-ESTRADA, A.; KARMIN, M.; TAMBETS, K.; BERGSTRÖM, A.; XUE, Y.; WARMUTH, V.; FRIEND, A. D.; SINGARAYER, J.; VALDES, P.; BALLOUX, F.; LEBOREIRO, I.; VERA, J. L.; RANGEL-VILLALOBOS, H.; PETTENER, D.; LUISELLI, D.; DAVIS, L. G.; HEYER, E.; ZOLLIKOFER, C. P.; PONCE DE LEÓN, M. S.; SMITH, C. I.; GRIMES, V.; PIKE, K. A.; DEAL, M.; FULLER, B. T.; ARRIAZA, B.; STANDEN, V.; LUZ, M. F.; RICAUT, F.; GUIDON, N.; OSIPOVA, L.; VOEVODA, M. I.; POSUKH, O. L.; BALANOVSKY, O.; LAVRYASHINA, M.; BOGUNOV, Y.; KHUSNUTDINOVA, E.; GUBINA, M.; BALANOVSKA, E.; FEDOROVA, S.; LITVINOV, S.; MALYARCHUK, B.; DERENKO, M.; MOSHER, M. J.; ARCHER, D.; CYBULSKI, J.; PETZELT, B.; MITCHELL, J.; WORL, R.; NORMAN, P. J.; PARHAM, P.; KEMP, B. M.; KIVISILD, T.; TYLER-SMITH, C.; SANDHU, M. S.; CRAWFORD, M.; VILLEMS, R.; SMITH, D. G.; WATERS, M. R.; GOEBEL, T.; JOHNSON, J. R.; MALHI, R. S.; JAKOBSSON, M.; MELTZER, D. J.; MANICA, A.; DURBIN, R.; BUSTAMANTE, C. D.; SONG, Y. S.; NIELSEN, R.; WILLERSLEV, E. Genomic evidence for the Pleistocene and recent population history of Native Americans. **Science**, v. 349, p. 12-36, 2015.

RAMPHUL, U. N.; GARVER, L. S.; MOLINA-CRUZ, A.; CANEPA, G. E.; BARILLAS-MURY, C. *Plasmodium falciparum* evades mosquito immunity by disrupting JNK-mediated apoptosis of invaded midgut cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 5, n. 2, p. 1273-1280, 2015.

RICH, S. M.; LEENDERTZ, F. H.; XU, G.; LEBRETON, M.; DJOKO, C. F.; AMINAKE, M. N.; TAKANG, E. E.; DIFFO, J. L.; PIKE, B. L.; ROSENTHAL, B. M.; FORMENTY, P.; BOESCH, C.; AYALA, F. J.; WOLFE, N. D. The origin of malignant malaria. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v.106, n.4, p. 14902-14907, 2009.

RODRIGUES, D. C. Casos de malária por *Plasmodium falciparum* resistentes ao tratamento pela cloroquina. **Arquivos de Higiene e Saúde Pública**, v. 26, p. 231-235, 1961.

RODRIGUES, P. T.; ALVES, J. M. P.; SANTAMARIA, A. M.; CALZADA, J. E.; XAYAVONG, M.; PARISE, M.; DA SILVA, A. J.; FERREIRA, M. U. Using Mitochondrial Genome Sequences to Track the Origin of Imported *Plasmodium vivax* Infections Diagnosed in the United States. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 90, n. 6, p. 1102-1108, 2014.

ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. **Mol. Biol. Evol.**, v. 9, p. 552-569, 1992.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Syst. Biol.**, v. 61, n. 3, p. 539-542, 2012.

SATTABONGKOT, J.; TSUBOI, T.; ZOLLNER, G. E.; SIRICHAISINTHOP, J.; CUI, L. *Plasmodium vivax* transmission: chances for control? **Trends Parasitol.**, v. 20, n. 4, p. 192-198, 2004.

SHANKS, G. D. Control and elimination of *Plasmodium vivax*. **Adv. Parasitol.**, v. 80, n. 5, p. 301-341, 2012.

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.

SHARMA, A.; KHANDURI, U. How Benign is benign tertian malaria? **J. Vector Borne Dis.**, v. 46, n. 2, p. 141-144, 2009.

SILVA, J. R. Resistência do *P. falciparum* à ação da cloroquina. **O Hospital.**, v. 60, p. 43-58, 1961.

SNOW, R. W.; GUERRA, C. A.; NOOR, A. M.; MYINT, H. Y.; HAY, S. I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 434, n. 3, p. 214-217, 2005.

SOUSA, T. N.; TARAZONA-SANTOS, E. M.; WILSON, D. J.; MADUREIRA, A. P.; FALCÃO, P. R. K.; FONTES, C. J. F.; GIL, L. H. S.; FERREIRA, M. U.; CARVALHO, L. H.; BRITO, C. F. Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in Brazilian *Plasmodium vivax* populations. **Malar. J.**, v. 9, n. 1, p. 334, 2010.

