

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

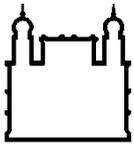
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Plasmodium vivax* EM UMA ÁREA DE  
ALTA ENDEMICIDADE PARA MALÁRIA NO MÉDIO RIO NEGRO,  
AMAZONAS, BRASIL.

JESSICA DE OLIVEIRA SOUSA

Rio de Janeiro  
Setembro de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

*JESSICA DE OLIVEIRA SOUSA*

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Plasmodium vivax* EM UMA ÁREA DE ALTA ENDEMICIDADE PARA MALÁRIA NO MÉDIO RIO NEGRO, AMAZONAS, BRASIL.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Ciências

**Orientador (a):** Prof. Dra. Martha Cecilia Suárez-Mutis

**Coorientador (a):** Prof. Dra. Simone da Silva Santos

**RIO DE JANEIRO**

Setembro de 2020

Sousa, Jessica de Oliveira.

Diversidade genética de *Plasmodium vivax* em uma área de alta endemicidade para malária no médio rio Negro, Amazonas, Brasil. / Jessica de Oliveira Sousa. - Rio de Janeiro, 2020.

xix, 109 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2020.

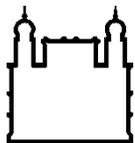
Orientador: Martha Cecilia Suárez-Mutis.

Co-orientador: Simone da Silva Santos.

Bibliografia: f. 89-102

1. malária. 2. *Plasmodium vivax*. 3. genotipagem. 4. microssatélites. 5. diversidade genética. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**JESSICA DE OLIVEIRA SOUSA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Plasmodium vivax* EM UMA ÁREA DE ALTA ENDEMICIDADE PARA MALÁRIA NO MÉDIO RIO NEGRO, AMAZONAS, BRASIL.**

**ORIENTADOR (A): Prof. Dra. Martha Cecilia Suárez-Mutis**

**COORIENTADOR (A): Prof. Dra. Simone da Silva Santos**

**Aprovada em: 10/09/2020**

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Patricia Cuervo Escobar - Presidente** (IOC/Fiocruz)

**Prof. Dra. Susana Campino Clark** (LSHTM/Londres)

**Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado** (UFF/RJ)

**Prof. Dra. Joseli de Oliveira Ferreira** (IOC/Fiocruz)

**Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira** (USP/SP)

Rio de Janeiro, 10 de setembro de 2020



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Medicina Tropical de Jessica de Oliveira Sousa, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis e Dr<sup>a</sup>. Simone da Silva Santos. Ao décimo dia do mês de setembro de dois mil e vinte, realizou-se às nove horas, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado intitulada: **“Diversidade genética de *Plasmodium vivax* em uma área de alta endemicidade para malária no médio Rio Negro, Amazonas, Brasil”**, no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Epidemiologia e Controle de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Patricia Cuervo Escobar – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr<sup>a</sup>. Susana Campino Clark – LSHTM/Londres, Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado – UFF/RJ, Dr<sup>a</sup>. Joseli de Oliveira Ferreira – IOC/FIOCRUZ, Dr. Marcelo Urbano Ferreira – USP/SP e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Gisely Cardoso de Melo - UFAM/AM e Dr. Josué da Costa Lima Junior - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos o membros da banca de forma síncrona remota, a Coordenadora do Programa Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 10 de setembro de 2020.

Dr<sup>a</sup>. Patricia Cuervo Escobar (Presidente da Banca)

Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis (Coordenadora do Programa):

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360

Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: [atendimentosec@ioc.fiocruz.br](mailto:atendimentosec@ioc.fiocruz.br) Site: [www.fiocruz.br/iocensino](http://www.fiocruz.br/iocensino)

“Dedico este trabalho a todos os moradores do rio Padauri e da área urbana do município de Barcelos - AM, pois sem eles, este trabalho não teria sido possível.”

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder força e fé, por iluminar meu caminho, por me proteger e por ter colocado tantas pessoas importantes na minha vida que me ajudaram a chegar até aqui. Aos meus pais e toda minha família por terem me educado e aos meus amigos por estarem comigo nos momentos em que mais necessito.

Agradeço especialmente às minhas orientadoras Dra. Martha Cecília Suárez-Mutis e Dra. Simone da Silva Santos, por estarem me orientando desde a iniciação científica, por todos os puxões de orelha, por todos os ensinamentos, por acreditarem na minha capacidade e terem me dado a oportunidade de entrar para o laboratório.

À Thalita Vasconcelos, que foi minha aluna no laboratório, que me ajudou em todos os experimentos realizados nesta tese e esteve sempre comigo quando precisei. Ensinar alguém é algo muito precioso, já dizia Cora Carolina: “Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

Aos organizadores do Programa de Mobilidade Acadêmica que sempre estiveram disponíveis para tirar dúvidas e pela oportunidade que me deram de fazer um estágio na Fiocruz Minas. À Dra. Cristiana Brito por ter me recebido em seu laboratório no Instituto René Rachou (Fiocruz Minas) para o estágio no qual aprendi as técnicas realizadas nesta tese, à Dra. Denise Anete e Danielle Rodrigues que em todo o tempo do estágio estiveram comigo me orientando e me ajudando nos experimentos.

A todos meus colegas e professores do curso de Medicina Tropical, pelo companheirismo, pelos momentos de muito trabalho e os de distração. À Laura e todo o pessoal do apoio predial do Pavilhão Arthur Neiva: Luciano, Márcio, Rafaela, Carlos e demais funcionários que estiveram sempre dispostos a ajudar quando eu precisei.

A todos meus colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) que sempre se colocaram à disposição para ajudar, tirar minhas dúvidas e pelo companheirismo nas tarefas diárias, principalmente ao “Malária Team”, especialmente à Vivian Franco, Tayane Alvites, Amanda Figueira, Mônica Palma e Rafael Santos, este último agradeço também pela elaboração dos mapas.

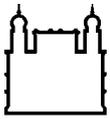
À Letícia Lima e Ohanna Cavalcanti que me ajudaram a utilizar os programas de análise de diversidade genética. Ao pessoal da Plataforma de Genotipagem e Análise de Fragmentos da Fiocruz, RJ: Aline, Carla e Beatriz por terem me ajudado com as reações.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo auxílio financeiro - Código de Financiamento 001.

A todos os moradores do rio Padauri e da área urbana do município de Barcelos por terem participado deste estudo. Sem eles, este trabalho não teria sido possível. *“Ninguém cruza nosso caminho por acaso e nós não entramos na vida de alguém sem nenhuma razão.”* Chico Xavier

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.*

Cora Carolina



# INSTITUTO OSWALDO CRUZ

## DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Plasmodium vivax* EM UMA ÁREA DE ALTA ENDEMICIDADE PARA MALÁRIA NO MÉDIO RIO NEGRO, AMAZONAS, BRASIL.

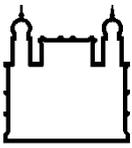
### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Jessica de Oliveira Sousa

A malária possui grande importância epidemiológica na região da Amazônia brasileira por causar consideráveis perdas sociais e econômicas na população sob risco. Atualmente, o *Plasmodium vivax* é o parasito responsável por mais de 90% dos casos malária no Brasil, sendo então de suma importância conhecer sua estrutura populacional e distribuição a fim de orientar os esforços direcionados à eliminação da doença. Diante disto, este trabalho teve como objetivo determinar o padrão de diversidade genética e estrutura populacional de isolados do parasito e sua associação com as características epidemiológicas da malária no período de dez anos no município de Barcelos, Amazonas, bem como associar padrões dos marcadores genéticos com o desfecho clínico dos indivíduos (se sintomáticos ou assintomáticos). Para alcançar os objetivos foi realizado um estudo retrospectivo dos casos de malária no município e a genotipagem dos parasitos de amostras, coletadas em vários períodos durante 10 anos, usando marcadores microssatélites (MS1, MS2, MS5, MS6, MS7, MS8) e os blocos 2 e 10 de *msp1* de 254 amostras da área urbana e 78 da área rural. Na área urbana foram comparados cinco diferentes anos de coleta, os quais apresentaram alta diversidade genética (heterozigosidade esperada -  $H_E$  média de  $0,67 \pm 0,13$ ), proporção de infecções múltiplas (33,9%) e distâncias genéticas significativas entre os anos, com raro compartilhamento de haplótipos entre eles, mostrando que o perfil genético da população de parasitos se modifica ao longo do tempo. Na área rural foi encontrada moderada diversidade genética ( $H_E$  média de  $0,47 \pm 0,21$ ) com uma alta proporção de infecções múltiplas (57,7%); nesta área também foram comparadas amostras coletadas consecutivamente do mesmo indivíduo e encontrou-se que quando um indivíduo assintomático na primeira infecção adquiriu um parasito geneticamente distinto na segunda infecção, este passou a apresentar sintomas. Na comparação entre parasitos isolados de indivíduos sintomáticos e assintomáticos não foram encontradas diferenças na diversidade e proporção de infecções múltiplas, porém a distância genética foi significativa entre os grupos e não houve compartilhamento de haplótipos. Este trabalho apresentou um conjunto de marcadores capazes de detectar alta diversidade genética, infecções múltiplas, de diferenciar populações ao longo do tempo e de acordo com a clínica do indivíduo. Para que a eliminação da malária seja possível se torna necessária a utilização de medidas de prevenção e controle adequadas a cada contexto e avaliar seu impacto no número de casos e na circulação de genótipos do parasito que podem estar relacionados com diferentes perfis de recaídas e de virulência, daí a importância de se conhecer a genética do parasito em diversos locais e contextos epidemiológicos.

**Palavras chaves:** malária, *P. vivax*, genotipagem, microssatélites, diversidade genética, infecções múltiplas



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### GENETIC DIVERSITY OF *Plasmodium vivax* IN A HIGH ENDEMICITY AREA FOR MALARIA IN MIDDLE RIO NEGRO, AMAZONAS, BRAZIL.

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN TROPICAL MEDICINE

Jessica de Oliveira Sousa

Malaria has great epidemiological importance in the Brazilian Amazon region as it causes considerable social and economic losses in the population at risk. Currently, *Plasmodium vivax* is the parasite responsible for more than 90% of malaria cases in Brazil, so it is extremely important to know its population structure and distribution in order to guide efforts aimed at eliminating the disease. In view of this, this study aimed to determine the pattern of genetic diversity and population structure of parasite isolates and its association with the epidemiological characteristics of malaria in the ten-year period in the municipality of Barcelos, Amazonas, as well as to associate patterns of genetic markers with the clinical outcome of individuals (whether symptomatic or asymptomatic). To achieve the objectives, a retrospective study of malaria cases in the municipality was carried out and the genotyping of the sample parasites, collected in various periods during 10 years, using microsatellite markers (MS1, MS2, MS5, MS6, MS7, MS8) and the blocks 1 and 10 of *msp1* of 254 samples from the urban area and 78 from the rural area. In the urban area, five different collection years were compared, which showed high genetic diversity (expected heterozygosity - mean  $H_E$  of  $0.67 \pm 0.13$ ), proportion of multiple infections (33.9%) and significant genetic distances between years, with rare sharing of haplotypes among them, showing that the genetic profile of the parasitic population changes over time. In the rural area, moderate genetic diversity was found (mean  $H_E$   $0.47 \pm 0.21$ ) with a high proportion of multiple infections (57.7%); in this area, samples collected consecutively from the same individual were also compared and it was found that when an asymptomatic individual in the first infection acquired a genetically distinct parasite in the second infection, he started to show symptoms. In the comparison between parasites isolated from symptomatic and asymptomatic individuals, no differences were found in the values of diversity and proportion of multiple infections, however the genetic distance was significant between the groups and there was no sharing of haplotypes. This work presented a set of markers capable of detecting high genetic diversity, multiple infections, of differentiating populations over time and according to the individual's clinic. For the elimination of malaria to be possible, it is necessary to use prevention and control measures appropriate to each context and assess its impact on the number of cases and the circulation of parasite genotypes that may be related to different relapse and virulence profiles, hence the importance of knowing the parasite's genetics in different locations and epidemiological contexts.

**Keywords:** malaria, *P. vivax*, genotyping, microsatellites, genetic diversity, multiple infections

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 MARCO TEÓRICO</b>	<b>2</b>
2.1 Desenho do estudo .....	2
2.2 Malária no mundo.....	3
2.3 Malária no Brasil.....	5
2.4 Ciclo e biologia de <i>P. vivax</i> .....	10
2.5 Diversidade genética de <i>P. vivax</i> .....	15
2.6 Estudos prévios da diversidade genética de populações de <i>P. vivax</i> através da genotipagem de microssatélites .....	18
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	<b>21</b>
3.1 Perguntas e Hipóteses .....	22
3.1.1 Perguntas .....	22
3.1.2 Hipóteses.....	23
<b>4 OBJETIVO GERAL</b>	<b>23</b>
4.1 Objetivos específicos.....	23
<b>5 METODOLOGIA</b>	<b>24</b>
5.1 Área e população de estudo.....	24
5.2 Desenho do estudo .....	28
5.2.1 Estudo retrospectivo .....	28
5.2.2 Estudos seccionais .....	28
5.2.2.1 Recrutamento dos indivíduos .....	29
5.2.2.2 Coleta das amostras.....	30
5.2.2.3 Definição de casos .....	30
5.2.3 Estudos laboratoriais .....	31
5.2.3.1 Extração de DNA genômico .....	31

5.2.3.2	PCR diagnóstico para malária .....	32
5.2.3.3	Genotipagem das amostras.....	34
<b>5.3</b>	<b>Análise de dados .....</b>	<b>37</b>
5.3.1	Estudo retrospectivo .....	37
5.3.2	Diversidade de <i>P. vivax</i> .....	37
<b>5.4</b>	<b>Aspectos éticos .....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
<b>6.1</b>	<b>Estudo retrospectivo dos casos de malária no município de Barcelos no período de 2003-2018.....</b>	<b>39</b>
6.1.1	Espécie parasitária .....	44
6.1.2	Faixa etária .....	46
6.1.3	Casos por sexo.....	46
<b>6.2</b>	<b>Estudo da diversidade genética de <i>Plasmodium vivax</i> .....</b>	<b>47</b>
6.2.1	Dados das amostras.....	47
6.2.2	Diversidade genética de <i>P. vivax</i> nas áreas urbana e rural .....	48
6.2.3	Diversidade genética de <i>P. vivax</i> na área urbana.....	50
6.2.3.1	Diversidade genética de <i>P. vivax</i> nos diferentes anos estudados (distância temporal) na área urbana .....	52
6.2.3.2	Estrutura populacional e diferenciação genética entre os anos estudados na área urbana .....	59
6.2.3.3	Diversidade genética de <i>P. vivax</i> nos bairros da área urbana (distância espacial) .....	62
6.2.4	Diversidade genética de <i>P. vivax</i> na área rural.....	63
6.2.4.1	Diversidade genética de <i>P. vivax</i> na área rural em amostras consecutivas .....	65
6.2.5	Diversidade genética de <i>P. vivax</i> em indivíduos com infecção assintomática e indivíduos sintomáticos das áreas urbana e rural .....	68
6.2.6	Diversidade genética de <i>P. vivax</i> encontrada em estudos na Amazônia brasileira .....	70
6.2.7	Diversidade genética de <i>P. vivax</i> em países da América do Sul, Ásia e África .....	71

<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>73</b>
7.1	A malária no município de Barcelos.....	73
7.2	Diversidade genética de <i>P. vivax</i> na área urbana do município de Barcelos .....	76
7.3	Diversidade genética de <i>P. vivax</i> na área rural.....	80
7.4	Diversidade genética de <i>P. vivax</i> em infecções sintomáticas e assintomáticas nas áreas urbana e rural .....	82
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>86</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>88</b>
<b>10</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>89</b>
<b>11</b>	<b>APÊNDICES E/OU ANEXOS</b>	<b>103</b>
	Apêndice 1: Protocolo PCR marcadores de <i>P. vivax</i> .....	103
	Apêndice 2: Quadro mostrando os haplótipos encontrados nos anos estudados na área urbana, os haplótipos mais frequentes estão em negrito.....	104
	Apêndice 3: Quadro mostrando os haplótipos encontrados nos anos estudados na área rural, os haplótipos mais frequentes estão em negrito.....	107
	Anexo 1: Parecer Consubstanciado do CEP .....	108
	Anexo 2: Parecer Consubstanciado da CONEP .....	109

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Países com casos autóctones de malária em 2000 e seu status para a eliminação em 2018 .....	5
Figura 2.2: Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2018.....	6
Figura 2.3: Número de casos de malária no Brasil de 1970 a 2018 .....	8
Figura 2.4: Ciclo evolutivo dos plasmódios humanos.....	11
Figura 5.1: Mapa do município de Barcelos mostrando os bairros da área urbana.....	26
Figura 5.2: Área urbana do estudo .....	26
Figura 5.3: Mapa do município de Barcelos mostrando as comunidades do rio Padauri (área rural).....	27
Figura 5.4: Comunidades do rio Padauri.....	27
Figura 5.5: Fluxograma dos estudos seccionais.....	29
Figura 5.6: Fluxograma dos estudos laboratoriais .....	31
Figura 5.7: Exemplo de análise no programa GeneMapper de uma amplificação usando o MS6 mostrando um pico principal (284pb) e outro adicional (200pb).....	37
Figura 6.1: Série de casos e Incidência Parasitária Anual no município de Barcelos AM, 2003 a 2018.....	39
Figura 6.2: Curva endêmica de casos de malária no município de Barcelos AM, 2003 a 2018.....	40
Figura 6.3: Série temporal de casos de malária no município de Barcelos AM, 2003 a 2018 e curva endêmica dos casos esperados no período .....	41
Figura 6.4: Diagrama de controle de casos de malária no município de Barcelos AM, 2005.....	41
Figura 6.5: Diagrama de controle de casos de malária no município de Barcelos AM, 2006.....	42
Figura 6.6: Diagrama de controle de casos de malária no município de Barcelos AM, 2007.....	42
Figura 6.7: Diagrama de controle de casos de malária no município de Barcelos AM, 2015.....	43
Figura 6.8: Diagrama de controle de casos de malária no município de Barcelos AM, 2016.....	43

Figura 6.9: Diagrama de controle de casos de malária no município de Barcelos AM, 2017.....	44
Figura 6.10: Diagrama de controle de casos de malária no município de Barcelos AM, 2018.....	44
Figura 6.11: Casos totais de acordo com a espécie plasmodial no município de Barcelos AM, 2003 a 2018.....	45
Figura 6.12: Distribuição dos casos de malária segundo porcentagem por faixa etária no município de Barcelos AM, 2003 a 2018.....	46
Figura 6.13: Proporção de casos de malária por sexo no município de Barcelos AM, 2003 a 2018.....	47
Figura 6.14: Área urbana: número de alelos encontrados para cada marcador em azul. Número de amostras com mais de um alelo no mesmo locus em vermelho.....	52
Figura 6.15: Alelos encontrados em MS1 em cinco anos amostrados na área urbana.....	54
Figura 6.16: Alelos encontrados em MS2 em cinco anos amostrados na área urbana.....	54
Figura 6.17: Alelos encontrados em MS5 em cinco anos amostrados na área urbana.....	55
Figura 6.18: Alelos encontrados em MS6 em cinco anos amostrados na área urbana.....	55
Figura 6.19: Alelos encontrados em MS7 em cinco anos amostrados na área urbana.....	55
Figura 6.20: Alelos encontrados em MS8 em cinco anos amostrados na área urbana.....	56
Figura 6.21: Alelos encontrados em <i>m<sub>sp</sub>1b12</i> em cinco anos amostrados na área urbana.....	56
Figura 6.22: Alelos encontrados em <i>m<sub>sp</sub>1b10</i> em cinco anos amostrados na área urbana.....	57
Figura 6.23: Distribuição das três subpopulações encontradas por ano de amostragem.....	60
Figura 6.24: Análise de agrupamento genético.....	61
Figura 6.25: Área rural: número de alelos encontrados para cada marcador em azul. Número de amostras com mais de um alelo no mesmo locus em vermelho.....	65

<b>Figura 6.26: Alelos encontrados em 8 marcadores em amostras de indivíduos sintomáticos e com infecção assintomática na área urbana (2006) .....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 6.27: Alelos encontrados em 5 marcadores em amostras de indivíduos sintomáticos e com infecção assintomática na área rural (Nov/2003).....</b>	<b>70</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 6.1: Casos totais de acordo com a espécie de <i>Plasmodium</i> sp. no município de Barcelos AM, 2003 a 2018.....</b>	<b>45</b>
--	-----------

## LISTA DE QUADROS

Quadro 5.1: Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação dos marcadores .....	36
Quadro 6.1: Dados demográficos de 78 amostras positivas para <i>Plasmodium vivax</i> da área rural de 2002-2004 .....	47
Quadro 6.2: Dados demográficos de 254 amostras positivas para <i>Plasmodium vivax</i> da área urbana de 2006-2016 .....	48
Quadro 6.3: Marcadores utilizados no estudo: tamanho dos fragmentos, número de alelos e heterozigosidade esperada nas áreas urbana e rural.....	50
Quadro 6.4: Frequência alélica encontrada em 8 marcadores em 254 amostras da área urbana.....	51
Quadro 6.5: Diversidade e distância genética de <i>P. vivax</i> em cinco anos amostrados na área urbana.....	53
Quadro 6.6: Frequência alélica dos marcadores por população na área urbana.....	57
Quadro 6.7: Distância espacial em quilômetros entre os bairros da área urbana.....	62
Quadro 6.8: Diversidade e distância genética de <i>P. vivax</i> em quatro bairros da área urbana.....	63
Quadro 6.9: Frequência alélica encontrada em 5 marcadores em 78 amostras da área rural.....	64
Quadro 6.10: Haplótipos encontrados em amostras consecutivas de indivíduos com infecção assintomática e indivíduos sintomáticos na área rural.....	65
Quadro 6.11: Diversidade de <i>P. vivax</i> em indivíduos com infecção assintomática e indivíduos sintomáticos nas áreas urbana e rural.....	68
Quadro 6.12: Diversidade genética de <i>P. vivax</i> em populações da Amazônia brasileira.....	70
Quadro 6.13: Diversidade genética de <i>P. vivax</i> em países da América do Sul, Ásia e África.....	71

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTs	Terapias Combinadas à base de Artemisinina (em português)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DP	Desvio Padrão
$H_E$	Heterozigidade Esperada
IM	Infecção Múltipla
IPA	Incidência Parasitária Anual
$I^S_A$	Índice de Associação Padronizado
MS	Microsatélite
<i>msp1</i>	Proteína de Superfície do Merozoíta 1
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (em português)
PNCM	Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária
RBM	<i>Roll Back Malaria</i>
SIM	Sistema de Informações sobre Mortalidade do Ministério da Saúde
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SIVEP	Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
WHO	<i>World Health Organization</i>

## 1. INTRODUÇÃO

A malária continua sendo um importante problema de saúde pública em mais de 80 países do mundo, apesar dos avanços na diminuição no número de casos e de mortes. No ano de 2018, estima-se que ocorreram cerca de 228 milhões de casos da doença, com 405.000 mortes (WHO 2019). No Brasil, em 2018, foram confirmados 193.838 casos (SIVEP 2019) com 56 mortes (SIM/ DATASUS/MS 2020). No município de Barcelos, no Amazonas, área do presente estudo, no ano de 2018 foram registrados 6.292 casos e uma Incidência Parasitária Anual (IPA) de 229,9 casos por mil habitantes, caracterizando a área como de alto risco epidemiológico (SIVEP 2020).

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* spp., sendo que a espécie de malária humana mais difundida no mundo encontrada em regiões tropicais e subtropicais é *Plasmodium vivax* (Dayanand et al. 2018). No Brasil, essa espécie é responsável por 90% dos casos da doença (Suárez-Mutis & Martinez-Espinosa 2019). Durante muito tempo pensou-se que *P. vivax* era uma espécie benigna, no entanto, a importância de se estudar esse parasito vêm aumentando, devido ao surgimento de casos graves e à resistência à cloroquina. Também o mundo está empenhado em eliminar a malária e *P. vivax* é mais difícil de controlar do que *P. falciparum*, devido às particularidades da sua biologia, como por exemplo a capacidade de produzir formas dormentes no fígado (hipnozoítos) que podem ocasionar recaídas, de produzir gametócitos antes da ocorrência de sintomas e pela ocorrência de infecções assintomáticas que não são detectadas e tratadas.

Além dos aspectos biológicos, o *P. vivax* apresenta alta diversidade genética em diversas regiões geográficas (Gunawardena et al. 2010, Abdelraheem et al. 2018, Li et al 2020). Todos esses fatores, juntamente com a implementação desigual das intervenções para o controle e/ou eliminação nas regiões endêmicas, impulsionam uma epidemiologia da malária em constante mudança, sendo então necessário aumentar o número de estudos sobre a diversidade e estrutura genética de isolados de diferentes regiões endêmicas (Escalante & Pacheco 2019). Também, à medida que os esforços de eliminação da malária progridem, é necessário um maior conhecimento da população de parasitos em infecções assintomáticas, pelo fato desse reservatório contribuir com a manutenção da transmissão da doença (Pava et al. 2017).

Sabendo da importância da infecção por *P. vivax*, o presente estudo teve o objetivo de correlacionar dados epidemiológicos com os da diversidade genética do parasito em uma área urbana e outra rural do município de Barcelos, que é altamente endêmico para malária.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. A malária

A malária é uma doença parasitária, na maioria dos casos febril e aguda, de elevada prevalência e morbidade, causada por protozoários das seguintes espécies do gênero *Plasmodium*: *Plasmodium falciparum* (Welch 1897), *Plasmodium vivax* (Grassi & Filetti 1890), *Plasmodium malariae* (Grassi & Filetti 1890) e *Plasmodium ovale* (Stephens 1922). *P. falciparum* e *P. vivax* são os mais prevalentes e respondem pela maioria dos casos globais. Em 2008, no Sudeste Asiático foram relatados casos de infecções humanas naturais causadas por *Plasmodium knowlesi* (Knowles & Gupta 1931), um *Plasmodium* que tem primatas não-humanos como seu hospedeiro natural, mas que também pode infectar humanos (Cox-Singh et al. 2008). Recentemente um outro *Plasmodium* que infecta primariamente primatas não-humanos foi encontrado infectando humanos na região da Mata Atlântica no Rio de Janeiro, *Plasmodium simium* (Fonseca 1951), muito semelhante a *P. vivax* (Brasil et al. 2017).

A transmissão dos plasmódios acontece pela picada da fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles* sendo então uma doença de transmissão vetorial. A transmissão também pode ocorrer em casos mais raros por transfusão sanguínea, uso de seringas contaminadas, acidentes de laboratório e transmissão congênita (Brasil 2005). Segundo o Ministério da Saúde, no Brasil, cinco espécies são consideradas vetores principais: *Anopheles darlingi* (Root 1926), *Anopheles aquasalis* (Curry 1932), *Anopheles albitarsis* (Lynch Arribálzaga, 1878), *Anopheles Kerteszia cruzi* (Dyar e Knab 1908) e *Anopheles Kerteszia bellator* (Dyar e Knab 1906), sendo essas duas últimas, vetores na região extra-amazônica da Mata Atlântica. Os anofelinos são popularmente conhecidos por carapanã, muriçoca, mosquito-prego, suvela e pernilongo (Brasil 2006). *An. darlingi* é o principal vetor no Brasil e é o mais endófilo e antropofílico dos anofelinos (Deane 1986); procria-se preferencialmente em grandes, profundas e claras coleções aquáticas como lagos,

pântanos ou grandes rios (Hiwat & Bretas 2011).

A malária possui grande importância epidemiológica, devido a sua gravidade clínica e elevado potencial de disseminação, em áreas com densidade vetorial que favoreça a transmissão (Brasil 2008). Entre as quatro espécies que causam a malária rotineiramente em humanos (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*), *P. falciparum* recebe a maior atenção devido ao seu alto potencial de causar doença grave e morte, principalmente em crianças com menos de cinco anos de idade e mulheres grávidas na África. *P. vivax*, embora menos virulento do que *P. falciparum*, tem um grande impacto socioeconômico entre as pessoas que vivem em áreas de risco para a infecção devido à sua intensa morbidade (Mendis et al. 2001; Lizcano 2013; Chehuan 2013).

A malária se caracteriza por acessos febris com intenso calafrio e sudorese, acompanhados de cefaleia, rubor e mal-estar geral (Suárez-Mutis & Martínez-Espinosa 2019), contudo, nas últimas décadas têm sido relatados quadros de infecções assintomáticas em diferentes lugares da Amazônia; indivíduos que tiveram vários episódios de malária podem atingir imunidade parcial apresentando quadro subclínico ou assintomático (Coura et al. 2006, Suárez-Mutis et al. 2007). Esses indivíduos portadores de infecções assintomáticas servem como reservatório para a malária humana, e por enquanto são inacessíveis às medidas de controle focadas no diagnóstico e tratamento precoces de infecções sintomáticas que eram a base do programa de controle (Batista 2014). Assim, para que os esforços de eliminação da malária tenham uma chance maior de sucesso, é crucial entender a dinâmica e a transmissibilidade dessas infecções (Bousema et al. 2014).

## **2.2. Malária no mundo**

Apesar dos avanços na diminuição da morbidade e mortalidade por malária nos últimos anos, essa doença continua sendo um importante problema de saúde pública em mais de 80 países do mundo (WHO 2019). Em 2018, cerca de 228 milhões de casos de malária ocorreram, em comparação com 251 milhões de casos em 2010 e 231 milhões de casos em 2017. A maioria dos casos em 2018 ocorreu na região Africana (93%), seguida pela região do Sudeste Asiático com 3,4% dos casos e pela região do Mediterrâneo Oriental com 2,1%. Em 2018, houve uma estimativa de 405.000 (67% crianças menores de 5 anos) mortes por malária em todo o mundo, dessas 94% ocorreram na região Africana, em comparação com 416.000 mortes

estimadas em 2017 e 585.000 em 2010. *P. falciparum* foi o parasito mais prevalente na região Africana, representando 99,7% dos casos estimados de malária em 2018, já *P. vivax* foi o parasito predominante na região das Américas, representando 75% dos casos de malária (WHO 2019). Em 2018, a região das Américas tinha quase um milhão de casos estimados de malária com cerca de 600 mortes; um aumento de 14% e 26%, respectivamente, em comparação com o ano de 2010; a maior parte do incremento foi devido ao aumento da transmissão na Venezuela. Três países (Brasil, Colômbia e Venezuela) representaram 80% de todos os casos estimados. O Paraguai recebeu o certificado de livre de malária em 2018 e a Argentina em 2019 (WHO 2019).

No ano de 2015 foi adotada pela Organização Mundial de Saúde, a Estratégia Técnica Global (ETG) para a malária 2016-2030, que fornece uma estrutura para orientar os países em seus esforços para acelerar o progresso em direção à eliminação da malária. A estratégia estabelece a meta de reduzir as taxas globais de incidência e mortalidade em pelo menos 90% até 2030 e eliminar a malária de pelo menos 35 países. Para tal, a estratégia possui três pilares: (1) Garantir o acesso universal à prevenção, diagnóstico e tratamento; (2) Acelerar os esforços para a eliminação e obtenção do certificado de país livre de malária; e (3) Transformar a vigilância da malária em uma intervenção essencial (WHO 2015a).

Dados dos últimos relatórios mundiais sobre malária (2018 e 2019) mostram que entre 2015 e 2018, apenas 31 países endêmicos para malária, reduziram significativamente a incidência de casos, podendo chegar em 40% de redução ou mais até 2020 (Figura 2.1). Contudo, o progresso global na luta contra a malária diminuiu e o mundo encontra-se fora do caminho para cumprir as metas previstas para 2020, 2025 e 2030; embora muitos países continuem na meta de diminuição de casos, a taxa de mudança parou nos países com maior incidência (Burkina Faso, Camarões, República Democrática do Congo, Gana, Índia, Mali, Moçambique, Níger, Nigéria, Uganda e República Unida da Tanzânia), os quais representam mais de 70% dos casos e mortes globais por malária. Para colocar o mundo de volta no caminho para alcançar as metas propostas para 2025, em 2018 a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a parceria *Roll Back Malaria* (RBM, “fazer recuar a malária”) lançaram um plano de resposta para acelerar as reduções na mortalidade e morbidade da doença concentrando-se nesses países com maior incidência (WHO 2018, 2019).

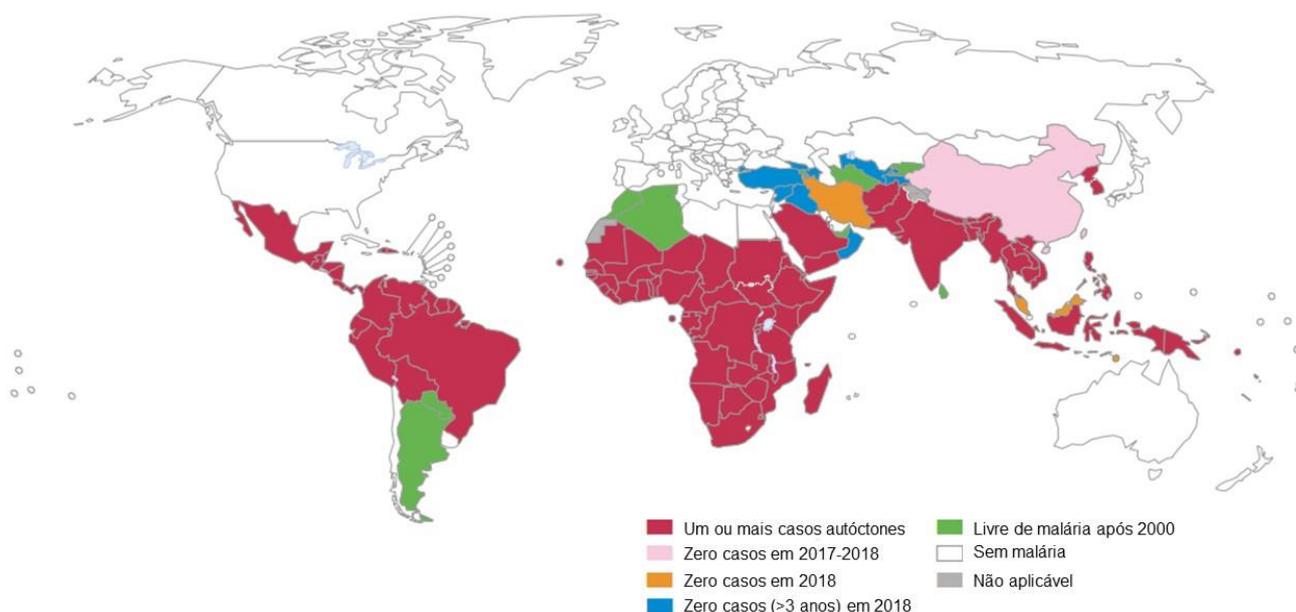


Figura 2.1: Países com casos autóctones de malária em 2000 e seu status para a eliminação em 2018.

Fonte: *World Health Organization: World Malaria Report 2019*.

