

LAIS CAMOESE SALLA

**Transmissão de *Plasmodium vivax* em área urbana da
Amazônia brasileira: análise espaço-temporal**

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

São Paulo

2019

LAIS CAMOESE SALLA

**Transmissão de *Plasmodium vivax* em área urbana da
Amazônia brasileira: análise espaço-temporal**

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira

Versão corrigida

São Paulo

2019

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)

Salla, Lais Camoese

Transmissão de Plasmodium vivax em área urbana
da Amazônia brasileira: análise espaço-temporal /
Lais Camoese Salla; orientador Marcelo Urbano
Ferreira. -- São Paulo, 2019.

81 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Malária Urbana. 2. Plasmodium vivax. 3.
Amazônia Brasileira. 4. Microssatélites. I.
Ferreira, Marcelo Urbano, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lais Camoese Salla

Título da Dissertação: Transmissão de *Plasmodium vivax* em área urbana da Amazônia brasileira: análise espaço-temporal

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

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

Aprovado(a)

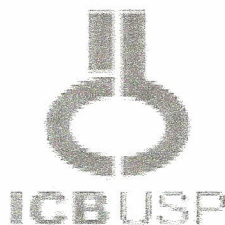
Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 15 de maio de 2017.

PARECER 1332/CEPSH

CAAE nº 67411117.1.0000.5467

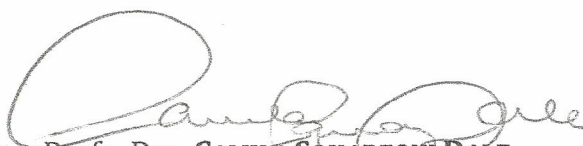
Protocolo CEPSH-ICB nº 1379/17

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "**Dinâmica da transmissão de Plasmodium vivax em área urbana da Amazônia brasileira: análise espaço-temporal**", do pesquisador Prof. Dr. **Marcelo Urbano Ferreira** e da aluna **Laís Camoese Salla**.

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: www.icb.usp.br, como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **15/05/2018**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,



Prof. Dra. **CAMILA SQUARZONI DALE**
Coordenadora 3 – CEPSH-ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Doutor Marcelo Urbano Ferreira** pela orientação e ensinamentos durante toda a minha graduação e mestrado e pela participação essencial no meu crescimento e desenvolvimento acadêmico e pessoal. Agradeço imensamente pela confiança, paciência, conhecimentos compartilhados e pela oportunidade de fazer parte desta equipe.

À **Priscila Thihara Rodrigues**, por me acolher e me cuidar como família, pela amizade indescritível, conselhos e sermões e por escutar e acalmar meu choro. Agradeço pela paciência, sinceridade e companheirismo durante o trabalho de campo, pela oportunidade de ser sua pupila, por todos os ensinamentos moleculares e eternas discussões de protocolos e resultados e por ser, simplesmente, tão incrível.

À **Maria José Menezes (Zezé)** e **Vanessa Cristina Nicolete** por tornar meus dias mais alegres, cheios de risadas e docinhos. Vocês são mulheres maravilhosas e muito especiais. Agradeço por fazerem parte desse caminho e por cada momento compartilhado.

Ao **Rodrigo Corder**, pela parceria nas disciplinas e por aguentar minhas reclamações, pelas discussões e ideias mirabolantes e por toda a ajuda com os bancos de dados e números.

Aos colegas de laboratório **Anaclara Pincelli**, **Thais Crippa de Oliveira**, **Susana Barbosa**, **Pablo Secato Fontoura** e **Igor Cavallini Johansen**, pela amizade e por tornarem o laboratório mais feliz e gordinho.

À **Simone Ladeia-Andrade** pelos ensinamentos e também pela coleta das amostras, e ao **Jaques Franco** pela extração de DNA e diagnóstico de malária.

À **Kátia Rocha** e **Carmen Takata** pela ajuda com a genotipagem de microssatélites, disponibilidade e disposição para discussão de resultados e resolução de problemas.

Ao **XXII Seminário Laveran & Deane** pela oportunidade de apresentar e discutir este projeto de pesquisa.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela bolsa de Mestrado concedida, fundamental para a realização deste trabalho.

À **Níl, Luana, Maristela, João e Bianca**, pela amizade de décadas, pelas origens, apoio e força em todas as situações. Por serem meu refúgio e lar.

Ao **Rodrigo, Emily, Léo e Pedro**, pela amizade, companheirismo e por fazerem com que São Paulo se tornasse minha segunda casa.

Ao **Jadi**, por estar sempre ao meu lado e me completar. Pela paciência, motivação, apoio e compreensão. Obrigada pelo carinho e por compartilharmos o presente e futuro.

E, principalmente, agradeço aos meus pais, **José Roberto e Maria Aparecida** e ao meu irmão, **Gabriel**, por todo alicerce, apoio inquestionável, paciência, confiança, incentivo e inspiração. Nada disso aconteceria se não fosse por vocês.

Muito obrigada!

FONTE DE FINANCIAMENTO

Este trabalho foi desenvolvido com auxílio, fundamental, da bolsa de mestrado concedida a Lais Camoese Salla, no âmbito FAPESP/CAPES através do processo nº 2017/02351-6, **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).**

Mas é preciso ter força, é preciso ter raça, é preciso ter
gana, sempre. Quem traz no corpo a marca, Maria, Maria,
mistura a dor e a alegria. Mas é preciso ter manha, é preciso
ter graça, é preciso ter sonho sempre. Quem traz na pele
essa marca possui a estranha mania de ter fé na vida.

Maria, Maria - Milton Nascimento

RESUMO

SALLA, L. C. **Transmissão de *Plasmodium vivax* em área urbana da Amazônia brasileira: análise espaço-temporal.** 2019. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Após 36 anos de queda de incidência de malária, em 2017 e 2018 o Brasil apresentou um aumento em 51% dos casos diagnosticados no ano anterior, permanecendo a transmissão virtualmente restrita à Amazônia Legal. A natureza focal da malária no país indica que a sua eliminação depende da priorização de um pequeno número de focos de transmissão. Neste trabalho foram utilizadas abordagens de genética populacional de parasitos para estudar a dinâmica de transmissão da malária residual em Mâncio Lima, área urbana no Vale do Alto Juruá, região da Amazônia Ocidental que concentra 20% dos casos de malária registrados no Brasil. O trabalho tem como base o uso de marcadores de DNA microssatélite para tipagem molecular de 178 amostras de *P. vivax* coletadas em Mâncio Lima ao longo de 14 meses, afim de analisar a distribuição espaço-temporal de *P. vivax*, a estrutura populacional do parasito e os níveis de diversidade genética e de multiplicidade de infecções, identificando padrões de circulação de linhagens do parasito na população de hospedeiros. Os resultados revelaram altos índices de diversidade genética, multiplicidade de infecção e desequilíbrio de ligação, indicando baixa recombinação entre clones não aparentados. O agrupamento de amostras indicou a constante introdução de parasitos distintos na cidade e, também, a capacidade de propagação de um único e numeroso agrupamento através do espaço e do tempo. Conclui-se, portanto, que a alta prevalência de malária na cidade de Mâncio Lima é suportada por uma constante introdução de parasitos em um local com alta receptividade e capacidade de transmissão da doença.

Palavras chave: Malária urbana; Amazônia; *Plasmodium vivax*; microssatélite; epidemiologia molecular

ABSTRACT

SALLA, L. C. **Transmission of *Plasmodium vivax* in an urban area of the Brazilian Amazon: spatial and temporal analysis.** 2019. 81p. Master thesis (Science) – Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

After 36 years of decline in the malaria incidence, in 2017 and 2018 Brazil presented 51% increase in the number of diagnosed cases compared to the previous year, with transmission virtually restricted to the Amazon region. The focal nature of malaria transmission in Brazil suggests that elimination efforts will require careful prioritization of a few residual malaria pockets. In this work, we use parasite's population genetic approaches to study the transmission dynamics of residual malaria in the urban area of Mâncio Lima. This site is located in Juruá Valley, a region in the western Amazon that accounts for 20% of the cases of malaria in Brazil. Microsatellite DNA markers were used to characterize 178 *P. vivax* samples collected over 14 months in Mâncio Lima, collected for analysis of spatial and temporal distribution, the parasite population structure and levels of genetic diversity and multiplicity infections, aiming to identify temporal and spatial patterns of parasite's strain circulation in the host population. The results revealed high rates of genetic diversity, multiplicity of infection and linkage disequilibrium, indicating low recombination between unrelated clones. The sample grouping indicated the constant introduction of different parasites in the city and the ability of a single and numerous group to propagate through space and time. We suggest that the high prevalence of malaria in the city of Mâncio Lima is supported by a constant introduction of parasites in a place with high receptivity and transmission capacity of the disease.

Keywords: Urban malaria; Amazon; *Plasmodium vivax*; microsatellite; molecular epidemiology

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Classificação de transmissão de malária nas cidades brasileiras de acordo com o Índice Parasitário Anual (IPA), em 2017. Adaptado de PAHO, 2017. 21
- Figura 2** - Número de casos de malária por espécie de acordo com o ano de notificação (1993-2018). Infecções causadas por *P. vivax* estão representadas pela linha cinza escura, *P. falciparum* pela cinza clara e os casos totais pela linha tracejada. Adaptado de MS (2019). .. 22
- Figura 3** – Mapa do Brasil indicando a localização geográfica do município de Mâncio Lima, localizado no Estado do Acre. 29
- Figura 4** - Imagem extraída do programa GeneMarker 2.7 (Soft Genetics®) representando três regiões de MSAT. Cada pico possui uma cor, de acordo com a fluorescência, um tamanho em pares de base (eixo X) e uma altura em unidades arbitrárias de fluorescência (eixo Y). A amostra possui indicativo de infecção mista, onde há duplicidade de picos de mesma cor e os minoritários apresentam ao menos um terço da altura dos majoritários. Considera-se dois haplótipos, o primeiro caracterizado pelos três picos de maior fluorescência e o segundo pelos picos de menor fluorescência. 35
- Figura 5** - Gráfico de distribuição temporal, mês a mês (junho, 2014 a julho, 2015), das amostras (barras), casos totais (linha contínua) e casos entre 5 e 63 anos (linha tracejada), proporcionalmente, de acordo com a data de diagnóstico. 40
- Figura 6** - Mapa de Mâncio Lima construído com o auxílio do programa QGIS 3.4.3. As ruas estão representadas por linhas azuis, destacando os domicílios (branco), casos totais de malária vivax (amarelo) e amostras (vermelho). 41
- Figura 7** - Distribuição de frequência de alelos de acordo com a proporção em que se encontram nas amostras genotipadas. 43
- Figura 8** - Gráfico de distribuição da matriz de distância genética entre todos os pares de amostras, considerando os valores reais (barras) e os valores permutados (linha). 45
- Figura 9** - Gráfico de distribuição da distância para o vizinho mais próximo dos valores reais das amostras (barras) e dos valores permutados (linha). 45
- Figura 10** – Haplogrupos compostos por mais de duas amostras sob forma de rede de haplótipos construída a partir dos resultados do programa eBURST e PHYLOViZ 2.0. Os nós representam os haplótipos com tamanho proporcional ao número de amostras que o compõem e as hastes contínuas e pontilhadas indicam a diferença entre haplótipos de um e dois alelos, respectivamente. 46
- Figura 11** - Distribuição temporal de amostras de acordo com o haplogrupo pertencente e de amostras não classificadas (NC). As barras representam as amostras genotipadas (escala à esquerda) e as linhas contínua e pontilhada mostram os números de casos totais de malária vivax e de casos entre 5 e 63 anos, respectivamente, obtidos através do banco de dados do sistema de notificação (escala à direita). 47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 12** - Distribuição espaço-temporal de amostras pertencentes ao HG1. (A) Mapa contendo a posição espacial das amostras. (B) Gráfico da distribuição das amostras de acordo com meses. (C) Rede de haplótipos do HG1..... 49
- Figura 13** - Distribuição espaço-temporal de 9 amostras numeradas pertencentes a um mesmo haplótipo do HG1. (A) Distribuição espacial. (B) Distribuição temporal. (C) Posição do haplótipo destacada na rede de haplótipos do HG1..... 50
- Figura 14** - Distribuição espaço-temporal de 8 amostras numeradas pertencentes a um mesmo haplótipo do HG1. (A) Distribuição espacial. (B) Distribuição temporal. (C) Posição do haplótipo destacada na rede de haplótipos do HG1..... 51
- Figura 15** - Distribuição espaço-temporal das amostras numeradas pertencentes ao HG2. (A) Distribuição espacial. (B) Distribuição temporal. (C) Rede de haplótipos. 52
- Figura 16** - Distribuição espaço-temporal de amostras numeradas pertencentes aos HG4, HG6 e HG14 (amostras idênticas estão destacadas em negrito). (A) Distribuição espacial. (B) Distribuição temporal. (C) Rede de haplótipos de cada HG. 54
- Figura 17** - Distribuição espaço-temporal de amostras numeradas pertencentes ao HG13 (amostras idênticas estão destacadas em negrito e com asterisco de acordo com o haplótipo ao qual pertencem). (A) Distribuição espacial. (B) Distribuição temporal. (C) Rede de haplótipos. 55
- Figura 18** - Distribuição espaço-temporal de amostras numeradas pertencentes ao HG17 (amostras idênticas estão destacadas em negrito e com asterisco de acordo com o haplótipo ao qual pertencem). (A) Distribuição espacial. (B) Distribuição temporal. (C) Rede de haplótipos. 56
- Figura 19** – Mapa de distribuição espacial de todas as amostras classificadas de acordo com HG a qual pertencem. 57
- Figura 20** - Valores de ΔK calculados a partir da probabilidade posterior para cada valor de K, variando de 1 a 10, com quatro repetições para cada valor. 58
- Figura 21** - Contribuição de cada uma das 5 populações na composição de amostras. Amostras compostas por 70% ou mais de apenas uma população foram consideradas pertencentes àquela..... 59
- Figura 22** - Distribuição temporal de amostras de acordo com a população a qual pertencente e de amostras não classificadas (NC). As barras representam as amostras genotipadas (escala à esquerda) e a linha mostra o número de casos totais de malária vivax, obtido através do banco de dados do sistema de notificação (escala à direita)..... 60
- Figura 23** - Mapa de distribuição espacial de todas as amostras classificadas de acordo com população a qual pertencem. 61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 24** - Distribuição espaço-temporal da POP1 (as amostras idênticas estão destacadas de acordo com o haplótipo ao qual pertencem: *, ** ou ***). (A) Distribuição espacial. (B) Distribuição temporal. 62
- Figura 25** – Possíveis mecanismos de transmissão de malária em Mâncio Lima. (A) Constante introdução de parasitos provenientes das zonas rurais (1, 2 e 3) incapazes de se fixar na população urbana. (B) Transmissão urbana estabelecida a partir de parasitos introduzidos provenientes de zonas rurais. 64

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a genotipagem de 14 regiões de microssatélites descritos por Karunaweera et al., 2007. A cauda adicionada nos oligonucleotídeos reversos encontra-se representada em letra minúscula na sequência. 32
- Tabela 2** - Combinação de marcadores de MSAT para reação em multiplex (6-FAM é representado pela cor azul, VIC pela cor verde e NED pela cor amarela). 33
- Tabela 3** – Variação dos tamanhos de alelos, heterozigosidade esperada e m-ratio dos 14 loci de microssatélite genotipados. 43
- Tabela 4** - Testes de evidências de DL através do cálculo do índice de associação padrão, com auxílio do programa Lian 3.0. O teste 1 foi realizado com todas as amostras, o teste 2 apenas com um representante de cada haplótipo, o teste 3 excluindo amostras com indicativo de infecções geneticamente mistas. O teste 4 apresenta a média dos I_A^S calculados a partir das combinações de exclusões de marcadores presentes no mesmo cromossomo. O teste 5 foi realizado utilizando os critérios do teste 2 e 3, simultaneamente. 44
- Tabela 5** - Composição das populações de acordo com os haplogrupos. Os HGs destacados em negrito foram desestruturados. 72

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|------------|---|
| A | Adenina |
| AC | Acre |
| ACT | Artemisinin-based Combination Therapy (Terapia Combinada Derivada de Artemisinina) |
| AM | Amazonas |
| C | Citosina |
| CDC | Centers for Disease Control and Prevention (Centro de Controle de Doença e Prevenção) |
| CEPSH | Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos |
| DL | Desequilíbrio de Ligação |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico) |
| dNTP | Deoxyribonucleotide Triphosphate (Trifosfato Desoxirribonucleotídeo) |
| G | Guanina |
| GPS | Global Positioning System (Sistema de Posicionamento Global) |
| hab | Habitantes |
| H_E | Heterozigosidade Esperada |
| HG | Haplogrupo |
| HGs | Haplogrupos |
| IC | Intervalo de Confiança |
| I_A^S | Índice de Associação Padrão |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IPA | Índice Parasitário Anual do Brasil |
| K | Número de Populações |
| ΔK | Variação da probabilidade posterior do número de populações |
| MATLAB | Matrix Laboratory |
| $MgCl_2$ | Cloreto de Magnésio |
| MS | Ministério da Saúde |
| MSAT | Microssatélite |
| MSATs | Microssatélites |
| n | Número |
| NC | Não Classificados |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------------------------|--|
| NH ₄ SO ₄ | Sulfato de Amônio |
| PAHO | Pan American Health Organization (Organização Pan-Americana da Saúde) |
| POP | População |
| qPCR | Quantitative Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa) |
| RNA | Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico) |
| T | Timina |
| U | Unidade |
| USP | Universidade de São Paulo |
| V _D | Variância Observada |
| V _E | Variância Encontrada |
| WHO | World Health Organization (Organização Mundial da Saúde) |
| % | Por cento |
| ≥ | Maior ou igual |
| ≤ | Menor ou igual |
| > | Maior |
| < | Menor |
| × | Vezes |
| °C | Graus Celcius |
| μl | Microlitro |
| μM | Micromolar |
| mM | Milimolar |
| ± | Mais ou menos |
| ® | Marca registrada |
| km | Quilômetro |
| km ² | Quilômetro quadrado |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 | Malária: Aspectos Gerais | 19 |
| 1.2 | Malária no Brasil | 20 |
| 1.3 | Malária Urbana e Residual da Amazônia Brasileira | 23 |
| 1.4 | Epidemiologia Molecular da Malária Residual | 24 |
| 2 | OBJETIVOS | 27 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODO | 28 |
| 3.1 | Considerações Éticas | 28 |
| 3.2 | Área de Estudo | 28 |
| 3.3 | Casos de Malária e Dados do Sistema de Posicionamento Global (GPS) | 30 |
| 3.4 | População de Estudo | 30 |
| 3.5 | Diagnóstico Molecular | 31 |
| 3.6 | Genotipagem de Microssatélites | 31 |
| 3.7 | Análise de Dados | 34 |
| 3.7.1 | Análise Epidemiológica | 34 |
| 3.7.2 | Genotipagem de Microssatélites | 34 |
| 3.7.3 | Níveis de Diversidade Genética | 35 |
| 3.7.4 | Estrutura Populacional e Variação Genética Espaço-Temporal | 37 |
| 4 | RESULTADOS | 39 |
| 4.1 | Análises Epidemiológica | 39 |
| 4.2 | Genotipagem de Microssatélites e Diversidade Genética | 42 |
| 4.3 | Distribuição Espaço-Temporal: haplogrupos | 46 |
| 4.4 | Distribuição Espaço-Temporal: populações | 58 |
| 5 | DISCUSSÃO | 63 |
| 5.1 | Análise Epidemiológica | 63 |
| 5.2 | Diversidade Genética de <i>P. vivax</i> | 66 |
| 5.3 | Estrutura Populacional | 70 |
| 5.4 | Limitações do Estudo | 74 |
| 6 | CONCLUSÃO | 75 |
| 7 | REFERÊNCIAS | 76 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária: Aspectos Gerais

Sendo uma das principais doenças parasitárias da atualidade, a malária atinge milhões de pessoas anualmente em regiões tropicais, incluindo África, Ásia, Américas e Oceania. No ano de 2017 foram notificados 219 milhões de casos (92% concentrados no continente africano) distribuídos em 90 países, e 435 mil mortes, sendo mais da metade crianças a baixo de cinco anos de idade (WHO, 2018a). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, neste mesmo ano, quase metade da população mundial encontrou-se sob risco de contração da doença.

O parasito causador da malária pertence ao gênero *Plasmodium* e cinco espécies são conhecidas por causar infecção no homem: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. A infecção mais presente e predominantemente encontrada nas regiões africanas e no sudeste asiático é dada pela espécie *P. falciparum*, sendo responsável pela forma de maior morbidade e mortalidade da doença, incluindo os quadros clínicos de malária grave. Já na região das Américas, 74,1% dos casos são causados pela espécie *P. vivax*, que embora não esteja relacionado com alta mortalidade, é considerado um grande problema de saúde pública (WHO, 2018a).

O ciclo de vida do parasito é iniciado no hospedeiro humano através da picada do mosquito fêmea pertencente ao gênero *Anopheles*. Os esporozoítos presentes na saliva do vetor são inoculados e invadem a corrente sanguínea permanecendo na circulação até atingirem o fígado, onde são capazes de invadir hepatócitos e formar, de forma assexuada, estruturas multinucleadas denominadas esquizontes. Os esquizontes rompem os hepatócitos e são liberados na corrente sanguínea sob a forma de merozoítos, que iniciam o ciclo eritrocítico invadindo hemácias, desenvolvendo-se em trofozoítos, se multiplicando em esquizontes, rompendo as células sanguíneas e gerando novos merozoítos, os quais podem invadir outras hemácias, dando continuidade ao ciclo. Durante o ciclo eritrocítico, os merozoítos podem se diferenciar em gametócitos e permanecer na corrente sanguínea. Em um próximo repasto sanguíneo, o mosquito pode adquirir as formas diferenciadas em gametócitos dando início a reprodução sexuada no hospedeiro invertebrado, através da fecundação e formação do ovo. Após adquirir mobilidade, o ovo, agora chamado de oocineto, migra até a hemocele formando oocisto que sofre divisão reducional e esporogonia. Já na glândula salivar, o parasito

desenvolve-se em esporozoítos, sendo a forma infectante e transmissível no próximo repasto sanguíneo (CDC, 2018).