SUNDARARAMAN, S. A.; LIU, W.; KEELE, B. F.; LEARN, G. H.; BITTINGER, K.; MOUACHA, F.; AHUKA-MUNDEKE, S.; MANSKE, M.; SHERRILL-MIX, S.; LI, Y.; MALENKE, J. A.; DELAPORTE, E.; LAURENT, C.; MPOUDI NGOLE, E.; KWIATKOWSKI, D. P.; SHAW, G. M.; RAYNER, J. C.; PEETERS, M.; SHARP, P. M.; BUSHMAN, F. D.; HAHN, B. H. *Plasmodium falciparum*-like parasites infecting wild apes in southern Cameroon do not represent a recurrent source of human malaria. **Proc. Natl. Acad. Sci .U.S.A.**, v. 110, n. 17, p. 7020-7025, 2013.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585-595, 1989.

TANABE, K.; JOMBART, T.; HORIBE, S.; PALACPAC, N. M.; HONMA, H.; TACHIBANA, S.; NAKAMURA, M.; HORII, T.; KISHINO, H.; MITA, T. *Plasmodium falciparum* mitochondrial genetic diversity exhibits isolation-by-distance patterns supporting a sub-Saharan African origin. **Mitochondrion.**, v. 13, n. 6, p. 630-636, 2013.

TANABE, K.; MITA, T.; JOMBART, T.; ERIKSSON, A.; HORIBE, S.; PALACPAC, N.; RANFORD-CARTWRIGHT, L.; SAWAI, H.; SAKIHAMA, N.; OHMAE, H.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, M. U.; ESCALANTE, A. A.; PRUGNOLLE, F.; BJÖRKMANN, A.; FÄRNERT, A.; KANEKO, A.; HORII, T.; MANICA, A.; KISHINO, H.; BALLOUX, F. *Plasmodium falciparum* accompanied the human expansion out of Africa. **Curr. Biol.**, v. 20, n. 5, p. 1283-1289, 2010.

TAZI, L.; AYALA, F. J. Infection, Genetics and Evolution Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v *P. simium* and *P. malariae* v *P. brasilianum*. **Infect. Genet. Evol.**, v. 11, n. 1, p. 209-211, 2011.

TAYLOR, J. E.; PACHECO, M. A.; BACON, D. J.; BEG, M. A.; MACHADO, R. L.; FAIRHURST, R. M.; HERRERA, S.; KIM, J. Y.; MENARD, D.; PÓVOA, M. M.; VILLEGAS, L.; MULYANTO, SNOUNOU, G.; CUI, L.; ZEYREK, F. Y.; ESCALANTE, A. A. The evolutionary history of *Plasmodium vivax* as inferred from mitochondrial genomes: parasite genetic diversity in the Americas. **Mol. Biol. Evol.**, v. 30, n. 3, p. 2050-64, 2013.

TYAGI, S.; DAS, A. Mitochondrial population genomic analyses reveal population structure and demography of Indian *Plasmodium falciparum*. **Mitochondrion.**, v. 24, n. 9, p. 21-32, 2015.

TYAGI, S.; PANDE, V.; DAS, A. Mitochondrial genome sequence diversity of Indian *Plasmodium falciparum* isolates. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 109, n. 4, p. 494-498, 2014.

UENO, H. M.; FORATINNI, O. P.; KAKITANI, I. Distribuição vertical e sazonal de Anopheles (Kerteszia) em Ilha Comprida, SP. **Rev. Saúde Pública**, v. 41, n. 2, p. 269-275, 2007.

VOLNEY, B.; POULIQUEN, J. F.; DE THOISY, B.; FANDEUR, T. A seroepidemiological study of malaria in human and monkey populations in French Guiana. **Acta Tropica**, v. 82, n. 1, p. 11-23, 2002.

WALKER, A. J.; LOPEZ-ANTUNANO, F. J. Response to drugs of South American strains of *Plasmodium falciparum*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 62, p. 654-667, 1968.

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

WILSON, A. C.; CANN, R. L.; CARR, S. M.; GEORGE, M.; GYLLENSTEN U. B.; HELM-BYCHOWSKI, K. M.; HIGUCHI, R.G.; PALUMBI, S.R.; PRAGER, E.M.; SAGE, R. D.; STONEKING M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Bio. J. Lin. Soc.**, v. 26, n. 4, p. 375-400, 1985.

WOOTTON, J. C.; FENG, X.; FERDIG, M. T.; COOPER, R. A.; UM, J.; BARUCH, D. I.; MAGILL, A. J.; SU, X. Z. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 418, n. 5, p. 320-323, 2002.

World Health Organization (WHO) — The malaria situation in 1976. WHO Chronicle. Disponível em [www.who.int/entity/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_1976/en](http://www.who.int/entity/malaria/publications/world_malaria_report_1976/en). Acesso em: 10 fev 2016.

World Health Organization (WHO). World malaria report. 2015. Disponível em: [www.who.int/entity/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2015/en](http://www.who.int/entity/malaria/publications/world_malaria_report_2015/en). Acesso em: 01 dez 2016.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, London, v. 15, n. 1, p. 323-354, 1951.

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.

ZERBINO, D.R.; BIRNEY, E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Res.**, v. 15, n. 5, p. 821-829, 2008.