### 2.3. Malária no Brasil

A malária no Brasil ainda representa um grande problema de saúde pública, com mais de 99% dos casos concentrados na região amazônica, que engloba os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Nessa região, as condições propícias para a sobrevivência do vetor e as condições socioeconômicas e ambientais favorecem a transmissão da doença (Brasil 2015a, Sousa et al. 2019).

Mesmo na área endêmica, o risco de adoecimento não é homogêneo. Este risco é medido pela incidência parasitária anual (IPA), calculada pelo número de casos ocorridos durante o ano em uma determinada área dividido pela população sob risco nesta área e expresso em casos por mil habitantes. A IPA é o indicador usado pelo Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) para realizar a estratificação epidemiológica de risco de transmissão. No Brasil, as áreas endêmicas são classificadas como de alto risco (IPA > 50/1.000 hab.), médio risco (IPA entre 10-49/1.000 hab.), baixo risco (IPA entre 1 e < 10/1.000 hab.) e áreas sem risco (IPA = 0) (Brasil 2009a) (Figura 2.2). No período de 2000 a 2013, a IPA foi reduzida em quase 80% na região amazônica, passando de 29,4 casos/1.000 hab. para 6,3 casos/1.000

hab. Em 1996, 121 municípios da região amazônica, eram considerados de alto risco para transmissão da doença (IPA  $\geq 50$  casos por mil habitantes), 112 de médio risco (IPA entre 10 e 49,9 casos por mil habitantes) e aproximadamente 500 de baixo risco (IPA  $< 10$  casos por mil habitantes). Em 2012, 45 municípios de seis estados da Amazônia Legal foram considerados de alto risco (Ipea 2014), já em 2018, 39 municípios foram considerados de alto risco (Brasil 2020). A transmissão da malária é variável nos diferentes municípios e localidades, sendo influenciada pela interação de fatores ambientais, socioculturais, econômicos e políticos. Esses fatores associados, assim como o planejamento e as atividades de prevenção e controle da doença, determinam o risco de contrair malária (Brasil 2015a). Deste modo, a IPA tem sido um dos indicadores mais utilizados na definição das ações de controle da malária, servindo para estimar o risco de transmissão de malária em determinado lugar, classificar as áreas de risco para malária e sua comparação entre diversas áreas (Brasil 2004). O PNCM foi criado em 2003 tendo como objetivos principais: reduzir a letalidade e gravidade dos casos, reduzir a incidência da doença, eliminar a transmissão em áreas urbanas e manter a ausência da doença em locais onde a transmissão já foi interrompida (Brasil 2003).

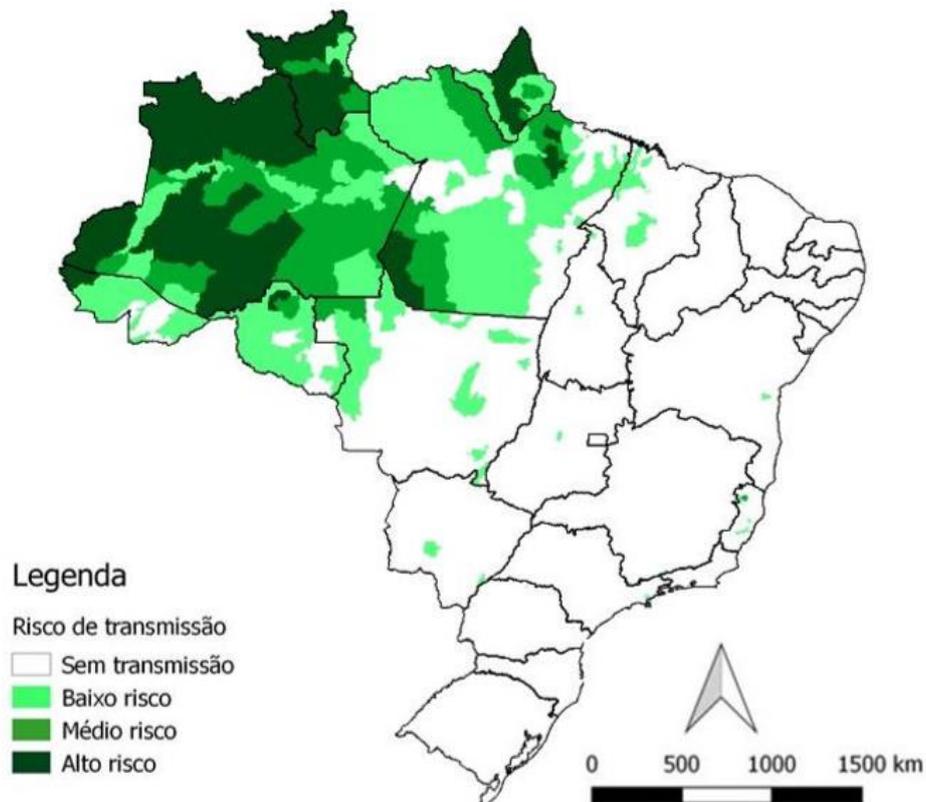


Figura 2.2. Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2018. Fonte: Brasil 2019d.

Estima-se que em 1940, o Brasil apresentava cerca de 6 milhões de casos de malária, numa população de 30 milhões de pessoas. No entanto, durante o final da década de 1950 com a descoberta das propriedades inseticidas de ação residual do DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), e da cloroquina, associados às reformulações do programa de combate, houve um declínio acentuado da doença (Suárez-Mutis et al. 2013). A adesão do Brasil à Campanha Global da Erradicação da malária levou à diminuição dos casos para seu nível mais baixo em 1960, quando foram registrados apenas 36,9 mil casos (Oliveira-Ferreira 2010). No entanto, a partir do ano 1976 houve grande aumento de casos, com o desenvolvimento intensificado da Amazônia que acelerou o processo migratório, atraindo moradores não imunes de outras regiões do país, devido aos projetos de colonização e à expansão da fronteira agrícola, à construção de estradas e hidrelétricas, aos projetos agropecuários, e à extração de madeira e mineração (Braga & Fontes 2011).

De 1987 a 1995, foram registrados em média 500 mil casos anuais da doença; no ano de 1999, a malária atingiu seu nível mais elevado com 635.646 casos. Em 2002 foi observado um declínio na incidência da doença em relação aos 40 anos anteriores, tendo sido registrados 348.259 casos, o que representou 43% de queda em relação a 2000 (Brasil 2009b). No ano de 2005 os casos voltaram a aumentar chegando a 607.782; este aumento deveu-se à ocupação desordenada das periferias das cidades da região amazônica, ao desmatamento para extração de madeira, criação de gado e agricultura, bem como em função da atividade de piscicultura desordenada, com a construção de tanques artificiais, o que aumentou o número de criadouros do mosquito vetor (Brasil 2013). Tendo em vista o aumento no número de casos, o Ministério da Saúde desencadeou um processo de mobilização envolvendo os gestores da saúde nos estados e municípios da região amazônica visando promover a ordenação dos movimentos populacionais priorizando as ações de vigilância, prevenção e o controle da malária (Brasil 2009b). Assim, a partir de 2006 foram implementadas algumas medidas como os novos esquemas de tratamento com terapias combinadas com derivados de artemisinina (ACT) para tratar o *P. falciparum*, a inclusão da primaquina no esquema de tratamento para *P. falciparum*, uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas de longa duração, implementação de novos postos de diagnóstico, controle de qualidade e monitoramento do desempenho do diagnóstico assim como sua supervisão, a inclusão de testes de diagnóstico rápido em áreas de difícil acesso e sistema de detecção e alerta de epidemias (Lapouble et al. 2015). Com essas ações, entre os

anos de 2006 e 2008, foi observado declínio constante no número de casos, passando de 550.930 para 313.922, uma redução de 43%. Outro aspecto a considerar na epidemiologia da malária é que até a década de 1980, houve relativa equivalência entre as espécies parasitárias (*P. vivax* e *P. falciparum*). Com a implantação da ACT no Brasil, a partir do ano 2006, notou-se uma diminuição de casos por *P. falciparum*, que culminou com a predominância de *P. vivax*, responsável por quase 85% dos casos notificados em 2008 (Brasil 2009b). No ano de 2018, 90,4% das notificações foram causadas por *P. vivax* e 10,3% por *P. falciparum* (Suárez-Mutis & Martinez-Espinosa 2019) (Figura 2.3).

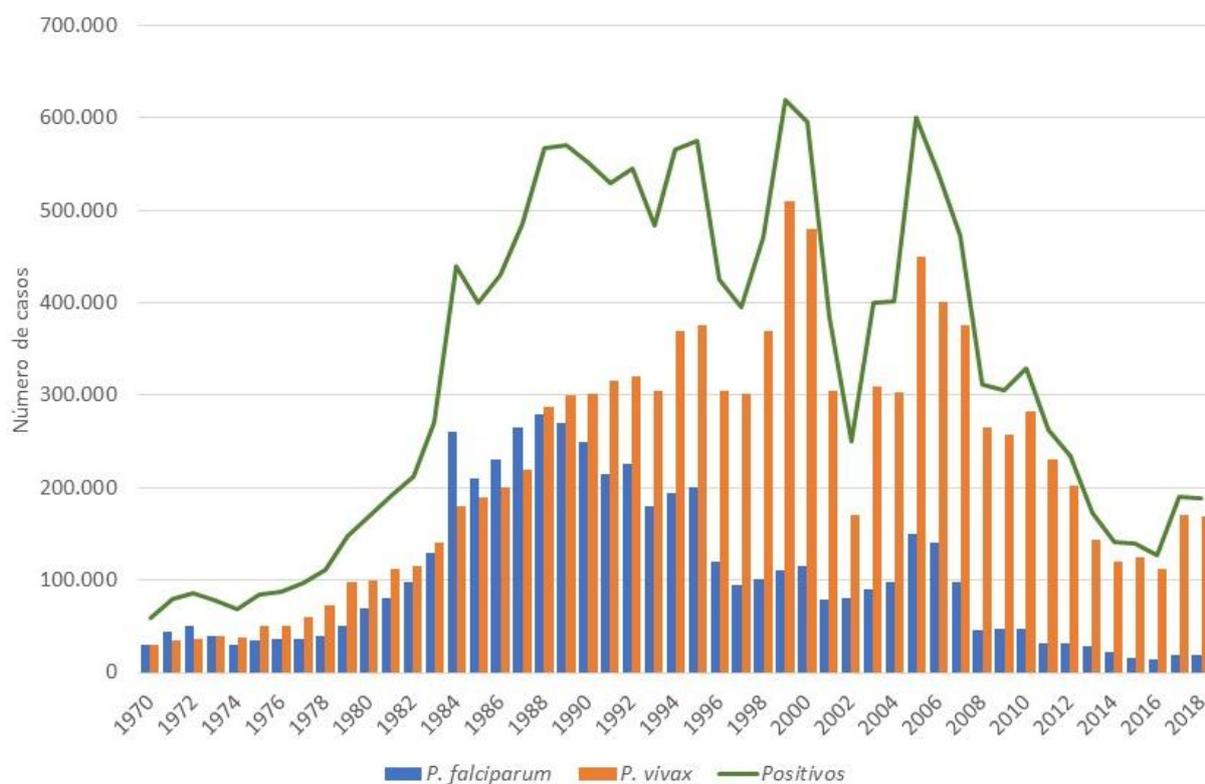


Figura 2.3: Número de casos de malária no Brasil de 1970 a 2018.  
 Fonte: Suárez-Mutis & Martinez-Espinosa 2019.

No ano de 2014, o Brasil conseguiu uma redução de 75% dos casos de malária quando comparado ao ano 2000 (ONU 2014), de forma que o país atingiu um dos objetivos do milênio para acabar com a pobreza, que foi o de reduzir a incidência e mortalidade associadas à malária (ONU 2000). No ano de 2017 houve um novo aumento e foram confirmados 193.916 casos (SIVEP 2019) com 34 mortes (SIM/ DATASUS/MS 2020). Em 2018, houve pouca diferença em relação à 2017 em relação ao número de casos, mas houve um aumento no número de mortes, sendo

confirmados 193.838 casos (SIVEP 2019) com 56 óbitos (SIM/ DATASUS/MS 2020). Dados do Ministério da Saúde apontam uma redução de casos de malária no Brasil em 2019 quando foram notificados em total 156.916 casos autóctones da doença no país, uma redução de 19% comparado com o ano de 2018 (SIVEP 2020). A redução dos casos se deve, principalmente, à integração das ações de saúde realizadas pelo governo federal em parceria com os estados, municípios e a população contra a malária (Brasil 2019a).

Na região extra-amazônica é notificado menos de 1% do total de casos de malária do país. Em 2014, foram registrados 559 casos de malária nesta região; destes, 54 foram autóctones nos estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Piauí, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo. Foram registrados 273 casos com local provável de infecção na região Amazônica e 232 casos com local provável de infecção em outros países (Brasil 2015b). Já no ano de 2018, foram registrados 737 casos nesta região, mostrando um aumento em relação à 2014. Contudo, no primeiro trimestre de 2019, foram registrados 17 casos, sendo que neste mesmo período em 2018, já tinham sido registrados 199, mostrando um importante declínio no número de casos (Brasil 2019a). No início de 2015, houve um surto de malária na região serrana do estado do Rio de Janeiro devido a *P. simium*. Esses casos foram associados à presença de primatas não-humanos infectados com *P. simium*, configurando-se uma zoonose (Brasil et al. 2017). A importância de se estudar a malária na região extra-amazônica reside no risco de reintrodução da doença, por meio de casos importados e à alta letalidade, que pode ser entre 40 e 90 vezes maior que na região amazônica, pelo fato dos médicos não pensarem em malária ao fazer o diagnóstico diferencial com outras patologias febris de importância na região, como dengue, zika e chikungunya (Suárez-Mutis & Martinez-Espinosa 2019). Nesta região, o sistema de vigilância deve ser constante e estar sempre atento, com o objetivo de se detectar e tratar rapidamente estes casos, evitando-se o aumento da transmissão autóctone (Brasil 2015a).

Com este histórico da malária no Brasil, nota-se que nos últimos anos, o Ministério da Saúde, por meio do PNCM, em esforço conjunto com estados e municípios, tem alcançado grandes avanços na prevenção e controle da malária (Brasil 2015a). Contudo, a continuidade da transmissão da malária na região amazônica brasileira, mesmo após intensos esforços de controle, é consequência das particularidades da dinâmica populacional nessa região, onde, além dos fatores humanos, coexistem os fatores ambientais propícios para a proliferação dos

mosquitos transmissores e para a manutenção da infecção. Ainda, as características geográficas amazônicas dificultam o acesso aos serviços de saúde, o que, junto com as difíceis condições ambientais, favorece a transmissão da malária (Lapouble et al. 2015). Diante destas dificuldades, deve haver uma constante inovação e capacitação de recursos humanos para a prevenção e combate da malária, a fim de se conseguirem avanços ainda mais expressivos rumo à eliminação da doença (Brasil 2015a).

#### **2.4. Ciclo e biologia de *P. vivax***

Os plasmódios são parasitos heteróxeos que desenvolvem um ciclo denominado esquizogônico ou assexuado no hospedeiro vertebrado, que é considerado hospedeiro intermediário, e um ciclo esporogônico ou sexuado, no vetor que é considerado seu hospedeiro definitivo (Suárez-Mutis et al. 2013).

No caso da infecção por *P. vivax*, o ciclo esquizogônico, inicia-se após a picada do mosquito *Anopheles* spp., com a inoculação de esporozoítas infectantes no homem. A seguir, os esporozoítas circulam na corrente sanguínea durante alguns minutos e rapidamente penetram nas células do fígado (hepatócitos), dando início à fase exoeritrocítica (ou esquizogonia tissular) do ciclo, que dura em média oito dias, a depender da espécie parasitária (Brasil 2009a). Ao final da fase exoeritrocítica, são liberadas vesículas chamadas merossomas na corrente sanguínea, dentro das quais existem milhares de elementos-filhos chamados merozoítas que vão invadir hemácias dando início à fase eritrocítica (ou esquizogonia sanguínea). Durante fase exo-eritrocítica, uma parte dos parasitos mantém-se no hepatócito sob a forma de hipnozoítas (formas latentes), levando às recaídas após meses ou anos (White 2011; Suárez-Mutis et al. 2013). *P. vivax* invade preferencialmente reticulócitos que correspondem a menos de 3% das células vermelhas do sangue (Brasil 2009a). Na fase eritrocítica, os merozoítas penetram nas hemácias e desenvolvem a esquizogonia sanguínea, inicialmente como trofozoítas, evoluindo para esquizontes, merócitos ou rosáceas, que rompem as células sanguíneas liberando merozoítas que vão invadir novas hemácias (Suárez-Mutis et al. 2013). A ruptura e consequente liberação de parasitos na corrente sanguínea traduz-se clinicamente pelo início do paroxismo malárico, que se repetirá com o término do novo ciclo (em 48h, no caso da infecção pelo *P. vivax*). Após um período de replicação assexuada, alguns merozoítas se diferenciam em gametócitos machos (microgametócito) e fêmeas (macrogametócito), que amadurecem sem divisão celular e tornam-se infectantes

aos mosquitos (Brasil 2009a).

Os anofelinos, ao picarem o homem que possui gametócitos no sangue, ingerem os macro e microgametas com as hemácias, iniciando o ciclo esporogônico que ocorre no estômago do mosquito após a diferenciação dos gametócitos em microgametócito (masculino) e macrogametócito (feminino), que se fundem formando o zigoto (Brasil 2009a, Suárez-Mutis et al. 2013). O zigoto se transforma em uma forma móvel (ocineto) que migra e atravessa a parede do intestino médio do inseto, formando o oocisto, no interior do qual se desenvolverão os esporozoítas (Brasil 2009a). Quando os oocistos estão maduros, rompem-se liberando os esporozoítas na cavidade geral dos mosquitos, atingindo as glândulas salivares. Quando este mosquito picar ao homem, os esporozoítas serão inoculados em sua corrente sanguínea e assim se reiniciará um novo ciclo (Suárez-Mutis et al. 2013) (Figura 2.4).

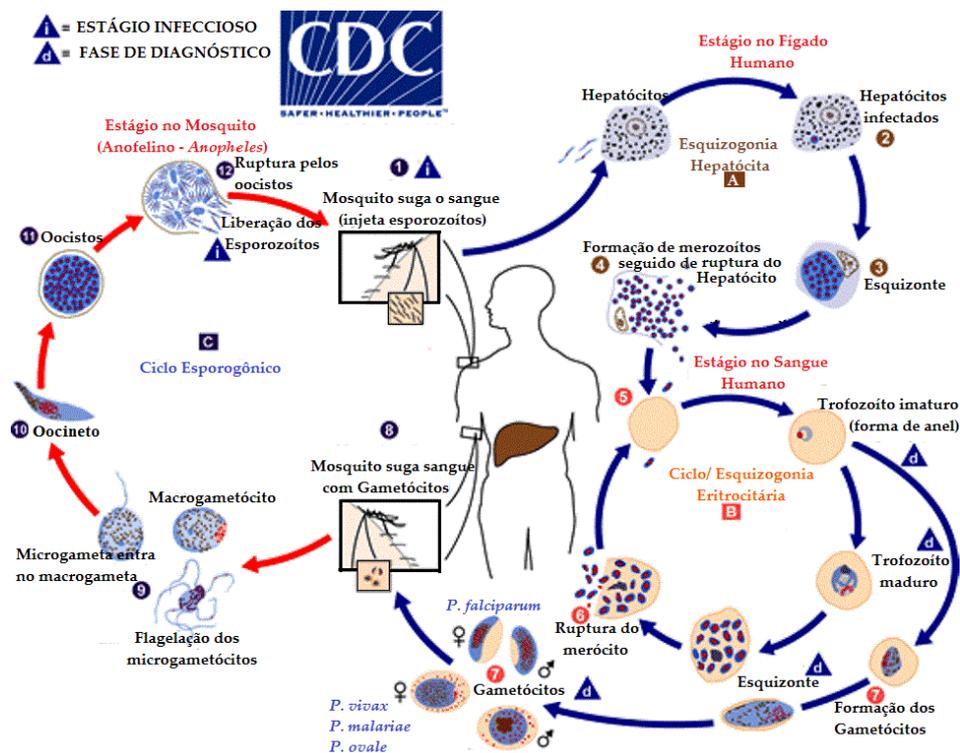


Figura 2.4: Ciclo evolutivo dos plasmódios humanos.

Fonte: Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention* 2019.

*P. vivax* é a espécie de parasito da malária humana mais amplamente distribuída geograficamente sendo encontrada em muitas partes das regiões tropicais e subtropicais do mundo, exceto no oeste e no centro da África Subsaariana (Mendis et al. 2001, Dayanand et al. 2018). Este parasito depende do

antígeno Duffy para invadir os glóbulos vermelhos (Howes et al. 2016). Esta dependência explica por que a distribuição geográfica de *P. vivax* coincide com áreas tropicais e temperadas, onde o antígeno Duffy é expresso na superfície dos eritrócitos, o que é o caso da maioria das populações humanas, exceto da África Subsaariana. (Olliaro et al. 2016, Dayanand et al. 2018). No entanto, existem relatos descrevendo a ocorrência da infecção por *P. vivax* em certas partes da África, onde os indivíduos aparentemente não possuem o antígeno Duffy, sugerindo que o parasito deve usar receptores alternativos para invasão de eritrócitos ou a população nessas regiões expressa baixos níveis de antígeno Duffy (Poirier et al. 2016, Mendes et al. 2011, Ménard et al. 2010). Acredita-se que a mobilidade da população, juntamente com a migração, pode amplificar a heterogeneidade do fenótipo Duffy e aumentar a população de hospedeiros Duffy positivos (Howes et al 2016). Na Amazônia brasileira foram identificados pela primeira vez indivíduos Duffy negativos com infecção por *P. vivax* em Porto Velho (Rondônia) no trabalho de Cavasini et al (2007) e no trabalho realizado em Anajás (Pará) por Carvalho et al (2012); nesses trabalhos, não foi encontrado diferencial de resistência à malária por *P. vivax* entre Duffy negativos e Duffy positivos. São necessárias investigações mais aprofundadas para avaliar a importância desses achados em saúde pública.

Em contraste com *P. falciparum*, a transmissão de *P. vivax* é mais difícil de interromper devido a aspectos particulares da sua biologia: (1) pelo fato deste parasito produzir formas hepáticas dormentes (hipnozoítos), que podem ocasionar recaídas meses ou mesmo anos após a infecção primária (Imwong et al. 2007b), (2) pela produção de gametócitos antes da ocorrência de sintomas e conseqüentemente antes da pessoa infectada receber qualquer tratamento (Luo et al. 2015), (3) pelas altas taxas de infecções assintomáticas que não são detectadas pelos métodos de diagnóstico usual e, portanto, não são tratadas (Congpuong & Ubalee 2017), (4) por possuir maior capacidade vetorial em comparação com *P. falciparum*, se desenvolvendo a temperaturas mais baixas e com um ciclo esporogônico mais curto no vetor (o desenvolvimento completo de *P. vivax* no mosquito é de 8 a 16 dias e para *P. falciparum* é de 9 a 22 dias), assim como pela sua capacidade de sobreviver no vetor a temperaturas até de 16°C (*P. falciparum* sobrevive a temperaturas maiores de 18°C). Estes aspectos permitem a transmissão de *P. vivax* em zonas temperadas e torna-o menos sensível às medidas de controle de vetores que são efetivas para *P. falciparum* e (5) a preferência por reticulócitos para invasão, o que explica as baixas parasitemias difíceis de detectar, levando a diagnósticos falso-

negativos e tratamentos atrasados (Olliaro et al. 2016).

Os hipnozoítos podem causar múltiplos ataques clínicos a partir de uma única picada de um mosquito infectado com *P. vivax*, ao contrário de *P. falciparum*, que produz uma única infecção no estágio sanguíneo (Howes et al. 2016). Estes hipnozoítos causam recaídas que ajudam a manter a diversidade genética do parasito e reduzem a dependência da transmissão pelo mosquito vetor, diminuindo a eficácia das medidas de controle de vetores (Olliaro et al. 2016). Além disso, atuam como um “porto seguro” contra ataques imunológicos durante longas estações frias sem mosquitos, permitindo a ocorrência do parasito em climas temperados (Howes et al. 2016).

A malária por *P. vivax* é diagnosticada tardiamente, porque os indivíduos infectados apresentam baixas parasitemias, que são difíceis de serem detectadas com diagnósticos atuais, como testes rápidos e microscopia. O diagnóstico tardio significa um atraso no tratamento e também a capacidade de transmissão por um período prolongado (Olliaro et al. 2016). Isso é agravado pelo fato de que os gametócitos infecciosos aparecem precocemente, quase simultaneamente com parasitos assexuais, em contraste com *P. falciparum*, no qual os gametócitos maduros levam 10 dias para aparecer no sangue periférico (Howes et al. 2016), fato que favorece o ciclo do protozoário, uma vez que a transmissão ocorre antes do diagnóstico e tratamento. Também os indivíduos com infecção assintomática, provavelmente devido à imunidade clínica, são um desafio no controle da doença. Indivíduos expostos a múltiplas infecções por *P. vivax* adquirem imunidade clínica mais rapidamente do que por *P. falciparum*, independente da intensidade de transmissão (Mueller et al. 2013). Barbosa et al (2014) relataram gametocitemia em mais de 90% dos indivíduos com infecção assintomática por *P. vivax* e já foi comprovado que essas infecções assintomáticas são infecciosas para os vetores, embora em nível mais baixo do que os casos clínicos (Pethleart et al. 2004; Alves et al. 2005; Martins-Campos et al. 2018).

Outro fator que também dificulta a eliminação da malária por *P. vivax* é a ocorrência de resistência à cloroquina, que é a droga de primeira linha no tratamento de parasitos de *P. vivax*. A cloroquina é capaz de eliminar os estágios sanguíneos durante ataques clínicos agudos incluindo os parasitos sexuais e quando administrada em combinação com a primaquina, produz cura radical da infecção por *P. vivax*, eliminando também os hipnozoítos responsáveis pelas recaídas (Howes et al. 2016). Nos últimos anos, a resistência antimalárica tem sido uma grande

preocupação no tratamento da doença. A resistência à cloroquina em *P. vivax* foi relatada pela primeira vez na Papua Nova Guiné em 1989 (Rieckmann et al. 1989) e subsequentemente resistência também foi observada na maioria dos locais endêmicos do sudeste da Ásia (Dayanand et al. 2018). No Brasil, a resistência foi relatada pela primeira vez em 1999 em Manaus (Alecrim 1999). Estudos na região amazônica brasileira sugerem que a resistência pode ser de 2,2% (Ladeia-Andrade et al 2019) até 10,1% (de Santana Filho et al. 2007) medida no dia 28 após a dose inicial de cloroquina. A terapia ineficaz devido à resistência causa um aumento da carga da doença, prolongando a duração dos sintomas clínicos, aumentando a probabilidade de aparecimento de doenças graves e a probabilidade de transmissão (Howes et al. 2016). No entanto, apesar da crescente evidência de resistência à cloroquina, a combinação desta com a primaquina continua sendo o tratamento de primeira linha em muitos países, incluindo o Brasil (WHO 2015b, Brasil 2019b); já em outras regiões, a terapia combinada de artemisinina é utilizada juntamente com a primaquina como estratégia alternativa de tratamento (WHO 2015b). Um outro fator que pode dificultar o tratamento é o fato da primaquina ser altamente tóxica para pessoas com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), por causar hemólise (Baird et al. 2016). Em vista destas problemáticas, se torna necessário reforçar os estudos para utilização de novas drogas contra *P. vivax*.

Embora anteriormente se acreditasse ser uma infecção benigna, *P. vivax* agora é bem reconhecida como uma causa significativa de doença grave em diferentes áreas endêmicas (Olliaro et al. 2016), podendo levar inclusive ao óbito de alguns pacientes (Tijitra et al. 2008, Baird 2013, Andrade et al. 2010, Martins et al. 2014). É possível que a resistência à medicamentos e as alterações em evolução genômica do parasito tenham resultado em respostas imunes desreguladas contribuindo para a gravidade das infecções (Dayanand et al. 2018).

Na malária grave por *P. vivax*, a anemia grave e lesão pulmonar aguda são as manifestações mais comumente relatadas; já a acidose metabólica, coma e outras complicações neurológicas ocorrem com menos frequência (Anstey et al. 2012). No Brasil, no trabalho de Lacerda et al. (2012), em Manaus, foram feitas autópsias de pessoas infectadas com *P. vivax* com síndrome do desconforto respiratório agudo e foram encontradas hemácias parasitadas nos capilares pulmonares, após remoção dos parasitos do sangue periférico pelo tratamento, mostrando que pode ocorrer sequestro de hemácias parasitadas, contribuindo para respostas inflamatórias em órgãos afetados. De qualquer forma, existe uma lacuna crítica no conhecimento

atual sobre a biologia, fisiopatologia e imunidade na infecção por *P. vivax* (Dayanand et al. 2018). São necessários mais estudos para entender a patogênese relacionada à doença grave causada por *P. vivax* (Lacerda et al. 2012).

A predominância de *P. vivax* em algumas das regiões mais densamente povoadas e empobrecidas do mundo, juntamente com sua, agora comprovada, associação com desfechos graves e fatais, mostra a importância de reverter a negligência histórica em relação à essa infecção (Howes et al. 2016). Todos esses aspectos da biologia de *P. vivax* representam grandes desafios para o controle e eliminação da malária por essa espécie (Adams & Mueller 2017). Melhorar a compreensão de sua biologia e como ela difere de *P. falciparum* para que possa ocorrer um melhor direcionamento das pesquisas e intervenções para intensificar o controle e possivelmente eliminar a malária por *P. vivax* é uma necessidade urgente (Olliaro et al. 2016).

## **2.5. Diversidade genética de *P. vivax***

Marcadores genéticos são ferramentas úteis para avaliar a estrutura populacional de *P. vivax*, como demonstrado para populações brasileiras e de outros locais do mundo (Ferreira et al. 2007, Rezende et al. 2010, Batista et al. 2015, Barry et al. 2015, Koepfli et al. 2011), e para a busca de evidências de eventos de seleção recentes associados à diferentes fenótipos, como a resistência aos fármacos (Orjuela-Sánchez et al. 2009, Lizcano et al. 2014). A diversidade genética de *P. vivax* pode influenciar a estabilidade da transmissão e o desenvolvimento de imunidade (Batista 2014) podendo revelar percepções sobre sua epidemiologia e dinâmica da transmissão, com o potencial de fornecer ferramentas para apoiar estratégias de combate ao parasito para o controle da doença (Rezende 2009).

Análises da diversidade genética de parasitos sugeriram que as populações de *P. vivax* são mais diversificadas geneticamente (Neafsey et al. 2012, Orjuela-Sánchez et al. 2013, Jennison et al. 2015) e menos estruturadas que as de *P. falciparum*, mesmo em áreas de baixa transmissão, indicando que *P. vivax* pode ser um parasito mais antigo nos seres humanos e/ou menos suscetível aos gargalos populacionais, além de ser mais eficiente na disseminação de seus genes (Barry et al. 2015). O fato de *P. vivax* ser mais diversificado geneticamente que *P. falciparum*, o torna um alvo mais complexo para a intervenção terapêutica (Olliaro et al. 2016).

Além da alta diversidade genética, as infecções por *P. vivax* comumente contêm múltiplos clones de parasitos geneticamente distintos que podem surgir de uma única picada de um mosquito carregando uma mistura de parasitos ou da inoculação por diferentes mosquitos portadores de variantes genéticas de parasitos (Koepfli et al. 2011, Havryliuk & Ferreira 2009). A ingestão de variantes geneticamente distintas pelo mosquito vetor durante o repasto sanguíneo pode aumentar a geração de diversidade genética através da recombinação meiótica (Barry et al. 2015). Além disso, as recidivas da infecção por *P. vivax* devido à reativação de hipnozoítos podem contribuir para o aumento da diversidade de parasitos (de Souza et al. 2015). Os hipnozoítos originários de infecções anteriores podem se acumular no fígado e serem ativados simultaneamente no momento da nova infecção resultando na co-circulação de cepas diferentes. Acredita-se que, quando dois ou mais clones geneticamente distintos estão presentes no mesmo hospedeiro, a competição intra-hospedeiro pode selecionar características de *P. vivax* que representam grandes desafios à saúde pública, como aumento da virulência, aumento da transmissibilidade e resistência a medicamentos antimaláricos (Havryliuk & Ferreira 2009). A hipótese de que a competição intraespecífica pode estar associada ao risco de infecções com variantes mais virulentas, pode ser testada comparando-se a complexidade de infecção em indivíduos com infecção assintomática e sintomática diagnosticadas em uma mesma população (Batista 2014).

A avaliação das respostas ao tratamento para a infecção por *P. vivax* é essencial, mas a interpretação de infecções recorrentes em estudos de eficácia de medicamentos é complicada porque pode resultar de recrudescência dos parasitos sobreviventes do estágio no sangue, novas infecções ou recaídas causadas pela ativação de hipnozoítos no fígado (Van den Eede et al. 2010b). Anteriormente, acreditava-se que as recaídas eram ocasionadas por variantes distintas da infecção primária, porém já se sabe que essas recaídas podem ter origem tanto na reativação de parasitos geneticamente similares aos da infecção primária (hipnozoítos homólogos) ou geneticamente diferentes (hipnozoítos heterólogos) (Brito & Ferreira 2011). A resistência de *P. vivax* à cloroquina emergiu mais lentamente quando comparada a *P. falciparum*; o que pode ter retardado o surgimento dessa resistência é o aumento das taxas de infecção múltipla, que permite que as recombinações alterem haplótipos de resistência (Olliaro et al. 2016).

Pelo fato de *P. vivax* não poder ser cultivado continuamente *in vitro*, o sequenciamento do genoma inteiro tornou-se um meio eficaz para estudar a biologia do parasito (Luo et al. 2015). O genoma de *P. vivax* é haplóide durante grande parte do seu ciclo de vida, inclusive no estágio sanguíneo, o que simplifica o estabelecimento de haplótipos a partir de loci independentes para a genética de populações (Barry et al. 2015). O primeiro esboço da sequência do genoma de *P. vivax* foi publicado em 2008 por Carlton et al. (2008) usando uma cepa proveniente de um paciente de El Salvador; este primeiro genoma foi nomeado Salvador I (Sal I). O genoma nuclear de *P. vivax* possui ~27 megabases (Mb), ~42,3% de composição G-C, ~5500 genes distribuídos em 14 cromossomos. Neste trabalho foi descrito um total de ~160 microssatélites com comprimento médio de repetição de 3,1 nucleotídeos e uma média de número de cópias de 19,1 (Carlton et al. 2008). O genoma mitocondrial de 6 kb (mtDNA) de *P. vivax* é outra fonte de variação bem estudada. Como o mtDNA é herdado unitariamente, reconstruir conexões entre isolados de parasitos individuais é mais direto do que usar loci do genoma nuclear, que se recombina durante a replicação sexual no mosquito (Barry et al. 2015).