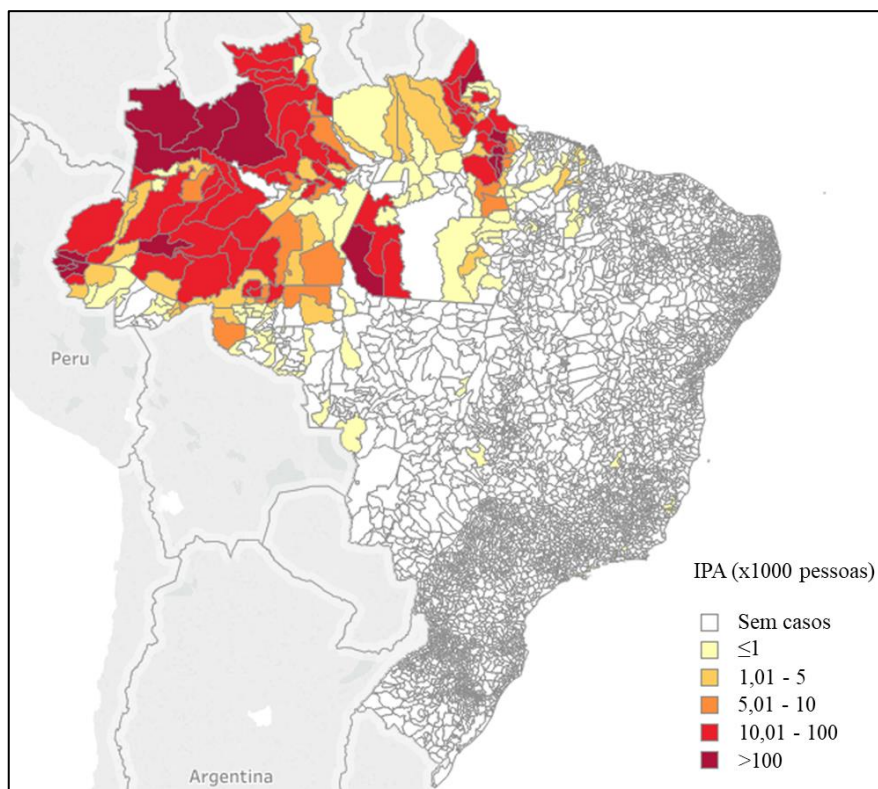
Uma particularidade do *P. vivax* e *P. ovale*, não encontrada em outras espécies, é o desenvolvimento de formas parasitárias chamadas hipnozoítos, que possuem uma baixíssima atividade metabólica e permanecem nos hepatócitos do hospedeiro humano, sendo responsáveis por recaídas, caso não tratadas. Essas formas são capazes de continuar dormentes no fígado por meses e as causas para a reativação ainda são pouco conhecidas. As recaídas diferem das recrudescências pela origem da infecção: as recrudescências ocorrem a partir de formas sanguíneas que não foram totalmente eliminadas e são capazes de reiniciar a infecção, enquanto que as recaídas são provocadas pela ativação de hipnozoítos (WHITE e IMWONG, 2012).

As origens dos casos de malária em áreas endêmicas podem ser explicadas a partir de um padrão de circulação de parasitos localmente sem qualquer tipo de barreiras, onde estes se comportam de forma panmítica, em um ambiente receptivo ao vetor transmissor e com condições adequadas à transmissão da doença (presença de indivíduos susceptíveis e competência e capacidade vetorial), mas também pela importação de casos, quando há uma significativa circulação e mobilidade de indivíduos para locais de alta transmissão e endemicidade, sendo os casos de malária diagnosticados na região resultados de constantes infecções importadas e que não se fixam na população. Outras formas de circulação de parasitos são em episódios de surtos, representados por aumento súbito de casos em locais de baixa e controlada endemicidade, ou até mesmo onde a doença já foi eliminada (WESOLOWSKI et al., 2018). Para fins de controle e erradicação da malária, o entendimento da origem e padrões complexos de circulação e transmissão de parasitos é um dos principais obstáculos encontrados e deve ser tratado com alta relevância.

1.2 Malária no Brasil

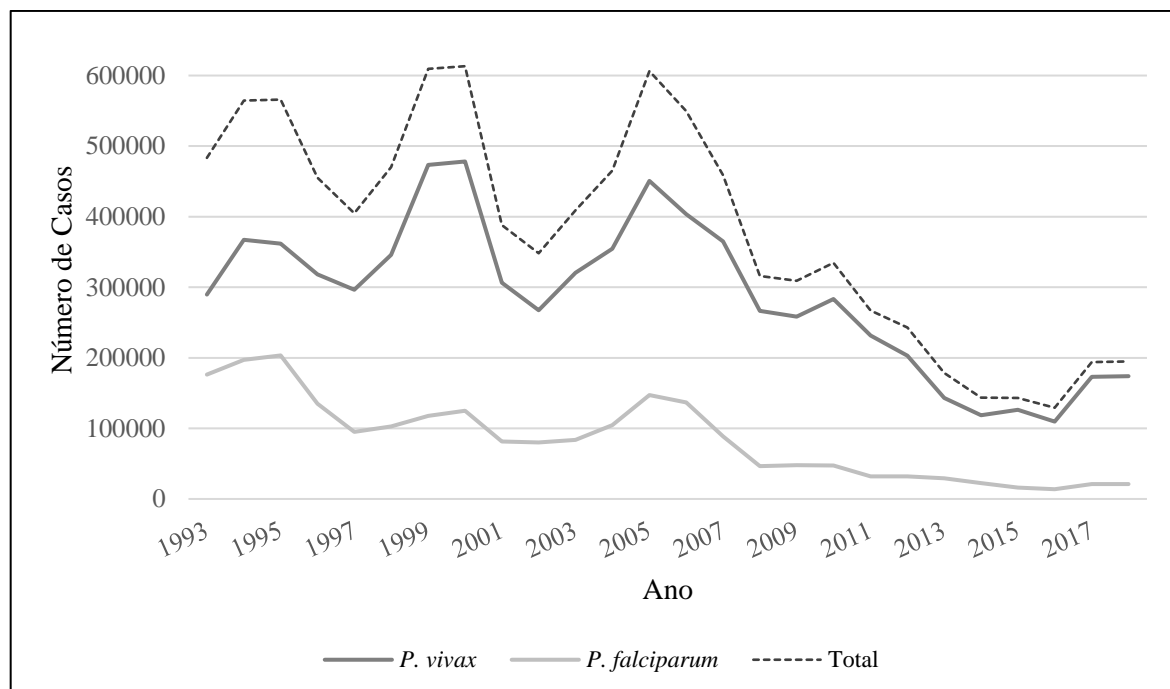
O Brasil é um dos países que mais contribui com casos de malária no continente americano, sendo responsável por 22% dos casos diagnosticados na América Latina (WHO, 2018a). Devido às características ambientais que favorecem o ciclo de vida do vetor e, consequentemente, a transmissão e manutenção da doença, 99% dos casos de malária brasileira estão concentrados na Amazônia Legal, localizada na região norte do país (Figura 1) compreendendo 60% do território nacional e 13,4% da população brasileira, totalizando 42 milhões de pessoas sob risco de infecção em 2017.

Figura 1 – Classificação de transmissão de malária nas cidades brasileiras de acordo com o Índice Parasitário Anual (IPA), em 2017. Adaptado de PAHO, 2017.



No ano de 2016, de acordo com o Ministério da Saúde, o Brasil apresentou o menor número de casos de malária (128.747) e após 36 anos de queda, o país registrou um aumento de 51% de casos em 2017, mantendo a alta prevalência em 2018, quando foram notificados 193.519 casos (Figura 2) (MS, 2019a). Embora o número de óbitos permaneça em declínio (35 casos fatais em 2016 e 30 em 2017), a malária persiste sendo uma das principais doenças parasitárias e negligenciadas da atualidade, de alta morbidade e considerada um problema de saúde pública.

Figura 2 - Número de casos de malária por espécie de acordo com o ano de notificação (1993-2018). Infecções causadas por *P. vivax* estão representadas pela linha cinza escura, *P. falciparum* pela cinza clara e os casos totais pela linha tracejada. Adaptado de MS (2019).



No Brasil, as infecções de malária são majoritariamente causadas pelo protozoário *Plasmodium vivax* (90% dos casos), seguido por *P. falciparum* (10%) e raríssimos casos de *P. malariae* (WHO, 2018b), sendo que um dos maiores desafios no controle de malária consiste no alto número de infecções causadas por *P. vivax*. Quando comparado com *P. falciparum*, *P. vivax* apresenta-se frequentemente em infecções de baixa parasitemia e assintomáticas, levando ao não diagnóstico e tratamento da infecção, promovendo a manutenção de constantes fontes de transmissão. Além disso, o parasito é capaz de formar hipnozoítos (estágios dormentes no fígado) responsáveis pelas recaídas e também possui uma rápida produção de gametócitos durante o ciclo no hospedeiro humano, normalmente, anteriormente ao aparecimento dos sintomas clínicos e, conseqüentemente, tornando-se transmissível antes do diagnóstico da infecção (BASSAT et al., 2016).

Outro importante desafio para as estratégias atuais de eliminação é a persistência de focos de malária residual na Amazônia. No Brasil, a prevenção da malária é realizada através de medidas de proteção individual e de controle de vetores. O principal vetor responsável pela transmissão de malária vivax e falciparum, na floresta Amazônica, é o mosquito *Anopheles darlingi* (LAPORTA et al., 2015). O Ministério da Saúde recomenda o uso de mosquiteiros e cortinados impregnados com inseticidas, telas em portas e janelas dos domicílios, evitar locais próximos a potenciais criadouros e de alta densidade de mosquitos, principalmente ao

amanhecer e fim da tarde (período em que os mosquitos se alimentam, portanto, de maior risco de contrair a doença) e o uso de repelentes em áreas descobertas do corpo. Já com relação ao controle vetorial, as medidas adotadas envolvem borrifação residual intradomiciliar e nebulização espacial, além da distribuição dos mosquiteiros impregnados (MS, 2019b).

Uma das principais medidas de controle envolve o diagnóstico rápido e o tratamento imediato de indivíduos infectados. As áreas endêmicas para malária possuem centros de diagnóstico específicos para a doença e profissionais capacitados, assim, pacientes com sintomas característicos e que procuram o sistema de saúde, são diagnosticados e tratados rapidamente, quando positivos. No Brasil, o tratamento para malária vivax dá-se pela administração de cloroquina por três dias e doses ajustadas de primaquina durante sete dias. Já no tratamento de infecções por *P. falciparum*, utiliza-se derivados de artemisinina (ACT) por três dias e dose-única de primaquina (MS, 2019b).

Regiões urbanas onde as medidas habituais de controle e prevenção da malária são aplicadas, porém, não resultam no impacto esperado na redução dos níveis de transmissão da doença, são considerados focos de malária residual (FERREIRA e CASTRO et al., 2016). Portanto, a natureza focal da malária no país indica que a sua eliminação depende da priorização de um pequeno número de focos de transmissão.

1.3 Malária Urbana e Residual da Amazônia Brasileira

O Vale do Alto Juruá, região localizada no norte do país, próxima à fronteira com o Peru, abriga quatro municípios responsáveis por mais de 20% dos casos de malária no Brasil: Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Rodrigues Alves no Estado do Acre e Guajará, no Amazonas (MS, 2016).

Além de ser a região com o maior número de casos do Brasil, a transmissão da malária não está restrita a zona rural do Vale do Alto Juruá. No ano de 2017, aproximadamente metade dos casos de malária notificados na região foram considerados infecções contraídas em zona urbana (DOS REIS et al., 2018). Usualmente, áreas de maior urbanização tendem a apresentar redução do número de casos, já que o ambiente é menos receptivo ao vetor transmissor, e está, frequentemente, acompanhada de melhorias nas condições básicas de saúde (incluindo diagnóstico e tratamento), nas habitações e no nível socioeconômico, características

comumente associadas a transmissão de malária (TATEM et al., 2013). Assim, as causas do fenômeno de malária urbana na região ainda são pouco conhecidas.

Outro importante fator é a definição de transmissão da malária urbana, onde casos importados de regiões endêmicas rurais e diagnosticados em áreas urbanas se diferem de casos contraídos no perímetro urbano. A complexidade está relacionada com a proximidade da área urbana com a área rural, sendo que, comumente, a primeira encontra-se inserida na segunda, além da presença de pequenos bolsões rurais dentro da cidade e da alta mobilidade de pessoas entre as regiões, principalmente devido a atividades de agricultura (WILSON et al., 2015). Assim, é de extrema importância o entendimento da receptividade da cidade à transmissão de malária, buscando o desenvolvimento adequado de medidas de controle da doença a serem aplicadas na região.

Um dos principais fatores contribuintes para a alta densidade de vetores das cidades pertencentes ao Vale do Alto Juruá são os numerosos tanques de piscicultura abertos em áreas urbanas e periurbanas, principalmente para fins comerciais, além de inúmeras áreas alagáveis em determinadas épocas do ano, como consequência da proximidade das cidades com rios. Os tanques estão entre os principais habitats para a reprodução de vetores da malária, onde são encontrados até quatro vezes mais larvas de *Anopheles* quando comparados com fontes naturais de água, podendo ter um importante papel na contribuição para o aumento da densidade de vetores e a manutenção da transmissão da doença na região (DOS REIS et al., 2015).

Considerando a alta endemicidade, as características físicas, ambientais e biológicas da região e o comportamento da transmissão da malária, o Vale do Alto do Juruá abriga os maiores focos de malária residual e urbana do Brasil.

1.4 Epidemiologia Molecular da Malária Residual

Técnicas moleculares no estudo da malária, antes limitadas para fins de diagnóstico e genotipagem, além do fornecimento de dados mais exatos sobre prevalência e incidência, detecção de infecções subpatentes e diferenciação entre recrudescência, recaídas e novas infecções, vêm sendo amplamente aplicadas em estudos epidemiológicos (ESCALANTE et al., 2015). As informações obtidas a partir da análise de material genético possibilitam estudos de padrões demográficos em populações de parasitos, como migrações, colonizações de novas áreas e expansão populacional, incluindo casos de transmissão impulsionada por grupos

específicos de indivíduos infectados, causando surtos e até mesmo reintrodução da doença, em locais onde fora eliminada (CONWAY et al., 2007).

Rastrear populações de parasitos no espaço e no tempo, bem como estimar os níveis de multiplicidade de infecções (coexistência ou não de múltiplas linhagens de parasitos no mesmo hospedeiro), trazem informações importantes para o desenvolvimento de estratégias de controle da malária, especialmente em áreas urbanas, onde distinguir entre casos importados e locais, detectar a origem de surtos e monitorar a circulação de parasitos, são informações essenciais para orientar o controle da doença (CONWAY et al., 2007, FERREIRA e RODRIGUES, 2014; ESCALANTE et al., 2015).

O maior obstáculo aos estudos de genética de populações de plasmódios e de epidemiologia molecular da malária vivax foi, até recentemente, a falta de marcadores moleculares adequados para uso em larga escala. Nos últimos anos, marcadores de DNA microsatélite (MSAT) altamente polimórficos, caracterizados em meados da década de 2000, vêm sendo utilizados no estudo de populações locais de *P. vivax* e em situações em que espera-se encontrar níveis relativamente baixos de diversidade e divergência entre populações (ESCALANTE et al., 2015).

Microsatélites são regiões de DNA repetitivo, com dezenas a milhares de cópias em série de motivos (conservados ou degenerados) entre um e seis nucleotídeos. São classificados de acordo com as unidades de repetição da sequência, podendo ser: perfeitos (sequência de repetição de motivos pura, não havendo interrupção por bases não pertencentes, como por exemplo: ACACACACAC); imperfeitos (sequência de repetição de motivos interrompida por bases não correspondentes, como por exemplo: ACACACACACgtACACAC); compostos (sequências com dois ou mais motivos de repetição adjacentes, como por exemplo: ACACACACACGTGTGTGTGTGT); ou complexos (sequências de repetição de motivos compostas e interrompidas) (WEBER, 1990).

Um dos mecanismos mutacionais capaz de influenciar e promover alterações nos tamanhos dos MSATs é o deslocamento da fita de DNA durante a replicação seguido de um pareamento de bases não complementares. Quanto maior o tamanho da sequência de DNA, maiores as chances de deslocamento e, caso ocorra na fita molde, a nova sequência apresentará deleção de algumas bases e diminuição da sequência de MSAT, em contrapartida, caso ocorra na nova fita, haverá inclusão de novas bases e aumento da sequência (LEVINSON e GUTMAN, 1987). Ainda assim, apenas as sequências que não forem detectadas pelo sistema de reparo de DNA se tornarão novos MSATs (STRAND et al., 1993). As mutações frequentemente observadas nos microsatélites conservados ocorrem seguindo o modelo de *stepwise mutation*,

caracterizadas pelo aumento ou diminuição do tamanho da sequência de DNA, de acordo com a adição ou redução de apenas um motivo repetitivo, independentemente do tamanho da sequência (OHTA e KIMURA, 1973; VALDES et al., 1993).

As análises de MSATs de *Plasmodium* são amplamente utilizadas em estudos populacionais de diversidade genética, devido ao fato de possuírem certa neutralidade em termos evolutivos e um alto grau de polimorfismos. Assim, a partir de um bom painel de marcadores, torna-se possível indicar multiplicidade de infecções e caracterizar a estrutura de uma população, incluindo detecção de níveis de diversidade gênica, padrões de transmissão, formação de agrupamentos e de surtos, além de permitir a comparação de parâmetros populacionais entre regiões distintas (SUTTON, 2013).

Ao longo da última década, foi explorado o uso de MSATs para caracterizar populações de *P. vivax* em comunidades rurais da Amazônia brasileira. Foram evidenciadas alta diversidade genética, níveis de multiplicidade de infecção e de desequilíbrio de ligação em populações provenientes de locais de baixa, média e alta endemicidade (REZENDE et al., 2010), permitiu identificar a expansão clonal de parasitos semelhantes durante um surto de malária em uma comunidade rural (BATISTA et al., 2015) e a detecção de um agrupamento específico de uma determinada região, dentre parasitos coletados de diversas áreas (MACHADO et al., 2004).

Informações fornecidas pelas análises de MSATs possibilitam o estudo da circulação de cepas endêmicas em ambiente urbano, a introdução de novos parasitos e a associação entre a transmissão da doença e mobilidade de hospedeiros entre áreas urbanas e rurais, bem como analisar se a transmissão de malária urbana depende de linhagens endêmicas de parasitos que se mantêm em circulação por longos períodos de tempo ou se está relacionada com introduções frequentes de novas linhagens, salientando o papel de migrações humanas e de casos importados na manutenção. Essas informações são cruciais para o planejamento de medidas de controle e eliminação da malária residual.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto consiste em examinar, através de dados epidemiológicos e moleculares, a distribuição espaço-temporal de casos de malária vivax e variações genéticas nas populações de *Plasmodium vivax* circulantes, em foco residual urbano no município de Mâncio Lima, Acre. Os objetivos específicos são:

- a) Analisar características epidemiológicas e a distribuição no tempo e no espaço dos casos de malária vivax urbana em Mâncio Lima, entre os meses de junho de 2014 e julho de 2015;
- b) Analisar a estrutura populacional de *P. vivax*, níveis de diversidade genética e de multiplicidade de infecções, a partir de análise de MSAT de populações do parasito circulantes na mesma área e período.
- c) Identificar padrões espaço-temporais de circulação de linhagens do parasito na população de hospedeiros, a partir de padrões de agrupamento de acordo com similaridade genética, na cidade de Mâncio Lima, AC.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Considerações Éticas

As amostras utilizadas neste estudo são provenientes de pacientes recrutados para ensaio de eficácia clínica de cloroquina e primaquina no tratamento de malária vivax (número de registro do estudo: NCT02043652), aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (parecer 550.565) (LADEIA-ANDRADE et al., 2019).

Este projeto foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (parecer 1332/CEPSH, 15 de maio de 2017).

3.2 Área de Estudo

A cidade de Mâncio Lima (Figura 3) pertence a região do Vale do Alto Juruá, no estado do Acre, localizada no extremo oeste do Brasil. Encontra-se na fronteira com Peru e com outras duas cidades pertencentes ao Vale (Cruzeiro do Sul - AC e Guajará - AM). No ano de 2018, de acordo com Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população estimada foi de 18.638 habitantes, distribuídos em uma unidade territorial de 5.452,853 km² e com densidade demográfica de 2,79 hab/km² (dados extraídos a partir do censo do IBGE, 2018).

Figura 3 – Mapa do Brasil indicando a localização geográfica do município de Mâncio Lima, localizado no Estado do Acre.



A zona urbana de Mâncio Lima ocupa cerca de 1% de todo o território municipal e foi desenvolvida às margens de uma das principais rodovias que cortam o estado (BR 364), estando cercada pela floresta Amazônica. É considerada uma das cidades de maior prevalência de malária da região Amazônica e da América do Sul e em 2016 apresentou o maior Índice Parasitário Anual do Brasil (IPA), com 518 casos notificados a cada 1.000 habitantes (MS, dados não publicados). Em 2017, foram notificados 9.278 casos, representando 28,6% dos casos de malária de todo o estado do Acre (PAHO, 2018; MS, dados não publicados). Em 2016, aproximadamente 50% dos casos de malária notificados foram considerados infecções adquiridas na zona urbana da cidade (DOS REIS et al., 2018).

A região da cidade de Mâncio Lima foi caracterizada como urbana seguindo critérios de classificação descritos por Dal'Asta et al., em 2017, incluindo formas espaciais (cidades e assentamentos de diferentes densidades, considerando a influência tecnológica), características sociais (padrões de consumo e comportamento da população) e evolução e desenvolvimento de acordo com o tempo (DAL'ASTA et al., 2017; DAL'ASTA et al., 2018).

3.3 Casos de Malária e Dados do Sistema de Posicionamento Global (GPS)

Os casos de malária urbana do município de Mâncio Lima, registrados nos postos urbanos de diagnóstico e tratamento de malária, no período de junho de 2014 a julho de 2015, foram identificados através do banco de dados de notificação cedido pelo Programa Nacional de Controle de Malária do Ministério da Saúde.

Através do banco de dados de indivíduos e domicílios de Mâncio Lima, construído a partir do censo realizado pela nossa equipe de trabalho durante os anos de 2015 e 2016, as localizações geográficas (coordenadas de GPS) dos casos notificados durante o período de 14 meses foram identificadas. O cruzamento dos dados foi realizado com auxílio do programa MATLAB (*Matrix Laboratory*, MathWorks, Natick, MA) considerando nome completo, sexo e idade: primeiramente foi realizada uma restrição dos dados do censo para sexo e idade (com intervalo de ± 3 anos), em seguida buscou-se por nomes idênticos aos casos notificados e, os não encontrados foram buscados utilizando um critério de diferença em até 15% dos caracteres.

3.4 População de Estudo

Os pacientes selecionados para a participação do estudo foram recrutados durante o período de 14 meses, entre junho de 2014 e julho de 2015, em cinco postos urbanos de diagnóstico e tratamento de malária, localizados no município de Mâncio Lima- AC.

Ao total, foram coletadas e selecionadas para o desenvolvimento deste estudo 178 amostras de sangue venoso. Os critérios de seleção foram homens e mulheres, com idades entre 5 e 70 anos, apresentando doença febril aguda ($\geq 37.5^{\circ}\text{C}$) ou histórico de febre nas últimas 48 horas, residentes na zona urbana e diagnosticados com malária vivax, somente, por exame microscópico de preparações de sangue em gota espessa corada com Giemsa, realizado por profissionais qualificados, em campo.

Para a localização geográfica de cada amostra, foram cruzados o banco de dados do censo com as informações das amostras (nome completo, sexo e idade dos indivíduos), utilizando a metodologia descrita no item 3.3, porém, respeitando o critério de diferença em até 25% dos caracteres. As amostras não encontradas foram buscadas manualmente e cada pareamento foi analisado, também manualmente, para eliminação de possíveis erros. Todas as localizações encontradas foram comparadas com o bairro de moradia, presente na descrição das

amostras, e aquelas em que o bairro divergia das coordenadas de GPS foram consideradas amostras de origem incerta.

Em seguida, cada amostra foi localizada, manualmente, no banco de dados de casos notificados para a confirmação do local provável de infecção, utilizando como critério de exclusão amostras cujo local fosse registrado como zona rural do município.

3.5 Diagnóstico Molecular

O DNA de cada amostra foi extraído a partir de 200 µl de sangue venoso total, de maneira automatizada, utilizando o equipamento QIAcube e kit de extração QIAamp DNA Mini Kit, comercializado pela Qiagen® (Hilden - Alemanha), utilizando o método de purificação de ácido nucleico baseado em membrana de sílica.

O diagnóstico de malária foi confirmado por Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo (qPCR) em tempo-real, utilizando *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Thermo Scientific®) como indicador, através de oligonucleotídeos iniciadores previamente descritos, tendo como alvo o gene do RNA ribossômico 18S de *P. vivax* e *P. falciparum* (KIMURA et al., 1997). A reação consiste em 5 µl do DNA extraído, 7,5 µl de 2×*Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix*, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (gênero específico e espécie-específico para as duas espécies, em reações distintas), e água ultra pura para completar o volume final de 20 µl. A qPCR foi realizada no termociclador *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystem®) com início a 50 °C por dois minutos, desnaturação a 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C seguido pela curva de *melting* (KIMURA et al., 1997, pouco modificado).

Todas as amostras utilizadas foram diagnosticadas como positivas para *P. vivax*, por exame microscópico e qPCR em tempo real, e negativas por ambas as técnicas para *P. falciparum*.

3.6 Genotipagem de Microssatélites

A tipagem molecular de microssatélites foi realizada utilizando 14 marcadores genéticos altamente polimórficos distribuídos em 10 cromossomos do *P. vivax*. Destes, 11 estão localizados em regiões codificadoras de proteínas. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados

para a genotipagem das amostras foram descritos por Karunaweera et al., em 2007 (Tabela 1) com marcações de fluorescência (6-FAM, NED ou VIC) adicionadas nas extremidades 5' dos oligonucleotídeos anteriores (KARUNAWEERA et al., 2007). Os MSATs escolhidos possuem repetições tetranucleotídicas (MS2) e trinucleotídicas, sendo que seis possuem sequências perfeitas (MS1, MS3, MS4, MS7, MS9 e MS15).

Tabela 1 – Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a genotipagem de 14 regiões de microssatélites descritos por Karunaweera et al., 2007. A cauda adicionada nos oligonucleotídeos reversos encontra-se representada em letra minúscula na sequência.

| Nome | Cromossomo | Marcador 5' | Oligonucleotídeos (5' -> 3') |
|------|------------|-------------|--|
| MS1 | 3 | 6-FAM | F: TCAACTGTTGGAAGGGCAAT R: ctgtcttTTGCTGCGTTTTTGTTCCTG |
| MS2 | 6 | VIC | F: GAGCTAGCCAAAGGTTCAACA R: ctgtcttTGGGGAGAGACTCCCTTTTC |
| MS3 | 4 | NED | F: GAAGATCCTGTGGAGGAGCA R: ctgtcttCTCCTTCGCTCCTTTTCCTTT |
| MS4 | 6 | 6-FAM | F: CGATTTACTGTTGACGCTGAA R: ctgtcttCAAAGGAACATGCTCGATGA |
| MS5 | 6 | NED | F: CGTCCTCTATCGCGTACACA R: ctgtcttAAAGGGAGAGGAGCGAAAAC |
| MS6 | 11 | VIC | F: GGTTCTTCGGTGATCTCTGC R: ctgtcttGGAGGACATCAACGGGATT |
| MS7 | 12 | 6-FAM | F: TTGCAGAAAATGCAGAGAGC R: ctgtcttAGGGTCTTCAGCGTGTGTT |
| MS8 | 12 | NED | F: AGAGGAGGCAGAAATGCAGA R: ctgtcttAGCCCCCTTTCGCTTCTTTAT |
| MS9 | 8 | 6-FAM | F: AGATGCCTACACGTTGACGA R: ctgtcttGAAGCTGCCCATGTGGTAAT |
| MS10 | 13 | NED | F: TTATCCCTGCTGGATGTGAA R: ctgtcttTCCTTCAGGTGGGACTTGT |
| MS12 | 5 | 6-FAM | F: AATGCGCATCCTATGTCTCC R: ctgtcttCTGCTGTTGTTGTTGCTGCT |
| MS15 | 5 | 6-FAM | F: TGTTTGCAAAGGAATCCACA R: ctgtcttCGCCAGATGAAAAGGATAA |
| MS16 | 9 | NED | F: TGTTGTGGTTGTTGATGGTGA R: ctgtcttGTCGGGGAGAACAACAACAT |
| MS20 | 10 | VIC | F: GCACAACAAATGCAAGATCC R: ctgtcttGTGGCAGTGGCTCATCTTCT |

A amplificação das 14 regiões foi realizada seguindo o protocolo de PCR, descrito por Orjuela-Sánchez et al. (2013), com um volume final de 15 µl, compreendendo: 3 µl de DNA, 1,8 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (anterior e reverso), 0,4 mM de dNTPs, 2 mM MgCl₂, 1× *Taq Buffer* NH₄SO₄, 1,25 U de *Taq DNA Polymerase* (Thermo Scientific®, Vilnius - Lituânia) e água ultrapura para completar o volume final (ORJUELA-SÁNCHEZ et al., 2013).

Os parâmetros do ciclo são: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos com 30 segundos para desnaturação a 94 °C, 40 segundos para anelamento a 58 °C e 50 segundos para alongação a 72 °C. A alongação final é de 5 minutos a 72 °C.

A enzima polimerase utilizada possui a tendência de adicionar um nucleotídeo extra (normalmente adenina) na extremidade 3' do produto amplificado, podendo alterar o tamanho do produto amplificado. Assim, os oligonucleotídeos reversos utilizados possuem uma cauda na extremidade 5' (CTGTCTT-) a fim de favorecer a adição do nucleotídeo e padronizar a amplificação (ORJUELA-SÁNCHEZ et al., 2013).

Após a reação de amplificação, o produto de DNA é diluído em água ultrapura nas proporções 1:180, na forma *multiplex* (totalizando 3 µl de DNA nas reações com três marcadores e 2 µl nas reações com dois marcadores, e 177 µl e 178 µl de água ultra pura, respectivamente), seguindo as combinações descritas na Tabela 2 (o marcador 6-FAM está representado pela cor azul, VIC pela cor verde e NED pela cor amarela). A combinação quatro é composta de dois marcadores de mesma cor (6-FAM), porém a distinção entre ambos é possível por possuírem tamanhos médios de alelos distantes. Para cada reação, são utilizados 2 µl do conjunto de DNAs diluídos e 9 µl do tampão de corrida, composto por 8,9 µl de *Hi-Di Formamide* (Applied Biosystem®, Foster City, EUA) e 0,1 µl de *GeneScan 500 ROX Dye Size Standard* (Applied Biosystems® Woolston - UK).

Tabela 2 - Combinação de marcadores de MSAT para reação em *multiplex* (6-FAM é representado pela cor azul, VIC pela cor verde e NED pela cor amarela).

| Combinações | MSAT |
|-------------|-------------------|
| 1 | MS1 + MS2 + MS3 |
| 2 | MS4 + MS5 + MS6 |
| 3 | MS7 + MS8 + MS20 |
| 4 | MS9 + MS15 + MS16 |
| 5 | MS10 + MS12 |

3.7 Análise de Dados

3.7.1 Análise Epidemiológica

As amostras utilizadas no desenvolvimento do projeto foram testadas com relação a representatividade do total de casos de malária vivax recuperados a partir do banco de dados fornecido pelo Programa Nacional de Controle de Malária do Ministério da Saúde. As comparações foram realizadas para sexo e distribuição temporal, utilizando o teste de qui-quadrado, e para idade, através do teste *t-student* de comparação de médias. Os cálculos foram realizados utilizando o programa Microsoft Office Excel (Microsoft®).

Para análise da distribuição espacial, foram construídos mapas com o auxílio do programa QGIS 3.4.4, utilizando as coordenadas de GPS de cada amostra, dos casos notificados e dos domicílios de Mâncio Lima, obtidos através do censo populacional.

3.7.2 Genotipagem de Microsatélites

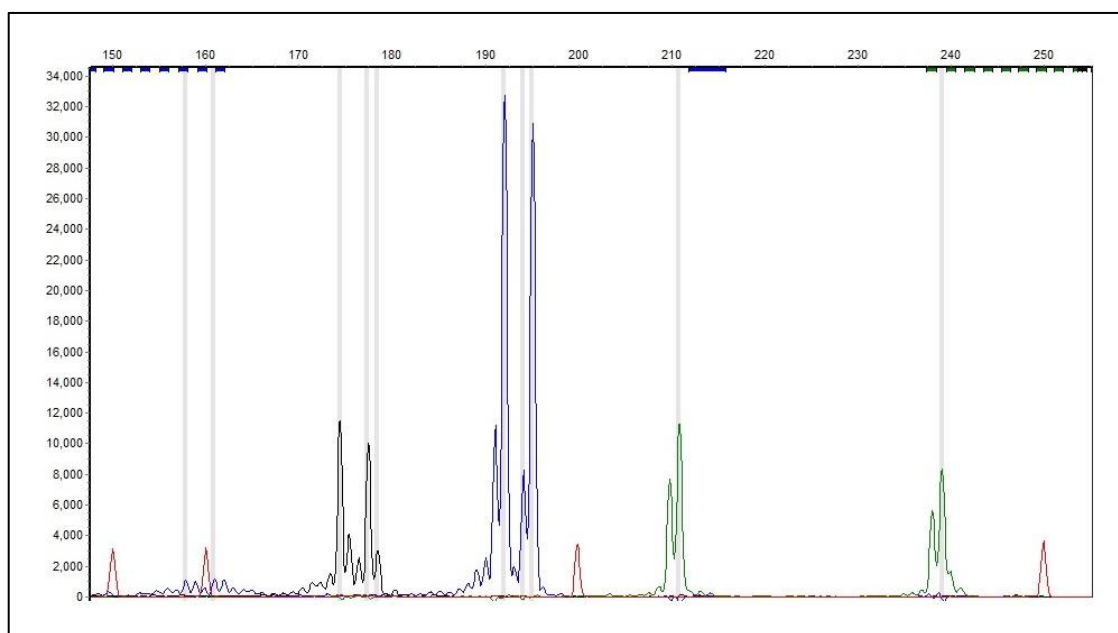
Os resultados das amplificações das regiões de MSATs foram obtidos a partir da emissão de fluorescência pelos marcadores 6-FAM, VIC e NED, através do sequenciador de DNA automatizado *ABI3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems®). As análises foram realizadas utilizando o programa *GeneMarker 2.7* (Soft Genetics®), onde cada fragmento de alelo amplificado é representado por um pico, que possui uma cor, de acordo com o marcador utilizado na amplificação, uma altura (eixo Y, medida em unidades arbitrárias de fluorescência) que estima a abundância relativa de parasitos na amostra, e um tamanho (eixo X, medido em pares de base) definido de acordo com o número de bases amplificadas (Figura 4). O padrão para as medições de tamanhos dos fragmentos utilizado foi o *GeneScan 500 ROX dye Size Standard* (Applied Biosystems®, Woolston - UK).

Os picos de fluorescência, representando a abundância relativa de parasitos na amostra, devem estar em uma altura mínima de 900 unidades de fluorescência para serem considerados e analisados.

Para a definição do tamanho de cada alelo, foram realizadas aproximações do número encontrado para o valor mais provável, considerando a variação dos tamanhos dos motivos em repetição do MSAT (caso o MSAT possua repetições trinucleotídicas, o valor encontrado será aproximado para o múltiplo de três mais próximo).

Todos os marcadores selecionados para a genotipagem estão presentes em uma única cópia no genoma haplóide do parasito, encontrado nos estágios sanguíneos do hospedeiro humano. Assim, caso haja presença de dois ou mais picos de amplificação (Figura 4), ou seja, dois ou mais alelos distintos em um mesmo *locus*, e o pico gerado pelo alelo minoritário (menor altura) tenha pelo menos um terço do tamanho do pico majoritário (maior altura), consideraremos um indicativo de infecção geneticamente mista, estando a amostra infectada com mais de um clone de parasitos (ANDERSON et al., 2000). Assim, o haplótipo predominante é aquele composto pelos picos majoritários.

Figura 4 - Imagem extraída do programa *GeneMarker 2.7* (Soft Genetics®) representando três regiões de MSAT. Cada pico possui uma cor, de acordo com a fluorescência, um tamanho em pares de base (eixo X) e uma altura em unidades arbitrárias de fluorescência (eixo Y). A amostra possui indicativo de infecção mista, onde há duplicidade de picos de mesma cor e os minoritários apresentam ao menos um terço da altura dos majoritários. Considera-se dois haplótipos, o primeiro caracterizado pelos três picos de maior fluorescência e o segundo pelos picos de menor fluorescência.



3.7.3 Níveis de Diversidade Genética

A análise da diversidade genética da população de parasitos encontrados foi realizada a partir do cálculo de heterozigosidade virtual (H_E), considerando apenas os alelos únicos ou predominantes (majoritários), em caso de infecções geneticamente mistas (ANDERSON et al., 2000).

$$H_E = \frac{n}{n-1} (1 - \sum p_i^2)$$

, sendo n o número de isolados analisados e p_i a frequência de cada alelo encontrado. O H_E varia de 0 a 1, sendo 0 o mínimo de diversidade esperada. Para realizar o cálculo, foi utilizado o programa Arlequin 3.5 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010).

Um índice de associação padrão (I_A^S) foi utilizado para testar evidências de desequilíbrio de ligação (DL) na população de parasitos. O teste compara a variância do número de alelos compartilhados por todos os pares de haplótipos observados na população (V_D) com a variância esperada de associações aleatórias de alelos (V_E):

$$I_A^S = \left(\frac{V_D}{V_E} - 1 \right) \left(\frac{1}{l-1} \right)$$

, onde l é o número de *loci* analisados. Os cálculos foram realizados com auxílio do programa LIAN 3.6, que testa a hipótese nula ($H_0: V_E = V_D$) utilizando o método de Monte Carlo com 10.000 interações (HAUBOLD e HUDSON, 2000).

Para o cálculo da força de DL na população foram realizados cinco diferentes testes com o objetivo de diminuir possíveis vieses, como amostras idêntica pertencentes ao mesmo haplótipo, erros na composição de haplótipo em infecções geneticamente mistas e forças físicas de DL pela presença de alelos em um mesmo cromossomo:

1. Número total de mostras;
2. Exclusão de amostras pertencentes ao mesmo haplótipo;
3. Exclusão de amostras com indicativo de infecções geneticamente mistas, com dois ou mais alelos em duplicidade;
4. Exclusão de marcadores localizados em um mesmo cromossomo, mantendo um representante por cromossomo;
5. Obedecendo os critérios dos testes 2 e 3.

Com o auxílio do programa MEGA7 (KUMAR et al., 2018), foi construída uma matriz de distância genética, utilizando como critério o número de marcadores distintos entre pares de amostras, variando de 0 a 14. Em seguida, utilizando o programa MATLAB e a matriz de

distância genética construída, foi localizado o vizinho mais próximo de cada amostra a partir da menor distância genética e essa distância foi computada. Os mesmos procedimentos de cálculo de matriz de distância e distância para o vizinho mais próximo foram realizados para as sequências criadas a partir da permutação de MSATs.

Os resultados das genotipagens do MSAT foram permutados dentro de cada marcador, com o auxílio do programa MATLAB e a função *randperm*, que, aleatoriamente, embaralha os tamanhos de alelos encontrados, respeitando a frequência em que aparecem. Assim, foram construídas 177 novas sequências de 14 marcadores, compondo haplótipos que simulam uma população panmítica com altos níveis de recombinação. Todas as simulações foram repetidas 50.000 vezes e os resultados foram compostos a partir da combinação de todas as simulações com intervalo de confiança de 95%.

3.7.4 Estrutura Populacional e Variação Genética Espaço-Temporal

Para as análises de haplótipos presentes na população, com o auxílio do programa Arlequin 3.5 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010), as amostras foram categorizadas de acordo com a semelhança de alelos, sendo consideradas pertencentes ao mesmo haplótipo aquelas que compartilhassem 100% de alelos idênticos. Para tanto, apenas os alelos majoritários foram utilizados.

O programa ainda mostra a distribuição de frequência alélica na população para a análise da presença de alelos raros e fenômeno de gargalo de garrafa populacional (*bootleneck*). Populações que estejam sob pressão seletiva e sofram uma redução de tamanho efetivo, apresentam também uma redução no número de alelos raros e na heterozigosidade de *loci* polimórficos (LUIKART et al., 1998).

Outra forma de observar o fenômeno de *bootleneck* é a partir do cálculo de *m-ratio*, assumindo também a queda na variabilidade alélica em uma população sob pressão seletiva. O *m-ratio* é calculado através da proporção de alelos encontrados dentre os possíveis, de acordo com a variação entre o menor e o maior alelo da população em questão (GARZA e WILLIAMSON, 2001). Assim, espera-se encontrar valores de *m-ratio* mais próximos de 1 em populações que não estejam sob efeito do fenômeno.

Além de haplótipos, as amostras foram categorizadas em haplogrupos de acordo com o compartilhamento de alelos, utilizando os critérios de ao menos 12 marcadores idênticos para participação em um mesmo haplogrupo. A classificação foi realizada utilizando programa

eBURST V3 (FEIL et al., 2004), com o número de reamostragem para *bootstrapping* no valor de 1.000. Ainda de acordo com os alelos compartilhados, o programa cria rede de haplótipos interligados, onde cada haplótipo ligado a outro difere em apenas um alelo. Com o auxílio do programa PHYLOViZ 2.0 (RIBEIRO-GONÇALVES et al., 2016), os haplótipos foram conectados independentemente do número de diferenças, a partir do algoritmo do programa goeBURST (FRANCISCO et al., 2009), possibilitando encontrar as conexões perdidas dentro dos haplogrupos construídos pelo eBURST.

Através do programa Structure 3.4 (PRITCHARD et al. 2000), as amostras foram geneticamente relacionadas a partir de um modelo bayesiano, buscando por conglomerados (*clusters*) genéticos agrupados por similaridade de acordo com o valor estipulado para o número de populações geneticamente distintas existentes na amostra (K). Além disso, foi possível estimar, para cada amostra, a fração do genótipo que provém de determinada população com base nas frequências alélicas observadas em cada *locus*. Os parâmetros utilizados foram 100.000 interações (período de *burn-in*) antes do início da coleta dos dados, afim de minimizar os efeitos das configurações iniciais, seguido de 1.000.000 de interações (repetições) para estimativas precisas. Os valores de K testados variaram de 1 a 10, com quatro repetições para cada valor, e o escolhido foi o melhor valor encontrado a partir do teste de ΔK , baseado na taxa de alteração da probabilidade do log entre valores K sucessivos (EVANNO et al., 2005).

$$\Delta K = \frac{m(|L(K + 1) - 2L(K) + L(K - 1)|)}{s[L(K)]}$$

, sendo $L(K)$ o valor estimado do logaritmo natural da probabilidade de K, m a média dos valores encontrados para o mesmo K em diferentes teste e s o desvio padrão.

4 RESULTADOS

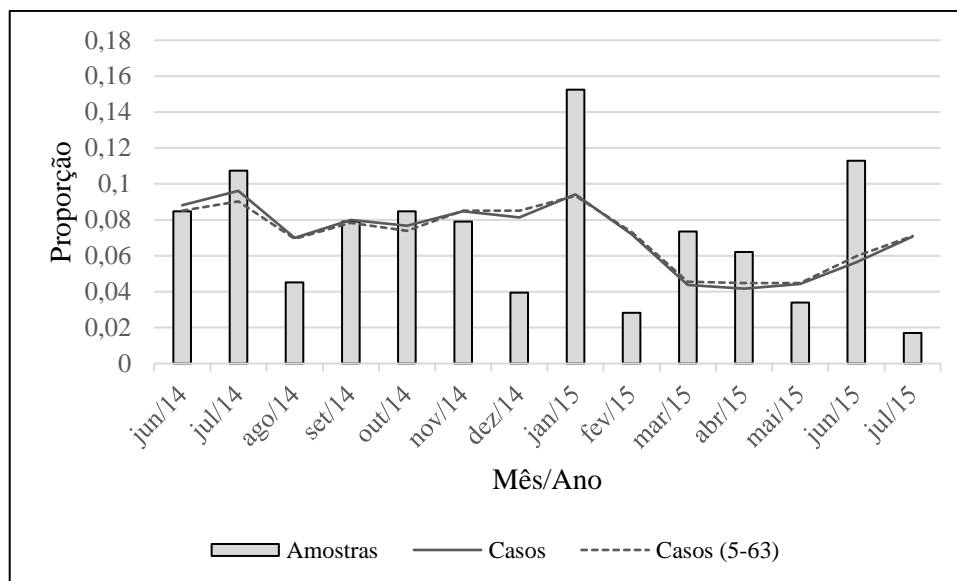
4.1 Análises Epidemiológica

A partir dos 6.341 casos de malária obtidos através do banco de dados de casos notificados pelo sistema de saúde, durante o período entre junho de 2014 e julho de 2015, 1.798 foram encontrados no banco de dados do censo de domicílios urbanos e indivíduos. Destes, 1.487 casos foram diagnosticados por exame microscópico como positivos para *P. vivax*, representado 82,7% do total. Com a inclusão apenas de indivíduos entre 5 e 63 anos, foram encontrados 1.339 casos de malária vivax.

Dentre as amostras, 62% são provenientes de indivíduos do sexo masculino, já do banco de dados de casos notificados (1.487 casos) e com a inclusão de apenas indivíduos entre 5 e 63 anos (1.339 casos), 56% e 58% são do sexo masculino, respectivamente. Testando a hipótese de que as proporções são diferentes, através do método de qui-quadrado, com 1 grau de liberdade, o valor de p encontrado é de 0,15 e 0,29, respectivamente, portanto, a hipótese nula não foi rejeitada e as amostras são capazes de representar os casos totais com relação ao sexo. Já com relação a idade, a idade média das amostras foi de 27,65 anos, dos casos totais de 25,90 e dos casos considerando apenas idades entre 5 e 63 anos, foi de 25,72. Testando a hipótese de que as idades são diferentes através do método *t-student*, o valor de p encontrado foi de 0,1, não rejeitando a hipótese nula e concluindo que as médias de idades são equivalentes.