Existem várias classes de marcadores disponíveis para a investigação da diversidade e estrutura populacional de *P. vivax*. Os principais utilizados são os SNPs (*single nucleotide polymorphisms* – polimorfismos de base única) em genes codificadores de antígenos; entretanto, como os antígenos sofrem a ação do sistema imune do hospedeiro, seus genes codificadores estão sob forte pressão seletiva positiva, não sendo dessa forma considerados marcadores neutros e, por isso, não são bons marcadores evolutivos (Araújo 2012). Os SNPs têm taxas de mutação mais lentas que os microssatélites, sendo, portanto, marcadores mais desejáveis para análises genéticas de populações em amplas escalas geográficas (Barry et al. 2015).

Exemplo de genes codificadores de antígenos, são os das proteínas de superfície do merozoíta (MSP), que se trata de uma grande família de proteínas de superfície envolvidas na interação inicial entre os parasitos e as células vermelhas do sangue (Araújo et al. 2012). Os genes destas proteínas são de rápida evolução e utilizados como marcadores para medir a diversidade e rastrear variantes individuais do parasito em um indivíduo. Estes genes contêm tanto SNPs como microssatélites (Barry et al. 2015). Em estudos de diversidade genética de *P. vivax* foi observado que o gene da Proteína de Superfície do Merozoíta 1 (*mSP1*) é altamente polimórfico e que os blocos 1, 3 e 5 de são conservados com poucas substituições, enquanto os

blocos 2, 4, 6 e 10 são altamente variáveis, sendo os blocos 2 e 10 os mais utilizados como marcadores genéticos (Brito & Ferreira 2011). Os blocos variáveis mostram extensas variações de sequência que consistem em várias substituições, inserções/deleções e números variáveis de repetições curtas, de forma que novos alelos de *msp1* podem ser gerados por eventos de recombinação mesmo em áreas com baixos níveis de transmissão de malária (Putaporntip et al. 2002).

Os microssatélites são utilizados para identificar e monitorar a diversidade genética de *P. vivax* em todo o mundo (Rezende et al. 2010, Lizcano et al. 2014, Ferreira et al. 2007, Barry et al. 2015, Koepfli et al. 2011, Congpuong & Ubalee 2017, Manegon et al. 2016). Os microssatélites são pequenas repetições em série no DNA; cada repetição possui entre 1 a 6 nucleotídeos que se repetem continuamente sem interrupção com um motivo único de repetição (tipo de repetição perfeita), quando existem bases diferentes intercaladas na sequência que se repete (tipo de repetição imperfeita) ou quando uma repetição perfeita ou imperfeita está associada à outra repetição com motivo diferente (tipo de repetição composta) (Litt & Luty 1989, Weber 1990, Sutton 2013). Os alelos diferem no número de repetições em série devido a *crossing over* desigual durante a meiose, ou ao “*slippage*” ou derrapagem da DNA polimerase na replicação do DNA (Ellegren 2004). Durante o processo de replicação do DNA, as fitas complementares podem se parear de modo errado ocorrendo um erro durante a replicação, resultando no ganho ou na perda de uma unidade repetitiva (Ellegren 2004). A diversidade nos microssatélites depende do número de repetições, ou seja, do tamanho do arranjo. Arranjos longos são mais variáveis do que os curtos, já que os erros na replicação aumentam exponencialmente com o aumento no comprimento do arranjo, tornando o marcador mais polimórfico (Imwong et al. 2007a, Rezende et al. 2010, Sutton 2013). São utilizados como marcadores genéticos por possuírem um alto nível de polimorfismo, um tamanho pequeno e serem de fácil detecção em protocolos de biologia molecular, sendo amplamente utilizados em estudos de genética de populações (Russell et al. 2006, Batista 2014).

## **2.6. Estudos prévios da diversidade genética de populações de *P. vivax* através da genotipagem de microssatélites**

Já foi demonstrado em populações de diferentes regiões da Amazônia brasileira que o *P. vivax* apresenta alta diversidade genética e alta proporção de

infecções por clones múltiplos como no Acre (Ferreira et al. 2007; Orjuela-Sánchez et al. 2009), Amapá, Rondônia, Para e Amazonas (Rezende et al. 2010; Batista et al. 2015). Na América Latina há estudos na Colômbia (Menegon et al. 2016), Venezuela (Chenet et al. 2012), México (Gonzalez-Ceron et al. 2013). Também há publicações mostrando essa alta diversidade em outros locais do mundo como em Papua Nova Guiné (Koepfli et al. 2011, Koepfli et al. 2013), Ilhas de Salomão (Koepfli et al. 2013), Camboja (Orjuela-Sánchez et al. 2013), Tailândia (Congpuong & Ubalee 2017) e Vietnã (Van den Eede et al. 2010b). Possivelmente para *P. vivax*, as inoculações policlonais repetidas e a presença de hipnozoítos que podem reativar a qualquer momento mantêm a população de parasitos altamente diversa e com infecções por múltiplos clones em todo o mundo, mesmo em áreas de baixa intensidade de transmissão (Havryliuk e Ferreira 2009, Van den Eede et al. 2010b).

Ferreira et al. (2007). compararam a diversidade genética de populações simpátricas de *P. vivax* e *P. falciparum*, em uma área de baixa endemicidade no Acre, e observaram que as populações de *P. vivax* eram mais diversas e compreendiam mais infecções com múltiplos clones que isolados simpátricos de *P. falciparum*. Os mesmos resultados foram encontrados na Venezuela (Chenet et al. 2012) e no Camboja (Orjuela-Sánchez et al. 2013). No trabalho de Menegon et al. 2016 utilizando amostras do Brasil, Colômbia, Índia e Papua Nova Guiné, foi observado que as populações de *P. vivax* dos quatro países foram mais diversas que as de *P. falciparum* e as populações de *P. vivax* eram distintas entre os quatro países, de forma que nenhum haplótipo foi compartilhado entre as populações.

Em outro trabalho feito no Brasil, Rezende et al. (2010) genotiparam amostras de quatro áreas da Amazônia brasileira: Macapá (AP), Porto Velho (RO), Augusto Corrêa (PA) e Manaus (AM) utilizando 11 microssatélites e foi demonstrado que isolados de áreas geográficas distintas exibem extensa diversidade genética dentro e entre as populações estudadas. Outro estudo realizado durante três anos em assentamentos agrícolas em Remansinho (AM), na Amazônia rural brasileira (Batista et al. 2015) utilizando 14 microssatélites, revelou uma diversidade genética moderada a alta, uma grande proporção de múltiplos clones e forte desequilíbrio de ligação multilocus (associação não aleatória de alelos de loci diferentes). Um único haplótipo de microssatélites foi compartilhado por três parasitos coletados durante um surto e todos os outros 81 haplótipos foram recuperados apenas uma vez; também durante o surto foi encontrada menor diversidade com menor proporção de infecções múltiplas e desequilíbrio de ligação mais forte, o que forneceu um exemplo

claro da estrutura populacional do parasito em um surto com expansão quase clonal de parasitos relacionados.

No trabalho realizado por Imwong et al. 2007a em áreas de baixa transmissão de três países asiáticos (Tailândia, Índia e Laos) e cinco locais na Colômbia utilizando 9 microssatélites, foi encontrada alta diversidade genética de *P. vivax* em todos os países e uma forte diferenciação entre os continentes. Genótipos idênticos foram frequentemente encontrados em populações colombianas, contribuindo para um forte desequilíbrio de ligação. Esses genótipos idênticos foram fortemente agrupados no tempo, consistentes com a transmissão epidêmica de clones e subsequente colapso de associações alélicas, sugerindo altas taxas de endogamia e baixas taxas de recombinação efetiva nesse país. Por outro lado, genótipos idênticos eram raros e os loci foram associados aleatoriamente nas três populações asiáticas, consistentes com maiores taxas de cruzamentos e recombinação. Com isto, não houve evidência de desequilíbrio de ligação na Índia, Laos e Tailândia, mas na Colômbia foi altamente significativa.

Em relação à episódios recorrentes de malária por *P. vivax*, no trabalho de Van den Eede et al. (2010b) realizado no Vietnã, utilizando 17 microssatélites, foi encontrada uma alta rotatividade de diferentes genótipos presentes nos episódios subsequentes de malária; 83% dos episódios recorrentes tiveram um perfil de genótipos diferente em comparação com infecções anteriores. Resultado semelhante foi encontrado na Colômbia (Menegon et al. 2016) e no Brasil (Orjuela-Sánchez et al. 2009; Araújo et al. 2012). No trabalho de Menegon et al. (2016) foram genotipadas quatro amostras de recorrência utilizando 7 microssatélites. Nessas amostras, o isolado identificado na infecção primária apresentava um haplótipo de microssatélites diferente daquele identificado no episódio subsequente correspondente. Os autores sugeriram que os quatro pacientes tiveram recaídas por ativação de hipnozoítos heterólogos, ou seja, diferentes dos parasitos encontrados na infecção primária. No trabalho de Araújo et al. (2012), foram utilizados 8 microssatélites e os blocos 2 e 10 do gene *msp1* para genotipar amostras de 30 pacientes pareados de infecção primária/recaída. Neste trabalho foi encontrada uma alta frequência de infecções por múltiplos clones tanto na infecção primária, quanto nas recaídas e a maioria dos parasitos envolvidos na recaída mostrou haplótipos distintos dos da infecção primária, ou seja, hipnozoítos heterólogos. Estes resultados também corroboram com o encontrado em uma área de baixa transmissão na Amazônia rural brasileira (Orjuela-Sánchez et al. 2009), no qual foram genotipadas

28 amostras de infecção e recorrência utilizando 14 microssatélites e foi encontrado que os isolados eram muito diversos e raramente compartilharam o mesmo haplótipo, indicando que recorrências frequentes não favorecem a persistência ou reaparecimento de linhagens clonais de parasitos na população. Nesse trabalho, a maioria das infecções recorrentes envolvia parasitos geneticamente distintos, consistentes com novas infecções ou reativação de hipnozoítos heterólogos. Os autores acreditam que o fato de haplótipos idênticos raramente serem compartilhados entre isolados sugere que novos haplótipos são rapidamente gerados por mutação ou recombinação ou introduzidos pela migração.

Embora existam trabalhos mostrando a diversidade genética de *P. vivax* na Amazônia brasileira, esses utilizaram amostras de um curto espaço de tempo, no máximo três anos. Faltam estudos que mostrem a diversidade do parasito em um longo período de tempo em uma mesma área, o que foi realizado no presente estudo; além disso, uma melhor compreensão da epidemiologia, diversidade, distribuição e dinâmica de transmissão de *P. vivax* em diferentes níveis de transmissão, permitirá que os programas de controle montem estratégias específicas que visem à biologia característica desse parasito e ajude a monitorar o impacto de uma intervenção determinada tendo como visão a eliminação da doença (Manegon et al. 2016, Olliaro et al. 2016).

### **3. JUSTIFICATIVA**

A epidemiologia da malária varia entre diferentes regiões geográficas como consequência das interações entre o parasito e os hospedeiros humano e vetor e o meio ambiente. Por este motivo, é importante conectar dados epidemiológicos com a genética parasitária a fim de entender a distribuição e o comportamento do parasito. Sendo *P. vivax* a espécie mais prevalente na Amazônia brasileira, a mais difícil de controlar e nos últimos anos estar associada à casos graves de malária (Oliveira-Ferreira et al. 2010), assim como o aparecimento da resistência aos medicamentos antimaláricos (Lizcano 2013, Chehuan et al. 2013), uma melhor compreensão da dinâmica de transmissão e genética populacional desta espécie é crucial para prever o surgimento e disseminação de novos fenótipos do parasito com importantes implicações para a saúde pública, tais como novos padrões recorrentes, resistência aos medicamentos e aumento da virulência (Brito & Ferreira 2011). Estratégias

efetivas de combate ao parasito são essenciais para o controle e eliminação da doença, e estas dependem do entendimento de diversos fatores como, por exemplo, a variabilidade genética e a estrutura populacional de *P. vivax*. Contudo, existem poucos trabalhos de estudo populacional de *P. vivax*, comparado com a quantidade de estudos sobre o *P. falciparum*. A magnitude da região amazônica brasileira faz com que a epidemiologia da malária seja muito variável, sendo, portanto, esta região particularmente interessante para a análise da estrutura populacional (Rezende et al. 2010). O trabalho aqui apresentado se propôs a determinar o padrão de diversidade genética de *P. vivax* de amostras clínicas de pacientes sintomáticos e com infecção assintomática de uma área rural e uma urbana do município de Barcelos, regiões altamente endêmicas para malária com presença de casos de *P. vivax* e *P. falciparum*, em um local de difícil acesso geográfico e cujos moradores vivem em condições sócio sanitárias precárias (Sousa 2015). A maioria dos trabalhos realizados sobre a genética de *P. vivax* no Brasil e no mundo utilizaram amostras em um curto espaço de tempo e o presente trabalho estudou amostras de um longo período de tempo (10 anos) de uma mesma área a fim de examinar a dinâmica temporal do parasito. Além da dinâmica temporal, comparar a coexistência de genótipos distintos em um mesmo indivíduo (infecção por múltiplo clone) em indivíduos com infecção assintomática e sintomática pode permitir testar a hipótese de que a competição intraespecífica pode estar associada ao risco de infecções com clones mais virulentos, mais propensos a causarem sintomas. Vários países estão empenhados na eliminação dessa doença até o ano 2030 (WHO 2019). Um dos empecilhos para que essa eliminação aconteça tem a ver com o pouco conhecimento de uma série de aspectos como a dinâmica da transmissão, a biologia e a genética de *P. vivax* que tem sido considerado um parasito negligenciado. Por estes motivos, estudar a diversidade de *P. vivax* que está amplamente distribuído nas áreas de estudo pode ajudar a monitorar e criar novas estratégias de controle e/ou eliminação da malária por este parasito, o principal problema de saúde dessas áreas.

### **3.1. Perguntas e Hipóteses**

#### **3.1.1. Perguntas**

- Qual é a diversidade genética de *Plasmodium vivax* em Barcelos?
- Existe diferença nesta diversidade entre a área urbana e rural do município?

- Existem infecções geneticamente múltiplas nos indivíduos infectados com o parasito nesta região?
- O perfil de diversidade genética pode variar em relação ao tempo e epidemiologia da malária?
- Podemos associar o perfil de diversidade genética com o desfecho clínico do indivíduo (se sintomático ou infecção assintomática)?

### **3.1.2. Hipóteses**

- Isolados de *Plasmodium vivax* circulantes no município de Barcelos apresentam alta diversidade genética, bem como, existe diferença nesta diversidade entre área urbana e rural.
- Nos indivíduos portadores deste parasito ocorrem infecções geneticamente múltiplas.
- O perfil de diversidade genética varia em relação ao tempo e epidemiologia da malária e podem estar associados com o desfecho clínico do indivíduo.

## **4. OBJETIVO GERAL**

Determinar o perfil de diversidade genética e estrutura populacional de isolados de *Plasmodium vivax* e sua associação com as características epidemiológicas da malária no período de dez anos em uma área de alta endemicidade para malária na região do médio rio Negro, Amazonas, Brasil.

### **4.1. Objetivos específicos**

- Estabelecer o perfil epidemiológico da malária no município de Barcelos;
- Identificar e determinar as frequências alélicas e haplótipos dos marcadores genéticos de *P. vivax* estudados na população;
- Determinar a proporção de infecções de *P. vivax* geneticamente múltiplas (coexistência de mais de uma variante genética do parasito infectando o mesmo indivíduo);

- Comparar os genótipos dos isolados de *P. vivax* de indivíduos provenientes da área rural e urbana do município;
- Comparar os genótipos dos isolados de *P. vivax* coletados na área urbana em diferentes períodos (distância temporal);
- Relacionar o perfil de diversidade dos marcadores genéticos estudados com a incidência de malária ao longo do tempo;
- Relacionar o perfil de diversidade dos marcadores genéticos estudados com a localidade de coleta (distância espacial);
- Relacionar o perfil de diversidade dos marcadores genéticos estudados com o desfecho clínico dos indivíduos (se sintomáticos ou assintomáticos);

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1. Área e população de estudo**

O município de Barcelos está localizado no médio rio Negro, norte do estado do Amazonas. A sede urbana do município encontra-se nas coordenadas 0°58'11" latitude norte e 62°56' longitude oeste. A altitude média é de 40 metros acima do nível do mar e faz fronteira com os municípios de Santa Isabel do Rio Negro ao oeste, Novo Airão ao sudeste, Marãa ao sudoeste, com o estado de Roraima ao leste e com a Venezuela ao Norte (Andrade 2005; Cevallos 2001). Tem uma área de 122.475 quilômetros quadrados, sendo o segundo maior município do Brasil em extensão territorial, após o município de Altamira, no Pará (Figura 5.1). A população estimada no ano de 2015 foi de 27.433 pessoas (IBGE 2015). A sede municipal situa-se na margem direita do rio Negro e dista da capital do estado do Amazonas (Manaus) a 390 km em linha reta e 496 km por via fluvial. Fatores ambientais como o clima quente e úmido, com temperatura média anual de 28°C (20-38°C), índice pluviométrico médio anual de 2.286,2 mm e umidade relativa do ar de 83%, notadamente em certos períodos do ano, são favoráveis ao mais rápido desenvolvimento do plasmódio no vetor e dos próprios anofelinos (WHO 2007).

O município é uma área altamente endêmica para malária com 6.292 casos notificados em 2018 e uma Incidência Parasitária Anual (IPA) de 229,9 casos por mil habitantes, caracterizando a área como de alto risco epidemiológico (SIVEP 2020).

Para o presente estudo, a população deste município foi dividida em duas áreas:

**Área 1:** Área urbana do município compreendendo os bairros: Centro, São Sebastião, São Francisco, Marará, Mariuá, Nazaré, Aparecida, Paz, São Lázaro e São Pedro (Figura 5.1). O bairro de São Sebastião (Figura 5.2), o maior em extensão e número de habitantes, encontra-se próximo do Igarapé do Salgado, o maior criadouro de mosquitos da área urbana da cidade e possui um posto de saúde que atende a população com uma estrutura mínima para a realização de exames de baixa complexidade como a gota espessa e administram o tratamento antimalárico (Sousa 2015). No centro de Barcelos também existe um hospital que atende todo o município. No bairro São Francisco e Aparecida também há postos de saúde onde funciona a Estratégia da Saúde da família e coleta de gotas espessas para diagnóstico de malária.

**Área 2:** Comunidades ribeirinhas localizadas ao longo do rio Padauri: Acú-acú, Acuquaia, Ararão, Ararinha, Castanho, São Pedro e Tapera (Figuras 5.3 e 5.4). O rio Padauri é um afluente da margem esquerda do rio Negro sendo o limite entre os municípios de Barcelos e Santa Isabel do Rio Negro, é uma área de difícil acesso dentro do município e possui alta incidência de malária, cuja epidemiologia está sendo descrita desde o ano 2002 por pesquisadores do Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) (Suárez-Mutis 2007, Sousa 2015). Este rio caracteriza-se pela presença de trabalhadores extrativistas de piaçaba, que se deslocam frequentemente de uma área para outra do rio e que desde muito tempo tem sido considerada uma área altamente endêmica para malária (Suárez-Mutis & Coura 2007).

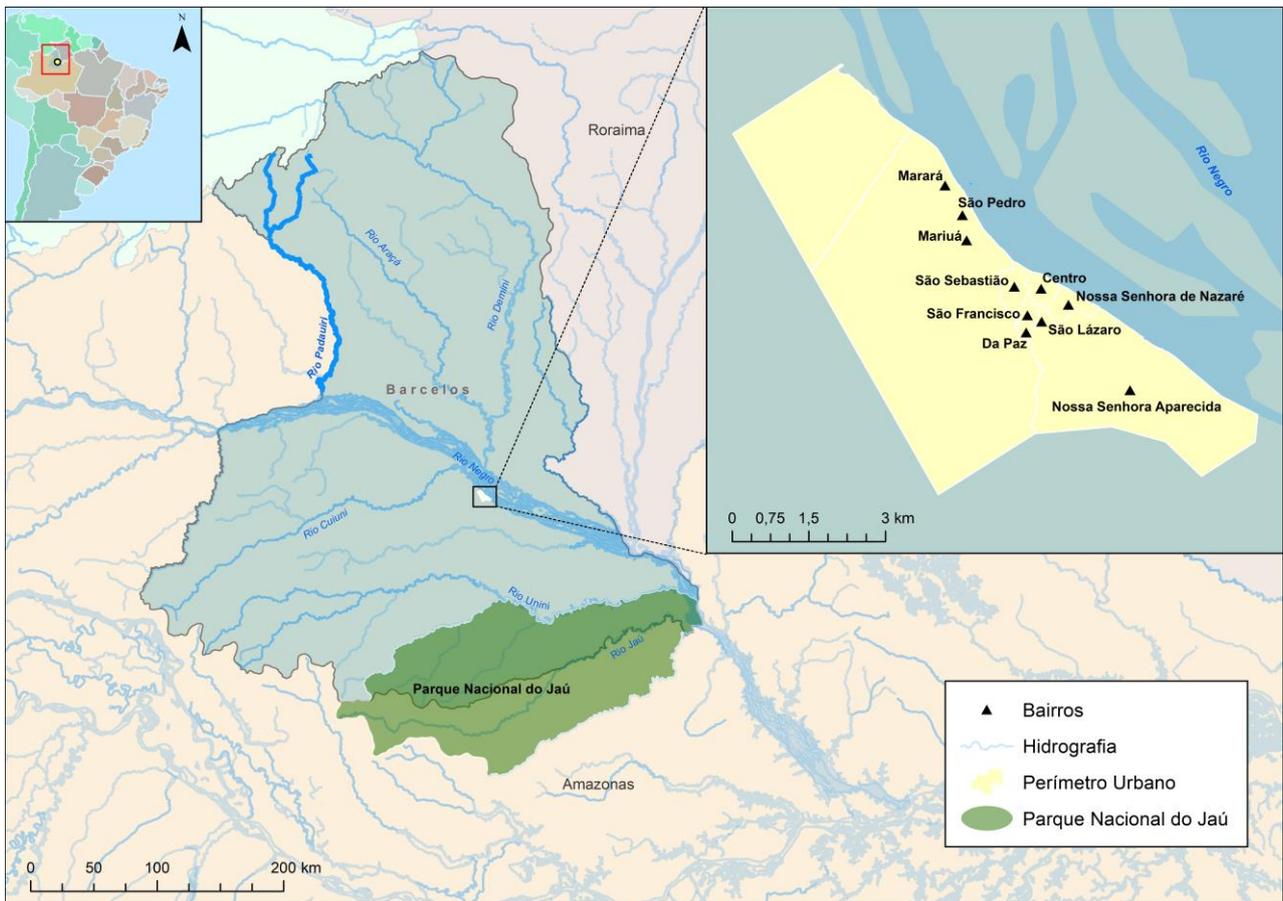


Figura 5.1: Mapa do município de Barcelos mostrando os bairros da área urbana. Elaborado por: Rafael Santos.



Figura 5.2: Área urbana do estudo: (1) Barcelos; (2) bairro de São Sebastião (3) Igarapé do Salgado/São Sebastião. Fonte: Sousa 2015.

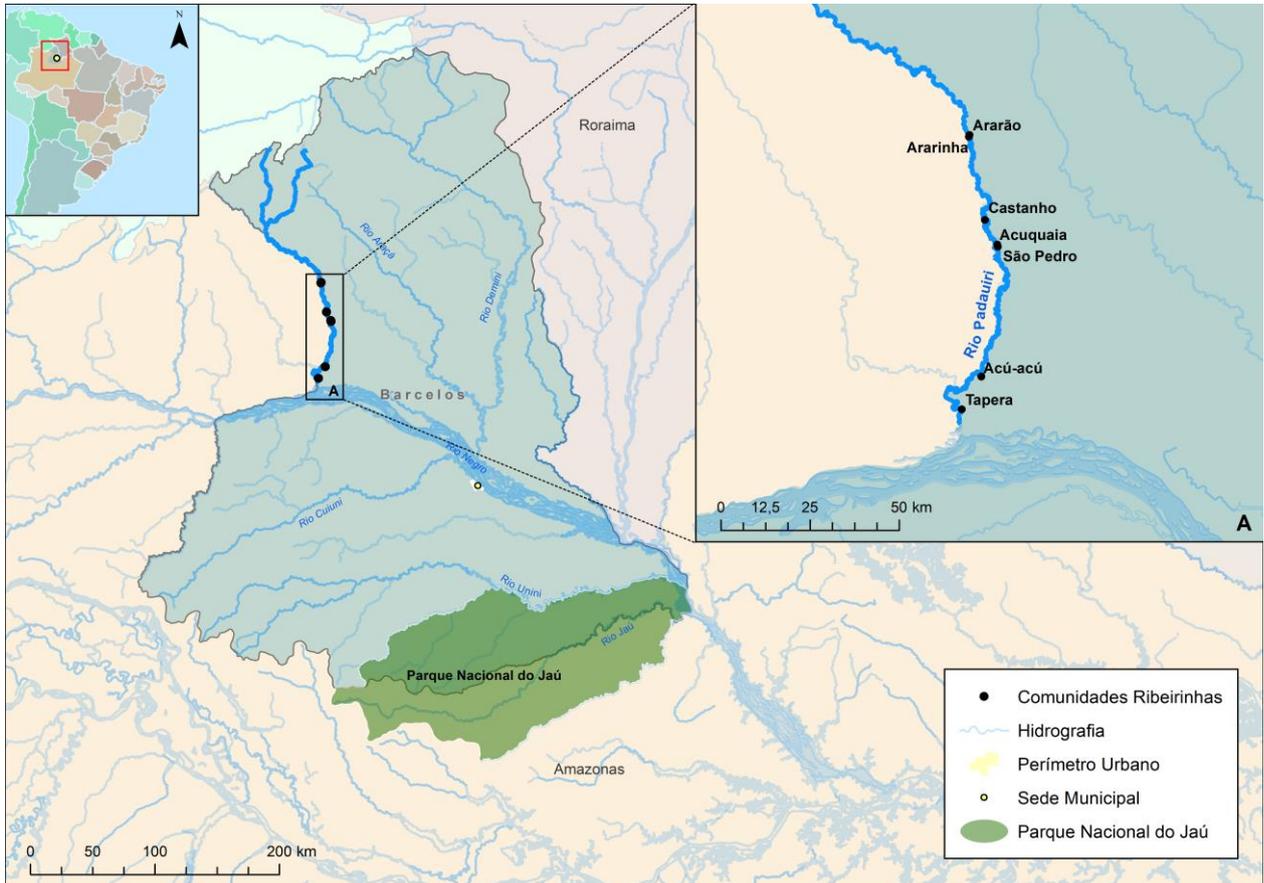


Figura 5.3: Mapa do município de Barcelos mostrando as comunidades do rio Padauri (área rural). Elaborado por: Rafael Santos.



Figura 5.4: Comunidades do rio Padauri (1) Tapera; (2) Acú-Acú; (3,4) Acuquaiá. Fonte: Sousa 2015.

## 5.2. Desenho do estudo

Trata-se de um desenho misto de estudos observacionais descritivos com um estudo retrospectivo baseado nos dados da vigilância epidemiológica e uma série de estudos transversais realizados no município de Barcelos no Amazonas no período de 2002-2016, período no qual foram coletadas amostras clínicas de indivíduos infectados com *Plasmodium vivax*.

### 5.2.1. Estudo retrospectivo

Foram utilizados dados secundários referentes ao período de 2003 até 2018 usando como fonte de informação o SIVEP-Malária.

Foram utilizadas as seguintes variáveis a partir dos casos positivos por local provável de infecção: (1) temporal (ano, mês), (2) demográficas (sexo e faixa etária) e (3) parasitológica (espécie de *Plasmodium*).

Para a análise temporal, foram elaborados gráficos com base na curva endêmica, que foi construída calculando-se as médias e os desvios padrões dos casos por mês no período estudado (2003-2018). Os meses que ultrapassaram o valor da média mais o desvio padrão foram excluídos. Após a exclusão, os desvios padrões mais as médias foram recalculados para cada mês e foi construído o gráfico da curva endêmica, no qual o limite superior foi calculado com o desvio padrão mais a média e o limite inferior com o desvio padrão menos a média de casos. Foram classificados como epidêmicos os meses/anos com o número de casos que excedeu o limite superior da curva endêmica.

Estas informações permitiram conhecer a situação epidemiológica do município de estudo.

### 5.2.2. Estudos seccionais

Entre 2002 e 2016 foram realizados vários estudos seccionais em diversos projetos que objetivavam estudar a epidemiologia da malária e da infecção assintomática no município de Barcelos (Figura 5.5). Durante esses estudos foram coletadas em total 1.475 amostras das quais 411 foram positivas para o *P. vivax* por gota espessa e/ou no diagnóstico molecular. No total foram utilizadas 332 amostras, sendo 78 (23,5%) da área rural e 254 (76,5%) da área urbana. As amostras da área rural foram coletadas no período de 2002 a 2004, em quatro cortes seccionais sendo que algumas dessas amostras foram recuperadas do mesmo indivíduo, porém em

diferentes momentos. No ano de 2002 (corte 1) foram coletadas 15 amostras, em 2003 foram feitos dois estudos transversais, um no mês de maio (corte 2), no qual foram coletadas 23 amostras e outro no mês de dezembro (corte 3), no qual foram coletadas 29 amostras e 2004 (corte 4) com 11 amostras. Na área urbana foram feitos estudos transversais no período de 2006-2016. Em 2006 foram coletadas 65 (25,6%) amostras, 7 anos depois, em 2013 foram coletadas 10 (3,9%) amostras, em 2014, 39 (15,3%) amostras, em 2015, 68 (26,7%) amostras e em 2016, 72 (28,4%) amostras.

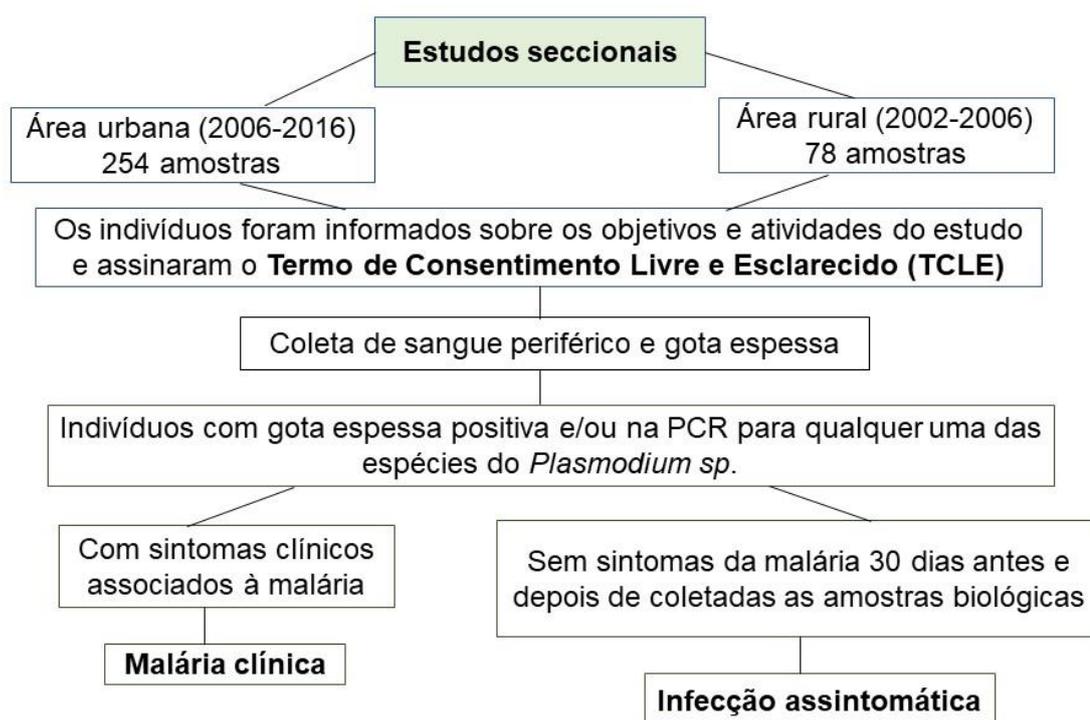


Figura 5.5: Fluxograma dos estudos seccionais.

### 5.2.2.1. Recrutamento dos indivíduos

Na área rural todos os indivíduos presentes durante os trabalhos de campo foram convidados a participar do estudo de tal forma que se trabalhou com o censo populacional por ser pequenas localidades. Na área urbana a estratégia adotada foi através de busca passiva dos casos de malária nas unidades de saúde e busca ativa com rastreamento domiciliar para a procura de indivíduos com infecção assintomática. Todos os indivíduos foram devidamente informados sobre os objetivos e atividades do estudo e foram convidados a participar após leitura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e responderam um questionário individual para obtenção dos dados demográficos e de informações pregressas de

malária. O recrutamento só foi realizado com os indivíduos que aceitaram participar e assinaram voluntariamente o TCLE.

Critérios de inclusão: Indivíduos com mais de dois anos de idade, moradores do município de Barcelos e que concordassem participar da pesquisa.

Critérios de exclusão: Indivíduo que não fornecesse material para os estudos sanguíneos ou o material fosse insuficiente. Indivíduos sem sintomas no momento da coleta da amostra que não foram acompanhados por 30 dias depois da coleta para poder confirmar ou descartar infecção plasmodial assintomática.

#### **5.2.2.2. Coleta das amostras**

De todos os indivíduos foi realizado o exame de gota espessa que foi corado e lido por microscopistas experientes do programa de controle de malária no município de Barcelos. Também foram coletados 5mL de sangue periférico em tubo a vácuo contendo Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) como anticoagulante e congeladas à -20°C. Esse material foi transportado ao Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo Cruz e ficou guardado em freezers de biorrepositório do laboratório. O sangue coletado foi utilizado para extração de DNA, diagnóstico molecular de *Plasmodium* spp. (nested PCR - Reação em Cadeia da Polimerase) e para os demais experimentos relacionados neste trabalho.

#### **5.2.2.3. Definição de casos**

Após o exame de gota espessa e PCR diagnóstico, juntamente com as informações dos questionários, os indivíduos foram agrupados segundo a definição de casos:

**Malária clínica:** definida como todo indivíduo com gota espessa positiva e/ou na PCR para qualquer uma das espécies de *Plasmodium* sp. e com sintomas clínicos associados à doença. Uma vez coletadas, as informações e as amostras biológicas destes pacientes, os mesmos foram tratados segundo a espécie parasitária usando os esquemas preconizados pelo Ministério de Saúde do Brasil.

**Infecção assintomática:** definida como todos os indivíduos positivos para o *Plasmodium* sp. na gota espessa e/ou na PCR que não tenham apresentado sintomas da doença 30 dias antes e depois de coletadas as amostras biológicas e sem ter tomado medicamentos antimaláricos nem antibióticos no mesmo período. Essas são as definições usadas pelo Grupo Brasileiro de Consensos em estudos de infecção plasmodial assintomática. No entanto, nesta pesquisa, todos os indivíduos

positivos na gota espessa no momento do recrutamento, mesmo sem sintomas, foram tratados com os esquemas preconizados pelo Ministério da Saúde, pois por ser área endêmica não era ético não fazer o tratamento, pois esses indivíduos se converteriam em fonte de infecção para os vetores. A equipe de pesquisa permaneceu em campo até 30 dias depois de ter coletado a amostra para conferir a inexistência de sintomas nesse período, pois os pacientes poderiam estar em período de incubação. O fluxograma dos estudos seccionais pode ser visto na Figura 5.5.