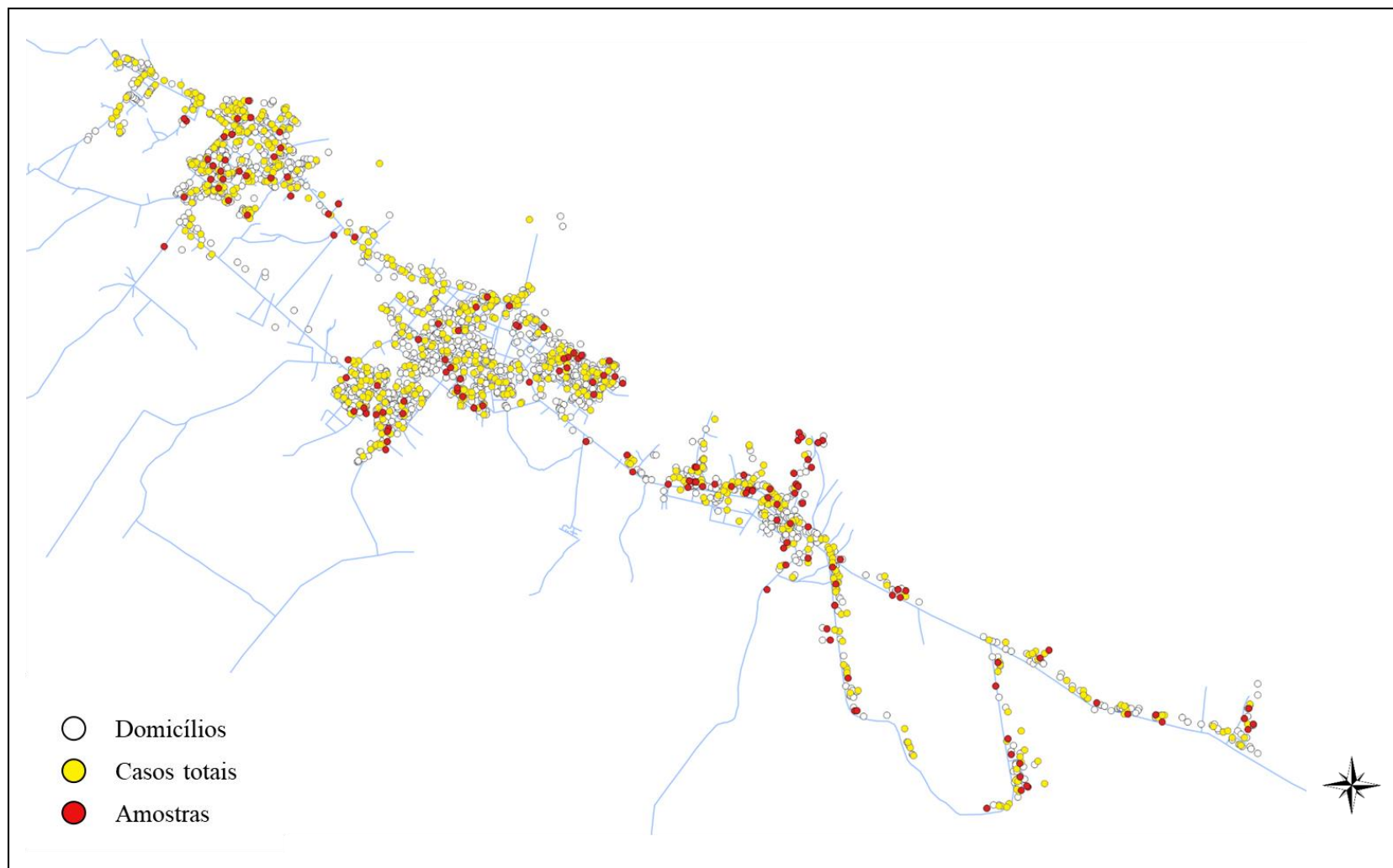
A Figura 5 representa a distribuição temporal, de acordo com a data de notificação, das proporções de número de amostras (178), de número de casos urbanos de malária vivax notificados pelo sistema de saúde (1.487) e de número de casos notificados incluindo apenas indivíduos entre 5 e 63 anos (1.339). A comparação da distribuição temporal das amostras com os 1.487 e 1.339 casos foi realizada utilizando o método de qui-quadrado, com 13 graus de liberdade. A hipótese testada foi de que as proporções diferem e o valor de p encontrado foi de 1, aceitando a hipótese nula de similaridade entre amostras e casos totais.

Figura 5 - Gráfico de distribuição temporal, mês a mês (junho, 2014 a julho, 2015), das amostras (barras), casos totais (linha contínua) e casos entre 5 e 63 anos (linha tracejada), proporcionalmente, de acordo com a data de diagnóstico.



O mapa representado na Figura 6 foi construído para a demonstração da distribuição espacial das amostras de acordo com a posição dos domicílios de Mâncio Lima, obtidos através do censo, e dos casos totais de malária. A residência de cada indivíduo está representada por pontos, sendo as amostras em vermelho, os casos totais de malária vivax (1.487 casos) em amarelo e os domicílios na cor branca. Dentre as 178 amostras, foram recuperadas as coordenadas geográficas de 157, sendo 21 amostras excluídas das análises espaciais devido a imprecisão da origem geográfica.

Figura 6 - Mapa de Mâncio Lima construído com o auxílio do programa QGIS 3.4.3. As ruas estão representadas por linhas azuis, destacando os domicílios (branco), casos totais de malária vivax (amarelo) e amostras (vermelho).



4.2 Genotipagem de Microssatélites e Diversidade Genética

Dentre as 178 amostras selecionadas para a participação deste estudo, a genotipagem completa dos 14 marcadores utilizados foi realizada em 177 amostras, não sendo possível a genotipagem do marcador MS16 em uma amostra. Todas as análises descritas a seguir foram realizadas utilizando os dados apenas das amostras totalmente genotipadas.

Com relação a presença de mais de um clone de *P. vivax* nas amostras, considerando dois alelos distintos amplificados em um mesmo *locus* como indicativo de infecções geneticamente mistas, 45,2% das amostras apresentaram um ou mais alelos em duplicidade, 16,4% dois ou mais alelos e 5,6% três ou mais. Para a composição de haplótipos, apenas o clone de maior abundância, ou seja, aquele composto pelos alelos de maiores picos de fluorescência, foi considerado.

Um total de 146 haplótipos foram encontrados dentre as 177 amostras: 8 são compostos por duas amostras, dois por três amostras, um haplótipo por quatro amostras e dois compostos por 9 amostras. Os 133 haplótipos restantes são compostos por amostras únicas.

Para detecção dos níveis de diversidade genética a partir da variação de alelos em cada marcador, foi calculada a heterozigosidade esperada, que estima a probabilidade de um alelo escolhido ao acaso, dentro da população, ser diferente de outro. Assim, quanto maior H_E , maior a diversidade de determinado *locus*. A Tabela 3 representa os valores de diversidade encontrada e o cálculo do *m-ratio*. Dentre os 14 *loci* analisados, 9 apresentaram valores de H_E maiores que a média (0,66 com desvio padrão de 0,15).

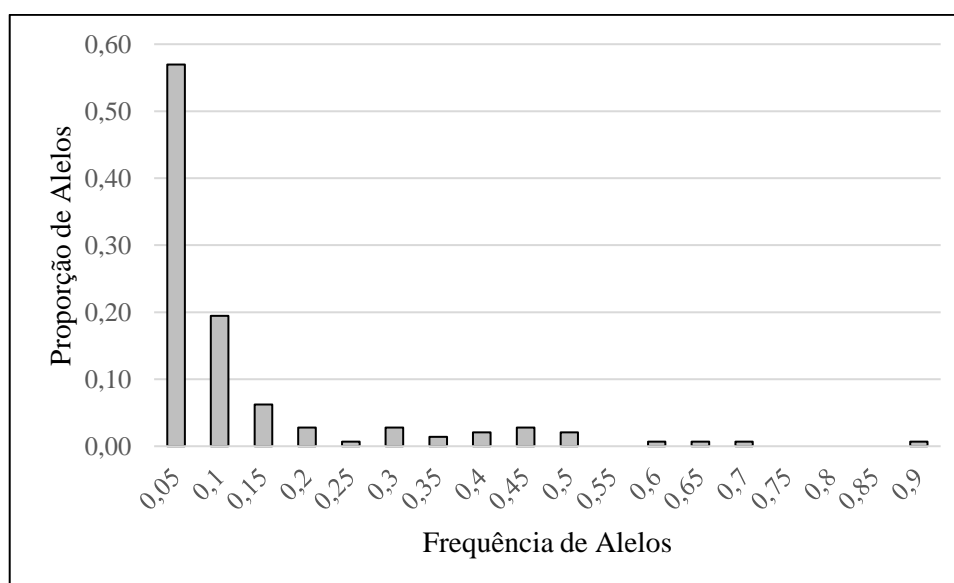
Na análise de *m-ratio* considera-se o número de possíveis alelos existentes, limitado pelo menor e maior alelo encontrado, e quais alelos foram efetivamente genotipados na população. Para tanto, são considerados apenas os marcadores cujos microssatélites seguem o padrão mutacional de *stepwise*, enquanto que aqueles com padrões repetitivos complexos (MS2, MS5, MS6, MS8, MS10, MS12, MS16 e MS20) não possibilitam uma inferência correta (Tabela 3).

Tabela 3 – Variação dos tamanhos de alelos, heterozigidade esperada e *m-ratio* dos 14 *loci* de microssatélite genotipados.

| Marcador | Variação dos tamanhos de Alelos | Número de Possíveis Alelos (r) | Número de Alelos Encontrados (k) | <i>He</i> | M-ratio (k/r) |
|----------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------|---------------|
| MS1 | 228-246 | 7 | 6 | 0,57 | 0,86 |
| MS2 | 194-238 | 12 | 9 | 0,49 | 0,75 |
| MS3 | 173-197 | 9 | 7 | 0,62 | 0,78 |
| MS4 | 183-210 | 10 | 7 | 0,60 | 0,70 |
| MS5 | 160-229 | 24 | 8 | 0,74 | 0,33 |
| MS6 | 192-258 | 23 | 13 | 0,69 | 0,57 |
| MS7 | 139-154 | 6 | 3 | 0,26 | 0,50 |
| MS8 | 207-300 | 32 | 19 | 0,81 | 0,59 |
| MS20 | 195-258 | 22 | 11 | 0,72 | 0,50 |
| MS9 | 146-176 | 11 | 9 | 0,74 | 0,82 |
| MS15 | 236-311 | 26 | 13 | 0,79 | 0,50 |
| MS16 | 267-357 | 31 | 15 | 0,77 | 0,48 |
| MS10 | 183-258 | 26 | 13 | 0,79 | 0,50 |
| MS12 | 197-266 | 24 | 11 | 0,73 | 0,46 |

Com a distribuição de frequência de alelos, apresentada na Figura 7, observa-se uma maior prevalência de alelos raros, já que aproximadamente 60% dos alelos estão presentes em uma frequência menor ou igual a 0,05. O gráfico mostra uma distribuição de frequência em formato de L, o que é esperado em populações que não estão sofrendo nenhum tipo de pressão seletiva e, portanto, não há perda de alelos raros.

Figura 7 - Distribuição de frequência de alelos de acordo com a proporção em que se encontram nas amostras genotipadas.



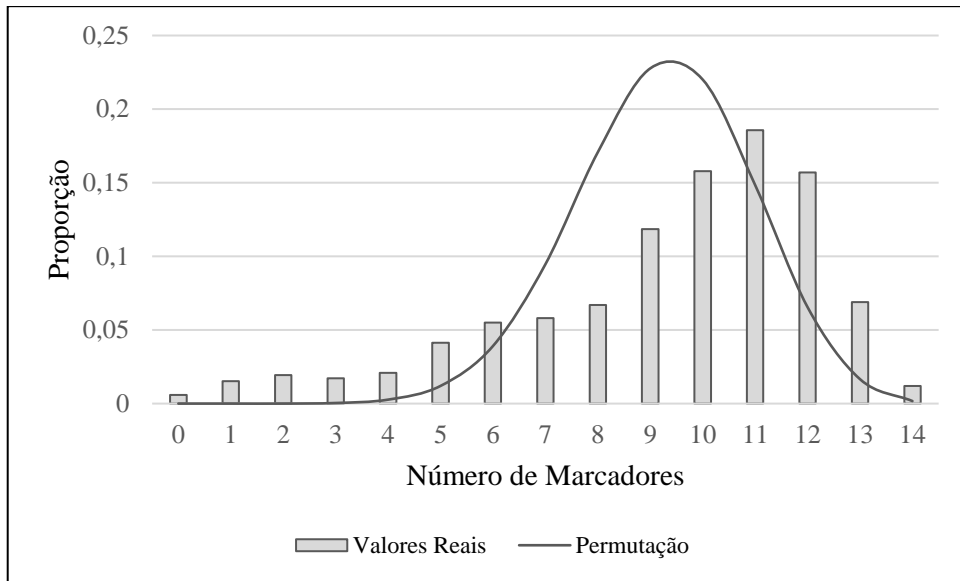
Para a análise de desequilíbrio de ligação, foram calculados cinco índices de associação padrão, excluindo as hipóteses de que a força do DL foi influenciada pela presença de amostras idênticas, de possíveis erros na composição de haplótipos em infecções geneticamente mistas e de DL entre alelos pertencentes ao mesmo cromossomo, especialmente entre os separados por uma pequena distância. No primeiro teste, o cálculo foi realizado utilizando dados genéticos de todas as amostras (n=177). Em seguida, foram excluídas amostras idênticas, permanecendo apenas um representante de cada haplótipo (n=146). No terceiro teste, amostras com dois ou mais alelos em duplicidade foram excluídas (n=149). No quarto teste, foram excluídos marcadores localizados em um mesmo cromossomo, permanecendo apenas um representante por cromossomo (n=177), sendo o valor do I_A^S apresentado equivalente à média dos valores encontrados de cada combinação. O quinto teste representa o índice de DL calculado utilizando os critérios do segundo e terceiro teste, simultaneamente (n=123). Foram observadas evidências de DL em todos os testes realizados, com valor de $p \leq 0,05$ (Tabela 4).

Tabela 4 - Testes de evidências de DL através do cálculo do índice de associação padrão, com auxílio do programa Lian 3.0. O teste 1 foi realizado com todas as amostras, o teste 2 apenas com um representante de cada haplótipo, o teste 3 excluindo amostras com indicativo de infecções geneticamente mistas. O teste 4 apresenta a média dos I_A^S calculados a partir das combinações de exclusões de marcadores presentes no mesmo cromossomo. O teste 5 foi realizado utilizando os critérios do teste 2 e 3, simultaneamente.

| Teste | I_A^S | <i>p-value</i> |
|-------|---------|----------------|
| 1 | 0,158 | < 1,00 x 10-04 |
| 2 | 0,113 | < 1,00 x 10-04 |
| 3 | 0,177 | < 1,00 x 10-04 |
| 4 | 0,160 | < 1,00 x 10-04 |
| 5 | 0,125 | < 1,00 x 10-04 |

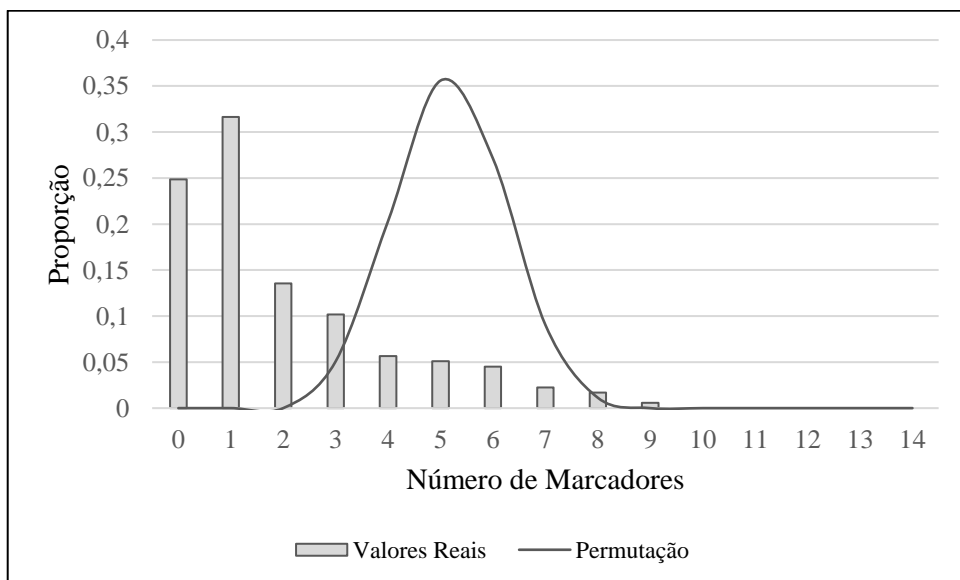
A Figura 8 representa o gráfico construído a partir da matriz de distância genética (barras), calculada através do número de diferenças entre todas as combinações de pares de amostras. O gráfico apresenta-se com a distribuição deslocada para a direita, onde o maior pico encontra-se em 11 diferenças. No mesmo gráfico apresenta-se a distribuição de distâncias genéticas utilizando a matriz encontrada com os resultados das permutações (linha), sendo que o pico maior é encontrado em 9 marcadores e a distribuição mais centralizada, semelhante a uma normal.

Figura 8 - Gráfico de distribuição da matriz de distância genética entre todos os pares de amostras, considerando os valores reais (barras) e os valores permutados (linha).



Já na análise dos gráficos de distância para o vizinho mais próximo, a distribuição encontra-se deslocada para a esquerda, agrupando amostras próximas entre si, e uma cauda em direção ao lado direito, representando amostras distantes. Com os dados permutados, a distribuição se assemelha com uma normal, com o pico máximo em cinco diferenças (Figura 9).

Figura 9 - Gráfico de distribuição da distância para o vizinho mais próximo dos valores reais das amostras (barras) e dos valores permutados (linha).

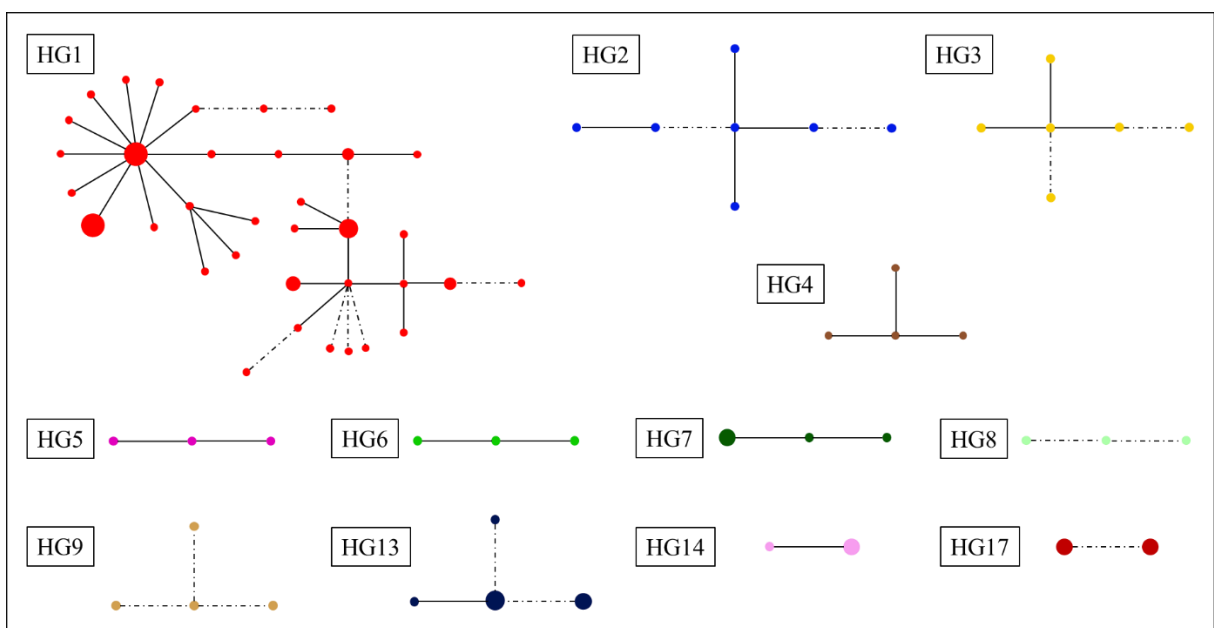


4.3 Distribuição Espaço-Temporal: haplogrupos

As amostras totalmente genotipadas foram classificadas em haplogrupos, sendo agrupadas aquelas que compartilham ao menos 12 marcadores idênticos. No total, 124 amostras foram distribuídas em 21 haplogrupos (HGs) e 53 amostras não foram classificadas por não apresentarem a semelhança necessária com nenhuma outra. Dos 21 haplogrupos, o primeiro (HG1) é composto por 57 amostras, os HG2 e HG13 por 7 amostras, o HG3 por 6 amostras, o HG7 por 5 amostras, os HG4, HG9 e HG17 por 4 amostras, os HG5, HG6, HG8 e HG14 possuem 3 amostras, e por fim, o HG10, HG11, HG12, HG15, HG16, HG18, HG19, HG20 e HG21 são compostos por uma dupla de amostras.

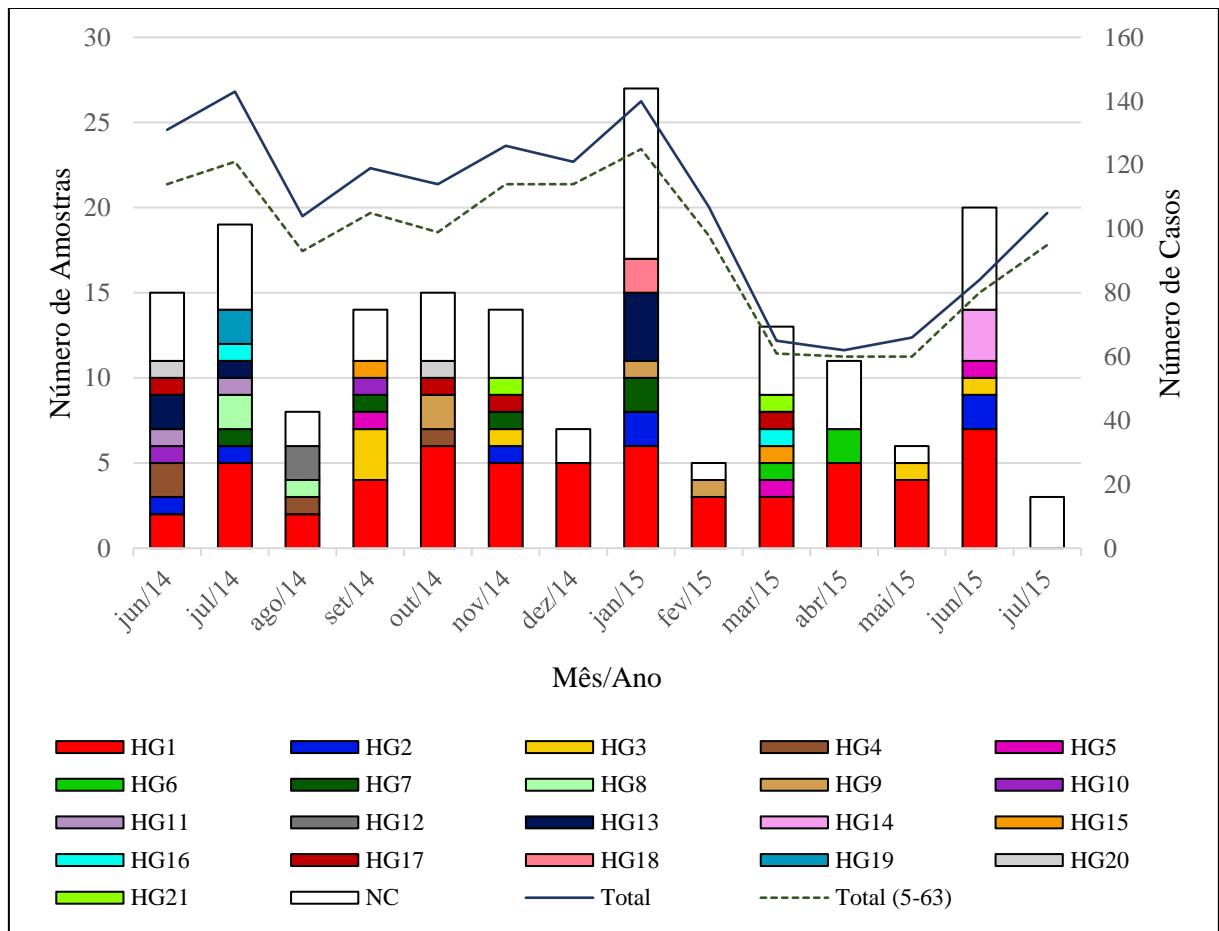
A Figura 10 representa as redes de haplótipos construídas para os HGs compostos por mais de duas amostras. Cada HG possui uma determinada cor e os haplótipos estão representados por nós de tamanhos proporcionais ao número de amostras idênticas. As hastes de linhas contínuas representam a variação de um alelo entre os dois haplótipos, ou seja, dois nós ligados por uma haste contínua são dois haplótipos que possuem uma semelhança de 13 em 14 marcadores. Já as hastes de linhas pontilhadas representam a diferença de dois alelos entre um par de haplótipos.

Figura 10 – Haplogrupos compostos por mais de duas amostras sob forma de rede de haplótipos construída a partir dos resultados do programa eBURST e PHYLOViZ 2.0. Os nós representam os haplótipos com tamanho proporcional ao número de amostras que o compõem e as hastes contínuas e pontilhadas indicam a diferença entre haplótipos de um e dois alelos, respectivamente.



A seguir, as amostras foram distribuídas temporalmente recebendo a cor do haplogrupo ao qual pertencem (Figura 11). O maior haplogrupo, HG1, está presente em todos os meses, com exceção de julho de 2015. O HG4, composto por quatro amostras, encontra-se entre os cinco primeiros meses. O HG6, composto por três amostras, está presente em apenas dois meses, consecutivos (março e abril de 2015). O HG13, composto por 7 amostras, está presente no início do período (junho e julho de 2014) e em janeiro de 2015. O HG14, composto por três amostras, está presente apenas em junho de 2015. Os demais HG não possuem uma distribuição temporal com alguma característica a ser destacada ou estão representados por apenas duas amostras, não apresentando nenhuma informação conclusiva. As amostras não classificadas (NC) estão distribuídas ao longo dos 14 meses analisados, não apresentando nenhuma particularidade.

Figura 11 - Distribuição temporal de amostras de acordo com o haplogrupo pertencente e de amostras não classificadas (NC). As barras representam as amostras genotipadas (escala à esquerda) e as linhas contínua e pontilhada mostram os números de casos totais de malária vivax e de casos entre 5 e 63 anos, respectivamente, obtidos através do banco de dados do sistema de notificação (escala à direita).



Para as análises espaciais, apenas as amostras que possuem as coordenadas de GPS precisas foram consideradas, totalizando 157 amostras. Especialmente, as amostras pertencentes ao HG1 estão dispersas por toda a cidade (Figura 12), não havendo, portanto, nenhuma restrição temporal ou espacial para a circulação deste haplogrupo. As Figuras 13 e 14 representam a distribuição espaço-temporal de dois haplótipos pertencentes ao HG1: o primeiro haplótipo, composto por 9 amostras, está concentrado nos primeiros quatro meses, desaparecendo em seguida (Figura 13), já o segundo haplótipo, com 8 amostras, está disperso temporalmente (Figura 14). Ambos os haplótipos são encontrados em toda a cidade, com uma tendência de maior concentração na região noroeste e central.

Enquanto o HG1 apresenta-se distribuído por toda a cidade, o HG2, encontra-se distribuído predominantemente na região sudeste do município (Figura 15). Portanto, embora não haja uma concentração temporal, as amostras apresentam-se em posições geográficas características.

Figura 12 - Distribuição espaço-temporal de amostras pertencentes ao HG1. (A) Mapa contendo a posição espacial das amostras. (B) Gráfico da distribuição das amostras de acordo com meses. (C) Rede de haplótipos do HG1.

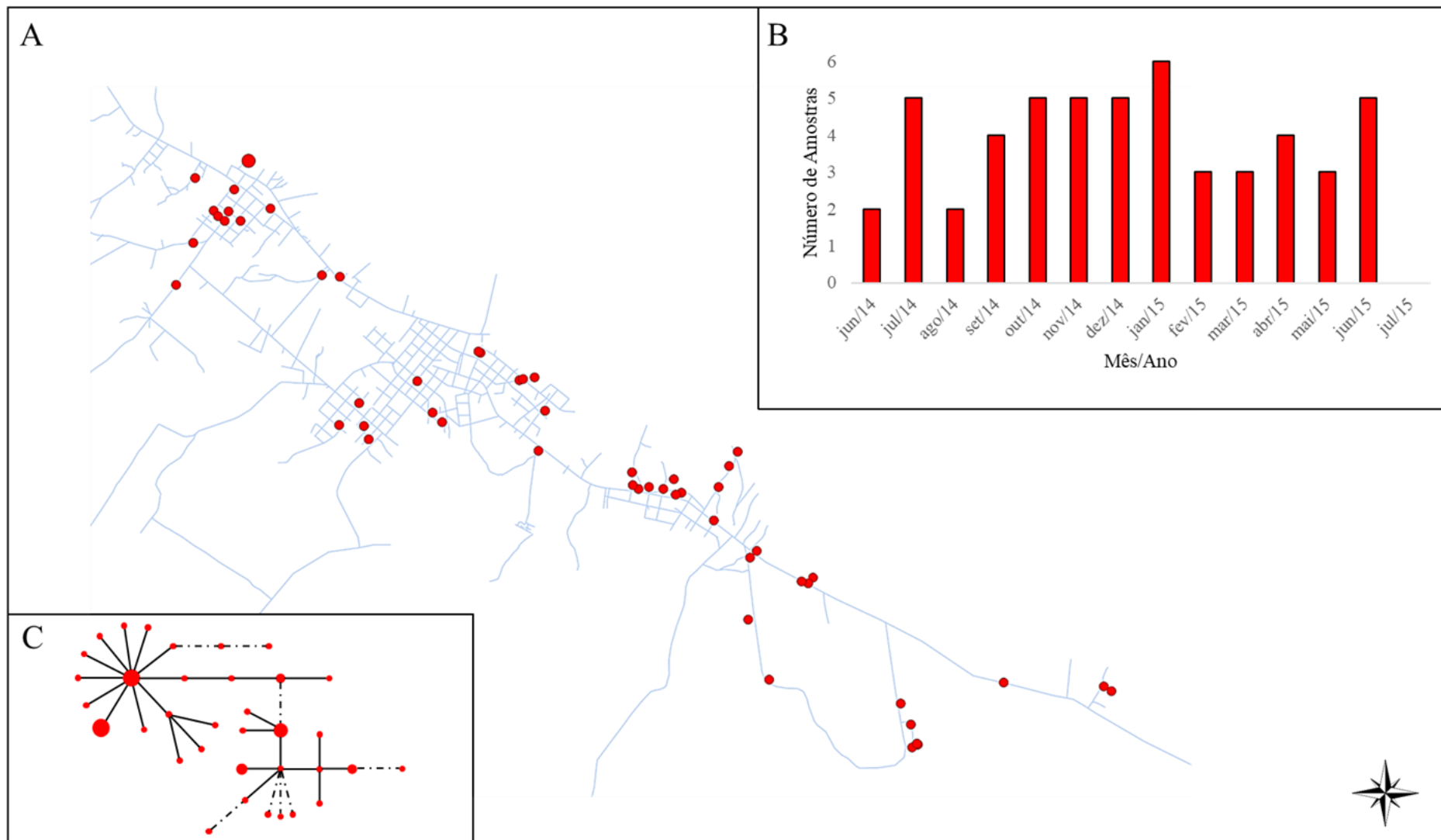


Figura 13 - Distribuição espaço-temporal de 9 amostras numeradas pertencentes a um mesmo haplótipo do HG1. (A) Distribuição espacial. (B) Distribuição temporal. (C) Posição do haplótipo destacada na rede de haplótipos do HG1.

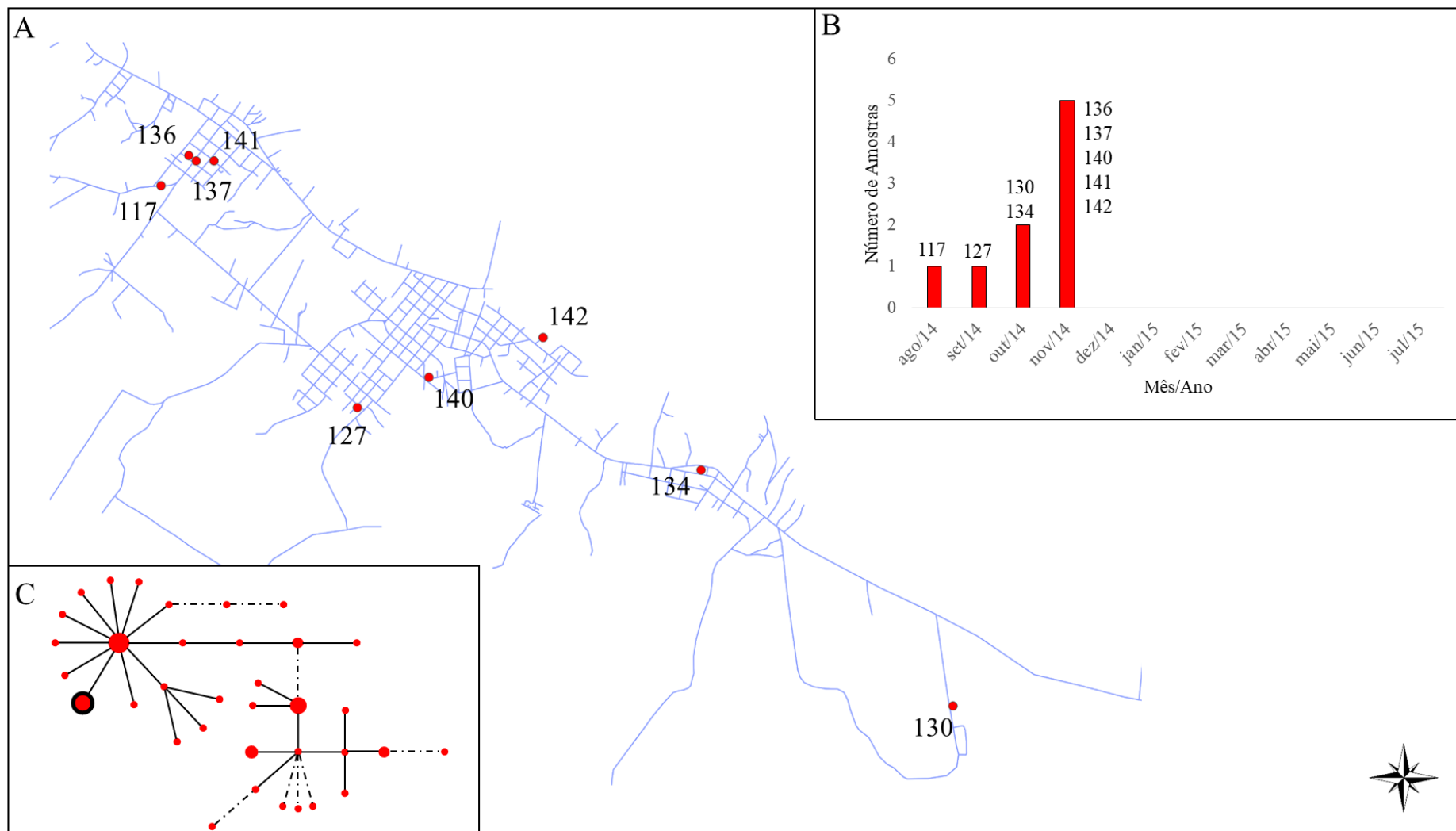


Figura 14 - Distribuição espaço-temporal de 8 amostras numeradas pertencentes a um mesmo haplótipo do HG1. (A) Distribuição espacial. (B) Distribuição temporal. (C) Posição do haplótipo destacada na rede de haplótipos do HG1.

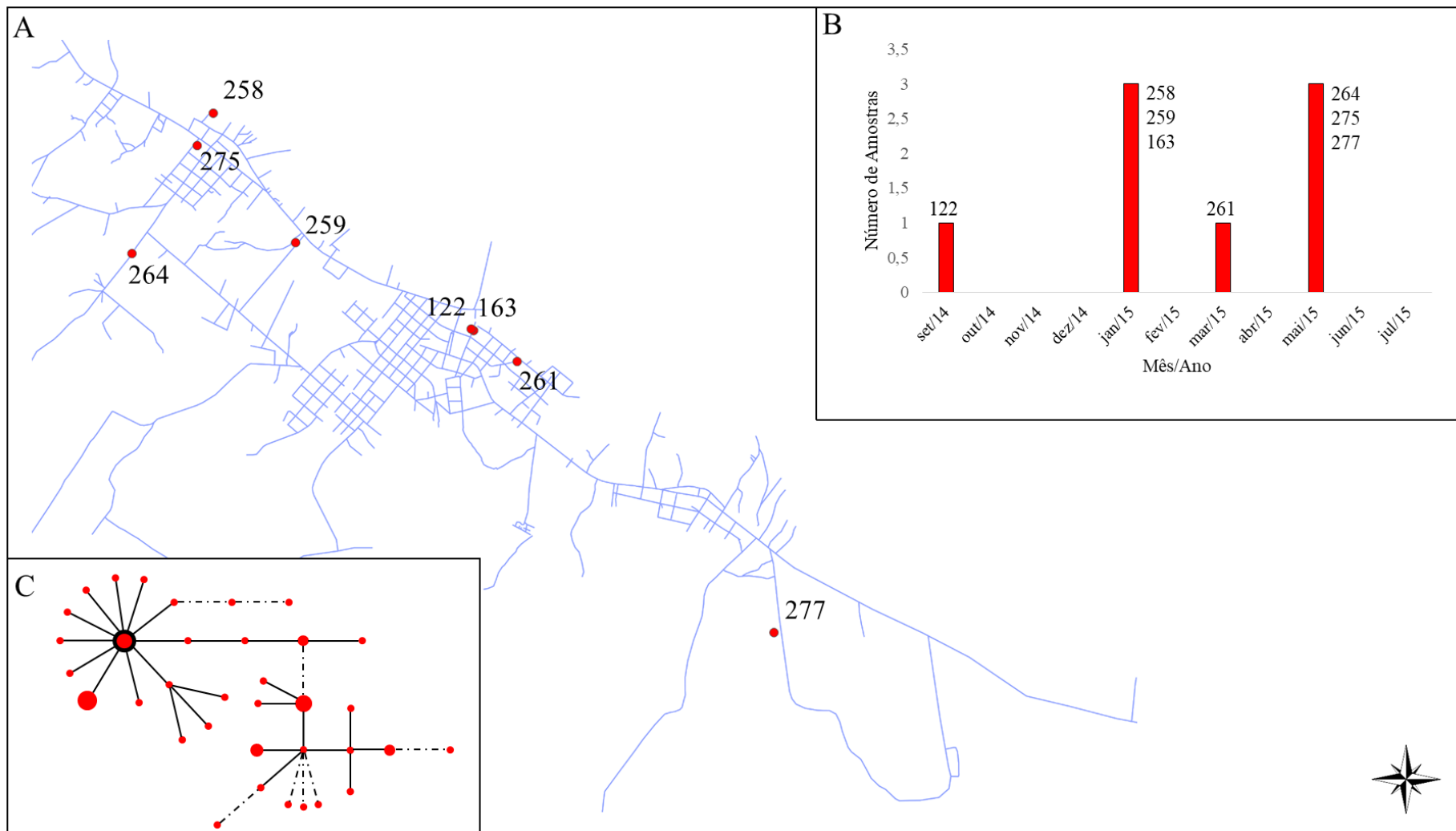
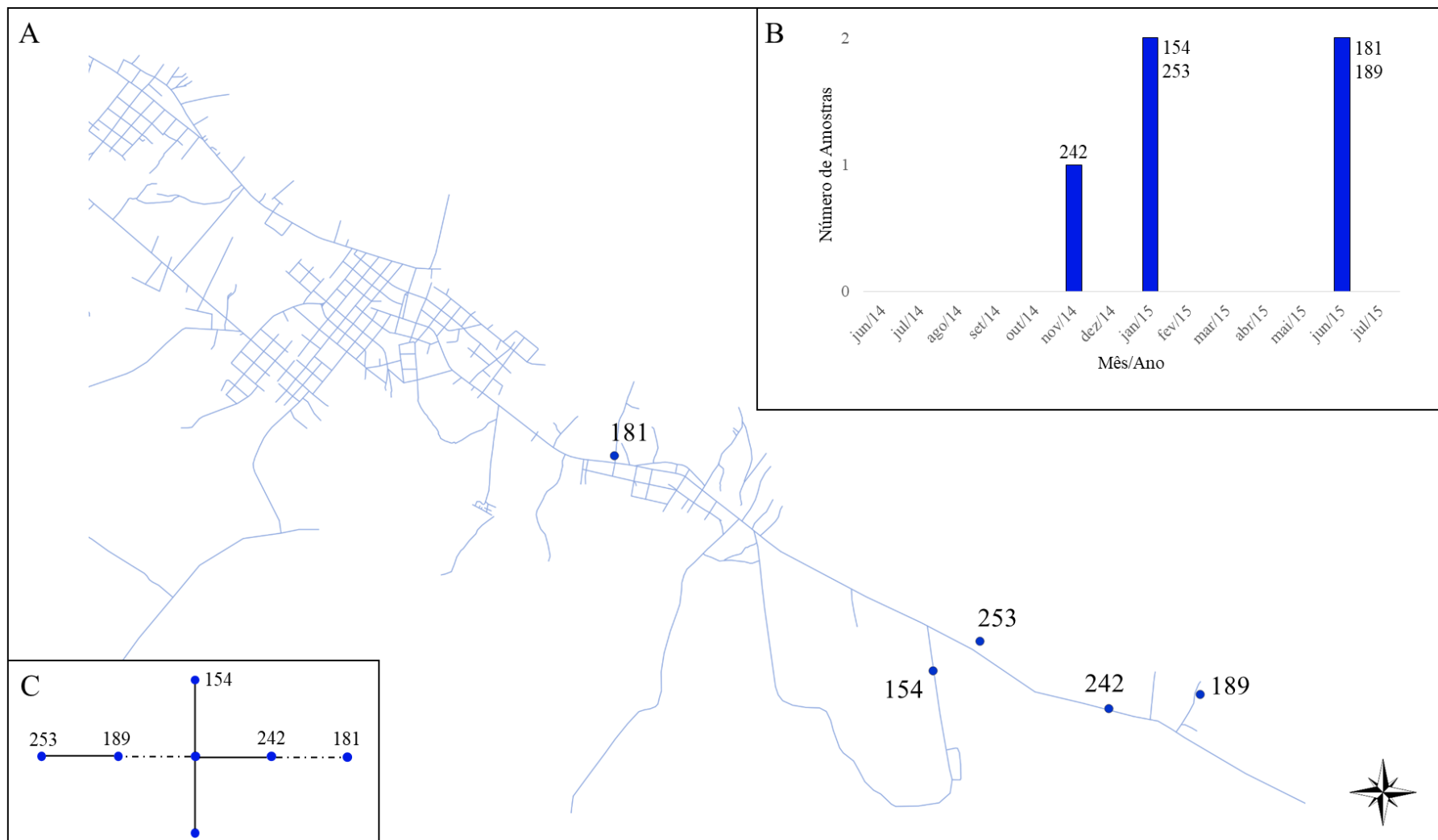


Figura 15 - Distribuição espaço-temporal das amostras numeradas pertencentes ao HG2. (A) Distribuição espacial. (B) Distribuição temporal. (C) Rede de haplótipos.



Além da distribuição temporal particular, os haplogrupos HG4, HG6 e HG14 também se destacaram por possuírem uma distribuição espacial concentrada. As amostras pertencentes a cada HG derivaram de indivíduos cujas residências são próximas geograficamente, portanto, possuem um comportamento espaço-temporal restrito. Na Figura 16 os três HGs estão representados geograficamente e temporalmente, e as amostras idênticas estão destacadas em negrito. Apesar de não haver uma relação entre os HGs, esses concentram-se na mesma região.

O HG13, também possui particularidades espaço-temporais. A Figura 17 indica que as amostras idênticas (em negrito e destacadas com asterisco de acordo com o haplótipo a qual pertencem) estão concentradas no espaço e no tempo, e a proximidade geográfica das quatro amostras de janeiro de 2015, que encontram-se conectadas por linhas contínuas na rede, pode indicar um pequeno surto.

O HG17, composto por quatro amostras, sendo uma dupla de haplótipos, não está agrupado temporalmente, mas está concentrado geograficamente na região central da cidade, como apresentado na Figura 18.

As demais amostras não estão concentradas geograficamente em determinada região. Na Figura 19 estão representadas todas as amostras ($n = 157$), classificadas de acordo com o HG a qual pertencem, incluindo as amostras não classificadas (em branco). Não foi observado nenhum comportamento espacial específico para as amostras não classificadas.

Figura 16 - Distribuição espaço-temporal de amostras numeradas pertencentes aos HG4, HG6 e HG14 (amostras idênticas estão destacadas em negrito). (A) Distribuição espacial. (B) Distribuição temporal. (C) Rede de haplótipos de cada HG.

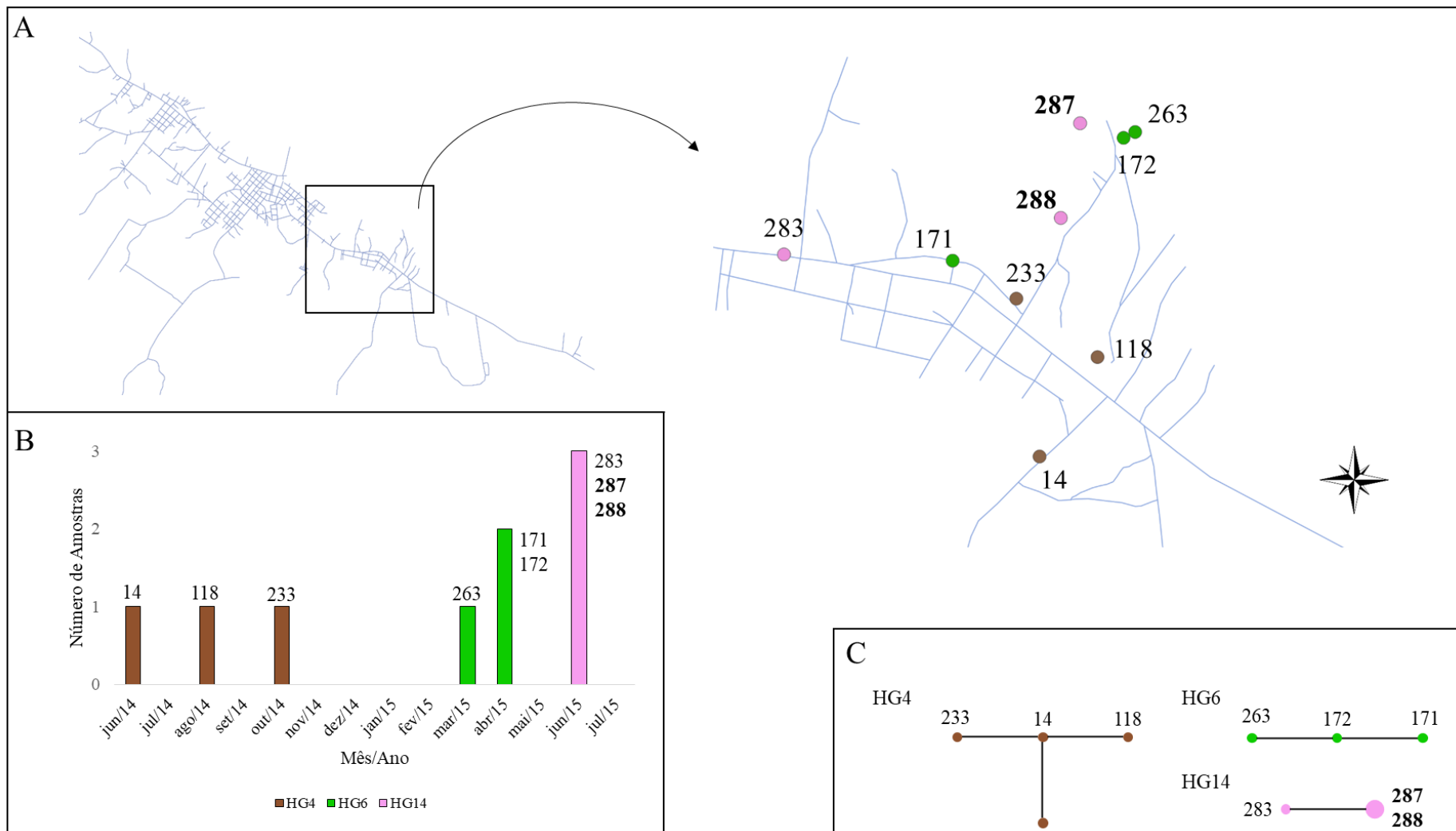


Figura 17 - Distribuição espaço-temporal de amostras numeradas pertencentes ao HG13 (amostras idênticas estão destacadas em negrito e com asterisco de acordo com o haplótipo ao qual pertencem). (A) Distribuição espacial. (B) Distribuição temporal. (C) Rede de haplótipos.