### 5.2.3. Estudos laboratoriais

O DNA do parasito foi extraído a partir de sangue coletado dos indivíduos e utilizado para a PCR diagnóstica e a amplificação dos marcadores de microssatélites. Foram selecionados indivíduos com infecção pelo *P. vivax*. O fluxograma dos estudos laboratoriais pode ser visto na figura 5.6.

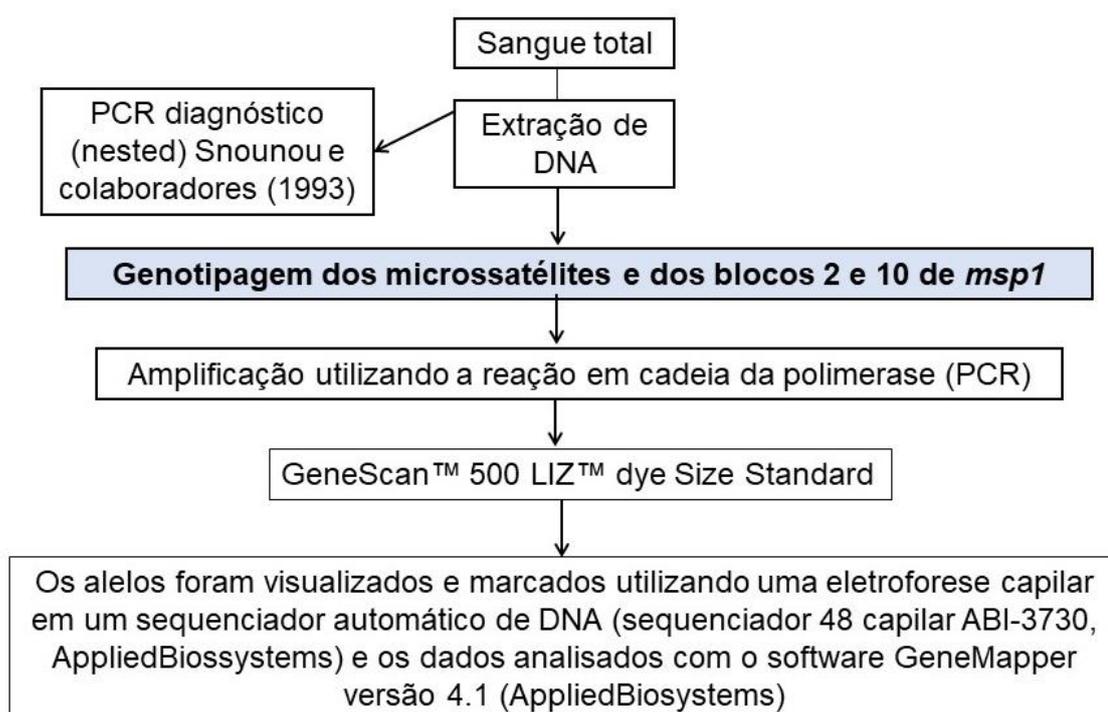


Figura 5.6: Fluxograma dos estudos laboratoriais.

#### 5.2.3.1. Extração de DNA genômico

Realizada a partir de 300µl do sangue total através da utilização do kit comercial Wizard® Genomic purification (Promega). Foi utilizado o protocolo do fabricante: foram adicionados 900µl de solução de lise de células a um microtubo de

1,5 ml estéril e transferidos 300µl de sangue para este tubo. O tubo foi invertido de 5 a 6 vezes para misturar e incubado durante 10 minutos à temperatura ambiente para lisar os glóbulos vermelhos. Após a incubação o tubo foi centrifugado a 13,000-16,000 x g durante 20 segundos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado sem ressuspender o sedimento (*pellet*). O tubo foi então agitado no vórtex vigorosamente até que as células brancas estivessem ressuspensas. Foi adicionada a solução de lise nuclear (300 µl) ao tubo. A solução foi pipetada de 5 a 6 vezes para lisar os glóbulos brancos até ficar viscosa. Foi adicionada a solução de precipitação de proteínas (100 µl) ao lisado nuclear e o tubo foi agitado no vórtex vigorosamente por 10 a 20 segundos e centrifugado à 13,000-16,000 x g durante 3 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 ml com 300µl de isopropanol à temperatura ambiente e centrifugado à 13,000-16,000 x g durante 1 minuto à temperatura ambiente. O DNA foi visível como um pequeno *pellet* branco. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados ao DNA (*pellet*) 300 µl de etanol 70% à temperatura ambiente. O tubo foi invertido suavemente várias vezes para lavar o *pellet* de DNA e as paredes do tubo. O DNA foi centrifugado à 13,000-16,000 x g durante 1 minuto à temperatura ambiente. O etanol foi cuidadosamente aspirado usando uma pipeta Pasteur. O tubo foi invertido em papel absorvente e o DNA seco durante 10 a 15 minutos. Após a secagem foi adicionada a solução reidratante (100µl) ao tubo e o DNA incubado à 65°C durante 1 hora. O DNA foi armazenado à 2-8°C para posterior uso nas reações de PCR.

### 5.2.3.2. PCR diagnóstico para malária

A PCR diagnóstica trata-se de uma reação de PCR aninhada (*nested*). O procedimento baseou-se no protocolo de Snounou et al. (1993) com algumas modificações (Suárez-Mutis et al. 2007). Realizou-se uma primeira amplificação com PCR para a identificação de um fragmento gênero-específico seguido de uma segunda amplificação de um fragmento espécie-específico (*nested-PCR*). Não foi realizada eletroforese entre a primeira e segunda PCR para evitar a contaminação.

Para a primeira PCR para identificação de gênero foram utilizados os seguintes iniciadores:

rPLU5 5'-CTT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3' (T<sub>m</sub>= 43);

rPLU6 5'-TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG-3' (T<sub>m</sub>= 41).

Foram usados os seguintes reagentes com as respectivas concentrações finais:

Tampão da Taq polimerase 1X, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTPs, 5 pmol do iniciador 1 (PLU5), 5 pmol do iniciador 2 (PLU 6), Taq-Polimerase (invitrogen) 5U/ $\mu$ l, DNA (amostra), 10-50ng num volume final de 25 $\mu$ l. Foram inseridos o controle positivo (amostra já conhecida de *P. vivax*) e negativo (H<sub>2</sub>O) em cada reação. Realizou-se a amplificação segundo o seguinte perfil térmico:

<u>TEMPERATURA °C</u>	<u>TEMPO</u>	<u>CICLOS</u>
95	5min	1
94	1min	
58	2 min	25
72	2min	
72	5min	1
4	$\infty$	

O produto da primeira reação de PCR foi utilizado como molde para realizar a PCR espécie - específica. Os iniciadores para a segunda reação foram:

*P. vivax*,

rVIV1 5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3' (T<sub>m</sub>=54),

rVIV2 5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3' (T<sub>m</sub>=55);

Os reagentes com as respectivas concentrações finais foram: Tampão da Taq polimerase 1X, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,12 $\mu$ M dNTP mix, 5pmol de cada iniciador, 0,5U Taq Polimerase (invitrogen) 5U/ $\mu$ l, 1 $\mu$ l do produto da primeira PCR em um volume final de 25 $\mu$ l.

Realizou-se a amplificação segundo o seguinte perfil térmico:

<b>TEMPERATURA °C</b>	<b>TEMPO</b>	<b>CICLOS</b>
95	5min	1
94	1min	
65	2 min	30
72	2min	
72	5min	1
4	∞	1

O resultado da amplificação foi visualizado em gel de agarose 2% corado pelo brometo de etídio (0,5 mg/ml). O tamanho da banda esperada para *P. vivax* foi de 120pb.

### **5.2.3.3. Genotipagem das amostras**

Para realização destes experimentos, a aluna foi treinada no Laboratório de Malária do Instituto René Rachou na Fiocruz Minas sob a orientação da Dra. Cristiana Brito dentro do Programa de Mobilidade Acadêmica da Fiocruz. Após o treinamento, todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro.

Para a genotipagem dos marcadores, foi feita a extração do DNA genômico a partir do sangue total. Os marcadores utilizados para genotipagem são específicos para o genoma de *Plasmodium vivax*. Foram amplificados seis microssatélites (MS1, MS2, MS5, MS6, MS7 e MS8) identificados no Laboratório de Malária do Instituto René Rachou (Rezende et al 2010) e os blocos 2 e 10 de *msp1* utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) de acordo com uma metodologia previamente descrita (Rezende et al 2010, Araújo et al 2012). O gene da Proteína de Superfície do Merozoíta 1 (*msp1*) possui sete blocos conservados e seis blocos polimórficos, dos quais os blocos 2 e 10 são os mais utilizados como marcadores genéticos em estudos de genética de populações de *P. vivax* (Putaporntip et al 2002, Brito & Ferreira 2011). Os microssatélites utilizados no presente estudo são todos perfeitos,

sendo MS1 e MS2 com unidades de repetição de dinucleotídeos (GT e CA respectivamente); MS5, MS6 E MS7 com repetições de trinucleotídeos (CAT, TGA e TAA respectivamente) e MS8 com repetições de tetranucleotídeos (TGTA).

Sutton 2013 avaliou estatisticamente a qualidade de 42 marcadores microssatélites utilizados em estudos de diversidade de *P. vivax* e determinou um painel com 18 marcadores de alta qualidade, entre os quais estavam os microssatélites utilizados no presente estudo. Sendo esses marcadores ideais para estudos de diversidade populacional, por descreverem de forma confiável a estrutura geral de uma população em função da endemicidade, ao mesmo tempo em que acomodam uma ampla gama de variações polimórficas.

Os marcadores utilizados neste trabalho também foram utilizados em estudos anteriores na Amazônia brasileira (Rezende et al 2010, Araújo et al 2012, Lizcano et al 2014). No trabalho de Araújo et al 2012, foi encontrado que os marcadores MS1, MS7 e bloco 2 de *msp1* foram capazes de detectar 97% das infecções múltiplas. Portanto, os marcadores se mostraram ideais para estudar a estrutura e diversidade populacional de *P. vivax*.

A PCR foi realizada em Termociclador da Applied Biosystems. As temperaturas de anelamento dos iniciadores e a concentração de cloreto de magnésio variaram de 53,4 °C a 60 °C e de 0,75 mM a 3,00 mM, respectivamente (Quadro 5.1). O protocolo utilizado pode ser visto em detalhes no Apêndice 1. O resultado da amplificação foi visualizado em gel de agarose 2% corado pelo brometo de etídio (0,5 mg/ml).

Os iniciadores senso contém fluoresceína (6-FAM) na extremidade 5' para realização da genotipagem no sequenciador automático. Os produtos de PCR amplificados foram adicionados aos poços de uma placa de 96 poços do modelo MicroAmp™ Fast Optica (Thermo Fisher). A cada poço, foram adicionados 8,8 µL de formamida, 0,2 µL de padrão de peso molecular GeneScan™ 500 LIZ Size Standard (Thermo Fisher) e 1 µL de produto de PCR para um volume final de 1 0µL.

Os alelos foram visualizados e seus tamanhos identificados utilizando uma eletroforese capilar em um sequenciador automático de DNA (sequenciador 48 capilar ABI-3730, Applied Biosystems (Plataforma de Análise de Fragmentos de Eletroforese de Capilar PDTIS/Fiocruz, RJ) conforme especificado pelo protocolo do fabricante. Os resultados da eletroforese capilar foram analisados utilizando o software GeneMapper versão 4.1 (Applied Biosystems) para determinar os tamanhos dos fragmentos amplificados em termos de número de pares de bases e a

altura dos picos. A altura mínima do pico foi ajustada para 150 unidades de fluorescência arbitrária (rFU). O pico mais elevado no electroferograma foi definido como o alelo predominante; alelos adicionais para o mesmo locus foram considerados quando as alturas dos picos correspondentes tinham pelo menos um terço da altura do alelo predominante na mesma amostra (Anderson et al. 1999). Pelo fato de os marcadores utilizados serem todos loci de cópia única e os parasitos da malária serem haploides na fase sanguínea do ciclo, o achado de um alelo adicional em pelo menos um locus no mesmo isolado foi interpretado como uma coinfeção com dois clones geneticamente distintos (infecção por múltiplos clones) (Figura 5.7). Para as análises populacionais, somente o pico predominante foi utilizado para medir a frequência de alelos e para a montagem dos haplótipos, o segundo pico foi somente utilizado para o cálculo da taxa de infecção múltipla. Para a montagem dos haplótipos foram consideradas somente as amostras completamente genotipadas.

Quadro 5.1: Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação dos marcadores. Os iniciadores senso foram marcados com o fluoróforo 6-FAM, com exceção dos externos de *msp1* (bloco 2 e 10).

Microssatélite	Senso (5' → 3')	Anti-senso (5' → 3')	TM (°C)	[Mg <sup>2+</sup> ]
PvMS1	CTATCTGAGGAATGGGGA	ATTTACTATGACGAAGGTGA	53,4°C	1,50mM
PvMS2	CATCATTGGGTAAGTCGGG	GCAGCCACAAAATCAACACC	60,0°C	1,50mM
PvMS5	TGCTATTTGCTCGGTCTGT	GAGCGTTATCATCATTAG	56,0°C	1,50mM
PvMS6	ACACATTTGACACAGTTCC	ATGCCCTGGTCCCTACAA	58,6°C	1,50mM
PvMS7	GTATCCCCGTCTTGTC	CTTTCTCCGTTCTTATTCT	56,0°C	1,50mM
PvMS8	TCCGTTGTTTTGTTGCC	CACTTGTTCCGTTCCGCTC	60,0°C	1,50mM
<i>msp1</i> bl2 (externos)	TATGATTTGTTGAGGGCGAAGC*	TGCTTTCCATCATCTGGATTTTGC	55,0°C	0,75mM
<i>msp1</i> bl2 (internos nested)	GACGATTTGGAAAATTGGA	CTCCTTCAGCACTTTACGCGCTT	63,0°C	3,00mM
<i>msp1</i> bl10 (externos)	GGAGAACATAAGCTACCTGTCC*	GTTGTTACTTGGTCTTCTCCC	63,0°C	0,75mM
<i>msp1</i> bl10 (internos nested)	CAAGCCTACCAAGAATTGATCCCCAA	ATTACTTTGTCGTAGTCTCGGCGTAGTCC	60,0°C	3,00mM

\*Sem o 6-FAM. Primers dos microssatélites de acordo com uma metodologia previamente descrita (Rezende et al. 2010, Araújo et al. 2012).

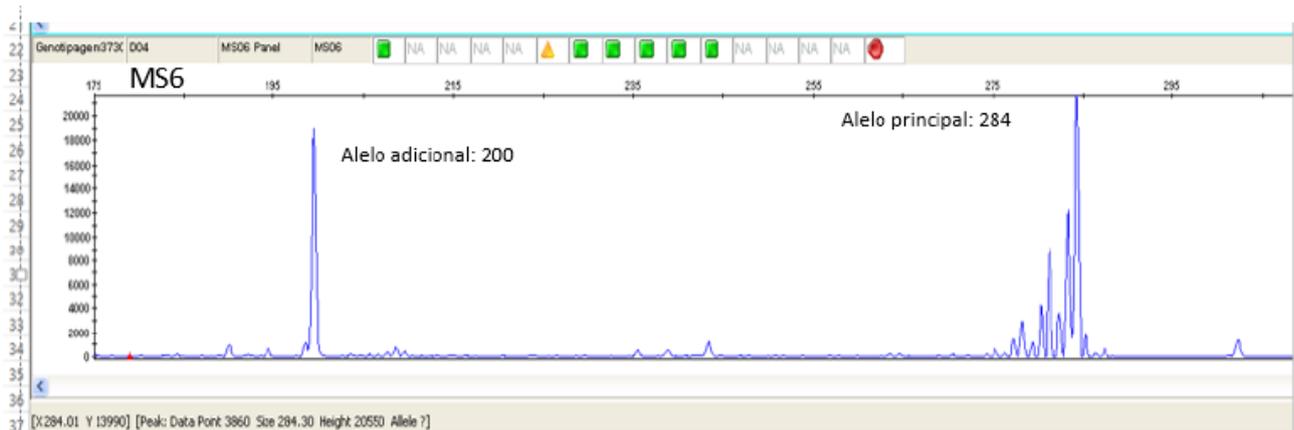


Figura 5.7: Exemplo de análise no programa GeneMapper de uma amplificação usando o MS6 mostrando um pico principal (284pb) e outro adicional (200pb).

### 5.3. Análise de dados

#### 5.3.1. Estudo retrospectivo

A informação coletada foi armazenada e analisada usando a plataforma Microsoft Excel® e a versão 7.0 do software Epi Info (Center for Diseases Control Atlanta -CDC Atlanta, 2014). Em todos os casos foi considerado como estatisticamente significativo um valor de  $p < 0,05$ .

#### 5.3.2. Diversidade de *P. vivax*

Na área urbana, os resultados da genotipagem foram analisados de forma geral (para as 254 amostras) e foi feita uma comparação da genética do parasito nos cinco anos amostrados - 2006, 2013, 2014, 2015 e 2016 – distância temporal, entre indivíduos com infecção assintomática e sintomáticos e entre os bairros (distância espacial).

Na área rural, foi feita uma análise geral (2002-2004), sem dividir pelos anos amostrados. Com os dados obtidos dessa área, foram feitas comparações da genética do parasito em infecções seriadas no mesmo indivíduo e entre indivíduos sintomáticos e com infecção assintomática.

O número e a frequência dos alelos em cada população foram calculados no software GenAlEx v6.5 na plataforma Microsoft Excel®. A diversidade genética de *P. vivax* foi calculada utilizando os haplótipos predominantes em cada locus por isolado. O *P. vivax* é um parasito haplóide na fase sanguínea portanto não é possível determinar a frequência de indivíduos heterozigotos, para tanto foi calculada a Heterozigosidade Esperada ( $H_E$ ), isto é, a chance de que um par de

alelos aleatoriamente obtidos numa mesma população sejam diferentes. A  $H_E$  pode ser interpretada como a chance de em um conjunto de amostras da população, retirando dois indivíduos e eles juntos formarem um genótipo heterozigoto para o locus em estudo. O cálculo da  $H_E$  é definido como:  $H_E = [n / (n - 1)] (1 - \sum p_i^2)$ , onde  $n$  é o número de isolados analisados e  $p_i$  representa a frequência de cada alelo diferente em um locus (Anderson et al. 1999). O intervalo de potencial é de  $H_E = 0$  (sem diversidade de alelos) para  $H_E = 1$  (todos os alelos amostrados são diferentes). Para calcular a distância genética entre as populações foi usado o Índice de Fixação  $F_{ST}$ , uma medida de diferenciação entre populações. Os valores do índice podem variar de 0 a 1, sendo que quando não há variação das frequências alélicas entre duas subpopulações, o  $F_{ST}$  será zero, se for acima de zero significa que existe diferença nas frequências alélicas (Wright 1965). Todos esses cálculos foram realizados no programa Arlequin ver 3.5.2.2.

Foram avaliados os diferentes loci distribuídos em diferentes cromossomos do parasito quanto ao desequilíbrio de ligação (associações não aleatórias de alelos de loci diferentes) utilizando o cálculo do Índice de Associação Padronizado ( $I^S_A$ ) em cada população, para tanto foi utilizado o software LIAN 3.7 (Haubold & Hudson 2000). Este teste compara a variância ( $V_D$ ) do número de alelos compartilhados entre todos os pares de haplótipos observados na população ( $D$ ) com a variação esperada na associação aleatória de alelos ( $V_E$ ) da seguinte forma:  $I^S_A = (V_D / V_E - 1) / (r - 1)$ , onde  $r$  é o número de loci analisados. O  $V_E$  é derivado de 10.000 conjuntos de dados simulados nos quais os alelos foram aleatoriamente reorganizados entre os haplótipos. Um desequilíbrio significativo de ligação foi detectado se o  $V_D$  foi maior que 95% dos valores derivados dos conjuntos de dados reorganizados. Para o cálculo de desequilíbrio de ligação foram consideradas somente as amostras completamente genotipadas.

Para identificar subpopulações geneticamente distintas e avaliar sua distribuição temporal, foi utilizado o software STRUCTURE 2.3.4 que emprega análises bayesianas de estrutura populacional para inferir o número mais provável de populações ( $K$ ) caracterizadas por um conjunto de frequências alélicas em cada locus (Pritchard et al 2000). O programa foi executado 10 vezes para cada valor de  $K$ , que variou de 1 a 8, a análise envolveu um período de *burn-in* de 10.000 interações seguidos por 100.000 interações, usando o modelo de frequências de alelos independentes. O modelo de mistura foi utilizado em todas as análises, o que permite a presença de indivíduos com ascendência em duas ou mais populações de

K. O melhor valor de K (que melhor explica os dados genéticos), foi definido de acordo com Evanno et al 2005, calculando a taxa de variação de K ( $\Delta K$ ) usando a ferramenta STRUCTURE HARVESTER versão 0.6.94 (Earl & vonHoldt 2012).

#### 5.4. Aspectos Éticos

Este projeto faz parte de um projeto maior: “Vigilância genômica da malária na Amazônia Brasileira”, (CAAE Nº 75000917.7.0000.5248) que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (Anexo 1) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (Anexo 2). Esse projeto inclui o processamento de amostras coletadas e armazenadas no biorrepositório do Laboratório de Doenças Parasitárias desde o ano de 2002.

### 6. RESULTADOS

#### 6.1. Estudo retrospectivo dos casos de malária no município de Barcelos no período de 2003-2018.

Durante o período de 2003 a 2018 foram notificados 67.603 casos de malária no município de Barcelos com uma média anual de  $4.225,2 \pm 2.134,6$  casos. Destes, 66.918 (99%) foram autóctones e 685 (1%) importados, sendo que a média anual de casos autóctones foi de  $4.182 \pm 2.120,5$  (mediana de 3.852) e a de casos importados foi de  $43 \pm 30,4$  (mediana de 43). A incidência parasitária anual (IPA) variou entre 70,9 e 293 casos por mil habitantes, com uma média anual de  $149 \pm 67,1$  (Figura 6.1).

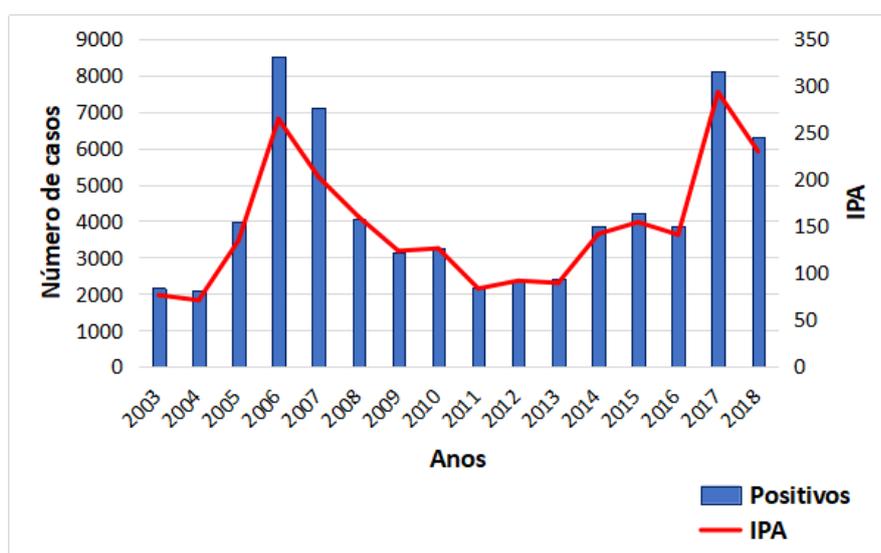


Figura 6.1: Série de casos e Incidência Parasitária Anual no município de Barcelos AM, 2003 a 2018. Fonte dos dados: SIVEP- malária 2020.

A curva endêmica (Figura 6.2) mostra os limites inferior, superior e a média de casos de malária esperados no município de Barcelos. A curva endêmica foi construída com os dados dos últimos 16 anos de casos notificados no município excluindo os valores dos anos epidêmicos (valores maiores que a média mais um desvio padrão). Observa-se que nos meses de março e entre agosto e outubro há um aumento esperado dos casos e no período de abril a julho o número de casos tende a diminuir.

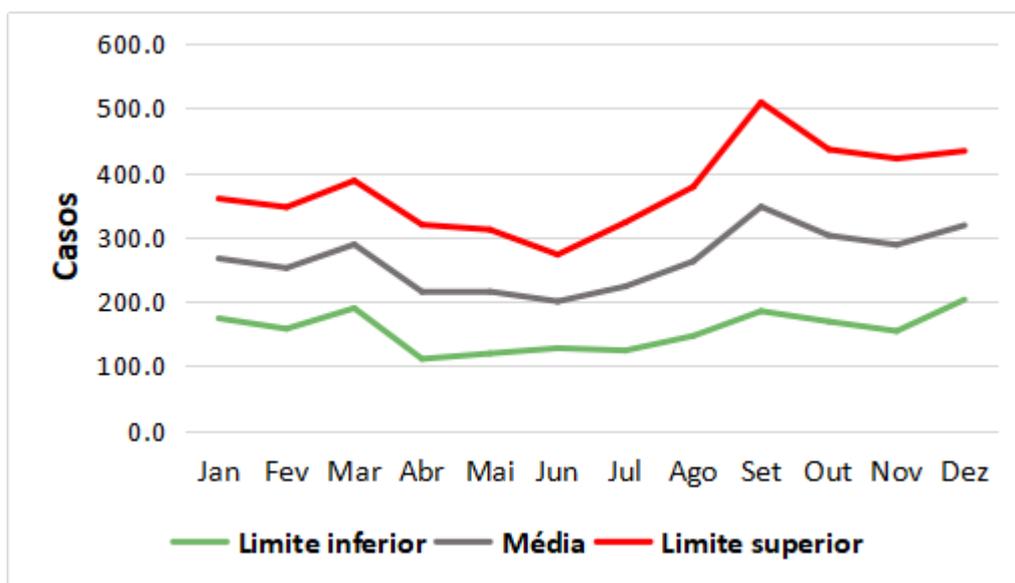


Figura 6.2: Curva endêmica de casos de malária no município de Barcelos AM, 2003 a 2018. Fonte dos dados: SIVEP- malária 2020.

A série temporal de casos de malária de 2003 a 2018 mostra que a partir do ano 2005 houve uma elevação no número de casos no município; neste ano foram registrados 3.982 casos; os anos de 2006 e 2007 foram considerados epidêmicos, tendo sido registrados 8.505 e 7.105 casos nos dois anos respectivamente e em 2008 as notificações começam a cair, tendo sido registrados 4.056 casos; os casos foram diminuindo no decorrer dos anos, chegando a 2.154 em 2011. Entretanto, em 2014 voltaram a crescer, tendo sido registrados 3.862 casos. No ano de 2015 houve duas epidemias nos meses de abril e agosto e em 2016 nos meses de outubro e novembro; foram registrados 4.207 e 3865 casos nestes dois anos respectivamente. A partir daí o número de casos continuaram a crescer no município e o ano de 2017 foi considerado epidêmico tendo sido registrados 8.129 casos, no ano de 2018 os casos diminuíram, mas ainda com meses epidêmicos (janeiro, fevereiro, abril, outubro, novembro e dezembro) com um total de casos de 6.292 (Figura 6.3).

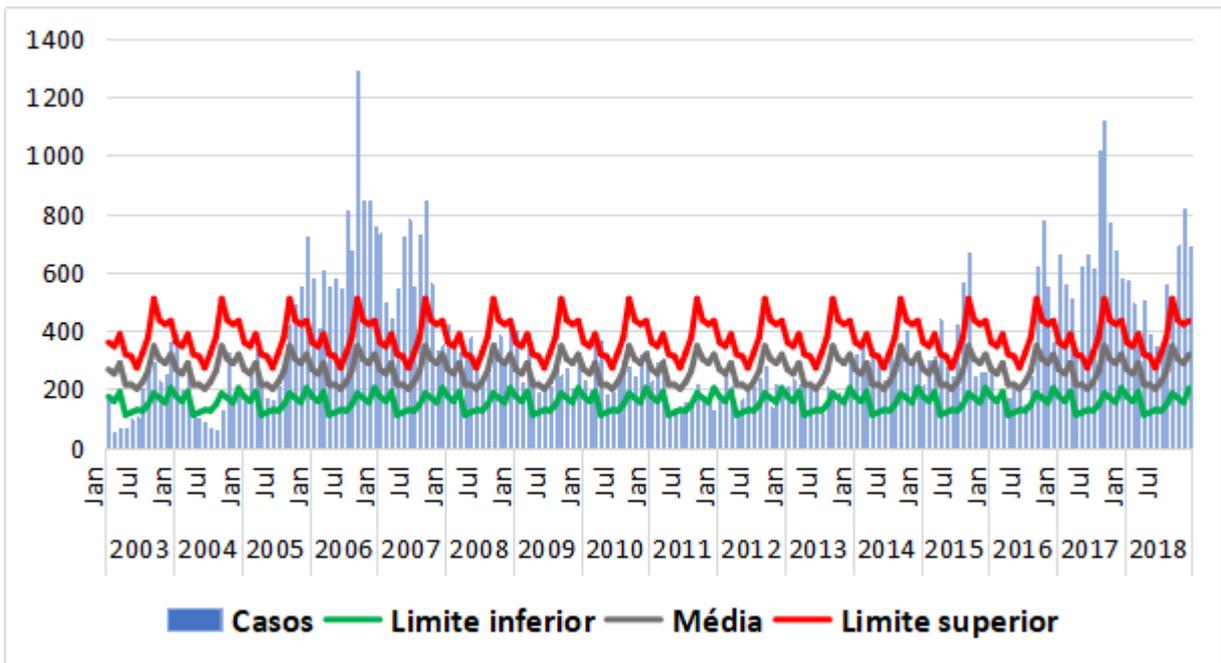


Figura 6.3. Série temporal de casos de malária no município de Barcelos AM, 2003 a 2018 e curva endêmica dos casos esperados no período. Fonte dos dados: SIVEP-malária 2020.

O diagrama de controle mostra que no ano 2005 houve a partir de março um aumento de casos chegando até à zona de alarme, com risco de epidemia que foi efetivamente deflagrada no mês de agosto desse ano (Figura 6.4).

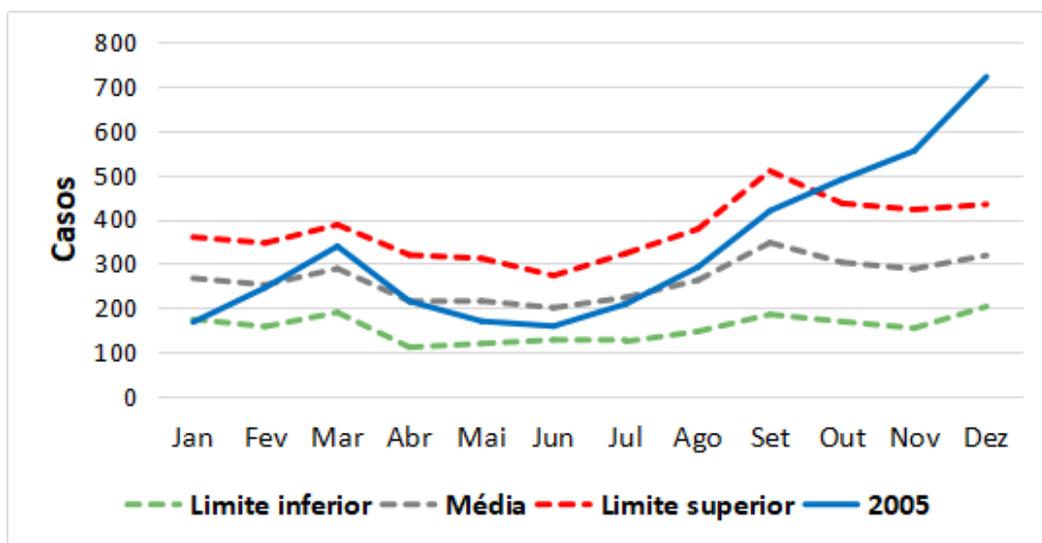


Figura 6.4: Diagrama de controle de casos de malária no município de Barcelos AM, 2005. Fonte dos dados: SIVEP- malária 2020.

Os anos 2006 (Figura 6.5) e 2007 (Figura 6.6) foram epidêmicos com uma grande elevação no número de casos em todos os meses. No ano 2006, o mês de

setembro foi o que atingiu o maior número de casos (1.290), quase três vezes maior que o esperado; no ano 2007, neste mesmo mês, foram registrados 849, quase duas vezes maior que o esperado para o período.

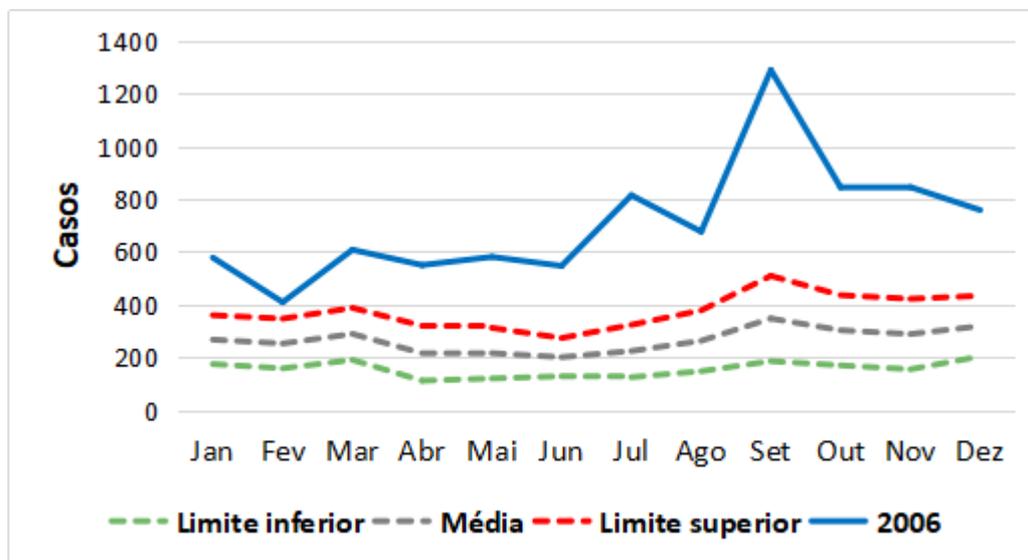


Figura 6.5: Diagrama de controle de casos de malária no município de Barcelos AM, 2006. Fonte dos dados: SIVEP- malária 2020.

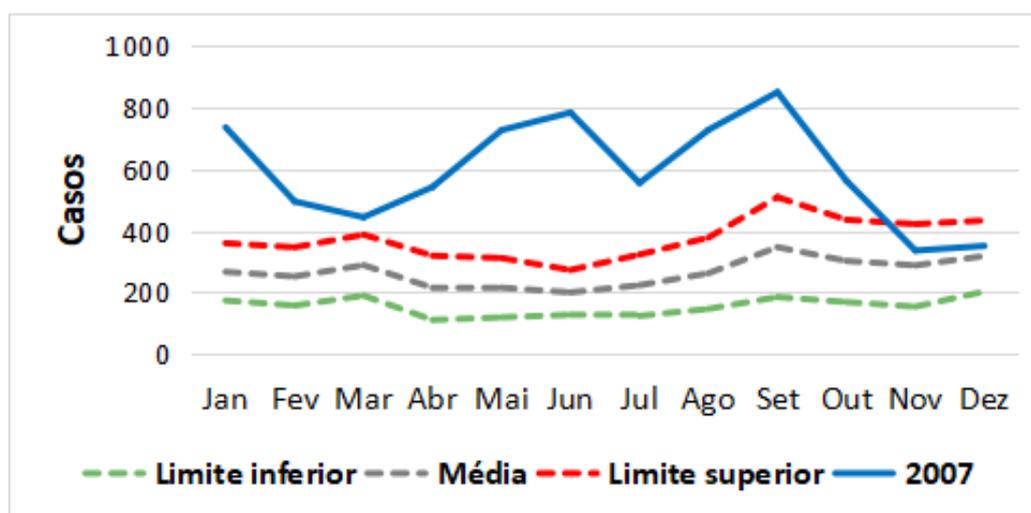


Figura 6.6: Diagrama de controle de casos de malária no município de Barcelos AM, 2007. Fonte dos dados: SIVEP- malária 2020.

A partir do mês de fevereiro do ano 2009, os casos voltaram ao nível de endemicidade esperado, mantendo esta tendência até 2014. Em 2015 ocorreram duas epidemias nos meses de abril e agosto (Figura 6.7); em 2016, o mês de outubro foi epidêmico (Figura 6.8). Desde então, houve um grande aumento no número de casos no município e os anos de 2017 (Figura 6.9) e 2018 (Figura 6.10) foram considerados epidêmicos com uma grande elevação no número de casos em

todos os meses. No ano de 2017, o mês de setembro foi o que atingiu o maior número de casos (1.121), quase três vezes maior que o esperado; no ano 2018, no mês de novembro, foram registrados 820, quase três vezes maior que o esperado para o período.

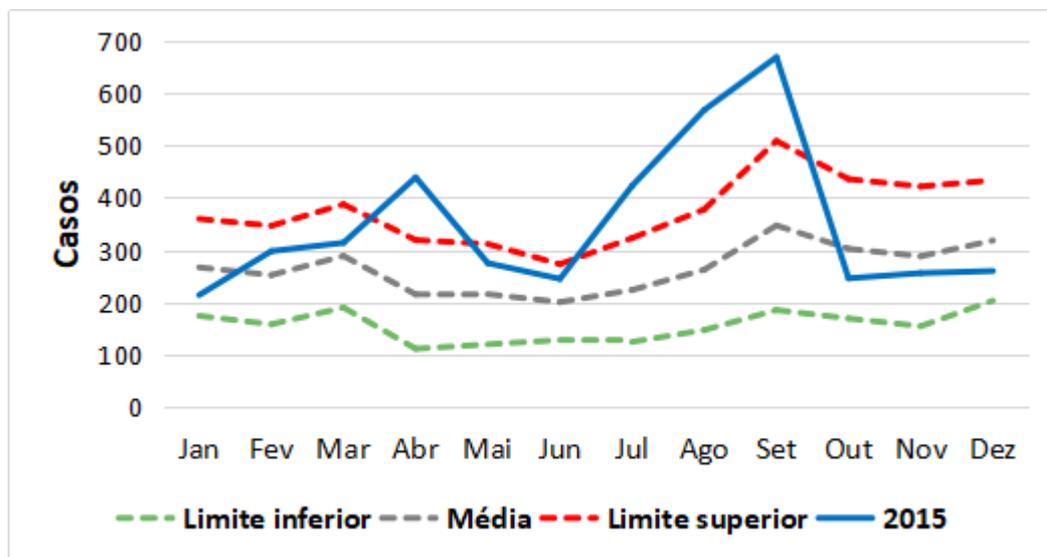


Figura 6.7: Diagrama de controle de casos de malária no município de Barcelos AM, 2015. Fonte dos dados: SIVEP- malária 2020.

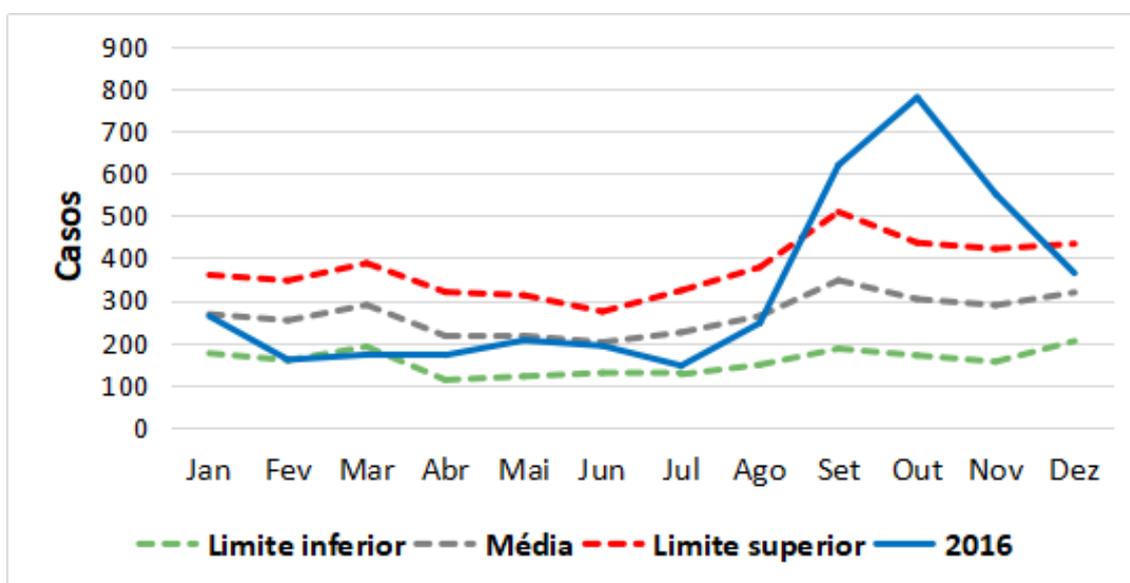


Figura: 6.8: Diagrama de controle de casos de malária no município de Barcelos AM, 2016. Fonte dos dados: SIVEP- malária 2020.

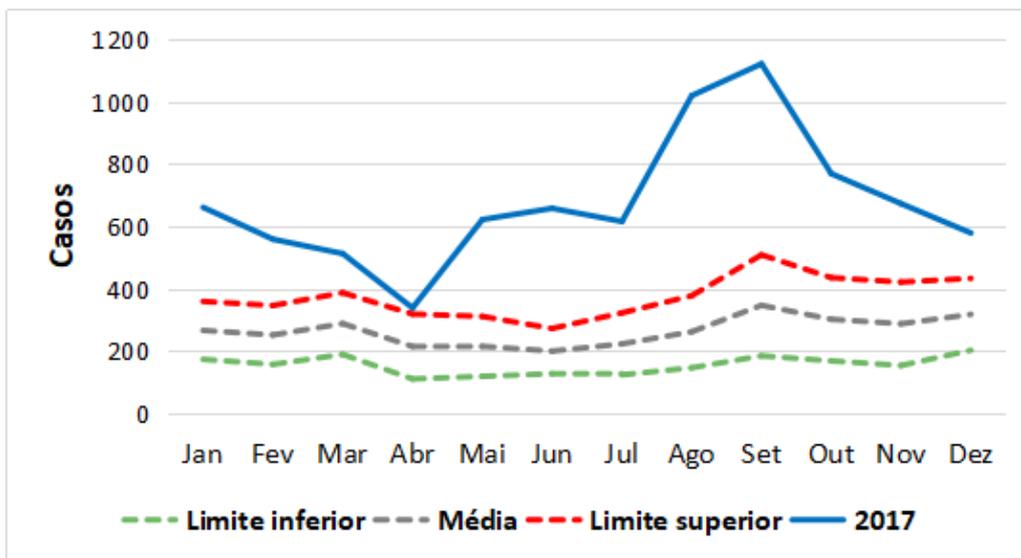


Figura: 6.9: Diagrama de controle de casos de malária no município de Barcelos AM, 2017. Fonte dos dados: SIVEP- malária 2020.

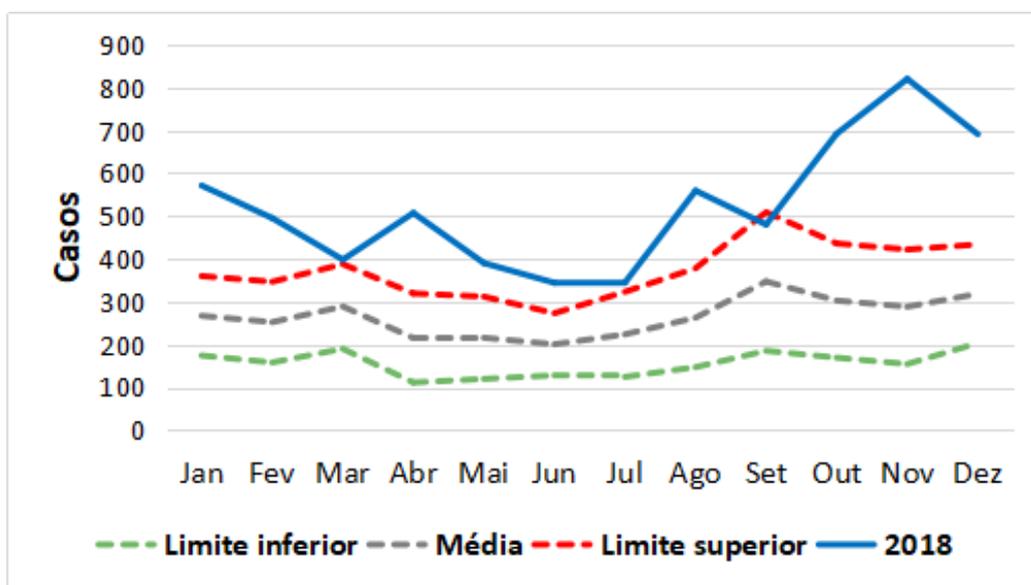


Figura: 6.10: Diagrama de controle de casos de malária no município de Barcelos AM, 2018. Fonte dos dados: SIVEP- malária 2020.

### 6.1.1. Espécie parasitária

Em relação à espécie de *Plasmodium* no período de 2003 a 2018 foram notificados 13.433 (19,9%) casos de *P. falciparum*, 52.618 (77,8%) de *P. vivax*, 1.019 (1,5%) de infecção mista (*P. falciparum* + *P. vivax*) e 44 (0,1%) de *P. malariae* (Tabela 6.1). Em todo o período, o *P. vivax* foi a espécie mais prevalente entre os casos. Nos anos epidêmicos (2006, 2007 e 2017), o *P. vivax* ultrapassou o valor de 5.000 casos em cada ano (Figura 6.11).

Tabela 6.1: Casos totais de acordo com a espécie de *Plasmodium* sp. no município de Barcelos AM, 2003 a 2018.

	<b>F</b>	<b>V</b>	<b>F+V</b>	<b>M</b>	<b>Total</b>	<b>%F</b>	<b>%V</b>	<b>%Mista</b>
<b>2003</b>	41	2117	0	0	2158	1,9	98,1	0
<b>2004</b>	142	1947	6	0	2095	6,8	92,9	0,3
<b>2005</b>	734	3209	39	0	3982	18,4	80,6	1
<b>2006</b>	2866	5358	281	0	8505	33,7	63	3,3
<b>2007</b>	1848	5060	197	0	7105	26	71,2	2,8
<b>2008</b>	983	3013	60	0	4056	24,2	74,3	1,5
<b>2009</b>	387	2739	14	0	3140	12,3	87,2	0,4
<b>2010</b>	942	2272	33	0	3247	29	70	1
<b>2011</b>	464	1672	18	0	2154	21,5	77,6	0,8
<b>2012</b>	281	2091	11	0	2383	11,8	87,7	0,5
<b>2013</b>	409	1970	43	1	2423	16,9	81,3	1,8
<b>2014</b>	515	3315	24	8	3862	13,3	85,8	0,6
<b>2015</b>	413	3749	25	18	4207	9,8	89,1	0,6
<b>2016</b>	276	3536	50	3	3865	7,1	91,5	1,3
<b>2017</b>	1710	6341	71	7	8129	21	78	0,9
<b>2018</b>	1422	4229	147	7	6292	22,6	67,2	2,3
<b>Total</b>	<b>13433</b>	<b>52618</b>	<b>1019</b>	<b>44</b>	<b>67603</b>	<b>19,9</b>	<b>77,8</b>	<b>1,5</b>

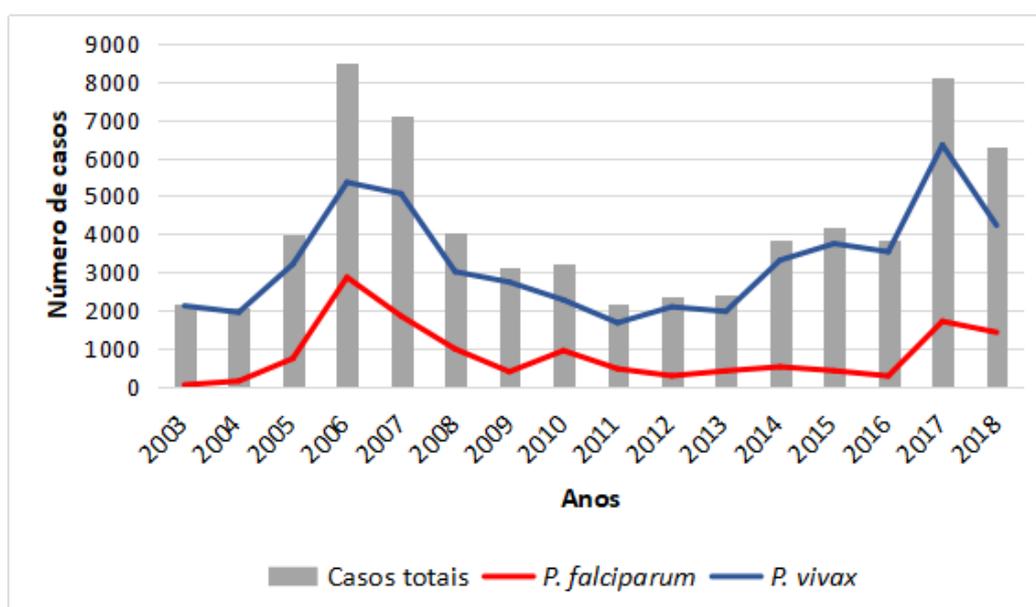


Figura 6.11: Casos totais de acordo com a espécie plasmodial no município de Barcelos AM, 2003 a 2018. Fonte: SIVEP- malária 2020.

### 6.1.2. Faixa etária

Em relação à faixa etária, no período de 2003 a 2018, houve muitos casos em crianças/adolescentes entre 1 a 14 anos (53,8% do total de casos no período). Houve também grande representação de adolescentes e jovens adultos com idades entre 15 a 29 anos (25,2%), a partir dos 30 anos, os casos tenderam a diminuir (Figura 6.12).

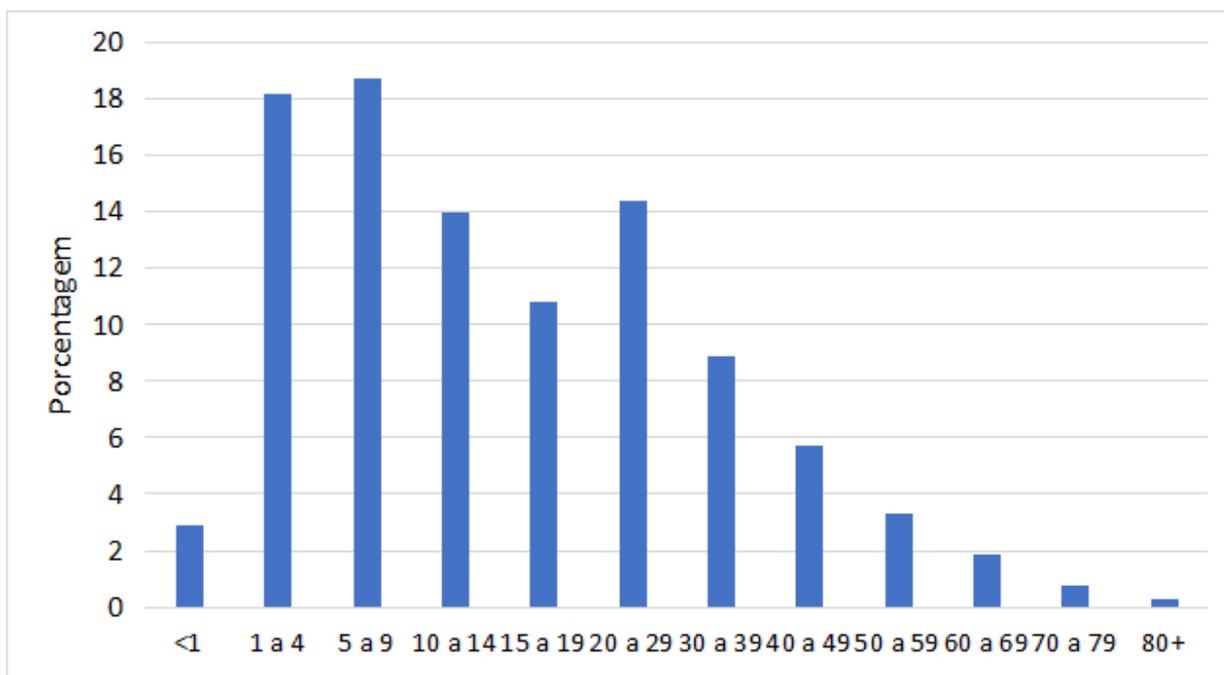


Figura 6.12: Distribuição dos casos de malária segundo a porcentagem por faixa etária no município de Barcelos AM, 2003 a 2018. Fonte: SIVEP- malária 2020

### 6.1.3. Casos por sexo

Em relação ao sexo, 56% das pessoas com malária no período eram do sexo masculino (máximo 58,8%, mínimo 54,2%) e 44% eram do sexo feminino (máximo 45,8, mínimo 41,2%). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no percentual de pessoas do sexo masculino/feminino com malária no período de estudo (Figura 6.13).

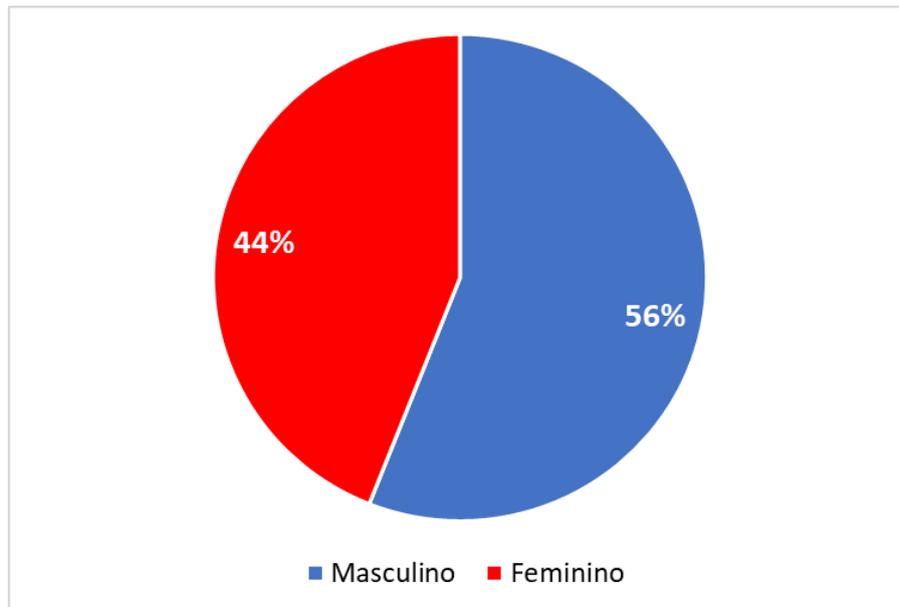


Figura 6.13: Proporção de casos de malária por sexo no município de Barcelos AM, 2003 a 2018. Fonte: SIVEP- malária 2020.

## 6.2. Estudo da diversidade genética de *Plasmodium vivax*.

### 6.2.1. Dados das amostras

Neste estudo foram utilizadas um total de 332 amostras, sendo 78 (23,5%) coletadas na área rural (rio Padauri) no período de 2002-2004 (Quadro 6.1) e 254 (76,5%) coletadas na área urbana no período de 2006-2016 (Quadro 6.2).

Quadro 6.1: Dados demográficos de 78 amostras positivas para *Plasmodium vivax* da área rural de 2002-2004.

<b>Sexo</b>	n	%
Feminino	25	32,1
Masculino	53	67,9
<b>Idade (anos)</b>		
Idade mínima	2	
Idade máxima	68	
Média de idade	22	
<b>Localidade</b>		
Acú-acú	10	12,8

Acuquaia	11	14,1
Ararão	14	18
Ararinha	24	30,8
Castanho	1	1,3
São Pedro	6	7,7
Tapera	12	15,4
<b>Desfecho clínico</b>		
Malária clínica	20	25,6
Infecção assintomática	58	74,4
<b>Malária prévia</b>		
Sim	75	96,1
Não	3	3,9
<b>Número de episódios prévios</b>		
1-5	38	50,7
6-10	33	44
Mais de 10	4	5,3

Quadro 6.2: Dados demográficos de 254 amostras positivas para *Plasmodium vivax* da área urbana de 2006-2016.

Ano de coleta	2006		2013		2014		2015		2016		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Número de amostras</b>	65	25,6	10	3,9	39	15,3	68	26,7	72	28,4	254	100
<b>Sexo</b>												
Feminino	37	56,9	6	60	12	30,8	32	47,1	32	44,4	119	46,8
Masculino	28	43,1	4	40	27	69,2	36	52,9	40	55,6	135	53,2
<b>Idade (anos)</b>												
Idade mínima	3	-	6	-	5	-	7	-	11	-	3	-
Idade máxima	77	-	43	-	83	-	87	-	79	-	87	-
Média de idade	21	-	18	-	32	-	31	-	30	-	28	-
<b>Localidade</b>												
Bairro Aparecida	0	0	2	20	14	35,9	4	5,9	18	25	38	15
Bairro da Paz	0	0	0	0	8	20,5	9	13,2	5	6,9	22	8,7
Bairro Marará	0	0	0	0	2	5,1	5	7,4	0	0	7	2,8
Bairro Mariuá	0	0	2	20	2	5,1	10	14,7	10	13,9	24	9,4

Bairro Nazaré	0	0	0	0	3	7,7	2	2,9	10	13,9	15	5,9
Bairro São Francisco	18	27,7	0	0	2	5,1	6	8,8	4	5,6	30	11,8
Bairro São Lázaro	0	0	1	10	2	5,1	5	7,3	4	5,6	12	4,7
Bairro São Pedro	0	0	0	0	1	2,6	3	4,4	2	2,8	6	2,4
Bairro São Sebastião	47	72,3	3	30	4	10,3	18	26,5	12	16,7	84	33,1
Centro Barcelos	0	0	2	20	1	2,6	6	8,8	6	8,3	15	5,9
Vila Militar	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,4	1	0,4
<b>Desfecho clínico</b>												
Malária clínica	34	52,3	10	100	39	100	68	100	72	100	223	87,8
Infecção assintomática	31	47,7	0	0	0	0	0	0	0	0	31	12,2
<b>Malária prévia</b>												
Sim	63	96,9	0	0	0	0	0	0	59	81,9	122	48
Não	2	3,1	0	0	0	0	0	0	13	18,1	15	5,9
Não informado	0	0	10	100	39	100	68	100	0	0	117	46,1
<b>Quantas malárias</b>												
1-5	36	57,1	-	-	-	-	-	-	41	69,5	77	63,1
6-10	15	23,8	-	-	-	-	-	-	13	22	28	23
Mais de 10	11	17,5	-	-	-	-	-	-	5	8,5	16	13,1
Não informado	1	1,6	-	-	-	-	-	-	0	0	1	0,8

### 6.2.2. Diversidade genética de *P. vivax* nas áreas urbana e rural

No total, foram genotipadas 332 amostras sendo 254 (76,5%) da área urbana e 78 (23,5%) da área rural. As amostras da área urbana, coletadas entre 2006 e 2016 foram utilizadas para o cálculo de diversidade genética, desequilíbrio de ligação, infecções múltiplas e distância genética entre os anos de coleta; para a identificação e cálculo de haplótipos foram consideradas apenas as amostras completamente genotipadas (190) com os 8 marcadores, MS1, MS2, MS5, MS6, MS7, MS8, *msp1bl2* e *msp1bl10* localizados em 6 cromossomos dos 14 existentes em *P. vivax* (Quadro 6.3).

As 78 amostras da área rural foram coletadas no período de 2002-2004 e estas foram utilizadas para o cálculo da diversidade genética, desequilíbrio de ligação e infecções múltiplas. Para a identificação e cálculo dos haplótipos foram consideradas apenas as amostras completamente genotipadas (35) com os 5

marcadores MS1, MS2, MS6, *msp1bl2* e *msp1bl10* localizados em 4 cromossomos do total de 14 de *P. vivax* (Quadro 6.3). Pelo fato de as amostras serem muito antigas, houve dificuldade para amplificar os demais marcadores utilizados na área urbana (MS5, MS7, MS8). Da mesma forma muitas amostras não funcionaram para alguns dos cinco marcadores utilizados nas análises da área rural e o número de amostras foi reduzido. Por esses motivos foi feita uma análise geral das amostras, sem dividir pelos anos de amostragem. Também foi feita a comparação entre haplótipos de amostras do mesmo paciente coletadas em épocas diferentes (amostras seriadas) e para esta análise também foram consideradas amostras parcialmente genotipadas.

O quadro 6.3 sintetiza os resultados dos marcadores estudados mostrando o tamanho dos fragmentos encontrados para cada microssatélite, número de alelos e a Heterozigidade Esperada ( $H_E$ ) segundo o local de coleta das amostras na área urbana ou rural do município.

Quadro 6.3. Marcadores utilizados no estudo: tamanho dos fragmentos, número de alelos e heterozigidade esperada nas áreas urbana e rural.

Marcador	Cromossomo*	Tamanho dos fragmentos		Número de alelos		$H_E$	
		Área rural	Área urbana	Área rural	Área urbana	Área rural	Área urbana
<b>MS1</b>	<b>12</b>	222-246	220-250	3	7	0,22	0,71
<b>MS2</b>	<b>3</b>	262-326	262-308	4	7	0,30	0,50
<b>MS5</b>	<b>3</b>	-	173-200	-	7	-	0,68
<b>MS6</b>	<b>14</b>	200-302	200-311	9	16	0,52	0,82
<b>MS7</b>	<b>2</b>	-	346-427	-	13	-	0,76
<b>MS8</b>	<b>13</b>	-	285-325	-	7	-	0,67
<b><i>msp1bl2</i></b>	<b>7</b>	397-429	397-429	5	5	0,59	0,43
<b><i>msp1bl10</i></b>	<b>7</b>	224-302	222-291	7	11	0,74	0,75

\*localização do cromossomo determinada em [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)  
( $H_E$ ): Heterozigidade Esperada.

### 6.2.3. Diversidade genética de *P. vivax* na área urbana

Na área urbana, no total de amostras (254), foi encontrada uma heterozigidade esperada ( $H_E$ ) que variou de 0,43 (*msp1bl2*) a 0,82 (MS6) com

uma  $H_E$  média de  $0,67 \pm 0,13$ . O número de alelos variou de 5 (*msp1* bloco2), sendo o marcador mais conservado a 16 (MS6), sendo o marcador mais diverso. As frequências de cada alelo podem ser vistas no quadro 6.4. Foi encontrado um significativo desequilíbrio de ligação ( $I^S_A = 0,0592$ ,  $p=0,002$ ) e 33,9% de infecções múltiplas. Os marcadores que com maior frequência apresentaram mais de um alelo no mesmo locus foram MS1 (12,7%), MS6 (11,4%) e *msp1bl10* (10,4%) (Figura 6.14). No total foram encontrados 122 haplótipos em 190 amostras.

Quadro 6.4. Frequência alélica encontrada em 8 marcadores em 254 amostras da área urbana.

Número de alelos	MS1	MS2	MS5	MS6	MS7	MS8	<i>msp1bl2</i>	<i>msp1bl10</i>
	Tamanho (%)*							
1	220 (0,01)	262 (0,08)	173 (0,07)	200 (0,04)	346 (0,01)	285 (0,01)	397 (0,03)	222 (0,01)
2	222 (0,10)	294 (0,04)	<b>176 (0,44)</b>	<b>209 (0,34)</b>	<b>349 (0,33)</b>	301 (0,18)	409 (0,04)	224 (0,08)
3	238 (0,13)	<b>296 (0,12)</b>	<b>179 (0,33)</b>	218 (0,02)	352 (0,05)	305 (0,03)	414 (0,03)	226 (0,22)
4	<b>240 (0,27)</b>	<b>298 (0,69)</b>	182 (0,13)	233 (0,01)	355 (0,14)	<b>309 (0,44)</b>	<b>425 (0,74)</b>	246 (0,01)
5	<b>244 (0,43)</b>	300 (0,02)	185 (0,01)	239 (0,01)	358 (0,01)	<b>313 (0,33)</b>	<b>429 (0,17)</b>	250 (0,01)
6	246 (0,04)	306 (0,01)	194 (0,01)	242 (0,01)	361 (0,01)	317 (0,01)		252 (0,03)
7	250 (0,02)	308 (0,04)	200 (0,01)	254 (0,01)	364 (0,01)	325 (0,01)		258 (0,02)
8				257 (0,06)	382 (0,01)			264 (0,01)
9				260 (0,06)	<b>385 (0,31)</b>			<b>266 (0,32)</b>
10				263 (0,01)	388 (0,11)			289 (0,01)
11				269 (0,01)	391 (0,02)			<b>291 (0,30)</b>
12				272 (0,01)	394 (0,01)			
13				281 (0,04)	427 (0,01)			
14				<b>284 (0,19)</b>				
15				302 (0,06)				
16				311 (0,14)				
<b>Número amostras</b>	252	248	221	238	238	220	234	250
<b><math>H_E</math></b>	0,71	0,50	0,68	0,82	0,76	0,67	0,43	0,75

\*em negrito os dois alelos mais frequentes em cada marcador.  
( $H_E$ ): Heterozigidade Esperada.

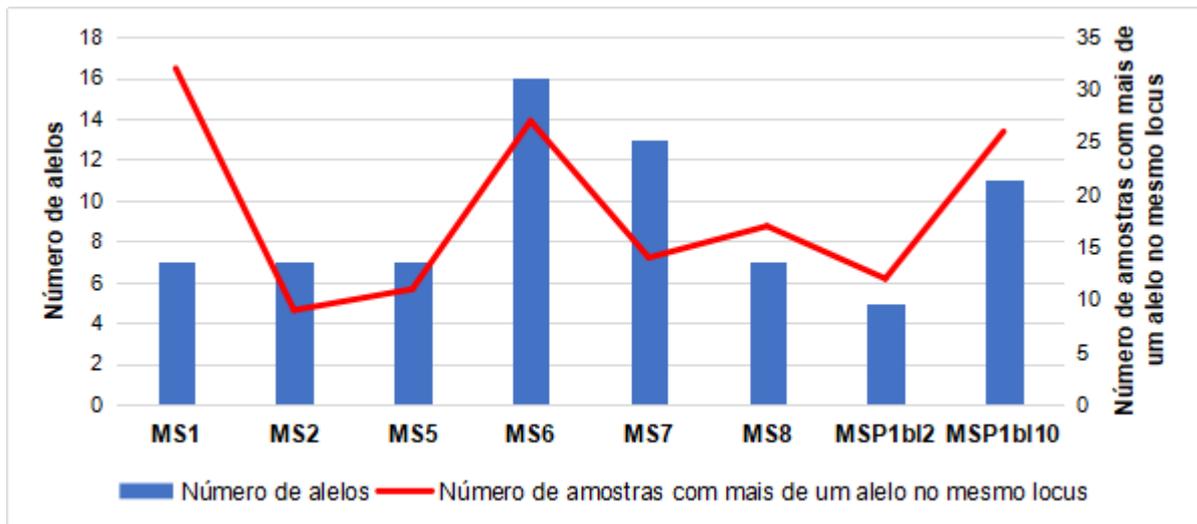


Figura 6.14: Área urbana: número de alelos encontrados para cada marcador em azul. Número de amostras com mais de um alelo no mesmo locus em vermelho.

### 6.2.3.1. Diversidade genética de *P. vivax* nos diferentes anos estudados (distância temporal) na área urbana.

Quando comparados os anos de amostragem, foi encontrada menor diversidade genética no ano de 2013 ( $H_E = 0,41 \pm 0,15$ ) e uma maior distância genética em relação ao ano de 2016 ( $F_{ST} = 0,5186$ ,  $p < 0,001$ ). Acredita-se que pelo fato de neste ano terem sido genotipadas apenas 10 amostras, se obteve um valor menor de diversidade e maior, mas não significativo desequilíbrio de ligação. O ano com maior diversidade genética foi o de 2006 ( $H_E = 0,73 \pm 0,08$ ) com um forte e significativo desequilíbrio de ligação ( $I^S_A = 0,0630$ ,  $p = 0,020$ ). Sem contar com o ano de 2013, todos os outros anos apresentaram desequilíbrio de ligação significativo e infecções por múltiplos clones que variou de 20,5% em 2014 a 53,9% em 2006 (Quadro 6.5).

Em relação à distância genética, todas foram significativas, com o menor valor encontrado entre os anos 2013 e 2015 ( $F_{ST} = 0,0980$ ,  $p < 0,001$ ) e entre 2013 e 2014 ( $F_{ST} = 0,1197$ ,  $p = 0,027$ ). O ano mais distante geneticamente dos demais, foi o de 2016, tendo apresentado uma distância que variou de  $F_{ST} = 0,3742$ ,  $p < 0,001$  (2006-2016) e  $F_{ST} = 0,5186$ ,  $p < 0,001$  (2013-2016) (Quadro 6.5).

Em relação ao número de haplótipos, no ano de 2006 foram encontrados 29 haplótipos em 32 amostras; em 2013 foram 7 haplótipos em 10 amostras; em 2014 foram 22 haplótipos em 33 amostras; em 2015 foram 43 haplótipos em 56 amostras e em 2016 foram 25 haplótipos em 59 amostras. No ano de 2006, o mesmo haplótipo foi compartilhado por no máximo 2 amostras, em 2013 um único haplótipo foi compartilhado por 4 amostras, em 2014 o mesmo haplótipo foi compartilhado por

no máximo 7 amostras, em 2015 por no máximo 4 amostras e em 2016 por no máximo 11 amostras. O quadro com os haplótipos pode ser conferido no Apêndice 2.