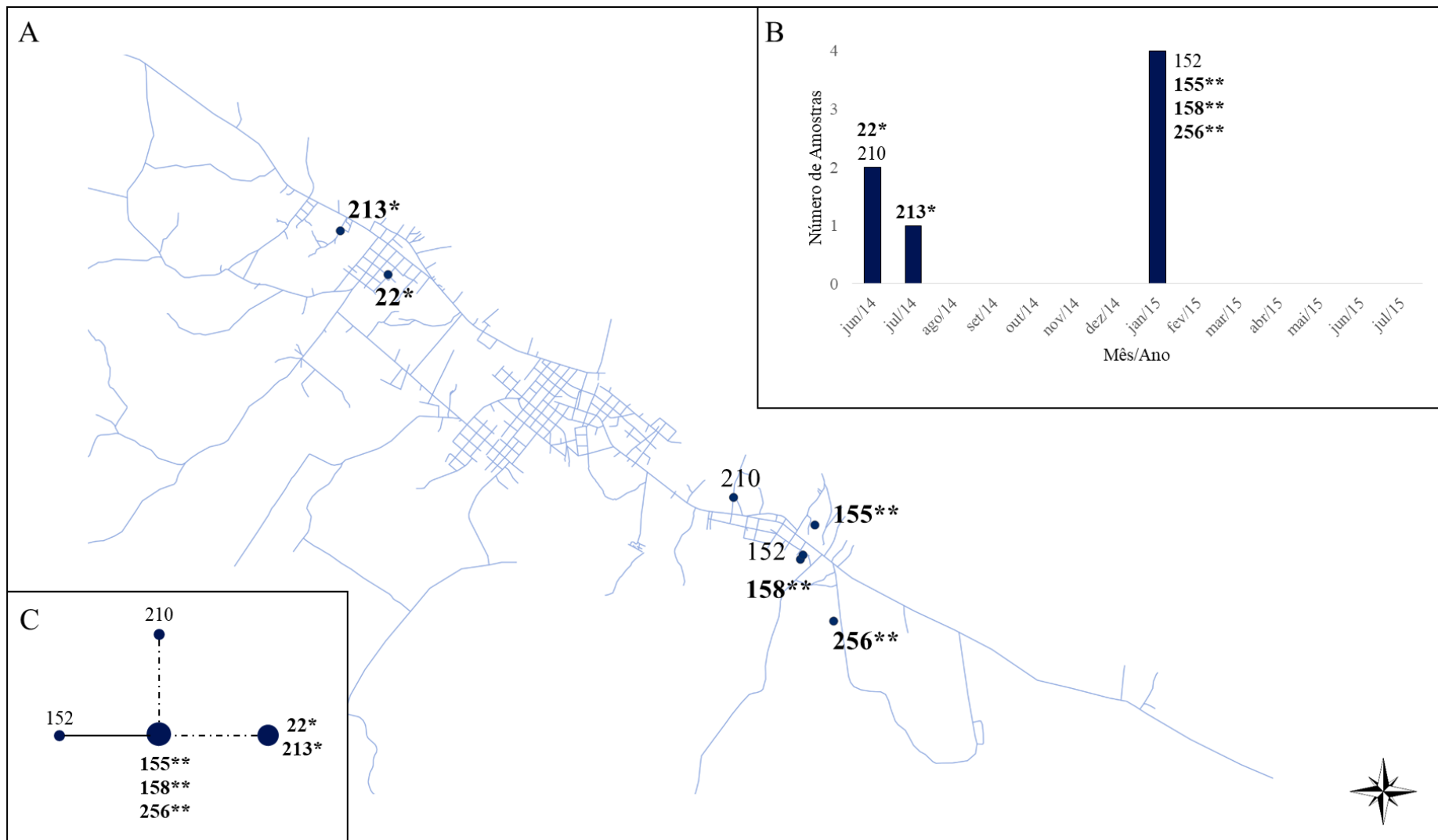


Figura 18 - Distribuição espaço-temporal de amostras numeradas pertencentes ao HG17 (amostras idênticas estão destacadas em negrito e com asterisco de acordo com o haplótipo ao qual pertencem). (A) Distribuição espacial. (B) Distribuição temporal. (C) Rede de haplótipos.

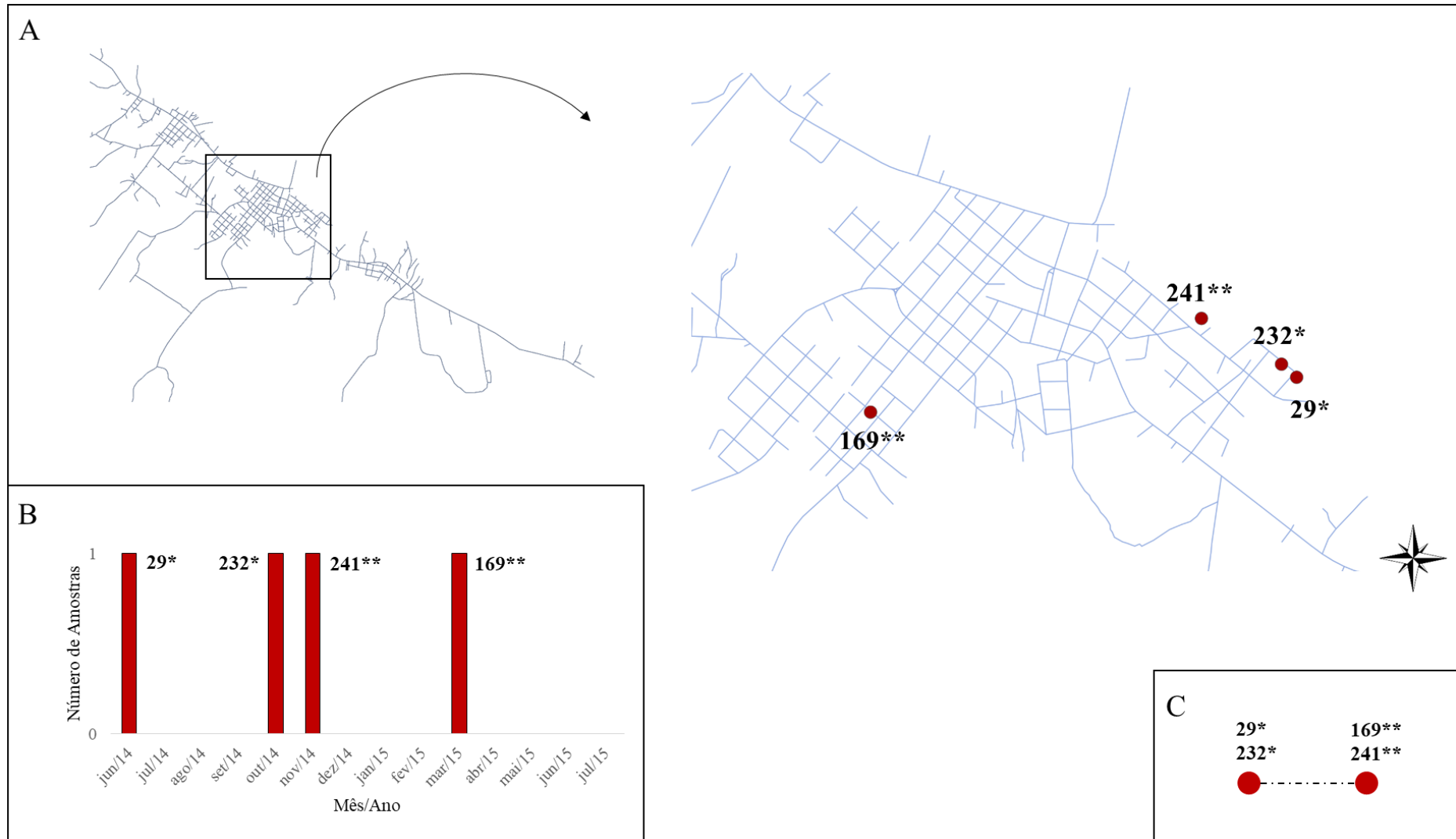
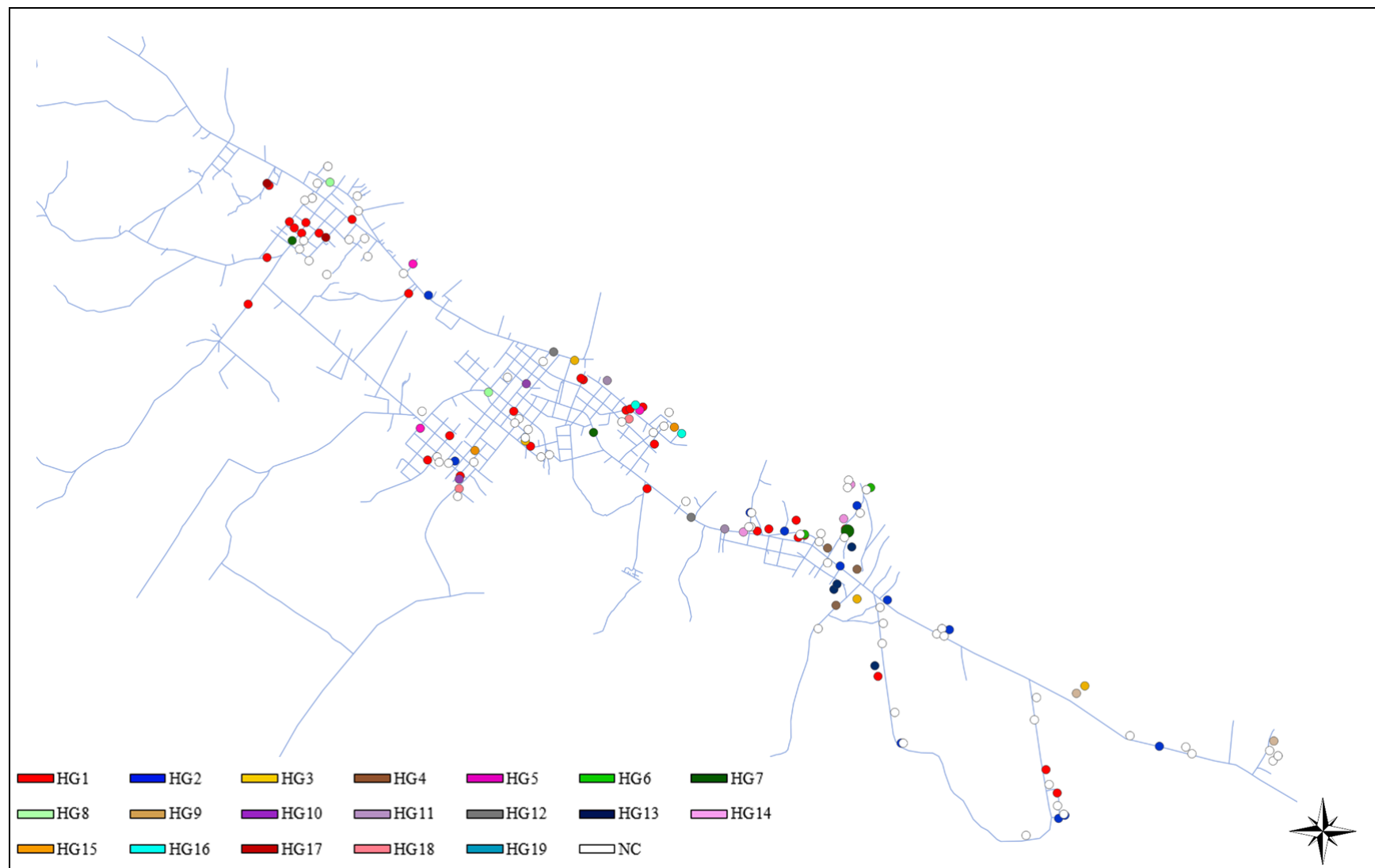


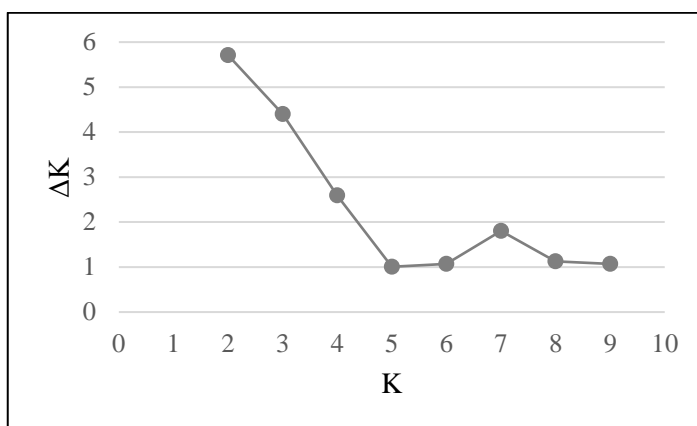
Figura 19 – Mapa de distribuição espacial de todas as amostras classificadas de acordo com HG a qual pertencem.



4.4 Distribuição Espaço-Temporal: populações

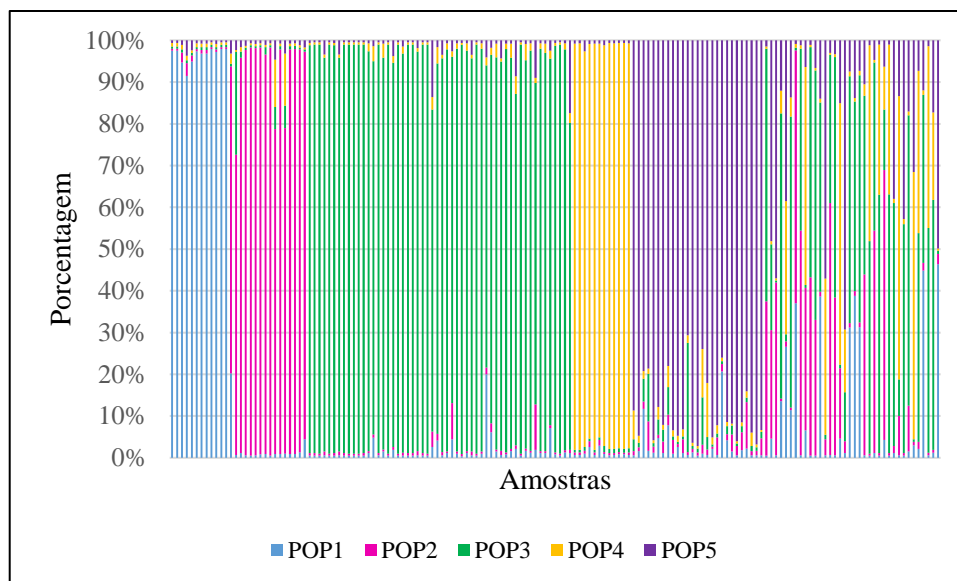
Os números de populações geneticamente distintas testados, com auxílio do programa Structure 3.4 (PRITCHARD et al., 2000) variaram de 1 a 10, e o ΔK , calculado com base nos valores de probabilidade posterior para cada população, está representado na Figura 20. No intervalo de 2 a 4 observa-se um decaimento nos valores encontrados, e, entre 5 e 9, atingem uma constância, com pequenas variações. Assim, o valor ideal de K para caracterizar as amostras genotipadas foi aquele que inicia o platô atingido, ou seja, $K=5$.

Figura 20 - Valores de ΔK calculados a partir da probabilidade posterior para cada valor de K , variando de 1 a 10, com quatro repetições para cada valor.



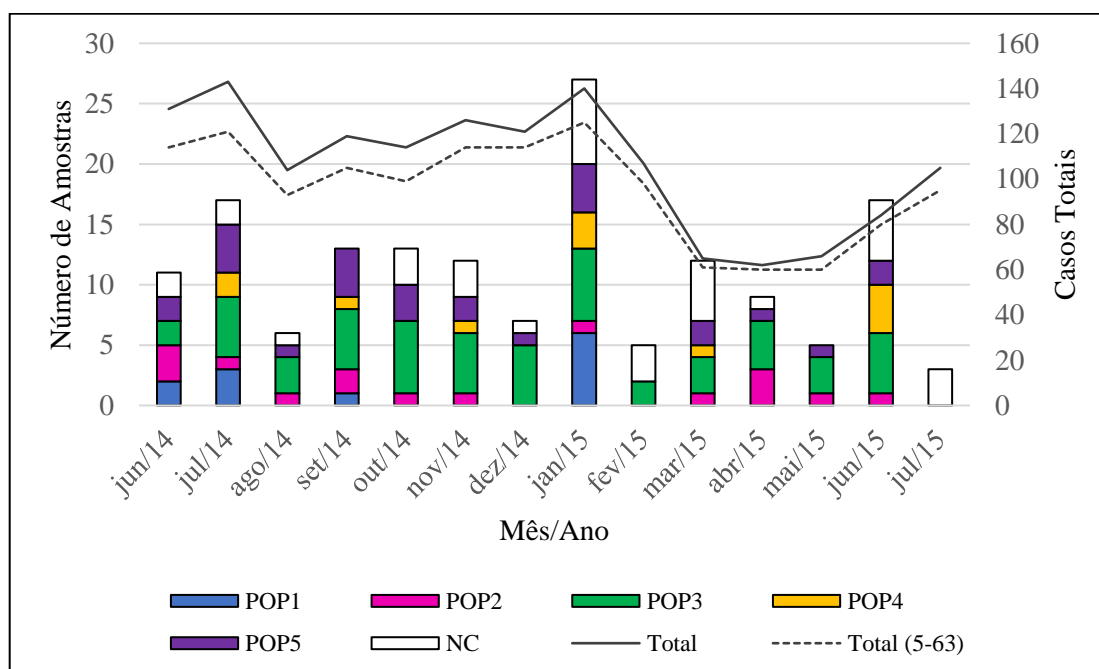
As amostras utilizadas para este teste foram aquelas que apresentaram posições geográficas definidas ($n = 157$). As que apresentaram a contribuição de 70% ou mais de uma determinada população foram agrupadas, enquanto as que apresentaram contribuições inferiores a 70% foram consideradas não classificadas (NC). A Figura 21 representa a porcentagem de contribuição de populações para cada amostra: dentre as 157 amostras categorizadas, 12 foram consideradas pertencentes à população 1 (POP1, em azul), 16 à população 2 (POP2, em rosa), 54 à população 3 (POP3, em verde), 12 à população 4 (POP4, em roxo), 27 à população 5 (POP5) e 36 amostras não foram classificadas como pertencentes a nenhuma população.

Figura 21 - Contribuição de cada uma das 5 populações na composição de amostras. Amostras compostas por 70% ou mais de apenas uma população foram consideradas pertencentes àquela.



Após a categorização, as amostras foram distribuídas temporalmente de acordo com a população a qual pertencem (Figura 22). A POP3, a qual possui o maior número de amostras, foi encontrada em 13 dos 14 meses, amplamente distribuída no tempo. Já as populações POP2, POP4 e POP5, embora possuam menos amostras quando comparadas a POP3, também foram encontradas dispersas temporalmente. A POP1 está presente em quatro meses, entre junho de 2014 e janeiro de 2015, sendo que 50% das amostras pertencentes a essa população circularam no mês de janeiro.

Figura 22 - Distribuição temporal de amostras de acordo com a população a qual pertencente e de amostras não classificadas (NC). As barras representam as amostras genotipadas (escala à esquerda) e a linha mostra o número de casos totais de malária vivax, obtido através do banco de dados do sistema de notificação (escala à direita).



Quando distribuídas espacialmente, as populações estão dispersas por toda a cidade (Figura 23), com exceção da POP1, que embora esteja representada por toda a extensão, possui um comportamento espaço-tempo característico no mês de janeiro, onde as amostras se concentraram em apenas uma região, como representado na Figura 24.

As amostras consideradas não classificadas não apresentaram um padrão de distribuição espaço-temporal característico.

Figura 23 - Mapa de distribuição espacial de todas as amostras classificadas de acordo com população a qual pertencem.