O fato de terem sido encontradas 4 amostras com o mesmo haplótipo no ano de 2013, no qual somente foram genotipadas 10 amostras foi consistente com uma menor diversidade e com o alto desequilíbrio de ligação. Nos anos de 2006 e 2015 houve um menor compartilhamento de haplótipos, consistente com o maior valor de diversidade genética; já 2014 e 2016 foram os anos em que houve um maior número de compartilhamento de haplótipos consistente com um menor valor de diversidade genética encontrado nestes anos. Em relação aos haplótipos compartilhados entre os anos, só foi encontrado um (1) haplótipo entre 2013-2014 e três (3) entre 2014-2015, o que também pode explicar o menor distanciamento genético entre esses anos. Todos os haplótipos de 2006 e 2016 foram únicos desses anos.

Quadro 6.5. Diversidade e distância genética de *P. vivax* em cinco anos amostrados na área urbana.

Ano	Nº amostras	Média $H_E$ ± DP	IM (%)	$I^S_A$	$F_{ST}$				
					2006	2013	2014	2015	2016
2006	65	0,73 ± 0,08	53,9	0.0630*	-				
2013	10	0,41 ± 0,15	30	0.3711	0,2222*	-			
2014	39	0,49 ± 0,26	20,5	0.1752*	0,2213*	0,1197*	-		
2015	68	0,60 ± 0,14	33,8	0.0887*	0,1621*	0,0980*	0,1494*	-	
2016	72	0,43 ± 0,27	23,6	0.0896*	0,3742*	0,5186*	0,4629*	0,4187*	-

\* $p < 0,05$ .  $H_E$ : Heterozigosidade esperada. IM: Infecção múltipla.  $I^S_A$ : desequilíbrio de ligação.  $F_{ST}$ : distância genética.

A frequência alélica de cada marcador na população geral pode ser conferida no Quadro 6.4 e em cada população no Quadro 6.6.

Para o marcador MS1, o alelo mais frequente entre as populações foi o 244, não tendo aparecido apenas em 2016 assim como o alelo 238 que também não foi observado em 2016; o alelo 250 foi exclusivo de 2006; os alelos 220 e 240 foram

exclusivos da população de 2016; o alelo 222 só apareceu nos anos de 2006, 2014 e 2015 e o alelo 246 estava presente nos anos de 2013, 2015 e 2016 (Figura 6.15).

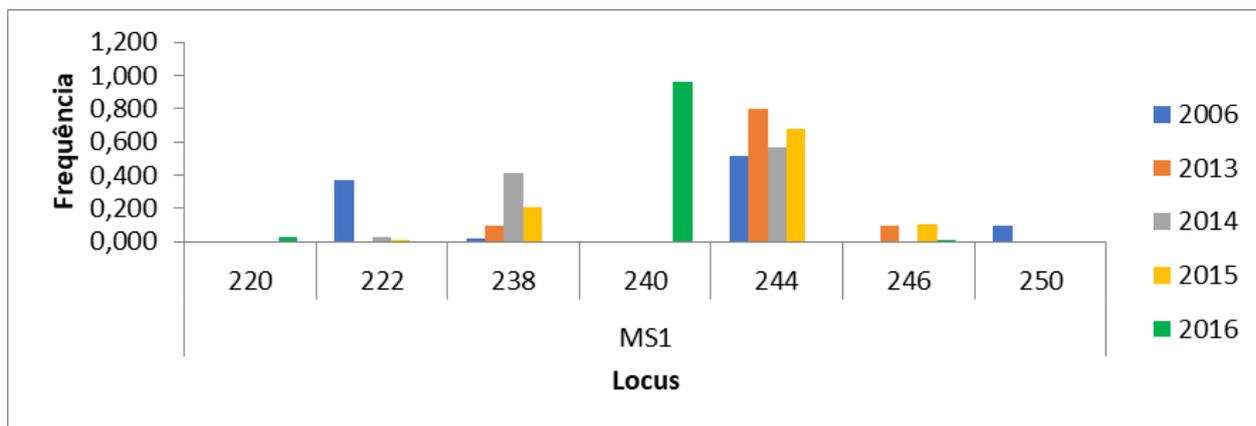


Figura 6.15: Alelos encontrados em MS1 em cinco anos amostrados na área urbana.

Para o marcador MS2, o alelo mais frequente foi o 298, tendo aparecido em todas as populações. Os alelos 262 e 306 foram exclusivos de 2006 e o 300 exclusivo de 2016. O alelo 294 só não foi observado em 2015 e o alelo 308 somente em 2006 e 2016 (Figura 6.16).

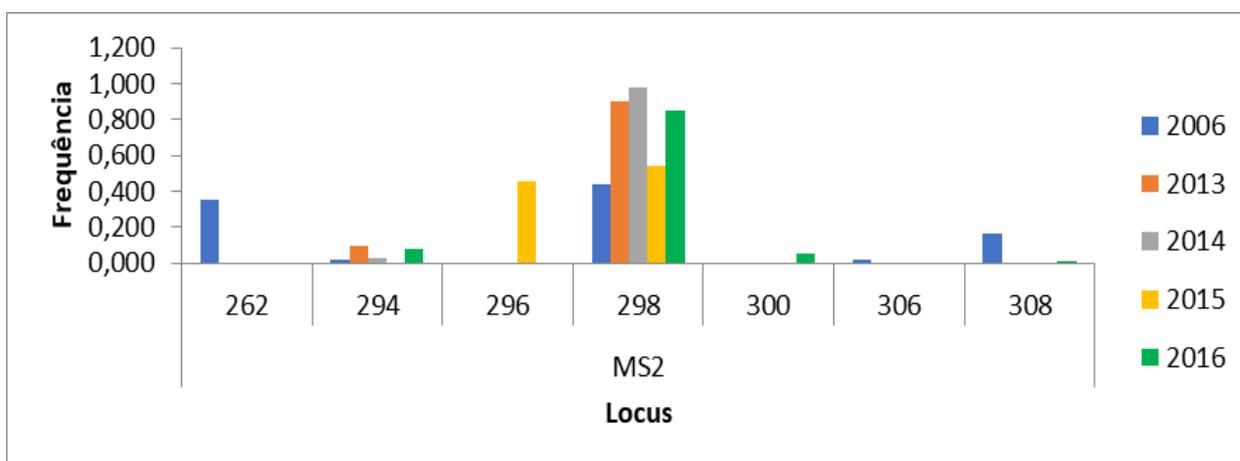


Figura 6.16: Alelos encontrados em MS2 em cinco anos amostrados na área urbana.

Para o marcador MS5, os alelos mais frequentes foram 176 e 179, que apareceram em todas as populações. Os alelos 173, 185 e 200 foram exclusivos de 2006. O alelo 182 somente foi observado nos anos de 2006 e 2015 e o alelo 194 nos anos de 2006 e 2016 (Figura 6.17).

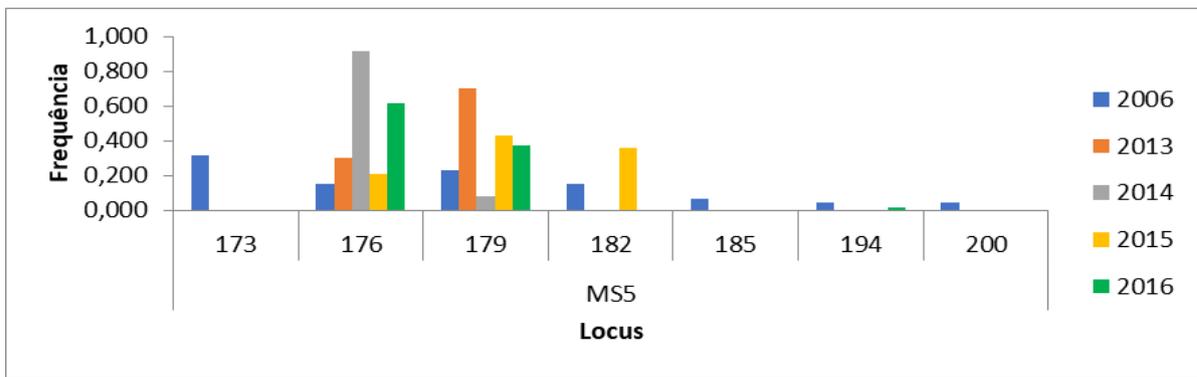


Figura 6.17: Alelos encontrados em MS5 em cinco anos amostrados na área urbana.

Para o marcador MS6, que foi aquele que apresentou maior número de alelos, o alelo 209 foi o mais frequente e apareceu em todas as populações; os alelos 200, 218, 233, 239, 242, 269, 272, 281 foram exclusivos do ano 2006; o alelo 263 foi exclusivo de 2014; e o alelo 254 exclusivo de 2015 (Figura 6.18).

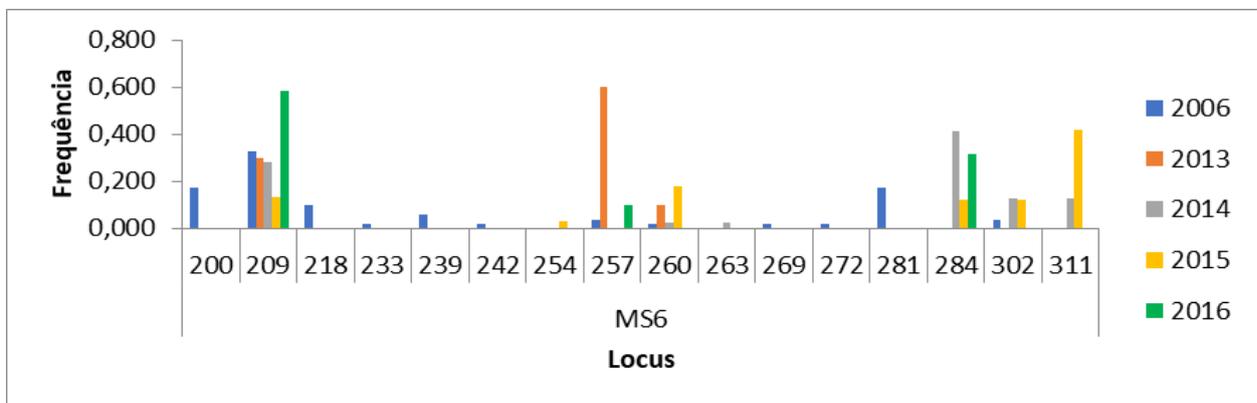


Figura 6.18: Alelos encontrados em MS6 em cinco anos amostrados na área urbana.

Para o marcador MS7, o alelo mais frequente foi o 349 estando presente em todas as populações, assim como o alelo 388, só que menos frequente; os alelos 346, 361, 364 e 427 foram exclusivos do ano de 2006; o alelo 358 foi exclusivo de 2013; os alelos 382 e 391 exclusivos de 2014; o alelo 394 exclusivo de 2015, e o alelo 355 só não apareceu em 2006 (Figura 6.19).

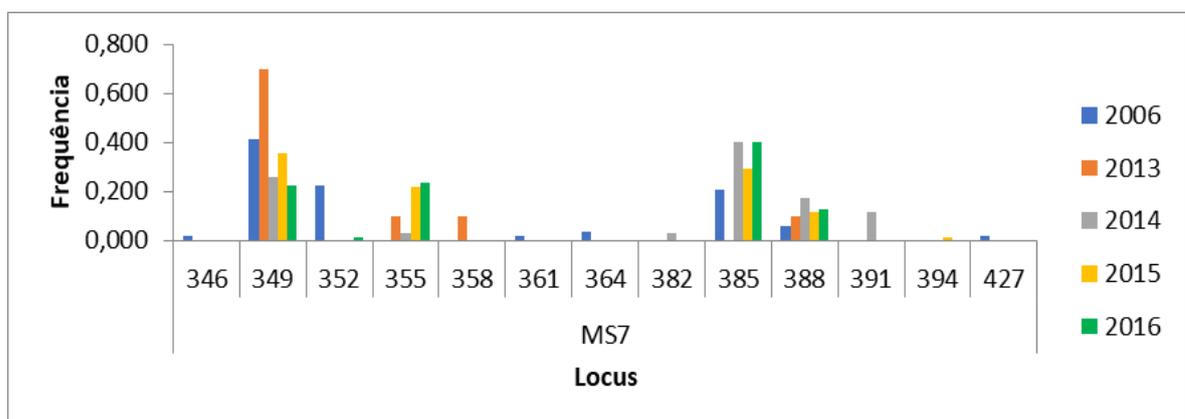


Figura 6.19: Alelos encontrados em MS7 em cinco anos amostrados na área urbana.

Para o marcador MS8, o alelo 309 foi o mais frequente e apareceu em todas as populações, assim como os alelos 301 e 313, só que em menor frequência; o alelo 325 foi exclusivo de 2006 e o 285 foi exclusivo de 2015 (Figura 6.20).

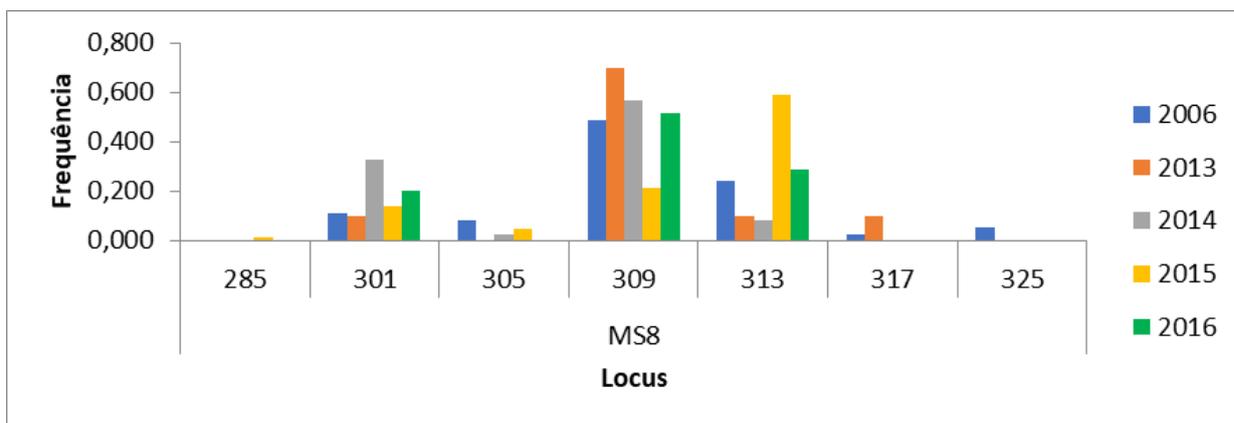


Figura 6.20: Alelos encontrados em MS8 em cinco anos amostrados na área urbana.

Para o marcador *msp1bl2*, o alelo mais frequente em todas as populações foi o 425, sendo observada uma frequência de 100% em 2016. Os alelos 409 e 414 foram exclusivos do ano 2006 (Figura 6.21).

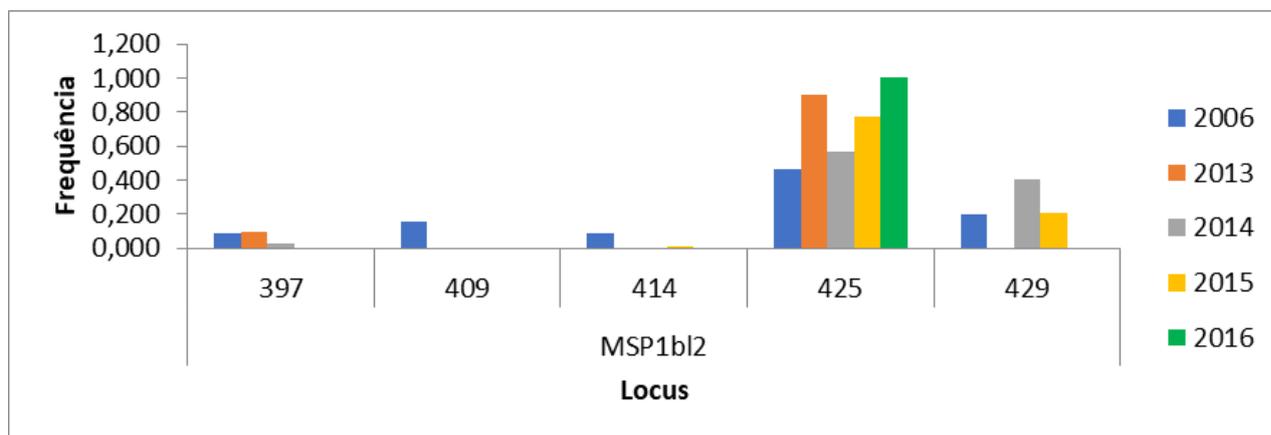


Figura 6.21: Alelos encontrados em *msp1bl2* em cinco anos amostrados na área urbana.

Para o marcador *msp1bl10*, outro marcador com muitos alelos encontrados, o alelo mais frequente foi o 266 sendo observado em todos os anos; o alelo 226 só não apareceu em 2013; os alelos 246 e 252 foram exclusivos de 2006; os alelos 250, 264 e 289 exclusivos de 2016 e alelo 291 só não apareceu em 2014 (Figura 6.22).

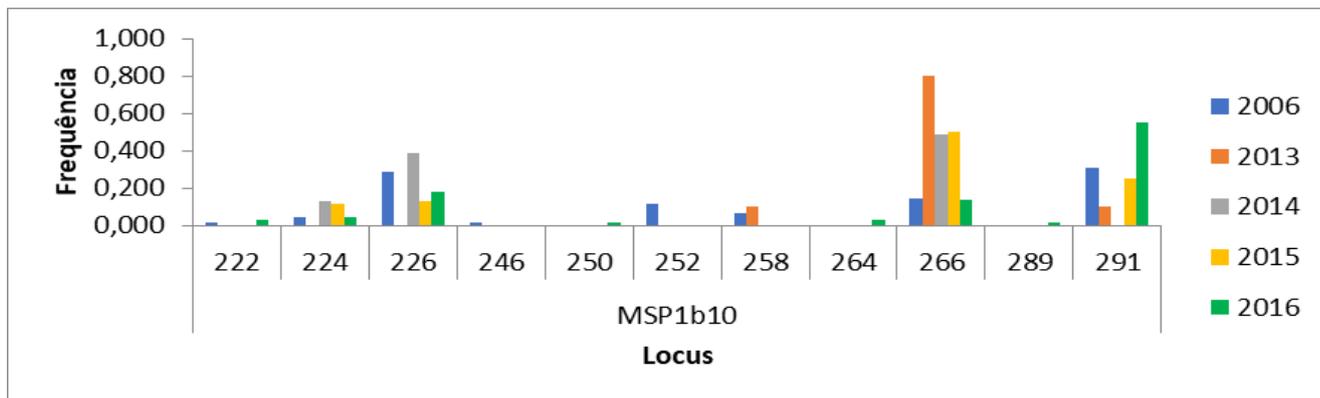


Figura 6.22: Alelos encontrados em *msp1b10* em cinco anos amostrados na área urbana.

Quadro 6.6. Frequência alélica dos marcadores por população na área urbana.

Locus	Alelo	2006	2013	2014	2015	2016
MS1	220	0,000	0,000	0,000	0,000	0,028
	222	<b>0,375</b>	0,000	0,026	0,015	0,000
	238	0,016	0,100	<b>0,410</b>	<b>0,206</b>	0,000
	240	0,000	0,000	0,000	0,000	<b>0,958</b>
	244	<b>0,516</b>	<b>0,800</b>	<b>0,564</b>	<b>0,676</b>	0,000
	246	0,000	0,100	0,000	0,103	0,014
	250	0,094	0,000	0,000	0,000	0,000
	Amostras		64	10	39	68
$H_E$		0,59	0,38	0,53	0,50	0,08
MS2	262	<b>0,356</b>	0,000	0,000	0,000	0,000
	294	0,017	0,100	0,026	0,000	0,083
	296	0,000	0,000	0,000	<b>0,456</b>	0,000
	298	<b>0,441</b>	<b>0,900</b>	<b>0,974</b>	<b>0,544</b>	<b>0,847</b>
	300	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056
	306	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000
	308	0,169	0,000	0,000	0,000	0,014
	Amostras		59	10	39	68
$H_E$		0,66	0,20	0,05	0,50	0,28
MS5	173	<b>0,319</b>	0,000	0,000	0,000	0,000
	176	0,149	<b>0,300</b>	<b>0,917</b>	<b>0,207</b>	<b>0,614</b>
	179	<b>0,234</b>	<b>0,700</b>	0,083	<b>0,431</b>	<b>0,371</b>
	182	0,149	0,000	0,000	<b>0,362</b>	0,000
	185	0,064	0,000	0,000	0,000	0,000
	194	0,043	0,000	0,000	0,000	0,014
	200	0,043	0,000	0,000	0,000	0,000
	Amostras		47	10	36	58
$H_E$		0,81	0,47	0,16	0,65	0,49
MS6	200	<b>0,173</b>	0,000	0,000	0,000	0,000
	Amostras		47	10	36	58

	<b>209</b>	<b>0,327</b>	<b>0,300</b>	<b>0,282</b>	0,134	<b>0,586</b>
	<b>218</b>	0,096	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>233</b>	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>239</b>	0,058	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>242</b>	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>254</b>	0,000	0,000	0,000	0,030	0,000
	<b>257</b>	0,038	<b>0,600</b>	0,000	0,000	0,100
	<b>260</b>	0,019	0,100	0,026	<b>0,179</b>	0,000
	<b>263</b>	0,000	0,000	0,026	0,000	0,000
	<b>269</b>	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>272</b>	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>281</b>	<b>0,173</b>	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>284</b>	0,000	0,000	<b>0,410</b>	0,119	<b>0,314</b>
	<b>302</b>	0,038	0,000	0,128	0,119	0,000
	<b>311</b>	0,000	0,000	0,128	<b>0,418</b>	0,000
Amostras		52	10	39	67	70
$H_E$		0,83	0,60	0,74	0,76	0,56
<b>Locus</b>	<b>Alelo</b>	<b>2006</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>
<b>MS7</b>	<b>346</b>	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>349</b>	<b>0,415</b>	<b>0,700</b>	<b>0,257</b>	<b>0,353</b>	<b>0,222</b>
	<b>352</b>	<b>0,226</b>	0,000	0,000	0,000	0,014
	<b>355</b>	0,000	0,100	0,029	<b>0,221</b>	<b>0,236</b>
	<b>358</b>	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000
	<b>361</b>	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>364</b>	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>382</b>	0,000	0,000	0,029	0,000	0,000
	<b>385</b>	<b>0,208</b>	0,000	<b>0,400</b>	<b>0,294</b>	<b>0,403</b>
	<b>388</b>	0,057	0,100	<b>0,171</b>	0,118	0,125
	<b>391</b>	0,000	0,000	0,114	0,000	0,000
	<b>394</b>	0,000	0,000	0,000	0,015	0,000
	<b>427</b>	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000
Amostras		53	10	35	68	72
$H_E$		0,74	0,53	0,75	0,74	0,73
<b>Locus</b>	<b>Alelo</b>	<b>2006</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>
<b>MS8</b>	<b>285</b>	0,000	0,000	0,000	0,015	0,000
	<b>301</b>	0,108	0,100	<b>0,324</b>	0,136	<b>0,200</b>
	<b>305</b>	0,081	0,000	0,027	0,045	0,000
	<b>309</b>	<b>0,486</b>	<b>0,700</b>	<b>0,568</b>	<b>0,212</b>	<b>0,514</b>
	<b>313</b>	<b>0,243</b>	0,100	0,081	<b>0,591</b>	<b>0,286</b>
	<b>317</b>	0,027	0,100	0,000	0,000	0,000
	<b>325</b>	0,054	0,000	0,000	0,000	0,000
Amostras		37	10	37	66	70
$H_E$		0,70	0,53	0,58	0,59	0,62
<b>Locus</b>	<b>Alelo</b>	<b>2006</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>
<b>msp1bl2</b>	<b>397</b>	0,089	0,100	0,027	0,000	0,000
	<b>409</b>	<b>0,161</b>	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>414</b>	0,089	0,000	0,000	0,015	0,000
	<b>425</b>	<b>0,464</b>	<b>0,900</b>	<b>0,568</b>	<b>0,776</b>	<b>1,000</b>

	<b>429</b>	<b>0,196</b>	0,000	<b>0,405</b>	<b>0,209</b>	0,000
Amostras		56	10	37	67	64
$H_E$		0,72	0,20	0,53	0,36	0,00
<b>Locus</b>	<b>Alelo</b>	<b>2006</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>
<i>msp1b10</i>	<b>222</b>	0,016	0,000	0,000	0,000	0,028
	<b>224</b>	0,048	0,000	0,128	0,118	0,042
	<b>226</b>	<b>0,290</b>	0,000	<b>0,385</b>	0,132	<b>0,183</b>
	<b>246</b>	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>250</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,014
	<b>252</b>	0,113	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>258</b>	0,065	0,100	0,000	0,000	0,000
	<b>264</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,028
	<b>266</b>	0,145	<b>0,800</b>	<b>0,487</b>	<b>0,500</b>	0,141
	<b>289</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,014
	<b>291</b>	<b>0,306</b>	0,100	0,000	<b>0,250</b>	<b>0,549</b>
Amostras		62	10	39	68	71
$H_E$		0,79	0,38	0,61	0,67	0,65

\*em negrito os alelos mais frequentes.

( $H_E$ ): Heterozigosidade Esperada.

### 6.2.3.2. Estrutura populacional e diferenciação genética entre os anos estudados na área urbana

A estrutura da população foi avaliada usando a análise bayesiana implementada no software STRUCTURE e foi definido o melhor valor de  $K=3$  pelo gráfico de Evanno et al 2005. Sendo assim, os isolados foram divididos em 3 subpopulações (A, B e C) e estas estiveram presentes em todos os anos amostrados, sendo que no ano de 2006 teve predomínio da população A (azul) com uma proporção de 58%, no ano de 2013 da subpopulação B (verde) com uma proporção de 74%, em 2014 os dados ficaram divididos entre as subpopulações A (azul) com uma proporção de 44% e C (vermelho) com uma proporção de 45%, no ano de 2015, assim como em 2013, prevaleceu a subpopulação B (verde), com uma proporção de 59% e no ano de 2016, as 3 subpopulações estiveram presentes em proporções similares, sendo A (azul) com 28%, B (verde) com 34% e C (vermelha) com 38%. Na figura 6.23, as três subpopulações estão representadas por cores em cada ano amostrado.

Na figura 6.24 cada barra representa um haplótipo e as cores azul, verde e vermelho mostram se um isolado foi atribuído à subpopulação A, B ou C respectivamente; nos casos em que mais uma cor esteve presente, o haplótipo consistiu em uma mistura de marcadores atribuídos às subpopulações representadas. A maioria dos parasitos teve sua origem claramente atribuída às três

subpopulações; alguns deles eram bastante misturados, mostrados por barras divididas em segmentos coloridos; cada fragmento na barra representa as frações estimadas de associação de cada isolado com as subpopulações. No ano de 2015 observou-se um forte agrupamento dos isolados 158-180, o que pode ser caracterizado como um surto com transmissão de clones de parasitos (Figura 6.24).

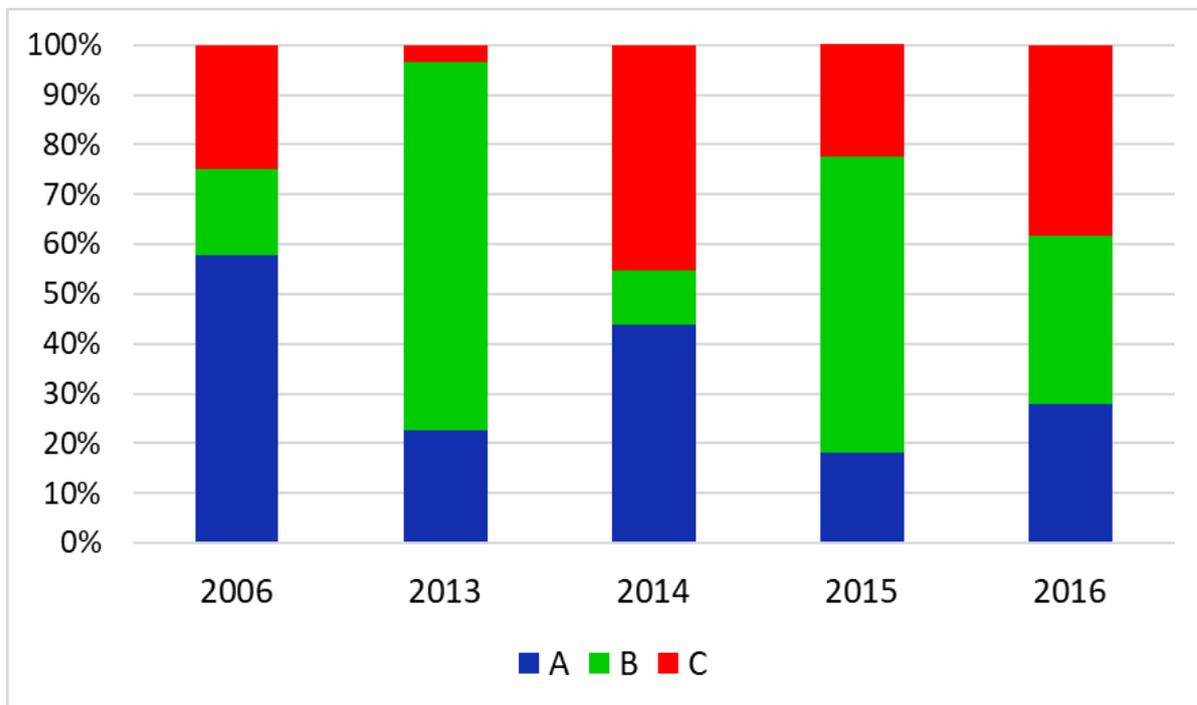
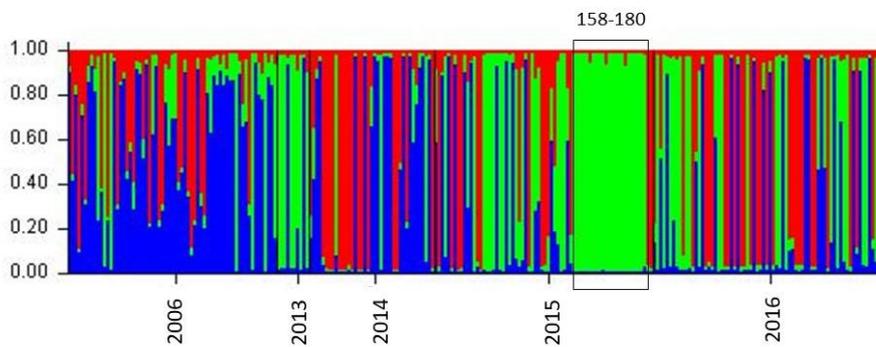


Figura 6.23: Distribuição das três subpopulações encontradas por ano de amostragem. Cada cor representa a contribuição de cada subpopulação em  $K=3$  usando o programa STRUCTURE nos cinco anos amostrados.

A



B

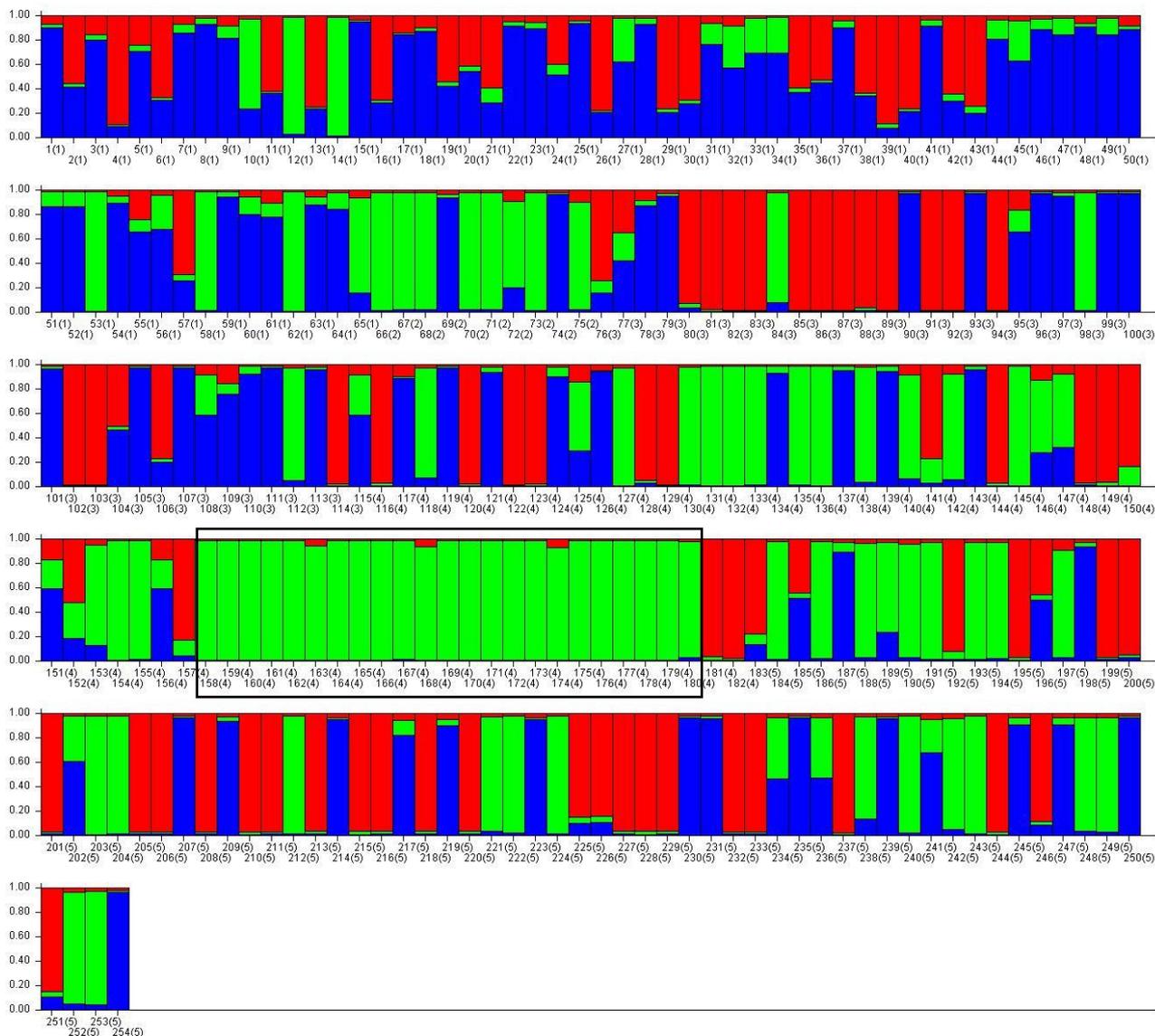


Figura 6.24: Análise de agrupamento genético. (A) Estrutura populacional de *Plasmodium vivax* plotada em uma única linha (subpopulação A, azul; subpopulação B, verde; subpopulação C, vermelha) inferida a partir da tipagem de microssatélites de 254 isolados da área urbana em K=3 usando o programa STRUCTURE nos cinco anos amostrados. (B) Estrutura populacional de *P. vivax* plotada em múltiplas linhas por ano amostrado mostrando as subpopulações em cada isolado. Cada parasito individual é representado por uma barra vertical dividida em K segmentos coloridos, com comprimentos proporcionais a cada uma das subpopulações inferidas. Os isolados 1-65 foram coletados em 2006; 66-75 em 2013; 76-114 em 2014; 115-182 em 2015; 183-254 em 2016. A caixa preta indica um forte agrupamento dos isolados 158-180, o que pode ser caracterizado como um surto com transmissão de clones de parasitos.