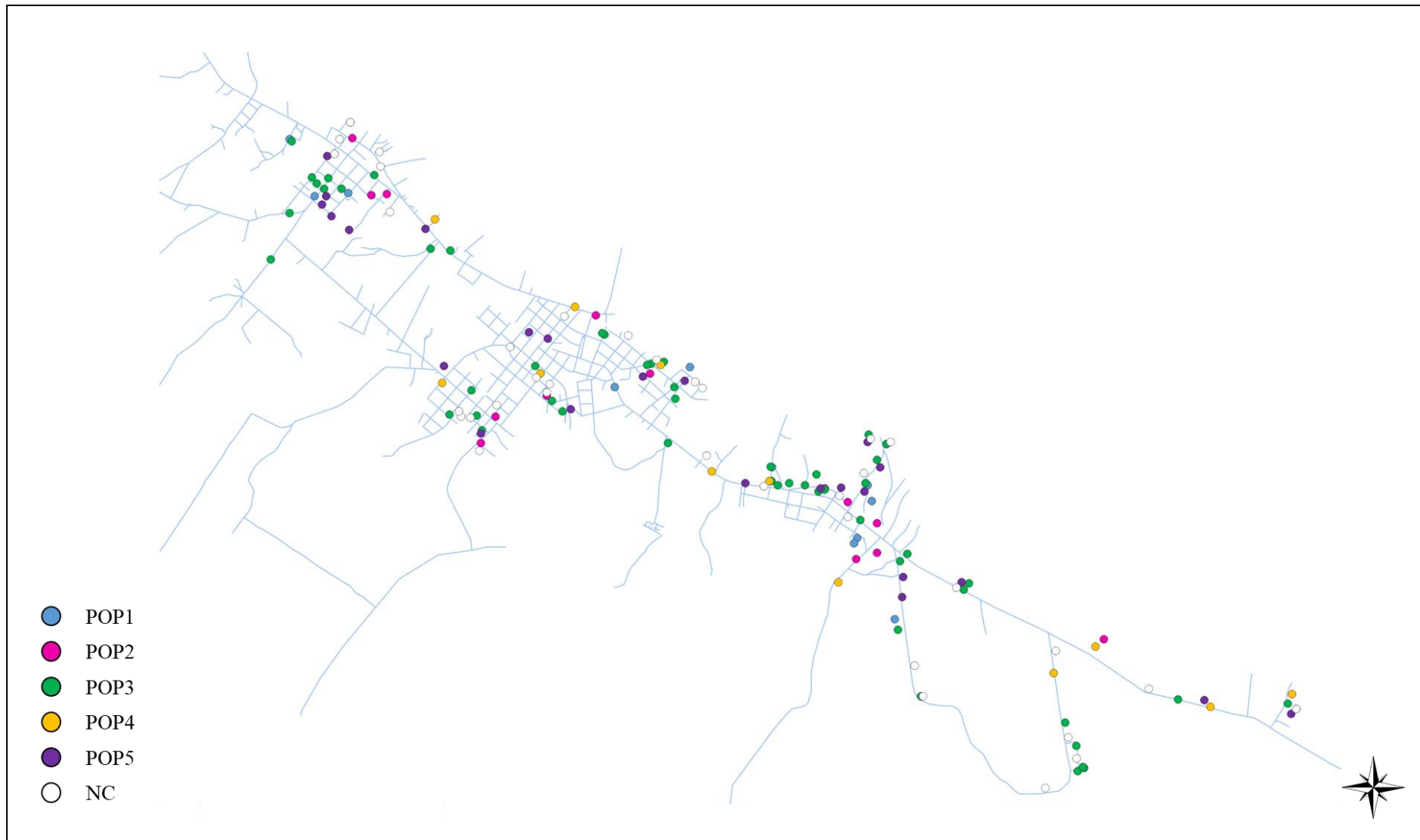
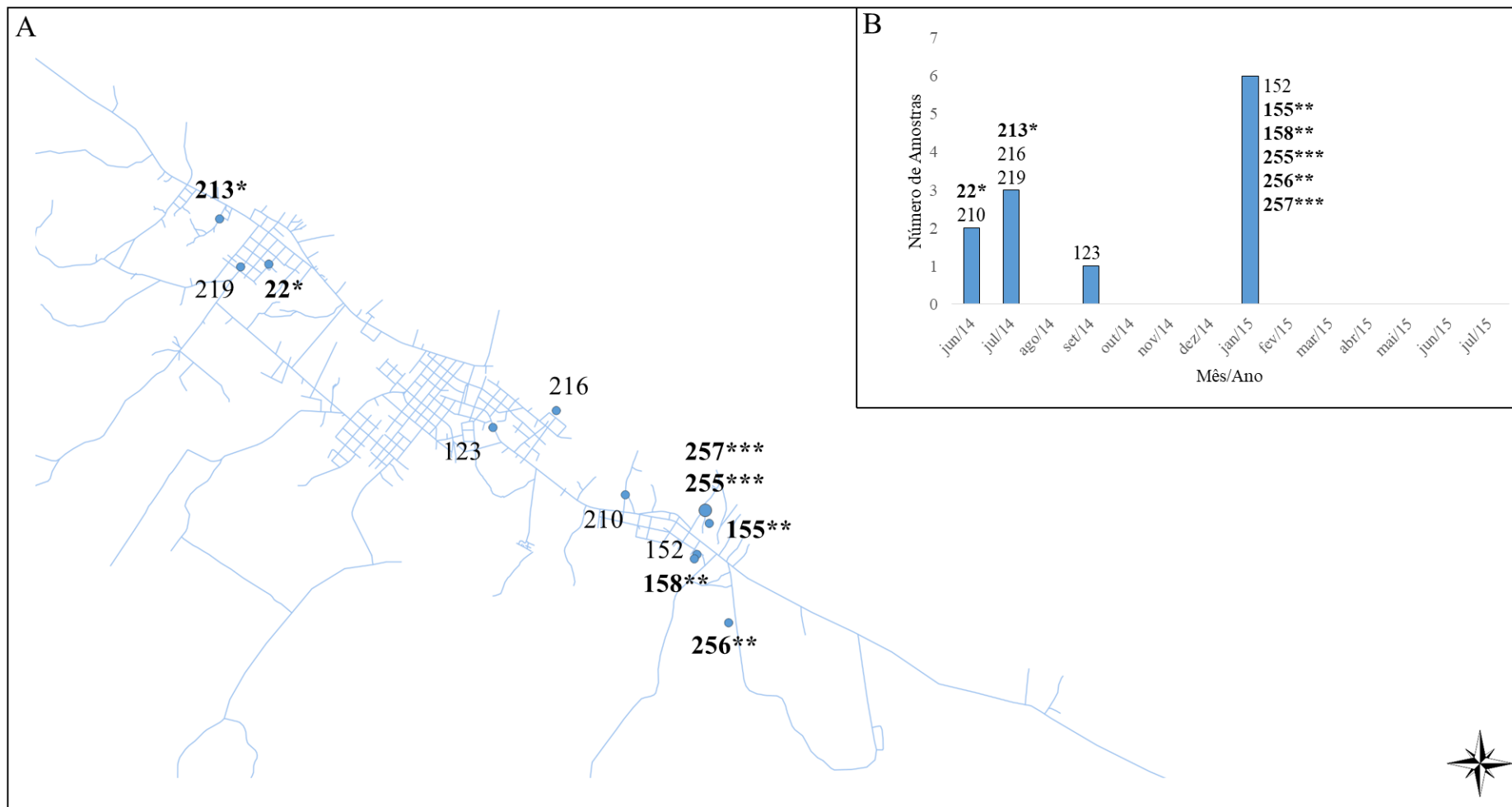


Figura 24 - Distribuição espaço-temporal da POP1 (as amostras idênticas estão destacadas de acordo com o haplótipo ao qual pertencem: *, ** ou ***). (A) Distribuição espacial. (B) Distribuição temporal.



5 DISCUSSÃO

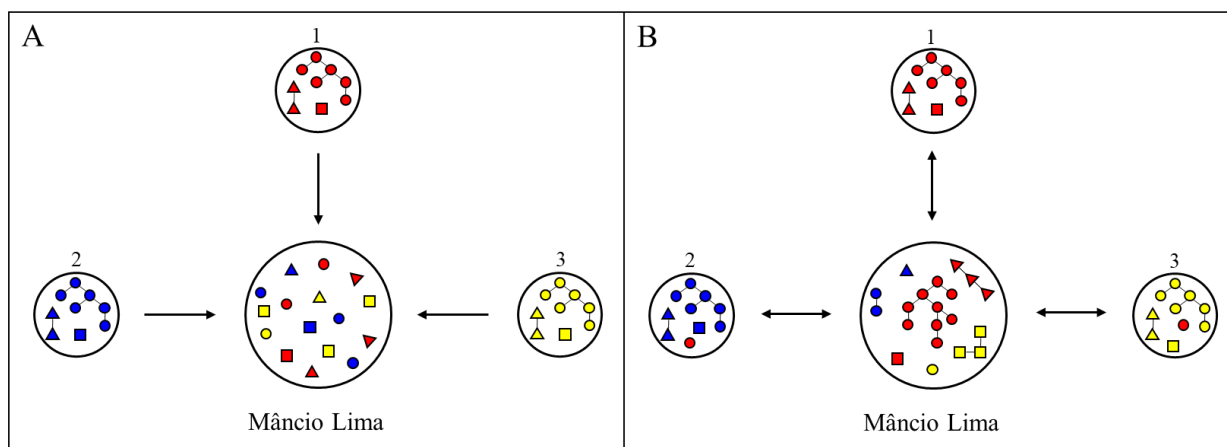
5.1 Análise Epidemiológica

Durante 36 anos de significativa queda do número de casos de malária no Brasil, o aumento de 51% de infecções diagnosticadas em 2017, com relação ao ano anterior, apontou para certa fragilidade no sistema de controle de malária (CARLOS et al., 2019). Os casos concentram-se na região norte do país, principalmente nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Rondônia e Roraima, afetando diretamente a saúde da população, associada a alta morbidade provocada pela doença e, conseqüentemente, apresentando um impacto no crescimento econômico, principalmente em municípios cuja economia baseia-se em atividades laborais como agricultura, extrativismo e pesca.

Uma das cidades com maior Índice Parasitário Anual (IPA) do país localiza-se no estado do Acre e pertence ao Vale do Alto Juruá. No ano de 2016, Mâncio Lima, apresentou 28% do total de casos notificados em todo o estado, apresentando o maior IPA do Brasil, sendo notificados 436,4 casos a cada mil habitantes (MS, 2017). Em 2017, o IPA subiu para 518, permanecendo entre os maiores valores do país (MS, dados não publicados).

A alta endemicidade de malária na cidade de Mâncio Lima baseia-se na hipótese de uma constante introdução de parasitos provenientes de zonas rurais localizadas próximas a zona urbana devido à alta mobilidade de indivíduos entre as regiões. Neste trabalho, foi avaliado se os parasitos introduzidos se disseminam de forma panmítica através de clones que não são capazes de se fixar na população ou se existe uma transmissão local, onde alguns clones são capazes de permanecer em circulação independente de novas introduções. A Figura 25A representa a primeira hipótese, sendo as áreas rurais 1, 2 e 3 as responsáveis pela contínua introdução de parasitos na cidade. A Figura 25B apresenta clones provenientes de regiões rurais, porém capazes de estabelecer uma transmissão local.

Figura 25 – Possíveis mecanismos de transmissão de malária em Mâncio Lima. (A) Constante introdução de parasitos provenientes das zonas rurais (1, 2 e 3) incapazes de se fixar na população urbana. (B) Transmissão urbana estabelecida a partir de parasitos introduzidos provenientes de zonas rurais.



Considerando o período de 14 meses, entre junho de 2014 e julho de 2015, foram notificados 6.341 casos de malária em Mâncio Lima, dos quais 1.339 foram considerados indivíduos moradores da zona urbana da cidade, infectados somente por *P. vivax* através do exame microscópico e entre as idades de 5 e 63 anos. Durante o mesmo período foram coletadas 178 amostras de pacientes com os mesmos critérios de idade e infecção. As análises estatísticas apontam que as amostras utilizadas neste trabalho são capazes de representar os casos totais de malária de acordo com sexo, idade e distribuição espaço-temporal.

Tanto as amostras coletadas quanto o número de casos notificados e recuperados são, majoritariamente, de indivíduos do sexo masculino com idades entre 16 e 40 anos. Os resultados corroboram com o fato de jovens adultos do sexo masculino estarem mais sujeitos a adquirir a doença por apresentarem maior exposição ao vetor transmissor, ao desempenharem atividades comportamentais e laborais, comumente realizadas na região, como extrativismo, desmatamento, caça e pesca (BARBOSA et al., 2014). Tal explicação pode estar associada, principalmente, a malária transmitida na zona rural envolvendo trabalhadores com certa mobilidade, que adquirem a infecção no local de trabalho (zona rural) e são diagnosticados no local de moradia (zona urbana).

Quanto a distribuição temporal dos casos totais, de acordo com os meses do ano, pode-se observar poucas variações abruptas de número de casos com exceção dos meses de março, abril e maio de 2015, que apresentaram uma queda. O clima da cidade é considerado equatorial úmido, com chuvas distribuídas durante o ano todo, porém, entre os meses de maio e setembro,

considerado o período de seca, os níveis de precipitação diminuem. Assim, a diminuição do número de casos apresentada não pode ser explicada devido à escassez de chuvas, suportando a hipótese de que os tanques de piscicultura são os principais criadouros de vetores (não sofrem influência de variações climáticas, ao contrário das fontes naturais de água, como áreas alagáveis) e, conseqüentemente, que existem condições necessárias para a transmissão local e urbana da malária (DOS REIS et al., 2015).

A importância de criadouros resultantes de atividades humanas na transmissão da malária urbana também foi observada na cidade de Porto Velho - RO. A proximidade da cidade com criadouros permanentes, como tanques de peixes abandonados que alagam durante os períodos de chuva, e não são totalmente drenados nas demais épocas do ano, traz como consequência uma alta densidade vetorial em zona urbana, durante todo o ano, e indica uma necessidade de alterações nas medidas de controle na doença, incluindo um direcionamento para saneamento ambiental (GIL et al., 2007).

Na região da Amazônia Legal, no município de Manaus, a malária urbana e autóctone foi detectada em regiões com condições ambientais inviáveis para a transmissão, resultante, portanto, de possíveis falhas do sistema de notificação. Porém, em outras regiões mais susceptíveis ao vetor (principalmente devido a ações humanas, como desmatamento, represamento de água dos igarapés e piscicultura), a malária urbana é considerada endêmica (SARAIVA et al., 2009).

Um estudo realizado na Colômbia, utilizando dados epidemiológicos dos anos entre 2008 e 2012, mostrou uma tendência de aumento de notificações de malária urbana, com relação aos casos rurais. O estudo aponta para uma provável falha na classificação e no registro dos casos, principalmente devido à falta de consenso para definições de áreas urbanas e de malária urbana, origens dos casos notificados não informativas, potenciais criadouros de vetores não identificados e falta de informações sobre a capacidade de transmissão dos vetores na zona urbana. Estas incertezas levam ao questionamento da importância da transmissão da malária urbana e peri-urbana na Colômbia, sendo de extrema importância a confirmação da origem e dos padrões de transmissão, objetivando o desenvolvimento de medidas de controle mais efetivas (PADILLA et al., 2015).

Espacialmente os casos de malária estão distribuídos por toda a extensão de Mâncio Lima. Os locais de maior densidade populacional também apresentaram o maior número de casos, não sendo possível encontrar uma distribuição espacial característica, como por exemplo a concentração de mais casos nas periferias ou nas proximidades com zonas mais ruralizadas. A disposição da cidade, no entorno da rodovia BR 364, faz com que esta esteja cercada pela

floresta Amazônica, sendo que o local mais central e de maior urbanização, ainda não encontra-se tão distante da floresta.

Em estudo na costa noroeste do Peru, foram detectados padrões de transmissão espaço-temporais de malária urbana, sendo os principais fatores a sazonalidade e a associação com a presença de locais com acúmulo de água (potenciais criadouros de mosquitos) onde há agrupamentos geográficos com maiores incidências de *P. vivax*. Estudos como este auxiliam na detecção de grupos de risco e no direcionamento das intervenções, mantendo os níveis de transmissão baixos, evitando surtos e buscando a eliminação da malária no país (ROSAS-AGUIERRE et al., 2015).

As análises dos casos de malária em Mâncio Lima sugerem que a transmissão de malária pode ocorrer tanto de forma urbana, devido a presença de vetores com alta capacidade de transmissão e de inúmeros criadouros de mosquitos distribuídos ao longo da cidade, quanto pela introdução de parasitos provenientes da zona rural, consequência da alta mobilidade de indivíduos, promovendo falhas de notificação de casos considerados autóctones.

5.2 Diversidade Genética de *P. vivax*

Para análises de padrões de transmissão de malária, além de dados epidemiológicos precisos, são necessárias informações sobre estruturas genéticas dos parasitos. Para tanto, marcadores moleculares neutros, como MSATs, fornecem dados sobre variações genéticas, estrutura de populações de parasitos e fluxo gênico, permite a detecção de infecções causadas por múltiplos clones e o rastreamento de origens de infecções como surtos, transmissão local ou casos importados (GUNAWARDENA et al., 2010; BRITO e FERREIRA, 2011). Os padrões de transmissão são de extrema importância em casos de malária urbana, principalmente pelo fato de que fontes de infecções diversas e independentes tornam favoráveis as recombinações entre cepas não relacionadas dificultando a diferenciação de parasitos locais e importados (BARRY et al., 2015). Tratando-se de medidas de controle de malária, as informações genéticas auxiliam nas análises dos impactos das medidas já aplicadas, na predição de esforços necessários e no melhor uso das medidas de controle disponíveis (BARRY et al., 2015).

Dentre os 14 marcadores de DNA de MSAT utilizados, 6 são compostos por repetições perfeitas (MS1, MS3, MS4, MS7, MS9 E MS15) e 8 por não perfeitas (MS2, MS5, MS6, MS8, MS10, MS12, MS16 e MS20), sejam interrompidas, compostas ou complexas. Enquanto

sequências perfeitas seguem o modelo de *stepwise mutation*, a origem das repetições não perfeitas ainda é incerta, mas pode ser explicada a partir de mutações e eventos de recombinação. Sequências imperfeitas podem estar relacionadas com uma superestimação de diversidade, devido a estrutura que as compõem (SUTTON, 2013).

A genotipagem das amostras mostrou considerável nível de diversidade genética a partir do cálculo de H_E (média calculada igual a 0,66) sendo que dentre os 5 marcadores de maior diversidade, quatro são compostos por repetições não perfeitas, porém, apenas cinco apresentaram valores menores do que a média. Quanto a infecções geneticamente mistas, considerando ao menos um alelo em duplicidade, quase metade das amostras foram consideradas infectadas por mais de um clone, sendo um pouco mais de um terço destas com dois ou mais alelos.

A presença de infecções geneticamente mistas foi observada em locais de níveis de transmissão variados, sendo muito presente em infecções de *P. vivax* quando comparado com *P. falciparum*. Os critérios para detecção de múltiplos clones utilizando análise de marcadores de DNA de MSAT ainda é discutida: há estudos que utilizam como limiar apenas um alelo em duplicidade e outros que adotam critérios mais estritos, considerando erros de genotipagem e presença de artefatos (HAVRYLIUK e FERREIRA, 2009). Infecções mistas de *P. vivax* podem ocorrer com a inoculação de mais de um clone em um único repasto sanguíneo (coinfecção), mas também a partir de picadas de diversos mosquitos portando distintos parasitos (superinfecção) ou ainda por conta das recaídas, onde indivíduos portadores de hipnozoítos são reinfectados e as formas dormentes são ativadas (DE ROODE et al., 2005; HAVRYLIUK e FERREIRA, 2009).

O desequilíbrio de ligação na população foi significativo em todas as estratificações: amostras totais, exclusão de amostras com haplótipos idênticos, exclusão de amostras com indicativo de infecções geneticamente mistas e exclusão de marcadores localizados em um mesmo cromossomo. Em situações em que o mosquito realiza o repasto sanguíneo em indivíduos infectados por clones distintos pode haver recombinação, diminuindo o DL. Assim, o DL e a diversidade genética tenderiam a aumentar quanto mais intensa a transmissão, porém, no Brasil e também em outros países foram evidenciados altos DL em regiões de baixa transmissão (KOEPLI et al., 2015).

Os níveis de diversidade genética observados neste estudo foram semelhantes aos encontrados em área rural da Amazônia brasileira, em estudo feito em 2007 e 2014. No Ramal do Granada, localizado no estado do Acre, foi encontrada uma H_E relativamente alta (0,8), frequente presença de infecções mistas e DL significativo (ocasionada por recombinações entre

clones aparentados), não havendo evidências de expansão clonal (FERREIRA et al., 2007). Já em 2014, na localidade do Remansinho, no estado do Amazonas, foi identificado um surto, em um determinado período, caracterizado por uma expansão clonal ou de parasitos aparentados, onde os níveis de H_E foram os mais baixos dentre os calculados em outros períodos, assim como o número de infecções geneticamente mistas, porém, com o maior valor de DL (BATISTA et al., 2015).

A Tailândia vem apresentando uma queda drástica no número de casos de malária nos últimos anos e os estudos de epidemiologia molecular podem auxiliar na eliminação de focos de malária remanescentes (KITTICHAJ et al., 2017). Em estudo feito em 2008 utilizando os 14 marcadores de DNA de MSAT apontou para uma H_E de 0,75, uma proporção de infecções geneticamente mistas (considerando um ou mais alelos em duplicidade) baixa em 2005 (60%), porém muito menor em 2003 (9,1%), e DL significativa (considerando haplótipos únicos), sendo de 2005 mais evidente do que 2003 (KARUNAWEERA et al., 2008). Em 2017, utilizando 10 dos 14 marcadores descritos, a H_E observada em três províncias da Tailândia se manteve alta (0,85), com 19,3% de infecções geneticamente mistas e DL significativa em duas das três localidades (KITTICHAJ et al., 2017). Ambos os estudos mostram que embora a prevalência de malária tenha reduzido nos últimos anos, a diversidade genética mantém-se alta, podendo ser explicada pela grande proporção de assintomáticos e infecções subpatentes além de recaídas frequentes (KITTICHAJ et al., 2017).

Este fenômeno também foi descrito em 2010, no Sri Lanka. Após uma importante queda do número de casos de malária, foram observados altos níveis de diversidade genética ($H_E = 0,87$), de multiplicidade de infecções (68,6% considerando um ou mais alelos em duplicidade e 15-30% considerando no mínimo dois alelos) e significativo DL (GUNAWARDENA et al., 2014).

Em Papua Nova Guiné, foram observados níveis de diversidade genética medianos, significativa DL (utilizando todas as amostras, excluindo as idênticas e mantendo apenas um representante por cromossomo), mostrando uma população caracterizada por considerável diversidade genética e DL, durante uma queda da transmissão de malária (FOLA et al, 2018).

Com relação a *P. falciparum*, quanto menores os níveis de transmissão, menores são os índices de diversidade genética, recombinação e presença de infecções múltiplas, incluindo o fato de que a espécie não é capaz de produzir hipnozoítos e, conseqüentemente, recaídas, diminuindo as chances de presença de mais um clone na infecção (HAVRYLIUK e FERREIRA, 2009; IWAGAMI et al., 2012; ESCALANTE et al., 2015). Na Amazônia brasileira, local de baixa transmissão, foram detectados altos níveis de desequilíbrio de ligação,

indicando a presença de recombinações entre clones aparentados (FERREIRA et al., 2017 e ANDERSON et al., 2000). A maior diversidade genética encontrada em *P. vivax*, quando comparada com *P. falciparum*, está relacionada com as diferentes origens das populações e sugere maiores taxas de mutações em *P. vivax*, incluindo melhor capacidade de adaptação a diferentes ambientes e vetores, além de sofrerem menor impacto de medidas de controle (BARRY et al., 2015; NEAFSEY et al., 2012).

Os dados de frequência alélica e *m-ratio* fornecem informações sobre perda de alelos raros na população em decorrência de uma possível redução do tamanho populacional efetivo, como por exemplo, a partir de eventos de gargalo de garrafa. O gráfico de frequência alélica apresentado (Figura 7) possui um comportamento em formato de L, onde a maioria dos alelos são encontrados em uma frequência baixa ($<0,1$), sendo considerados raros, e suportando a hipótese de que a população não passou por um evento de pressão seletiva (LUIKART et al., 1998). Com relação ao *m-ratio*, Garza e Williamson descreveram o comportamento de redução populacional através de valores de *m-ratio* abaixo de 0,68, considerando mecanismos mutacionais que seguem o modelo de *stepwise* (GARZA e WILLIAMSON, 2008). Neste caso, os valores de *m-ratio* considerados são os dos marcadores MS1, MS3, MS4, MS7, MS9 e MS15 e apenas o MS7 e MS15 apresentaram valores menores que 0,66. Assim, tanto a frequência alélica quanto os valores de *m-ratio* indicam que a população analisada não sofreu recente fenômenos de redução populacional.

Resultados similares foram encontrados na população do Remansinho - AC, em 2014, com o mesmo comportamento de frequências alélicas e apenas um marcador indicando efeito de *bottleneck* (BATISTA et al., 2015). No estudo realizado no Sri-Lanka, em 2010, a população apresentou uma alta frequência de alelos raros, porém, valores menores que 0,68 para todos os 14 marcadores testados, indicando que a população passou por uma perda de apenas alguns alelos raros, mantendo o tamanho médio dos alelos (GUNAWARDENA et al., 2014).

Utilizando os resultados de frequências alélicas, os valores dos MSATs foram permutados, respeitando a proporção em que aparecem em cada *loci*. Essa permutação simula um comportamento panmítico da população, com altas taxas de recombinação e em absoluto equilíbrio de ligação. Os resultados obtidos através das análises dos MSAT das amostras, quando comparados com os valores permutados, permite identificar um comportamento de transmissão característico do local. O gráfico construído a partir da matriz de distância (Figura 8), entre cada par de amostras, revela que aproximadamente 8% das comparações apresentam ao menos 10 marcadores idênticos, e quando comparado com a matriz de distância resultante da permutação, a porcentagem cai para 0,3%. Este resultado indica que em uma população

panmítica seria extremamente improvável encontrar amostras compartilhando ao menos 10 marcadores idênticos, suportando a hipótese de que a transmissão de malária em Mâncio Lima segue padrões mais restritos.

Já no gráfico (Figura 9) construído a partir da análise do número de alelos compartilhados entre uma amostra e a amostra mais próxima geneticamente (vizinho mais próximo), observa-se a distribuição de valores reais deslocada para a esquerda, indicando que, aproximadamente 70% das amostras compartilham de 12 a 14 marcadores idênticos com outra, e, portanto, se relacionam entre si, enquanto que 30% diferem de qualquer outra por mais de dois marcadores, podendo ser consideradas como não relacionadas. Os valores permutados mostram que, em uma situação panmítica, nenhuma amostra compartilhou o mínimo de 12 marcadores idênticos, sendo que maioria das amostras apresentou uma diferença de no mínimo 5 marcadores. Esses resultados indicam que amostras que se diferenciam em mais de dois marcadores possuem altas chances de serem relacionadas entre si. A metodologia de análise do indivíduo mais próximo para agrupamento de amostras foi extraída a partir de estudos de identificação de clones de células B através de combinações V(D)J, onde a distribuição bimodal de distâncias permitiu a diferenciação de clones aparentados e clones não aparentados (GLANVILLE et al., 2011; NOURI e KLEINSTEIN, 2018).

5.3 Estrutura Populacional

Partindo do pressuposto de que amostras compartilhando 12 marcadores idênticos possuem grandes chances de serem aparentadas, as amostras foram realocadas em haplogrupos a partir da diferença de no máximo dois marcadores. Ao todo, 124 amostras foram classificadas e destas 57 fazem parte do mesmo haplogrupo (HG1), presente em toda a cidade e em todo o período de coleta. O maior haplótipo, composto por 9 amostras, pertencente ao HG1, foi encontrado apenas nos quatro primeiros meses de coleta, enquanto que o segundo mais numeroso (8 amostras), apresenta-se no início, meio e final do período de coleta. O comportamento espaço-temporal do HG1 indica que a transmissão de malária é urbana e local, onde clones idênticos e aparentados encontram condições suficientes para circularem independente do tempo e do espaço, não necessitando de uma constante introdução de haplótipos novos para a manutenção da transmissão.

O HG2, composto por 7 amostras, também não apresentou nenhuma restrição temporal, porém, a circulação se restringiu a região sudeste da cidade, zona mais próxima de áreas rurais.

Já o HG17, composto por quatro amostras, idênticas em pares, apresentou-se disperso no tempo, porém concentrado na região central da cidade. Ambos os HGs podem ser exemplos de restrição espacial, compostos por clones que não se propagaram por questões geográficas ou comportamentais dos hospedeiros.

Os haplogrupos menores, HG4 (quatro amostras), HG6 (três amostras) e HG14 (três amostras), apresentaram um padrão espacial semelhante, estando restritos a um bairro da cidade localizados próximo a região central. Além disso, as amostras se localizaram no tempo, podendo ser exemplos de clones introduzidos e que não se disseminaram devido a alguma particularidade.

Baseado no ΔK calculado a partir da probabilidade posterior de cada K testado, foram identificadas 5 populações distintas. O método de detecção de *clusters* utilizado pelo programa Structure considera uma população em total equilíbrio de ligação (PRITCHARD et al. 2000), e, portanto, não resulta em classificações confiáveis para as amostras testadas, visto que o DL calculado foi significativo. Ainda assim, o programa é utilizado em estudos onde também são detectados indicativos de DL.

A Tabela 5 representa a distribuição dos HGs nas populações, incluindo apenas amostras de localização exata. A POP1 é composta pelos HG7 e HG13, além de uma amostra que não havia sido classificada em nenhum HG, sendo que todas as amostras notificadas no mês de janeiro (quatro do HG13 e duas do HG7) estão concentradas no mesmo local, sugerindo um pequeno surto clonal. A POP3 é composta por 51 amostras derivadas do HG1 (apenas uma amostra deste HG não foi classificada) e três amostras antes não classificadas. Os demais HG estão dispersos nas populações POP2, POP4 e POP5, sendo que a última é composta por 18 amostras antes não classificadas. Alguns HGs foram desestruturados entre as populações e as não classificadas (HG's destacados na Tabela 5), 22 amostras permaneceram sem classificação e as demais 27 estão distribuídas nas populações.

Tabela 5 - Composição das populações de acordo com os haplogrupos. Os HGs destacados em negrito foram desestruturados.

| População | Haplogrupo | Número de Amostras |
|-----------|-------------|--------------------|
| POP1 | HG17 | 4 |
| | HG13 | 7 |
| | NC | 1 |
| POP2 | HG3 | 5 |
| | HG4 | 3 |
| | HG6 | 2 |
| | HG11 | 2 |
| | HG16 | 1 |
| | NC | 3 |
| POP3 | HG1 | 51 |
| | NC | 3 |
| POP4 | HG2 | 5 |
| | HG5 | 3 |
| | HG19 | 2 |
| | NC | 2 |
| POP5 | HG8 | 2 |
| | HG10 | 2 |
| | HG12 | 1 |
| | HG15 | 2 |
| | HG18 | 2 |
| | NC | 18 |
| NC | HG1 | 1 |
| | HG6 | 1 |
| | HG9 | 3 |
| | HG12 | 1 |
| | HG14 | 3 |
| | HG16 | 1 |
| | HG17 | 4 |
| | NC | 22 |

Em estudo realizado em região rural na floresta Amazônica do Peru, a análise de haplogrupos, utilizando como critério a similaridade em 11 de 15 marcadores (sendo 14 destes os mesmos utilizados neste trabalho), permitiu identificar um haplogrupo presente durante todo o período de estudo (dois anos), enquanto outros três apareceram e desapareceram em determinadas épocas. A partir do cálculo de ΔK , o valor ideal de populações foi quatro, sendo a composição de cada uma muito semelhante a composição dos HGs. O trabalho sugere que o cruzamento entre clones semelhantes é a provável causa do comportamento de transmissão

encontrado, considerando o alto desequilíbrio de ligação na população (DELGADO-RATTO et al., 2014).

No Vietnã, no período de 20 meses, foram identificados dois haplogrupos, sendo um majoritário (com 90% das amostras), presente nas quatro comunidades estudadas, considerando uma similaridade de 9 dos mesmos 14 marcadores. Também foram classificadas duas populações, porém, a maioria dos haplótipos da comunidade quatro foram agrupadas em uma população, com contribuições mínimas de outras comunidades, tornando possível a diferenciação das comunidades 1-3 e 4, provavelmente devido à disposição geográfica e relações socioeconômicas. Apesar dos altos níveis de infecções geneticamente mistas (71,4%), a média-alta diversidade ($H_E = 0,68$) e o significativo desequilíbrio de ligação encontrado apontam para uma baixa estruturação e características de moderada à baixa transmissão de malária (VAN HONG et al., 2016).

O critério de 12 marcadores idênticos para definição de haplogrupos, escolhido com base nos resultados de proximidade com o clone mais aparentado, mostrou-se mais restrito com relação aos exemplos citados da literatura. Apesar da restrição, ainda foi possível detectar a presença de um haplogrupo majoritário, distribuído por toda a cidade e também no tempo, fortalecendo a presença de recombinação entre clones aparentados em uma dinâmica de transmissão local e urbana. A presença de HGs agrupados no tempo indica também a importância de novas fontes de introdução de parasitos, sendo alguns capazes de se propagar e de se estabelecer na população, enquanto outros circulam localmente e desaparecem, em comportamentos similares a pequenos surtos.

5.4 Limitações do Estudo

O estudo foi realizado com base em dados obtidos através da análise de 11-13% do número de casos de malária, notificados em zona urbana, no período de 14 meses, recuperados pelo censo, além de serem exclusivamente provenientes de pacientes sintomáticos. Logo, os resultados obtidos podem ter sofrido influência de uma subamostragem com relação ao total de casos.

A ausência de amostras provenientes das zonas rurais próximas à cidade impede que sejam realizadas inferências sobre a origem dos parasitos que circulam na zona urbana, sendo necessários futuros estudos envolvendo a tipagem de parasitos de diferentes origens para testar a hipótese da contribuição das zonas rurais, sugerida por este trabalho.

6 CONCLUSÃO

A análise de regiões de MSAT permite a caracterização de níveis de diversidade genética e comportamento epidemiológico de doenças infecciosas. Neste estudo, os resultados obtidos através da genotipagem de MSAT de *P. vivax* presentes em indivíduos infectados na zona urbana da cidade de Mâncio Lima, durante o período de 14 meses, permitiram a detecção de altos níveis de diversidade genética e multiplicidade de infecção, associados a um significativo desequilíbrio de ligação. Tratando-se de uma região de baixa transmissão e alta endemicidade, os dados sugerem alta recombinação entre parasitos aparentados.

A análise de padrões de circulação no espaço e no tempo de parasitos mostrou uma forte presença de um grupo aparentado durante todo o período de análise e que também foi encontrado em todas as regiões da cidade, apontando para a ausência de barreiras físicas e temporais de transmissão e condições suficientes para a manutenção da transmissão local. Também foram encontrados agrupamentos específicos de um período ou de uma região, representando parasitos introduzidos na população e que não foram capazes de se disseminarem. Além disso, diversos parasitos não foram agrupados, representando clones únicos não aparentados. Ambas caracterizações indicam a importância da constante introdução de parasitos provenientes de outras regiões na manutenção da transmissão da malária urbana, não sendo possível inferir a origem dos parasitos, mas sugerindo a hipótese da colaboração das zonas rurais que circundam a cidade.

Conclui-se que a alta prevalência de malária na cidade de Mâncio Lima é suportada por uma constante introdução de parasitos em um local com alta receptividade e capacidade de transmissão da doença.

7 REFERÊNCIAS

ANDERSON, T. J.; HAUBOLD, B.; WILLIAMS, J. T.; ESTRADA-FRANCO, J. G.; RICHARDSON, L.; MOLLINEDO, R.; BOCKARIE, M.; MOKILI, J.; MHARAKURWA, S.; FRENCH, N.; WHITWORTH, 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*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 10, p. 1467-1482, 2000.

BARBOSA, S.; GOZZE, A. B.; LIMA, N. F.; BATISTA, C. L.; BASTOS, M.; NICOLETE, V. C.; PABLO S. FONTOURA, P. S.; GONÇALVES, R. M.; VIANA, S. A.; MENEZES, M. J.; SCOPEL, K. K.; CAVASINI, C. E.; MALAFRONTTE, R. S.; SILVA-NUNES, M.; VINETZ, J. M.; CASTRO, M. C.; FERREIRA, M. U. Epidemiology of disappearing *Plasmodium vivax* malaria: a case study in rural Amazonia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, p. e3109-e3121, 2014.

BARRY, A. E.; WALTMANN, A.; KOEPFLI, C.; BARNADAS, C.; MUELLER, I. Uncovering the transmission dynamics of *Plasmodium vivax* using population genetics. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 3, p. 142-152, 2015.

BASSAT, Q.; VELARDE, M.; MUELLER, I.; LIN, J.; LESLIE, T.; WONGSRICHANALAI, C.; BAIRD, J. K. Key knowledge gaps for *Plasmodium vivax* control and elimination. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 6_Suppl, p. 62-71, 2016.

BATISTA, C. L.; BARBOSA, S.; Da Silva Bastos, M.; VIANA, S. A. S.; FERREIRA, M. U. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* over time and space: A community-based study in rural Amazonia. **Parasitology**, v. 142, n. 2, p. 374-384, 2015.

BRITO, C. F.; FERREIRA, M. U. Molecular markers and genetic diversity of *Plasmodium vivax*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 12-26, 2011.

CARLOS, B. C.; RONA, L. D.; CHRISTOPHIDES, G. K.; SOUZA-NETO, J. A. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. **Pathogens and Global Health**, v.113, n. 1, p. 1-13, 2019.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) - Impact of Malaria, 2015. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
Acesso em 10 de abril, 2019.

CONWAY, D. J. Molecular epidemiology of malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 188-204, 2007.

DAL'ASTA, A. P.; AMARAL, S.; MONTEIRO, A. M. V. Um modelo para a representação espaço-temporal do fenômeno urbano na Amazônia Contemporânea. **Revista Políticas Públicas & Cidades - 2359-1552**, v. 5, n. 2, p. 17-37, 2017.

DAL'ASTA, A.; LANA, R., AMARAL, S.; CODEÇO, C.; MONTEIRO, A. The Urban Gradient in Malaria-Endemic Municipalities in Acre: Revisiting the Role of Locality. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 6, p. 1254-1270, 2018.

DE ROODE, J. C.; HELINSKI, M. E.; ANWAR, M. A.; READ, A. F. Dynamics of multiple infection and within-host competition in genetically diverse malaria infections. **The American Naturalist**, v. 166, n. 5, p. 531-542, 2005.

DELGADO-RATTO, C.; SOTO-CALLE, V. E.; VAN DEN EEDE, P.; GAMBOA, D.; ROSAS, A.; ABATI, E. N.; FERRUCCI, H. R.; LLANOS-CUENTAS, A.; GEERTRUYDEN, J., ERHART, A.; D'ALESSANDRO, U. Population structure and spatio-temporal transmission dynamics of *Plasmodium vivax* after radical cure treatment in a rural village of the Peruvian Amazon. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 8, 2014.

DOS REIS, I. C.; CODEÇO, C. T.; DEGENER, C. M.; KEPPELER, E. C.; MUNIZ, M. M.; DE OLIVEIRA, F. G. S.; CORTÊS, J. J. C.; MONTEIRO, A. F. M.; DE SOUZA, C. A. A.; RODRIGUES, F. C. M.; MAIA, G. R.; HONÓRIO, N. A. Contribution of fish farming ponds to the production of immature *Anopheles* spp. in a malaria-endemic Amazonian town. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 452-463, 2015.

DOS REIS, I. C.; CODEÇO, C. T.; CAMARA, D. C. P.; CARVAJAL, J. J.; PEREIRA, G. R.; KEPPELER, E. C.; HONÓRIO, N. A. Diversity of *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) in an Amazonian urban area. **Neotropical Entomology**, v. 47, p. 412-417, 2018.

ESCALANTE, A. A.; FERREIRA, M. U.; VINETZ, J. M.; VOLKMAN, S. K.; CUI, L.; GAMBOA, D.; KROGSTAD, D. J.; BARRY, A. E.; CARLTON, A. M.; PRADHAN, K.; MUELLER, I.; GREENHOUSE B.; PACHECO, A.; VALLEJO, A. F.; HERRERA, S.; FELGER, I. Malaria molecular epidemiology: lessons from the International Centers of Excellence for Malaria Research Network. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 3_Suppl, p. 79-86, 2015.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p. 2611 – 2620, 2005.

EXCOFFIER, L. E.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FEIL, E. J.; LI, B. C.; AANENSEN, D. M.; HANAGE, W. P. E.; SPRATT, B. G. eBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1518-1530, 2004.

FERREIRA, M. U.; KARUNAWEEERA, N. D.; DA SILVA-NUNES, M.; DA SILVA, N. S.; WIRTH, D. F.; HARTL, D. L. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 8, p. 1218-1226, 2007.

FERREIRA, M. U.; RODRIGUES, P. T. Tracking malaria parasites in the eradication era. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 10, p. 465–466, 2014.

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 284, 2016.

FRANCISCO, A. P.; BUGALHO, M.; RAMIREZ, M.; CARRIÇO, J. A. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 152, 2009.

GARZA, J. C.; WILLIAMSON, E. G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v.10, p.305-318, 2001.

GIL, L. H.; TADA, M. S.; KATSURAGAWA, T. H.; RIBOLLA, P. E.; SILVA, L. H. Urban and suburban malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II: perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 271-276, 2007.

GLANVILLE, J.; KUO, T. C.; BÜDINGEN, H. C.; GUEY, L.; BERKA, J.; SUNDAR, P. D.; HUERTA, G.; MEHTA G. R.; OKSENBERG, J. R.; HOUSER S. L.; COX, D. R.; RAJPAL, A.; PONS, J. Naive antibody gene-segment frequencies are heritable and unaltered by chronic lymphocyte ablation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 50, p. 20066-20071, 2011.

GUNAWARDENA, S.; KARUNAWEERA, N. D.; FERREIRA, M. U.; PHONE-KYAW, M.; POLLACK, R. J.; ALIFRANGIS, M.; RAJAKARUNA, R. S.; KONRADSEN, F.; AMERASINGHE, P. H.; SCHOUSBOE, L. M.; GALAPPATHTHY, G. N.; ABEYASINGHE, R. R.; HARTL, D. L.; WIRTH, D. F. Geographic structure of *Plasmodium vivax*: microsatellite analysis of parasite populations from Sri Lanka, Myanmar, and Ethiopia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 2, p. 235-242, 2010.

GUNAWARDENA, S.; FERREIRA, M. U.; KAPILANANDA, G. M.; WIRTH, D. F.; KARUNAWEERA, N. D. The Sri Lankan paradox: high genetic diversity in *Plasmodium vivax* populations despite decreasing levels of malaria transmission. **Parasitology**, v. 141, n. 7, p. 880-890, 2014.

HAUBOLD, B.; HUDSON, R. R. LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. **Bioinformatics**, v. 16, n. 9, p. 847-849, 2000.

HAVRYLIUK, T.; FERREIRA, M. U. A closer look at multiple-clone *Plasmodium vivax* infections: detection methods, prevalence and consequences. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 67-73, 2009.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Cidades e Estados – Mâncio Lima. 2018. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/ac/mancio-lima.html?>
Acesso em: 11 de abril, 2019

KARUNAWEERA, N. D.; FERREIRA, M. U.; HARTL, D. L.; WIRTH, D. F. Fourteen polymorphic microsatellite DNA markers for the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 1, p. 172-175, 2007.

KIMURA M.; KANEKO O.; LIU Q.; ZHOU M.; KAWAMOTO F.; WATAYA Y.; OTANI S.; YAMAGUCHI Y. E.; TANABE K. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasitology International**, v. 46, n. 2, p. 91-95, 1997.

KOEPFLI, C.; RODRIGUES, P. T.; ANTAO, T.; ORJUELA-SÁNCHEZ, P.; EEDE, P. V.; GAMBOA, D.; HONG, N. V.; BENDEZU, J.; ERHART, A.; BARNADAS, C.; RATSIMBASOA, A.; MENARD, D.; SEVERINI, M. M.; NOUR, B. Y.; KARUNAWEEERA, N.; MUELLER, I.; FERREIRA, M. U.; FELGER, I. *Plasmodium vivax* diversity and population structure across four continents. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003872, 2015.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution** v. 35, p.1547-1549, 2018.

LADEIA-ANDRADE, S.; MENEZES, M. J.; DE SOUSA, T. N.; SILVINO, A. C. R.; DE CARVALHO, J. F.; SALLA, L. C.; NERY, O. A.; MELO, G. N.; CORDER, R. M.; RODRIGUES, P. T.; FERREIRA, M. U. Monitoring the efficacy of chloroquine-primaquine therapy for uncomplicated *Plasmodium vivax* malaria in the main transmission hotspot of Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, AAC.01965-18, 2019.

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. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 426, 2015.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 3, p. 203–221, 1987.

LUIKART, G.; ALLENFORD, F. W.; CORNUET, J. M.; SHERWIN, W. B. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. **The Journal of Heredity**, v.89, n.3, p.238-247, 1998.

MACHADO, R. L.; VOA, M. M. P.; CALVOSA, V. S.; FERREIRA, M. U.; ROSSIT, A. R.; SANTOS, E. J. D.; CONWAY, D. J. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* populations in the Brazilian Amazon region. **Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 9, p. 1547-1555, 2004.

Ministério da Saúde (MS). Lista de municípios pertencentes às áreas de risco ou endêmicas para malária. 2016.

Disponível em: <https://bit.ly/2DdBt4U>

Acesso em: 12 de abril, 2019.

Ministério da Saúde (MS). Situação epidemiológica da malária na região Amazônica. 2019a.

Disponível em: <https://tabsoft.co/2UQAsKk>

Acesso em: 10 de abril, 2019.

Ministério da Saúde (MS). Malária: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. 2019b.

Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria>

Acesso em: 10 de abril, 2019.

Ministério da Saúde (MS). Resumo epidemiológico nacional por local de notificação. 2016.

Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria#epidemiologia>

NOURI, N.; KLEINSTEIN, S. H. A spectral clustering-based method for identifying clones from high-throughput B cell repertoire sequencing data. **Bioinformatics**, v. 34, n. 13, p. i341-i349, 2018.

OHTA, T.; KIMURA, M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. **Genetics Research**, v. 22, n. 2, p. 201-204, 1973.

ORJUELA-SÁNCHEZ, P.; BRANDI, M. C.; FERREIRA, M. U. Microsatellite analysis of malaria parasites. **Methods in Molecular Biology**, Humana Press, Totowa - NJ, 2013, p. 247-258.

PADILLA, J. C.; CHAPARRO, P. E.; MOLINA, K.; AREVALO-HERRERA, M.; HERRERA, S. Is there malaria transmission in urban settings in Colombia? **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 453-461, 2015.

Pan American Health Organization (PAHO). Malaria Incidence Map - Annual Parasite Index at Municipality Level. 2017.

Disponível em: http://ais.paho.org/phis/viz/malaria_surv_API_popup.asp

Acesso em: 10 de abril, 2019.

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

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

RIBEIRO-GONÇALVES, B.; FRANCISCO, A. P.; VAZ, C.; RAMIREZ, M.; CARRIÇO, J. A. PHYLOViZ Online: web-based tool for visualization, phylogenetic inference, analysis and sharing of minimum spanning trees. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W246-W251, 2016.

ROSAS-AGUIRRE, A.; PONCE, O. J.; CARRASCO-ESCOBAR, G.; SPEYBROECK, N.; CONTRERAS-MANCILLA, J.; GAMBOA, D.; POZO, E.; HERRERA, S.; LLANOS-CUENTAS, A. *Plasmodium vivax* malaria at households: spatial clustering and risk factors in a low endemicity urban area of the northwestern Peruvian coast. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 176-186, 2015.

SARAIVA, M. D.; AMORIM, R. D.; MOURA, M. A.; MARTINEZ-ESPINOSA, F. E.; BARBOSA, M. D. Expansão urbana e distribuição espacial da malária no município de Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 515-522, 2009.

STRAND, M.; PROLLA, T. A.; LISKAY, R. M.; PETES, T. D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, v. 365, n. 6443, p. 274, 1993.

SUTTON, P. L. A call to arms: On refining *Plasmodium vivax* microsatellite marker panels for comparing global diversity. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 447-458, 2013.

TATEM, A. J.; GETHING, P. W.; SMITH, D. L.; HAY, S. I. Urbanization and the global malaria recession. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 133-143, 2013.

VALDES, A. M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N. B. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. **Genetics**, v. 133, n. 3, p. 737-749, 1993.

VAN HONG, N.; DELGADO-RATTO, C.; THANH, P. V.; VAN DEN EEDE, P.; GUETENS, P.; BINH, N. T.; PHUC, B. Q.; DUONG, T.T.; GEERTRUYDEN, D'ALESSANDRO, U.; ERHART, A.; ROSANAS-URGELL. Population genetics of *Plasmodium vivax* in four rural communities in central Vietnam. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004434, 2016.

WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)_n(dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, v. 7, n. 4, p. 524-530, 1990.

WESOLOWSKI, A.; TAYLOR, A. R.; CHANG, H.; VERITY, R.; TESSEMA, S.; BAILEY, J. A.; PERKINS, T. A.; NEAFSEY, D. E.; GREENHOUSE, B.; BUCKEE, C. O. Mapping malaria by combining parasite genomic and epidemiologic data. **BMC Medicine**, v. 16, n. 1, p. 241-248, 2018.

WHITE, N. J.; IMWONG, M. Relapse. **Advances in Parasitology**, v. 80, p. 113-150, 2012.

WILSON, M. L.; KROGSTAD, D. J.; ARINAITWE, E.; AREVALO-HERRERA, M.; CHERY, L.; FERREIRA, M. U.; NDIAYE, D.; MATHANGA D. P.; EAPEN, A. Urban malaria: understanding its epidemiology, ecology, and transmission across seven diverse ICEMR network sites. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 3_Suppl, p. 110-123, 2015.

World Health Organization (WHO). World Malaria Report 2018. Geneva, 2018a.

Disponível em: <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/en/>
Acesso em 10 de abril, 2019.

World Health Organization (WHO). Country Profile. Geneva, 2018b.

Disponível em: https://www.who.int/malaria/publications/country-profiles/profile_bra_en.pdf?ua=1
Acesso em 10 de abril, 2019.