### 6.2.3.3. Diversidade genética de *P. vivax* nos bairros da área urbana (distância espacial)

Para a análise da distância espacial, foram utilizados isolados de apenas um período amostrado, para descartar o viés do fator tempo. Foram escolhidos quatro bairros que possuíam um número de amostras comparáveis do ano de 2016. Esses bairros foram Aparecida, Mariuá, Nazaré e São Sebastião; a distância espacial aproximada em quilômetros pode ser conferida no quadro 6.7. A diversidade variou de  $H_E = 0,33 \pm 0,23$  nos bairros de Aparecida e Mariuá a  $H_E = 0,43 \pm 0,34$  em São Sebastião. Em relação à distância genética, foi encontrado um valor significativo de  $F_{ST}$  entre os bairros Aparecida e Mariuá ( $F_{ST} = 0,2463$ ,  $p < 0,001$ ), entre Aparecida e Nazaré ( $F_{ST} = 0,1486$ ,  $p = 0,01$ ), entre São Sebastião e Mariuá ( $F_{ST} = 0,1431$ ,  $p < 0,001$ ) e entre São Sebastião e Nazaré ( $F_{ST} = 0,1233$ ,  $p = 0,03$ ) (Quadro 6.8).

Quadro 6.7. Distância espacial em quilômetros entre os bairros da área urbana.

Bairro	Distância espacial entre os bairros*			
	Aparecida	Mariuá	Nazaré	São Sebastião
Aparecida	-			
Mariuá	2,2 km	-		
Nazaré	0,2 km	1,3 km	-	
São Sebastião	1,7 km	0,2 km	0,8 km	-

\*distância relativa em linha reta entre os aglomerados urbanos mais próximos entre os bairros.

Quadro 6.8. Diversidade e distância genética de *P. vivax* em quatro bairros da área urbana.

Bairro	Nº amostras	Nº haplótipos	Média $H_E \pm$ DP	$F_{ST}$			
				Aparecida	Mariuíá	Nazaré	São Sebastião
Aparecida	14	7	0,33 $\pm$ 0,23	-			
Mariuíá	8	4	0,33 $\pm$ 0,23	0,2463*	-		
Nazaré	8	7	0,41 $\pm$ 0,29	0,1486*	0,0562	-	
São Sebastião	12	10	0,43 $\pm$ 0,34	0,0562	0,1431*	0,1233*	-

\* $p < 0,05$ .  $H_E$ : Heterozigiosidade esperada. DP: Desvio padrão.

Em relação aos haplótipos encontrados no mesmo bairro, em Aparecida e Mariuíá, um mesmo haplótipo foi compartilhado por no máximo cinco amostras e em Nazaré e São Sebastião por no máximo duas amostras. Nos bairros de Aparecida e Mariuíá, o número maior de compartilhamento de haplótipos é consistente com o menor valor de diversidade entre os bairros (quadro 6.8). Em relação aos haplótipos compartilhados entre os bairros no ano de 2016, apenas um haplótipo foi encontrado em todos os bairros, três foram exclusivos de Aparecida, um de Mariuíá, quatro de Nazaré e seis de São Sebastião.

#### 6.2.4. Diversidade genética de *P. vivax* na área rural

Em relação à diversidade genética na área rural, foi encontrada uma heterozigiosidade esperada que variou de 0,22 (MS1) a 0,74 (*msp1bl10*), com uma  $H_E$  média de  $0,47 \pm 0,21$ . O número de alelos variou de 3 para o MS1, sendo o marcador mais conservado, a 9 para o MS6, sendo o mais diverso (Quadro 6.9). Foi encontrado um forte e significativo desequilíbrio de ligação ( $I^S_A = 0,1136$ ,  $p = 0,012$ ) e 57,7% de infecções múltiplas. Os marcadores que mais apresentaram mais de um alelo no mesmo locus foram *msp1bl10* (37,8%), MS6 (23,3%), MS1 (15,6%) (Figura 6.25). O número de haplótipos encontrados nas 35 amostras completamente genotipadas foi de 27, sendo que um mesmo haplótipo apareceu em duas amostras,

dois haplótipos apareceram em três amostras e um apareceu em quatro amostras. O quadro com os haplótipos pode ser conferido no Apêndice 3.

Quadro 6.9. Frequência alélica encontrada em 5 marcadores em 78 amostras da área rural.

Número de alelos	MS1	MS2	MS6	<i>msp1bl</i> 2	<i>msp1bl</i> 10
	Tamanho (%)				
1	<b>222 (0,88)</b>	<b>262 (0,83)</b>	<b>200 (0,69)</b>	397 (0,07)	224 (0,28)
2	244 (0,04)	294 (0,03)	206 (0,01)	409 (0,21)	240 (0,01)
3	246 (0,08)	298 (0,12)	209 (0,10)	<b>414 (0,60)</b>	252 (0,20)
4		326 (0,02)	215 (0,01)	425 (0,07)	258 (0,01)
5			236 (0,01)	429 (0,05)	266 (0,03)
6			254 (0,06)		<b>291 (0,38)</b>
7			281 (0,01)		302 (0,08)
8			299 (0,03)		
9			302 (0,08)		
<b>Amostras</b>	77	65	73	43	74
<b><i>H<sub>E</sub></i></b>	0,22	0,30	0,52	0,59	0,74

\*em negrito o alelo mais frequente por marcador.

*H<sub>E</sub>*: Heterozigosidade Esperada

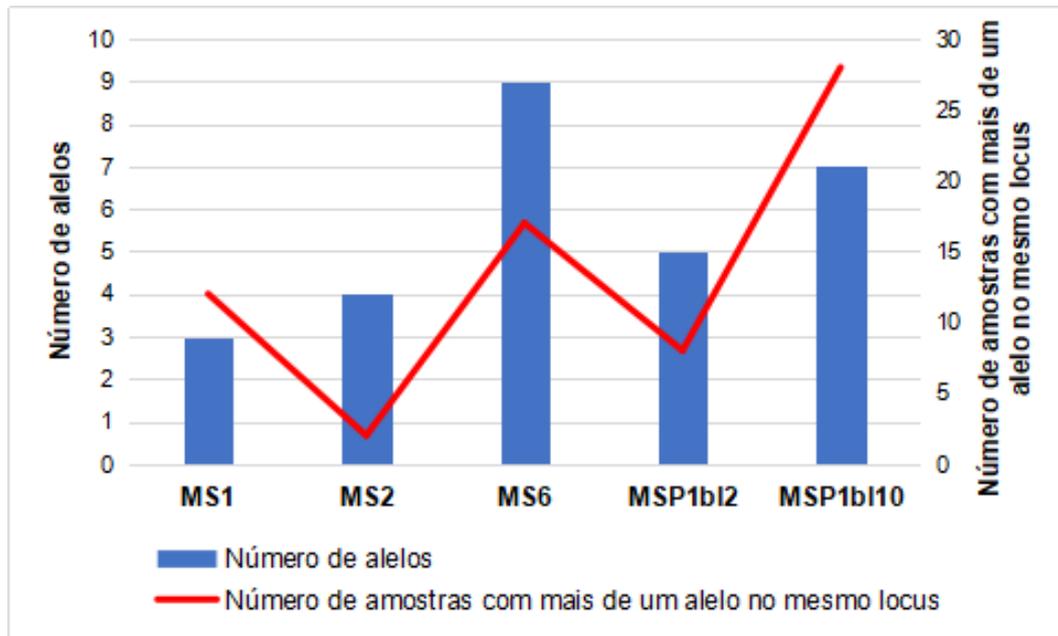


Figura 6.25: Área rural: número de alelos encontrados para cada marcador em azul. Número de amostras com mais de um alelo no mesmo locus em vermelho.

Fazendo uma comparação entre área urbana e rural (Quadro 6.3 e 6.9), observa-se que na área rural a quantidade de alelos e a heterozigosidade esperada foi menor do que a encontrada na área urbana, possivelmente pela diferença no número de amostras utilizadas entre as áreas e menor número de MS genotipados em relação à área urbana, com exceção do marcador *mSP1b12*, no qual foi encontrado o mesmo número de alelos (5) e a mesma faixa de tamanho (387-429), porém a  $H_E$  foi maior na área rural, consistente com a diferença na frequência alélica que houve entre as duas áreas em relação a este marcador, que podem ser conferidas nos Quadros 6.4 e 6.9.

#### 6.2.4.1. Diversidade genética de *P. vivax* na área rural em amostras consecutivas

No quadro 6.10 foram listados os haplótipos encontrados em amostras consecutivas dos mesmos indivíduos entre os cortes dos estudos seccionais; o corte 1 representa amostras coletadas em novembro de 2002, o corte 2 amostras coletadas em maio de 2003, o corte 3 entre novembro e dezembro de 2003 e o corte 4 em maio de 2004, sendo que o intervalo de um corte para outro foi entre 5-6 meses e entre o primeiro e último corte, 18 meses. Alguns desses indivíduos tinham malária clínica e outros eram assintomáticos. No total foi possível genotipar amostras consecutivas de nove (9) indivíduos diferentes, sendo que em duas

peças, foram coletadas amostras positivas durante três cortes diferentes. Comparando os haplótipos encontrados em indivíduos que na primeira amostragem eram assintomáticos e na segunda foram sintomáticos, a maioria apresentou menos de 50% de alelos compartilhados e esta porcentagem variou de 25%-50%. Quando comparados indivíduos assintomáticos em todas as amostragens foi observado que a maioria teve um percentual de compartilhamento de alelos acima de 60% e este variou de 40-100%. O único indivíduo que foi sintomático nas duas amostragens apresentou 75% de alelos compartilhados.

Esses resultados mostram que provavelmente quando indivíduos assintomáticos são infectados por um parasito geneticamente diferente da infecção anterior, ele pode desenvolver sintomas. Essa hipótese foi levantada quando observamos os indivíduos 25 e 31 que foram amostrados com o mesmo lapso de tempo (7 meses), sendo que o 25 permaneceu assintomático por que adquiriu um parasito 75% idêntico ao da primeira amostra, já o indivíduo 31 adquiriu um parasito 25% idêntico ao da primeira amostra analisada, apresentando assim sintomas na nova infecção. Nos indivíduos assintomáticos 35 e 36 que possuem 3 amostras seriadas, foi observado que o tempo influenciou no compartilhamento de alelos; as amostras com maior espaço de tempo de coleta geralmente apresentaram menor percentual de compartilhamento de alelos.

Quadro 6.10. Haplótipos encontrados em amostras consecutivas de indivíduos com infecção assintomática e indivíduos sintomáticos na área rural.

Indivíduos (amostra)	Corte*	Clínica	Marcador					Número de alelos compartilhados com a primeira amostra (%)	Número de alelos compartilhados com a segunda amostra (%)
			MS1	MS2	MS6	msp1bl2	msp1bl10		
25 (1)	Corte 2	assintomático	222	262	302	414	291		
25 (2)	Corte 3 <sup>(1)</sup>	assintomático	222	262	200	x	291	3 de 4 (75%)	
31 (1)	Corte 2	assintomático	246	262	299	414	252		
31 (2)	Corte 3 <sup>(1)</sup>	sintomático	222	262	200	x	224	1 de 4 (25%)	
35 (1)	Corte 1	Assintomático	222	262	200	414	224		
35 (2)	Corte 2 <sup>(2)</sup>	assintomático	222	262	200	x	224	4 de 4 (100%)	
35 (3)	Corte 3 <sup>(4)</sup>	assintomático	222	262	302	414	291	3 de 5 (60%)	2 de 4 (50%)
36 (1)	Corte 1	assintomático	222	262	200	414	252		
36 (2)	Corte 2 <sup>(2)</sup>	assintomático	222	262	299	414	291	3 de 5 (60%)	
36 (3)	Corte 4 <sup>(5)</sup>	assintomático	222	262	281	429	224	2 de 5 (40%)	2 de 5 (40%)
39 (1)	Corte 1	assintomático	222	298	209	414	252		
39 (2)	Corte 2 <sup>(2)</sup>	sintomático	222	262	200	414	291	2 de 5 (40%)	
40 (1)	Corte 1	assintomático	222	262	302	x	252		
40 (2)	Corte 2 <sup>(2)</sup>	sintomático	222	262	200	414	291	2 de 4 (50%)	
44 (1)	Corte 3	assintomático	222	262	200	x	224		
44 (2)	Corte 4 <sup>(3)</sup>	assintomático	222	262	200	429	266	3 de 4 (75%)	
57 (1)	Corte 3	sintomático	222	262	200	409	302		
57 (2)	Corte 4 <sup>(3)</sup>	sintomático	222	262	200	x	291	3 de 4 (75%)	
58 (1)	Corte 3	assintomático	222	298	215	409	252		
58 (2)	Corte 4 <sup>(3)</sup>	sintomático	244	298	254	397	291	1 de 5 (25%)	

<sup>1</sup>Sete meses depois da coleta da primeira amostra; <sup>2</sup>Seis meses depois de coletada a amostra anterior; <sup>3</sup>Cinco meses depois de coletada a amostra anterior;

<sup>4</sup>(13 meses após do corte 1 e 7 meses depois do corte 2); <sup>5</sup>18 meses após o corte 1 e 12 meses depois do corte 2). x: dado faltante

\*Corte 1: novembro/2002, Corte 2: maio/2003, Corte 3: dezembro/2003, Corte 4: maio/2004.

### 6.2.5. Diversidade genética de *P. vivax* em indivíduos com infecção assintomática e indivíduos sintomáticos das áreas urbana e rural

Para evitar o viés do fator tempo, foram analisadas amostras coletadas no mesmo momento tanto na área urbana quanto na área rural. Na área urbana foi feita a comparação de amostras de indivíduos com infecção assintomática e indivíduos sintomáticos no ano de 2006 (os demais anos só tiveram amostras de indivíduos sintomáticos) e na área rural essa comparação foi feita com amostras coletadas no corte 2 (maio/2003), sendo que esse corte foi escolhido por ter um número equivalente de indivíduos assintomáticos e sintomáticos.

Na área urbana não houve diferença entre os dois grupos em relação à diversidade genética que foi igual para os dois ( $H_E = 0,72 \pm 0,10$ ); também não foi encontrada diferença no percentual de infecção múltipla, sendo que nos sintomáticos foi de 55,9% e nos assintomáticos de 51,6%; porém houve uma distância genética significativa ( $F_{ST} = 0,0825$ ,  $p < 0,001$ ) (Quadro 6.11). A figura 6.26 mostra que não houve diferença na diversidade entre os dois grupos e o número de alelos exclusivos foram equivalentes.

Quadro 6.11. Diversidade de *P. vivax* em indivíduos com infecção assintomática e indivíduos sintomáticos nas áreas urbana e rural.

Ano	Nº amostras	Média $H_E \pm DP$	IM (%)	$F_{ST}$	
				Sintomático	Assintomático
<b>Área urbana (Outubro/2006)</b>					
<b>Sintomático</b>	34	0,72±0,10	55,9%	-	
<b>Assintomático</b>	31	0,72±0,10	51,6% <sup>1</sup>	0,0825*	-
<b>Área rural (Maio/2003)</b>					
<b>Sintomático</b>	12	0,34±0,31	50%	-	
<b>Assintomático</b>	11	0,61±0,27	63,6% <sup>2</sup>	0,2385*	-

\* $p < 0,05$ .  $H_E$ : Heterozigidade esperada. IM: Infecção múltipla.  $I^S_A$ : desequilíbrio de ligação.  $F_{ST}$ : distância genética. <sup>1</sup> $p=0,7321$ ; <sup>2</sup> $p=0,5192$

	MS1	MS2	MS5	MS6	MS7	MS8	<i>msp1bl2</i>	<i>msp1bl10</i>
sintomáticos	222	262	173	200	349	301	397	224
	238	298	176	209	352	305	409	226
	244	308	179	218	361	309	414	252
	250		182	239	364	313	425	258
			185	257	385	317	429	266
			194	269	388	325		291
			200	281				
assintomáticos	222	262	173	200	346	301	397	222
	244	294	176	209	349	305	409	224
	250	298	179	233	352	309	414	226
		306	182	239	364	313	425	246
		308	194	242	385		429	252
				257	427			266
				260				291
				272				
				281				
				302				

Figura 6.26: Alelos encontrados em 8 marcadores em amostras de indivíduos sintomáticos e com infecção assintomática na área urbana (2006). Os alelos marcados em azul foram compartilhados entre os dois grupos, os alelos em amarelo foram exclusivos dos pacientes sintomáticos e os alelos em laranja exclusivos dos indivíduos assintomáticos.

Na área rural, o grupo dos pacientes sintomáticos apresentaram  $H_E$  média de  $0,34 \pm 0,31$  e 50% de infecções múltiplas, já o grupo dos indivíduos com infecção assintomática apresentaram  $H_E$  média de  $0,61 \pm 0,27$  e 63,6% de infecções múltiplas. Sendo assim, o grupo dos indivíduos com infecção assintomática apresentou maior diversidade genética e porcentagem de infecções múltiplas do que o grupo dos sintomáticos. A distância genética entre os grupos foi significativa ( $F_{ST} = 0,2385$ ,  $p=0,036$ ), tendo sido maior ainda do que o encontrado na área urbana (Quadro 6.11). A figura 6.27 mostra essa diferença na diversidade entre os dois grupos, reforçando que os parasitos dos indivíduos com infecção assintomática são mais diversos e possuem mais alelos exclusivos do que o grupo dos sintomáticos.

	MS1	MS2	MS6	<i>msp1bl2</i>	<i>msp1bl10</i>
sintomáticos	222	262	200	409	224
		298	209	414	266
					291
assintomáticos	222	262	200	409	224
	244	294	209	414	240
	246		236		252
			254		266
			299		291
			302		302

Figura 6.27: Alelos encontrados em 5 marcadores em amostras de indivíduos sintomáticos e com infecção assintomática na área rural (Nov/2003). Os alelos marcados em azul foram compartilhados entre os dois grupos, os em amarelo foram exclusivos dos indivíduos sintomáticos e em laranja exclusivos dos com infecção assintomática.

### 6.2.6. Diversidade genética de *P. vivax* encontrada em estudos na Amazônia brasileira

Foi feita uma comparação dos resultados encontrados na área urbana do município de Barcelos com outros três estudos realizados na Amazônia brasileira. No Quadro 6.12 pode-se observar o número de alelos e a  $H_E$  média encontrada em cada estudo. Foi observado que em todos os estudos, o *P. vivax* apresentou uma alta diversidade genética, que variou de 0,62-0,74 e que esta foi similar entre os estudos.

Quadro 6.12. Diversidade genética de *P. vivax* em populações da Amazônia brasileira.

Estudos	Nº amostras	Número de alelos								Média $H_E$
		MS1	MS2	MS5	MS6	MS7	MS8	<i>msp1bl2</i>	<i>msp1bl10</i>	
Macapá (AP), Porto Velho (RO), Augusto Corrêa (PA), Manaus (AM) (Rezende et al 2010)	53	4	8	12	19	11	9	-	-	0,68
Diversos locais da região Amazônica (Araújo et al 2012)	30	5	10	10	12	8	7	7	12	0,74
Manaus, Amazonas (Lizcano et al 2014)	11	-	3	7	5	8	6	4	9	0,62
<b>Este estudo (área urbana)</b>	254	7	7	7	16	13	7	5	11	0,67

$H_E$ : Heterozigosidade esperada.

### 6.2.7. Diversidade genética de *P. vivax* em países da América do Sul, Ásia e África

No quadro 6.13 encontra-se a diversidade genética de *P. vivax* em países da América do Sul, Ásia e África. Observou-se que em todos os estudos, o *P. vivax* apresentou de moderada a alta diversidade genética, que variou de 0,57-0,80 com um significativo desequilíbrio de ligação em todas as populações, muitas vezes acompanhados de alta proporção de infecções múltiplas, que chegou a 89,6% no Camboja, na Ásia.

Quadro 6.13: Diversidade genética de *P. vivax* em países da América do Sul, Ásia e África.

Referência	Região	País	Localidade	Número de amostras	Número de marcadores	Média $H_E$	$I^S_A$	IM (%)
Este estudo (área urbana)	América do Sul	Brasil	Barcelos (Amazonas) 2006-2016	254	8	0,67	0,0592*	33,9
Ferreira et al. (2007)	América do Sul	Brasil	Plácido de Castro, Acrelândia, Xapuri e Rio Branco (Acre) 1999	25	14	0,80	0,101*	48
			Granada (Acre) 2004-2005	49	14	0,71	0,202*	49
Orjuela-Sánchez et al. (2009)	América do Sul	Brasil	Granada (Acre) 2005-2006	99	14	0,72	0,068*	42,4
Rezende et al. (2010)	América do Sul	Brasil	Macapá (Amapá) 2004	11	11	0,57	0,4228*	45
			Porto Velho (Rondônia) 2004	16	11	0,75	0,0770*	69
			Augusto Corrêa (Pará) 2005	15	11	0,74	0,1706*	40
			Manaus (Amazonas) 2003	11	11	0,77	0,0344*	73
Batista et al. (2015)	América do Sul	Brasil	Remansinho (Amazonas) 2010-2013	84	15	0,70	0,040*	78,5

Salla et al. (2020)	América do Sul	Brasil	Mâncio Lima (Acre) 2014-2015	177	14	0,66	0,158*	45,2
Chenet et al. (2012)	América do Sul	Venezuela	Tumeremo (Bolívar) 2003-2004	107	22	0,73	0,3776* (2003) 0,1448* (2004)	15,9
Van den Eede et al. (2010a)	América do Sul	Peru	Iquitos 2006-2008	143	16	0,59	0,177*	34
Manrique et al. (2019)	América do Sul	Peru	Cahuide, Lupuna e Santa Emilia (Departamento de Loreto) 2012-2015	777	16	0,64	0,145*	26
Gunawardena et al. (2010)	Ásia	Sri Lanka	Trincomalee, Batticaloa, Ampara, Anuradhapura, Polonnaruwa, Kurunegala, Vavuniya e Colombo 2003-2008	140	12	0,86	0,0236*	55
Gunawardena et al. (2010)	Ásia	Mianmar	Kayin, Kachin e Rakhine 2007	167	12	0,85	0,0149*	67,1
Gunawardena et al. (2010)	África	Etiópia	Assendabo 2006-2008	118	12	0,75	0,0137*	73,7
Orjuela-Sánchez et al. (2013)	Ásia	Camboja	Pursat 2008	87	13	0,87	0,010*	89,6
Congpuong et al. (2017)	Ásia	Tailândia	Mae Hong Son, Kanchanaburi, Yala e Chanthaburi 2009-2010	234	6	0,87	0,133*	85
Kittichai et al. (2017)	Ásia	Tailândia	Tak. Kanchanaburi e Ubon Ratchathani 2013-2016	124	10	0,85	0,1092*	19,3

Abdelraheem et al. (2018)	Ásia	Catar 2013-2016	-	265	9	0,78	0,0050*	59,6
Abdelraheem et al. (2018)	África	Sudão 2013-2014	-	137	9	0,72	0,0958*	44,7
Abdelraheem et al. (2018)	África	Etiópia 2010-2013	-	87	9	0,68	0,0367*	67
Abdelraheem et al. (2018)	Ásia	Índia 2014-2016	-	40	9	0,80	0,0265*	62,5

\* $p < 0,05$ .  $H_E$ : Heterozigidade esperada. IM: Infecção múltipla.  $I^S_A$ : desequilíbrio de ligação.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. A malária no município de Barcelos

O município de Barcelos, historicamente tem se configurado como uma área de alto risco epidemiológico para malária. Um estudo que avaliou a epidemiologia da doença entre 1992 e 2004 mostrou uma IPA média de 136,7 e de 613,6 casos por mil habitantes na área urbana e na área rural respectivamente (Suárez-Mutis & Coura 2007). Por ser uma doença de uma extrema complexidade epidemiológica não é possível pensar na diversidade genética dos agentes infecciosos que a causam sem entender a epidemiológica local durante o período de estudo. Entre 2003 e 2018, o município apresentou uma Incidência Parasitária Anual (IPA) acima de 50 casos por mil habitantes em todos os anos (quase sempre acima de 100 casos por 1000 habitantes) caracterizando a área como de alto risco epidemiológico. Observou-se que usualmente há um aumento dos casos no mês de março e entre os meses de agosto a outubro, ao final da estação das chuvas, que se iniciam nos meses de março e abril, com enchentes ocorrendo nos meses de junho até agosto; no mês de outubro, o nível dos rios começa a diminuir (Suárez-Mutis & Coura 2007). *Anopheles darlingi*, principal vetor de *Plasmodium* spp. na Amazônia brasileira, usa criadouros permanentes; porém as chuvas torrenciais no início da estação não são

propícias para a reprodução do vetor porque as larvas são levadas pelas águas; porém, ao final da estação das chuvas, os criadouros ficam estabilizados e o mosquito pode usar criadouros temporários, como valas e poças, aumentando assim sua proliferação e conseqüentemente a transmissão da malária. Normalmente, durante a estação seca, os criadouros ficam na sua mínima expressão e diminuem de tamanho, reduzindo assim o espaço de oviposição necessário para esse vetor (Suárez-Mutis 2007, Hiwat & Bretas 2011).

Na nossa série histórica, a partir do ano 2005 houve um aumento no número de casos e os anos de 2006 e 2007 foram considerados epidêmicos, em razão dos casos ter ultrapassado o limite superior do diagrama de controle (média de casos mais o desvio padrão). Este aumento no número de casos neste período ocorreu em todo país; as causas das epidemias ocorridas são muitas e não podem ser atribuídas a um único fator. Em alguns lugares, a intensa e desordenada ocupação das periferias das grandes cidades da região amazônica, bem como desmatamento e atividade de piscicultura desordenada, colaborou com o aumento de criadouros do mosquito (Brasil 2013). Os estudos de Souza et al (2019) caracterizaram os padrões espaciais da malária segundo uma regionalização proposta por áreas geográficas e atividade econômica. Nessa regionalização, o município de Barcelos está inserido numa área em que as atividades extrativas agem como um dos principais determinantes da malária. O fato, é que ainda existem vários fatores não conhecidos do aumento do número de casos em 2006 nesse município. O que é extremamente importante para este estudo é que houve um aumento real em 2006, de mais de 2000 casos de *P. vivax* quando comparado com o ano 2005.

Com esta problemática, o Ministério da Saúde desencadeou uma intensa mobilização, envolvendo os gestores da saúde nos municípios da região amazônica visando promover a ordenação de movimentos populacionais e priorizar as ações de vigilância, prevenção e o controle da malária. Em Barcelos, os efeitos dessa articulação refletiram-se a partir do ano de 2008, quando foi observado declínio constante no número de casos (Brasil 2009b). Até o ano de 2013, o número de casos se manteve abaixo de 3 mil, sendo que a partir de 2014 estes casos começaram a aumentar e novos surtos foram observados em vários meses de 2015 e 2016; os anos de 2017 e 2018 foram considerados epidêmicos tendo chegado a mais de 8 mil casos em 2017 e mais de 6 mil casos em 2018, fato semelhante ao ocorrido nos anos de 2006 e 2007. Desde 2015, mais de 90% dos casos são causados por *P. vivax*. Uma possível causa para este aumento no número de casos

foi o fato de que como os casos da doença vinham caindo e pareciam estar sob controle, houve uma diminuição da importância da enfermidade e consequente fragilidade do programa de combate à malária em 2016. O que ocorreu em Barcelos refletiu a situação que ocorreu no Ministério da Saúde com a fusão do Programa Nacional de Controle de Malária com os Programas de combate às doenças transmitidas pelo *Ae. aegypti*, em momentos que o país vivia epidemias por dengue, zika e chikungunya (Brasil 2019c).

Em todo o período do nosso estudo, *P. vivax* foi a espécie de *Plasmodium* mais prevalente, com uma proporção de 77,8% dos casos de malária no período. No país, até a década de 80, houve relativa equivalência entre as espécies parasitárias (*P. vivax* e *P. falciparum*) inclusive com um período de inversão parasitária de 1983 a 1988 com predominância de *P. falciparum*. A partir de então, nota-se um distanciamento entre o número de registro das duas espécies, que culminou com a predominância de *P. vivax*, responsável por quase 85% dos casos notificados em 2008 (Brasil 2009b). Isto se deve à biologia de *P. falciparum*, pois seus gametócitos só começam a aparecer no sangue entre os dias 10-20 da infecção, assim, quando se realizam intervenções adequadas em uma área rapidamente diminui o número de portadores desses gametócitos. Um fator fundamental para a diminuição dos casos por *P. falciparum* foi a implantação no Brasil, ao final do ano 2006, das combinações terapêuticas com derivados da artemisinina (Brasil 2010). Com *P. vivax*, é mais difícil o controle, já que os gametócitos estão circulando no sangue antes do início dos sintomas (Suárez-Mutis & Coura 2007); por outro lado, a presença de hipnozoítos no ciclo exo-eritrocítico é outro fator que dificulta o controle dessa espécie, assim como a maior capacidade do vetor de transmitir esse parasito (Olliaro et al. 2016).

Na nossa série, não foi encontrada diferença estatística em relação ao sexo; homens e mulheres estão sob o mesmo risco de serem infectados. Sobre a faixa etária, nota-se que o maior número de casos ocorreu principalmente entre crianças e em segundo plano entre adolescentes e jovens adultos até os 29 anos, provavelmente pela aquisição de imunidade clínica, na qual o indivíduo está infectado, mas não apresenta sintomas, sendo então um portador de infecção assintomática. Os estudos de Suárez-Mutis et al (2007) mostraram que no rio Padauri, uma das áreas da nossa pesquisa, 20,4% dos indivíduos podem ter infecção assintomática por *P. vivax* usando a PCR como técnica de diagnóstico. Indivíduos assintomáticos não procuram atendimento, não são notificados nem tratados, porém podem ser fonte de infecção mantendo a transmissão (Pethleart et

al. 2004, Alves et al. 2005, Martins-Campos et al. 2018). Por outro lado, o fato de crianças estarem adoecendo mais que adultos pode estar indicando que existe transmissão vetorial intradomiciliar. Em estudo realizado por Suárez-Mutis et al. (2009) no rio Padauri, foi encontrado que entre *An. darlingi* capturados, 83,8% estavam picando dentro das casas e 64,8% desses foram coletados durante a estação das chuvas.

## **7.2. Diversidade genética de *P. vivax* na área urbana do município de Barcelos**

Sendo *P. vivax* o parasito que causa malária mais frequentemente no Brasil e o mais difícil de eliminar, uma melhor compreensão da dinâmica de transmissão e estrutura populacional é crucial para orientar os esforços direcionados para atingir a eliminação da malária. Para tanto, conhecer a genética deste parasito e sua distribuição tem se tornado cada vez mais importante. Diante disto, neste trabalho, foram utilizados marcadores genéticos de microssatélites para estudar a diversidade genética de isolados de *P. vivax* e sua associação com o tempo e desfecho clínico do indivíduo.

Neste estudo foi observado que amostras clínicas de *P. vivax* isoladas de indivíduos residentes na área urbana do município apresentaram uma alta diversidade genética e frequentes infecções por múltiplos clones coexistindo com um significativo desequilíbrio de ligação multilocus. O desequilíbrio de ligação (associações não aleatórias de alelos de loci diferentes) encontrado no presente estudo, é corroborado por outros trabalhos (Ferreira et al. 2007, Karunaweera et al. 2008, Orjuela-Sánchez et al. 2009, Orjuela-Sánchez et al. 2013, Kittichai et al. 2017, Li et al. 2020) sugerindo que este parasito tem uma baixa taxa de recombinação meiótica, sugestivo de um modo de reprodução predominantemente clonal. É provável que gametócitos geneticamente não relacionados estejam presentes no mesmo repasto sanguíneo do mosquito, favorecendo a consanguinidade durante a reprodução meiótica de parasitos no vetor (Ferreira et al. 2007). Alternativamente, a seleção natural em alguns desses microssatélites ou loci vizinhos podem originar associações não aleatórias de alelos (Orjuela-Sánchez et al. 2013). Escalante & Pacheco 2019 explicam que o desequilíbrio de ligação pode surgir de duas maneiras: (1) os loci podem estar fisicamente próximos no genoma e isso pode ser informativo se essas regiões estiverem associadas às mutações que conferem

resistência a algum antimalárico, e (2) devido a processos que afetam o acasalamento aleatório, como endogamia, redução do tamanho efetivo da população, expansões epidêmicas e isolamento geográfico.

Nós comparamos a diversidade genética dos parasitos que circularam na área urbana durante 10 anos (2006-2016) usando amostras coletadas em cinco períodos diferentes. O ano de 2006 apresentou maior valor de diversidade genética, de infecções múltiplas e também foi o único ano em que foram detectados alelos únicos em todos os microssatélites estudados, o que já era esperado pelo fato de ter sido um ano epidêmico na região amazônica, sugerindo que muitas variantes genéticas de *P. vivax* deveriam estar circulando ao mesmo tempo (Brasil 2013). Por outro lado, em uma região com uma alta carga de infecções assintomáticas é de esperar que a circulação de novas variantes genéticas do parasito, às quais a população ainda não teria tido contato, pode fazer com que apareçam casos sintomáticos. Devido a que no ano de 2006, foi coletado um importante número de amostras clínicas de indivíduos com infecção assintomática bem caracterizadas assim como de indivíduos com malária clínica fizemos uma análise do perfil de microssatélites para comparar esses dois grupos. Salla et al. (2020) argumentaram que a frequência desproporcional de uma variante do parasito em infecções sintomáticas pode refletir uma virulência aumentada, em relação a todas as outras variantes que circulam silenciosamente entre hospedeiros assintomáticos em uma mesma localidade (Salla et al. 2020). Em um estudo realizado em Tumeremo na Venezuela por Chenet et al. (2012) utilizando 215 amostras coletadas em dois anos seguidos, também foi observado uma maior diversidade e proporção de infecções por múltiplos clones em um período de pico de transmissão. Esses dados permitem dizer que a diversidade e as infecções múltiplas podem estar aumentadas em períodos epidêmicos.

As amostras coletadas no ano de 2016 foram, geneticamente, as mais distantes das outras obtidas na área urbana, e também foram as que apresentaram uma população mais homogênea, ficando somente atrás de 2013 que foi o ano menos diverso. Esses resultados são consistentes com um maior compartilhamento de haplótipos entre os parasitos. O fato desse ano ter sido mais distante geneticamente dos demais e ter tido parasitos geneticamente semelhantes pode configurar um surto de malária com introdução de novos haplótipos (efeito fundador), aos quais a população ainda não havia sido exposta (ausência de memória imunológica), ou pode se dever também a uma recombinação de haplótipos que já

circulavam na região ou ainda a recombinação de haplótipos introduzidos com haplótipos já circulantes e sua subsequente expansão clonal (Batista et al. 2015). Isto corrobora os resultados encontrados através da análise bayesiana (programa Structure), na qual foram definidas três subpopulações nos anos amostrados, as quais estavam presentes em todos os anos em diferentes proporções. No ano de 2016, as três subpopulações estiveram presentes quase que na mesma proporção, o que é consistente com o fato de as amostras coletadas neste ano ter sido as mais distantes geneticamente das demais. Enquanto, no ano de 2016 os isolados eram mais misturados, ou seja, geneticamente relacionados, nos demais anos, os isolados estavam concentrados em uma ou no máximo duas populações. Os anos de 2013 e 2015, tiveram uma subpopulação predominante (subpopulação B), o que explica o menor valor de  $F_{ST}$  encontrado entre esses dois anos. Estes resultados sugerem que a probabilidade de amostrar parasitos de diferentes subpopulações difere ao longo do tempo, mesmo que em um intervalo de tempo curto, como em anos sequenciais. No ano de 2015 foi identificado um grupo de 22 amostras compostas praticamente pela mesma população, o que pode caracterizar um surto de malária com clones de parasitos. Podemos salientar, que tanto no ano de 2015 quanto no ano de 2016 houve vários meses epidêmicos, ocorrendo sempre no segundo semestre de cada ano.

Nossos resultados mostraram que a genotipagem por microsatélites é uma boa metodologia para identificar a estrutura populacional ao longo do tempo, bem como em um curto período para identificar surtos com clones de parasitos. No trabalho de Batista et al. (2015) realizado durante um período de três anos em Remansinho, um assentamento agrícola no estado de Rondônia, foi observado que os níveis de diversidade genética de *P. vivax* e a proporção de infecções múltiplas permaneceram praticamente inalterados ao longo dos três anos, exceto para parasitos coletados durante um surto, no qual se recuperou uma menor diversidade e um único haplótipo foi compartilhado por três amostras, sendo que todos os outros haplótipos coletados durante todo o período, foram observados apenas uma vez. A diversidade genética de *P. vivax* é influenciada pelos padrões de transmissão de malária, sendo positivamente correlacionada com os níveis de endemicidade das diferentes regiões estudadas. É necessário um mapeamento da estrutura genética da população de *P. vivax* para entender sua epidemiologia, diversidade, distribuição e dinâmica populacional e com a eliminação da malária de volta à agenda global,

esse mapeamento se torna essencial antes do estabelecimento de metas para eliminação e implementação de intervenções (Arnott et al. 2012).

Em relação à dinâmica de transmissão de *P. vivax* na área urbana, nossos resultados mostraram uma grande substituição de haplótipos em Barcelos, de forma que só foi encontrado o compartilhamento de um haplótipo entre 2013-2014 e três entre 2014-2015. O achado de uma suposta introdução de novos haplótipos no município no ano de 2016 é consistente com o aumento de casos, não só no município estudado, mas em todo o país. A alta substituição de haplótipos na população mesmo em amostras de anos consecutivos como foi entre 2013-2016, mostra que não houve uma propagação de clones do parasito, dados corroborados por outros estudos realizados na Amazônia brasileira com menos tempo de intervalo entre as coletas: Acre (Ferreira et al. 2007, Orjuela-Sánchez et al. 2009), Remansinho, Amazonas (Batista et al. 2015, Salla et al. 2020) e outros locais do mundo: Sri Lanka e Vietnã (Karunaweera et al. 2008, Van den Eede et al. 2010b), Papua Nova Guiné e Ilhas Salomão (Koepfli et al. 2013) e Tailândia (Kittichai et al. 2017).

A renovação de haplótipos é consistente com o alto nível de mutação dos microssatélites, levando esses haplótipos a se diversificarem rapidamente para originar novas variantes. O fato de haplótipos idênticos raramente serem compartilhados entre isolados sugere que novos haplótipos são rapidamente gerados por mutação ou recombinação ou introduzidos pela migração da população (Orjuela-Sánchez et al. 2009). Alternativamente, pode-se supor que linhagens de parasitos possam sofrer mutações e recombinar-se rapidamente enquanto se propagam em populações, gerando grupos de haplótipos multilocais intimamente relacionados, mas não idênticos (Ferreira et al. 2007).

Em relação à distância genética entre os isolados de bairros diferentes, o maior valor de  $F_{ST}$  foi encontrado entre bairros mais distantes geograficamente (2,2 km), que foram Aparecida e Mariuá ( $F_{ST} = 0,2463$ ,  $p < 0,001$ ). O mesmo não aconteceu entre os demais bairros com maior distância espacial, como por exemplo entre Aparecida e São Sebastião (1,7 km de distância), que não apresentaram uma distância genética significativa ( $F_{ST} = 0,0562$ ,  $p = 0,08$ ). Entretanto, houve distância genética significativa entre bairros mais próximos um do outro (0,2 km), como entre Aparecida e Nazaré ( $F_{ST} = 0,1486$ ,  $p = 0,01$ ). Embora não fosse avaliado neste trabalho em particular, de fato, as cidades amazônicas têm diferentes conformações socioambientais; no município de Barcelos há um intenso fluxo de trabalhadores

extratores da piaçaba que passam uma parte do ano na selva e ficam na cidade durante alguns meses, na época em que não há possibilidade da extração. É provável que em alguns casos, essa seja a causa da distância genética encontrada em bairros mais próximos. Esse aspecto deve ser mais bem elucidado.

A distância genética significativa tanto em bairros mais distantes quanto em mais próximos é consistente com o fato de todos os bairros terem compartilhado apenas um haplótipo. Isto pode ser devido à capacidade de voo do vetor que varia entre dois a sete quilômetros (Charlwood & Alecrim 1989), sendo assim, para encontrar uma distância genética correlacionada com a distância espacial, seria necessário estudar localidades mais distantes geograficamente, bem como utilizar um número maior de amostras por local. Por outro lado, os casos de malária autóctone da cidade de Barcelos estão associados ao principal criadouro da cidade que é o Igarapé do Salgado que passa justamente atrás do bairro São Sebastião, o local com maior número de casos na cidade. O bairro Aparecida é o mais distante desse igarapé.

### **7.3. Diversidade genética de *P. vivax* na área rural**

Na área rural estudada, nas comunidades do rio Padauri, a transmissão de malária se dá de forma intensa. Nessa área, as pessoas estão expostas continuamente às picadas dos anofelinos vetores com moradias muito próximas dos criadouros e casas que possuem muitas frestas, o que facilita a entrada do mosquito vetor. Além disso, muitos indivíduos trabalham como piaçabeiros, extraíndo a fibra da *Leopoldinia piassaba* para subsistência, se expondo frequentemente dentro das matas (Suárez-Mutis 2007). Devido a estes fatores, esperava-se encontrar uma alta diversidade genética de *P. vivax*, porém foi encontrado um valor de  $H_E$  menor em comparação à área urbana; isto pode ser devido ao menor número de marcadores microssatélites genotipados e ao número reduzido de amostras em relação à área urbana. Por se tratarem de amostras antigas houve dificuldade em amplificar alguns marcadores.

Apesar do valor de  $H_E$  ter sido moderado, foi encontrada uma alta proporção de infecções por múltiplos clones, com aproximadamente 60% dos indivíduos coinfectados com mais de uma variante do parasito e uma baixa taxa de compartilhamento de haplótipos. Assim como na área urbana, também foi encontrado um forte e significativo desequilíbrio de ligação multilocus. O marcador

MS6 foi o que apresentou mais alelos nas áreas urbana e rural e foi responsável por boa parte da detecção de infecções múltiplas. As infecções múltiplas foram detectadas principalmente pelos marcadores MS1, MS6 e *msp1b10* nas duas áreas.

Em relação às infecções recorrentes no mesmo indivíduo (amostras pareadas), foi verificado que indivíduos com infecção assintomática na infecção primária que adquiriram um parasito semelhante geneticamente permaneceram assintomáticos; já indivíduos que adquiriram um parasito geneticamente diferente, apresentaram sintomas, mostrando que variantes genéticas podem fazer com que o indivíduo seja sintomático. Pelo fato do município de Barcelos ser uma área de transmissão permanente, esses episódios recorrentes podem ter sido devido a novas infecções (genótipo diferente da infecção inicial), recrudescências (mesmo genótipo da infecção inicial) ou recaídas, que podem ser causadas tanto por hipnozoítos homólogos, como heterólogos (Imwong et al. 2007b, Araújo et al. 2012). Não foi objetivo do estudo fazer essa diferenciação. Para se classificar como nova infecção ou recaída é necessário realizar um trabalho em uma área não endêmica para ter certeza que o parasito que está sendo encontrado não é derivado de uma reinfeção. Já para detectar recrudescência, é necessário realizar a dosagem plasmática da cloroquina para confirmação, além de coletar a amostras com menos de 30 dias de intervalo (Brasil 2010). Dados na literatura mostram que os MS podem ser ferramentas úteis na identificação de episódios de recaídas, recrudescência e reinfeção. Estudos prévios de Araújo et al. (2012), mostraram que a maioria dos parasitos envolvidos na recaída apresentou haplótipos distintos das infecções primárias, além de terem sido detectadas infecções por múltiplos clones tanto na infecção primária, como na recaída. Neste trabalho foi possível afirmar que se tratava de recaídas, por ter sido realizado com amostras de pacientes cujo diagnóstico e tratamento da malária foram realizados em um hospital de Cuiabá, MT, uma área sem transmissão de malária, onde os indivíduos não foram expostos a uma reinfeção por *P. vivax*. Em outro trabalho realizado no Acre, foi observado que a maioria das infecções recorrentes envolvia parasitos geneticamente distintos, consistentes com novas infecções ou reativação de hipnozoítos heterólogos, não sendo possível distinguir entre esses dois por ter sido realizado em área endêmica (Orjuela-Sánchez et al. 2009). No trabalho de Van den Eede et al. 2010b realizado no Vietnã foi encontrado que 83% dos episódios recorrentes apresentaram perfis genéticos diferentes das infecções anteriores e todos os episódios foram por múltiplos clones. Neste trabalho não foi feita distinção entre nova infecção e

recaída, mas a maioria das infecções recorrentes provavelmente foram recaídas devido à transmissão relativamente baixa nessa área e à ausência de tratamento com primaquina. No trabalho de Boulos et al. (1991), foi encontrado que 95% das recaídas sofridas por pacientes tratados com cloroquina e primaquina e seguidos em um ambiente livre de malária foram diagnosticados durante os primeiros 6 meses de acompanhamento pós-tratamento.

Analisando os dados das nossas amostras pareadas, não foi possível classificar as infecções consecutivas como novas infecções, recaídas ou recrudescência, mas pode-se supor por exemplo, que o indivíduo 25 pode ter tido uma recaída com parasitos homólogos, o indivíduo 31 pode ter tido recaída com parasitos heterólogos ou nova infecção e o indivíduo 35 pode ter tido recaída com parasitos 100% idênticos e na terceira infecção recaída com parasitos heterólogos ou nova infecção. Nesta região, a grande proporção de infecções múltiplas também desafia a distinção entre recaídas e novas infecções. A infecção por malária pode ser induzida pela inoculação de mais de um clone de esporozoítos e mais de um clone podem permanecer inativos até que alguns sejam ativados (Araújo et al. 2012).

#### **7.4. Diversidade genética de *P. vivax* em infecções sintomáticas e assintomáticas nas áreas urbana e rural**

Em relação ao desfecho clínico do indivíduo, na área urbana não foi encontrada diferença no valor de  $H_E$  e na proporção de infecções múltiplas entre os grupos de sintomáticos e assintomáticos, mas foi encontrada distância genética significativa entre esses dois grupos. Já na área rural foram encontradas diferenças na  $H_E$ , proporção de infecções múltiplas e quantidade de alelos exclusivos, cujos parâmetros foram maiores nos indivíduos com infecção assintomática e a distância genética foi significativa e maior que a encontrada na área urbana.

Analisando estes dados, como não foi encontrada diferença na diversidade genética e percentual de infecções múltiplas na área urbana, só na área rural, podemos sugerir que a distância genética entre os dois grupos (assintomático x sintomático), que foi significativa nas duas áreas, foi o que influenciou o desfecho clínico. Essa distância genética foi influenciada pelos alelos exclusivos, bem como pelo fato dos grupos não terem compartilhado nenhum haplótipo tanto na área urbana, como na rural. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por

Batista et al. (2015) que não acharam diferença na proporção de infecções múltiplas entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos, mostrando que as infecções múltiplas não afetavam o risco de malária clínica nos indivíduos. O mesmo achado foi observado por Pava et al. (2017) em trabalho realizado na Indonésia, no qual não foi encontrada diferença na diversidade, nem na proporção de infecções múltiplas entre sintomáticos e assintomáticos.

Para que estratégias de controle e eliminação sejam bem-sucedidas, é necessário identificar a origem e o movimento das populações de *P. vivax*, o que pode ser alcançado pela genotipagem de isolados de várias regiões diferentes. Já foi demonstrado que a genotipagem com microssatélites pode ser usada para mapear a origem dos isolados de países diferentes, em diferentes continentes (Gunawardena et al. 2010, Abdelraheem et al. 2018). Os resultados encontrados no nosso estudo corroboram os achados de outras pesquisas. Dados da literatura mostram que as populações de *P. vivax* apresentam de moderada a alta diversidade genética, alta proporção de infecções múltiplas e um significativo desequilíbrio de ligação em diferentes regiões da Amazônia brasileira: Acre (Ferreira et al. 2007, Orjuela-Sánchez et al. 2009, Salla et al. 2020), Amapá, Rondônia, Pará e Amazonas (Rezende et al. 2010; Batista et al. 2015) e em outras regiões do mundo: Colômbia, Índia, Laos e Tailândia (Imwong et al. 2007a), Sri Lanka (Karunaweera et al. 2008), Vietnã (Van den Eede et al. 2010b), Sri Lanka, Mianmar e Etiópia (Gunawardena et al. 2010), Peru (Van den Eede et al. 2010a), Venezuela (Chenet et al. 2012), Camboja (Orjuela-Sánchez et al. 2013), Tailândia (Congpuong & Ubalee et al. 2017, Kittichai et al. 2017), Catar, Sudão, Etiópia e Índia (Abdelraheem et al. 2018), China, Mianmar e Tailândia (Li et al 2020).

Além disso, essa alta diversidade genética foi encontrada não somente em áreas de alta transmissão (Congpuong & Ubalee et al. 2017, Salla et al. 2020) mas também já foi verificada em áreas com baixa transmissão (Imwong et al. 2007a, Ferreira et al. 2007, Karunaweera et al. 2008, Orjuela-Sánchez et al. 2009, Van den Eede et al. 2010b, Chenet et al. 2012, McCollum et al. 2014, Pacheco et al. 2016, Kittichai et al. 2017), bem como em locais sem transmissão de malária, nos quais foram introduzidos casos importados de outros locais, como no Catar (Abdelraheem et al. 2018). Possivelmente para populações de *P. vivax*, repetidas inoculações policlonais e a presença dos hipnozoítos, que podem ser reativados a qualquer momento, mantêm a população de parasitos altamente diversificada e complexa, apesar da baixa intensidade de transmissão (Van den Eede et al. 2010b). Na

comparação entre populações de diferentes continentes (Ásia, África e América do Sul) *P. vivax* se mostrou mais diverso em populações asiáticas, o que pode estar relacionado com a maior endemicidade de *P. vivax* em países asiáticos (Schousboe et al. 2014, Rougeron et al. 2020).

As populações de *P. vivax* exibem maior diversidade genética e maior proporção de infecções por múltiplos clones do que populações de *P. falciparum* (Neafsey et al. 2012). Esses achados foram observados tanto na Amazônia brasileira no estado do Acre (Ferreira et al. 2007), como em outros países da América do Sul como Venezuela (Chenet et al. 2012) e Colômbia (Pacheco et al. 2016) e na Ásia (Orjuela-Sánchez et al. 2013), comparando-se amostras simpátricas de *P. vivax* e *P. falciparum*. Isto pode ser explicado pelo fato de que nas infecções por *P. vivax* podem ocorrer recaídas, de forma que os hipnozoítos que se acumulam no fígado podem ser ativados simultaneamente resultando na circulação simultânea de genótipos diferentes, gerando as infecções por múltiplos clones (Havryliuk e Ferreira 2009, de Souza et al. 2015). As infecções múltiplas também podem refletir coinfeções (dois ou mais genótipos sendo transmitidos simultaneamente por um mosquito) e superinfecções (um paciente que adquire infecções múltiplas, mas independentes) (Escalante & Pacheco 2019). Estudos feitos por Pacheco et al. 2016 na Colômbia, com casos complicados e não complicados de malária por *P. vivax*, encontraram uma associação significativa entre infecções multiclonais e gravidade da doença, um padrão consistente com observações anteriores feitas em modelos de malária para roedores. Dados de infecções experimentais com camundongos co-infectados com diferentes cepas de *Plasmodium chabaudi* revelaram que em infecções multiclonais a competição favorece cepas com maior virulência (de Roode et al. 2005, Bell et al. 2006). Existem poucos estudos sobre as consequências evolutivas das infecções com múltiplos clones de *P. vivax*, entretanto, Havryliuk e Ferreira (2009) sugeriram que, quando dois ou mais clones geneticamente distintos estão presentes no mesmo hospedeiro, a competição intra-hospedeiro pode selecionar características de *P. vivax* que representam grandes desafios à saúde pública, como aumento da virulência e a resistência à medicamentos antimaláricos. É provável que infecções com múltiplos clones aumentem a diversidade genética através da recombinação entre parasitos com diferentes haplótipos (Van den Eede et al. 2010b).

No trabalho de Lizcano et al. (2014) foram genotipadas por microssatélites amostras com fenótipos resistentes e sensíveis à cloroquina *in vitro* e foram

encontrados alelos exclusivos nos dois grupos. Os alelos 301 e 313 de MS8 e 176 de MS5 foram exclusivos do fenótipo resistente e também foram encontrados no nosso estudo com uma frequência alta e estiveram presentes em todos os anos amostrados. Os dados encontrados por Lizcano et al. (2014) sugerem que os microssatélites podem ser usados para identificar e monitorar a propagação da resistência ao *P. vivax* em todo o mundo, de forma que mais estudos devem ser realizados. Compreender a estrutura genética dos plasmódios é essencial para prever a rapidez com que alguns fenótipos de interesse, como resistência a medicamentos, se originam e se espalham nas populações (Ferreira et al. 2007). Outra característica que pode ser mensurada pela genotipagem por microssatélites é que os medicamentos podem ser menos eficazes com parasitos mais diversos geneticamente. No trabalho de Congpuong & Ubalee et al. (2017) feito na Tailândia, foi observado que isolados de pacientes que levaram mais que 24 horas para que a parasitemia fosse indetectável por microscopia após a primeira dose de cloroquina apresentaram maior diversidade genética em comparação com os que tiveram parasitemia indetectável dentro de 24 horas.

Com o fortalecimento das ações antimaláricas (Brasil 2006) e a implementação de novas tecnologias como os mosquiteiros impregnados com inseticidas de longa duração, que foram adotados a partir do ano de 2009 (Sousa et al. 2019), houve uma queda no número de casos de malária e conseqüentemente pode ter havido uma mudança no perfil genético de *P. vivax*, de forma que alguns haplótipos podem ter sido perdidos. No presente estudo foi notada uma diminuição na diversidade genética do parasito no decorrer dos anos, com um pequeno aumento apenas no ano de 2015, um ano com vários meses epidêmicos, como já foi mostrado. Acredita-se que a estrutura populacional de *P. vivax* parece estar associada à epidemiologia e às medidas de controle de determinada região, que podem modificar a configuração genética do parasito. Em trabalho realizado por Li et al. (2020) em áreas fronteiriças da sub-região do Grande Mekong com amostras coletadas antes e após a ampliação de intervenções de controle, foi encontrado que a diversidade genética do parasito permaneceu alta apesar da redução na incidência, mas o percentual de infecções por múltiplos clones teve diminuição significativa. Segundo os autores, a mobilidade das populações em áreas de fronteira pode introduzir novos parasitos e aumentar a diversidade genética das populações. Para alcançar as metas de controle e eliminação da malária, os levantamentos genéticos populacionais são vitais para mapear a diversidade e a

estrutura das populações locais, estimar a probabilidade de sucesso e medir o resultado dos métodos de intervenção contra a malária e identificação de novos alvos pra intervenções que possam ser usados para entender melhor a transmissão da malária no contexto dos esforços de controle e eliminação (Arnott et al. 2012, Escalante & Pacheco 2019).

Finalmente, destaca-se que este trabalho utilizou um conjunto de marcadores genéticos capaz de detectar alta diversidade genética, infecções múltiplas e de diferenciar populações ao longo do tempo e de acordo com a presença ou não de sintomas no indivíduo. A pesquisa contribuiu para o entendimento da diversidade e estrutura genética de *P. vivax* em um período de 10 anos e foi o primeiro a ser realizado na região do médio rio Negro, em um município altamente endêmico para a doença. Sugere-se que em estudos futuros com *P. vivax* sejam utilizados os mesmos marcadores a fim de que se possa fazer uma comparação entre estudos em populações distintas. A genotipagem pode ser utilizada para o monitoramento epidemiológico com a observação de novos parasitos introduzidos e sua expansão clonal. Diversos países estão empenhados para atingir a meta de eliminação e para que isso seja possível se torna necessário aumentar as medidas de prevenção e controle. Além disso, é necessário avaliar o impacto dessas medidas no número de casos e na circulação de genótipos do parasito que podem estar relacionados com resistência aos medicamentos, às recaídas e aumento da virulência, daí a importância de se conhecer a genética do parasito em diversos locais e contextos epidemiológicos.

## **8. CONCLUSÕES**

8.1. O estudo dos casos de malária com dados da vigilância epidemiológica permitiu concluir que o município de Barcelos é uma área de alto risco epidemiológico, tendo apresentado um valor de IPA muito acima de 50 casos por mil habitantes em todos os anos estudados; foi possível também identificar anos epidêmicos, como foram os anos de 2006 e 2007 e posteriormente vários meses epidêmicos em 2015 e 2016. Os anos de 2017 e 2018 foram anos epidêmicos; *P. vivax* foi o parasito mais prevalente em todo o período de estudo.

8.2. Foram identificadas as frequências alélicas e haplótipos dos isolados de *P. vivax* nas áreas urbana e rural e notou-se uma grande substituição dos haplótipos, o que já era esperado pelo fato dos microssatélites possuírem um alto nível de mutação originando novos haplótipos. O marcador com maior número de alelos em ambas as áreas foi MS6, sendo então o mais diverso.

8.3. Foi encontrada uma alta proporção de infecções múltiplas, 33,9% na área urbana e 57,7% na área rural. Essas infecções múltiplas foram detectadas principalmente pelos marcadores MS1, MS6 e *msh10* nas duas áreas.

8.4. A área rural apresentou menor diversidade do que a área urbana, mas a proporção de infecções múltiplas foi maior. Contudo, essa comparação é limitada devido ao número diferente de marcadores e de amostras utilizados; as amostras da área rural eram antigas e tinham o DNA mais degradado; por esse motivo, alguns marcadores não amplificaram bem.

8.5. Quando comparados os anos amostrados na área urbana, conclui-se que o perfil genético dos parasitos circulantes de *P. vivax* muda com o tempo e que há uma grande substituição de haplótipos, de modo que a distância genética entre os anos foi significativa.

8.6. Foi visto que em anos epidêmicos, como em 2006, foi possível encontrar maior diversidade e proporção de infecções múltiplas do que nos demais anos, mostrando que pode ocorrer maior número de parasitos geneticamente distintos circulando em períodos epidêmicos. A genotipagem com os microssatélites também foi capaz de identificar através de uma análise populacional um surto de malária com parasitos geneticamente relacionados ocorrido no ano de 2015. Estes dados permitiram concluir que a diversidade genética de *P. vivax* é influenciada pelos padrões de transmissão de malária, se relacionando com a incidência ao longo do tempo.

8.7. Não foi encontrada relação entre distância genética e distância geográfica nas populações de *P. vivax* nos bairros na área urbana, sendo necessário utilizar localidades mais distantes geograficamente para fazer este tipo de análise, devido à capacidade de vôo dos vetores ultrapassar os limites dos bairros estudados;

8.8. Não foi encontrada relação entre diversidade genética e infecção múltipla no que diz respeito ao desfecho clínico do indivíduo, porém foi encontrado que os grupos (sintomáticos x assintomáticos) não compartilharam haplótipos, supondo-se que a distância genética entre os dois grupos foi o que influenciou o desfecho clínico. Na área rural foi possível sugerir a partir da análise de amostras pareadas no mesmo indivíduo que quando um indivíduo com infecção assintomática na primeira infecção é infectado com um parasito geneticamente diferente na segunda infecção, este pode desenvolver sintomas.

## **9. PERSPECTIVAS**

Realizar novas coletas nas áreas urbana e rural, bem como em outras localidades rurais do município de Barcelos em um mesmo espaço de tempo, em períodos de baixa e de alta transmissão a fim de comparar a genética do parasito entre as localidades buscando um possível distanciamento espacial. Realizar a genotipagem de amostras de diferentes locais da Amazônia brasileira com diferentes taxas de incidência da doença utilizando o mesmo grupo de marcadores para se possa ter uma comparação fidedigna, a fim de estudar como o parasito está se distribuindo. Também é importante genotipar amostras de recrudescência, com dosagem de cloroquina com o objetivo de associar a genética do parasito com a resistência ao medicamento.

## 10. REFERÊNCIAS

- Abdelraheem MH, Bansal D, Idris MA, Mukhtar MM, Hamid MMA, Imam ZS, Getachew S, Sehgal R, Kaur H, Gadalla AH, Al-Hamidhi S, Al-Hashami Z, Al-Jabri A, Sultan AA, Babiker HA 2018. Genetic diversity and transmissibility of imported *Plasmodium vivax* in Qatar and three countries of origin. *Sci. Rep.* 8: 1–9.
- Adams JH, Mueller I 2017. The biology of *Plasmodium vivax*. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7: 1–12.
- Alecrim MDGC, Alecrim W, Macedo V 1999. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32: 67–68.
- Alves FP, Gil LHS, Marrelli MT, Ribolla PEM, Camargo EP, Silva LHP Da 2005. Asymptomatic carriers of *Plasmodium spp.* as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J. Med. Entomol.* 42: 777–779.
- Anderson TJC, Su XZ, Bockarie M, Lagog M, Day KP 1999. Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. *Parasitology* 119: 113–125.
- Andrade SL 2005. *Aspectos Epidemiológicos Da Malária No Parque Nacional Do Jaú, Amazonas, Brasil*, Tese PhD, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro, 296 p.
- Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarncio J, Camargo LM, Barral A, Barral-Netto M 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar. J.* 9.
- Anstey NM, Douglas NM, Poespoprodjo JR, Price RN 2012. *Plasmodium vivax*: Clinical Spectrum, Risk Factors and Pathogenesis. *Adv. Parasitol.* 80: 151–201.
- Araujo FCF 2012. *Estudo comparativo da variabilidade genética de Plasmodium vivax provenientes de infecções primárias e episódios de recaída após tratamento com Primaquina e Cloroquina*, Dissertação do Mestrado, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte.
- Araujo FCF de, Rezende AM de, Fontes CJF, Carvalho LH, Alves de Brito CF 2012. Multiple-Clone Activation of Hypnozoites Is the Leading Cause of Relapse in *Plasmodium vivax* Infection. *PLoS One* 7: 1–9.

- Arnott A, Barry AE, Reeder JC 2012. Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination. *Malar. J.* 11: 1–10.
- Baird JK 2013. Evidence and implications of mortality associated with acute *Plasmodium vivax* malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 26: 36–57.
- Baird JK, Valecha N, Duparc S, White NJ, Price RN 2016. Diagnosis and treatment of *Plasmodium vivax* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 95: 35–51.
- Barbosa S, Gozze AB, Lima NF, Batista CL, Bastos M da S, Nicolete VC, Fontoura PS, Gonçalves RM, Viana SAS, Menezes MJ, Scopel KKG, Cavasini CE, Malafronte R dos S, Silva-Nunes M da, Vinetz JM, Castro MC, Ferreira MU 2014. Epidemiology of Disappearing *Plasmodium vivax* Malaria: A Case Study in Rural Amazonia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8.
- Barry AE, Waltmann A, Koepfli C, Barnadas C, Mueller I 2015. Uncovering the transmission dynamics of *Plasmodium vivax* using population genetics. *Pathog. Glob. Health* 109: 142–152.
- Batista CL 2014. *Diversidade genética em Plasmodium vivax: variação temporal e espacial em uma comunidade rural Amazônica*, Dissertação do Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Batista CL, Barbosa S, Silva Bastos M Da, Viana SAS, Ferreira MU 2015. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* over time and space: A community-based study in rural Amazonia. *Parasitology* 142: 374–384.
- Bell AS, Roode JC de, Sim D, Read AF 2006. Within-Host Competition in Genetically Diverse Malaria Infections: Parasite Virulence and Competitive Success. *Evolution (N. Y.)*. 60: 1358.
- Boulos M, Amato Neto V, Dutra AP, Santi SM Di, Shiroma M 1991. Frequency of malaria relapse due to *Plasmodium vivax* in a non-endemic region (São Paulo, Brazil). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 33: 143–146.
- Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C 2014. Asymptomatic malaria infections: Detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat. Rev. Microbiol.* 12: 833–840.

- Braga EM, Fontes CJF 2011. *Plasmodium* – malária. In Neves DP (ed.), Parasitologia humana, 12 ed., São Paulo: Editora Atheneu, p.155-176
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde 2003. Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM). Brasília/DF
- Brasil. Tribunal de Contas da União 2004. Relatório de avaliação de programa: Programa Nacional de Controle da Malária. Brasília/DF
- Brasil. Ministério da Saúde 2005. Guia de vigilância epidemiológica. 6 ed. Brasília/DF.
- Brasil. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica 2006. Ações de Controle da Malária: Manual para Profissionais de Saúde na Atenção Básica. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília/DF.
- Brasil. Ministério da Saúde 2008. Cadernos de atenção básica: Vigilância em saúde. 2 ed. Brasília/DF
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde 2009a. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. 2 ed .Brasília/DF.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde 2009b. Guia de vigilância epidemiológica. 7 ed .Brasília/DF.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica 2010. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília/DF.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde 2013. Boletim epidemiológico 2013. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. Brasília/DF.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde 2015a. Boletim epidemiológico 2013. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2012 e 2013. Brasília/DF.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde 2015b. Boletim epidemiológico 2013. Malária: Monitoramento dos casos no Brasil em 2014. Brasília/DF.

- Brasil. Ministério da Saúde 2019a. Brasil reduz em 38% casos de malária em relação a 2018. [acesso em Out. 2019]. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45391-brasil-reduz-em-38-casos-de-malaria-em-relacao-a-2018>.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis 2019b. Guia de tratamento da malária no Brasil. Brasília/DF.
- Brasil. Ministério da Saúde 2019c. Eliminação da malária no Brasil é discutida durante evento. [acesso em Ago. 2020]. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/noticias/svs/45423-eliminacao-da-malaria-no-brasil-e-discutida-durante-evento>
- Brasil. Ministério da Saúde 2019d. Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2018. [acesso em Out. 2019]. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/31/Mapa-de-risco-da-mal-ria-por-munic--pio-de-infec----o-Brasil-2018-.pdf>.
- Brasil. Ministério da Saúde 2020. Lista de municípios pertencentes às áreas de risco ou endêmicas para malária. [acesso em Jan. 2020]. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/25/Lista-de-municipios-pertencentes-as-areas-de-risco-ou-endemicas-para-malaria.pdf>
- Brasil P, Zalis MG, Pina-Costa A de, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, Areas ALL, Pelajo-Machado M, Alvarenga DAM de, Silva Santelli ACF da, Albuquerque HG, Cravo P, Santos de Abreu FV, Peterka CL, Zanini GM, Suárez Mutis MC, Pissinatti A, Lourenço-de-Oliveira R, Brito CFA de, Fátima Ferreira-da-Cruz M de, Culleton R, Daniel-Ribeiro CT 2017. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: A molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob. Heal.* 5: e1038–46.
- Brito CFA de, Ferreira MU 2011. Molecular markers and genetic diversity of *Plasmodium vivax*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106: 12–26.
- Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, Crabtree J, Angiuoli S V., Merino EF, Amedeo P, Cheng Q, Coulson RMR, Crabb BS, Portillo HA Del, Essien K, Feldblyum T V., Fernandez-Becerra C, Gilson PR, Gueye AH, Guo X, Kang'A S, Kooij TWA, Korsinczky M, Meyer EVS, Nene V, Paulsen I, White O, Ralph SA, Ren Q, Sargeant TJ, Salzberg SL, Stoeckert CJ, Sullivan SA, Yamamoto MM, Hoffman SL, Wortman JR, Gardner MJ, Galinski MR, Barnwell JW, Fraser-Liggett CM 2008. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* 455: 757–763.

- Carvalho TAA, Queiroz MG, Cardoso GL, Diniz IG, Silva ANLM, Pinto AYN, Guerreiro JF 2012. *Plasmodium vivax* infection in Anajás, State of Pará: No differential resistance profile among Duffy-negative and Duffy-positive individuals. *Malar. J.* 11: 2–7.
- Cavasini CE, Mattos LC de, Couto ÁADA, Bonini-Domingos CR, Valencia SH, Neiras WC de S, Alves RT, Rossit ARB, Castilho L, Machado RLD 2007. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101: 1042–1044.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention 2019. Malaria - Biology. [acesso em Out. 2019]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>.
- Cevallos WT 2001. *Estudo do processo de transmissão da malária humana na sede do município de Barcelos, Estado do Amazonas, Brasil*, Dissertação do Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Charlwood JD, Alecrim WA 1989. Capture-recapture studies with the South American malaria vector *Anopheles darlingi*, *Root. Ann. Trop. Med. Parasitol.* 83: 569–576.
- Chehuan YF, Costa MR, Costa JS, Alecrim MG, Nogueira F, Silveira H, Brasil LW, Melo GC, Monteiro WM, Lacerda MV 2013. In vitro chloroquine resistance for *Plasmodium vivax* isolates from the Western Brazilian Amazon. *Malar. J.* 12: 1–5.
- Chenet SM, Schneider KA, Villegas L, Escalante AA 2012. Local population structure of *Plasmodium*: Impact on malaria control and elimination. *Malar. J.* 11: 1–13.
- Congpuong K, Ubalee R 2017. Population genetics of *Plasmodium vivax* in four high malaria endemic areas in Thailand. *Korean J. Parasitol.* 55: 465–472.
- Coura JR, Suárez-Mutis M, Ladeia-Andrade S 2006. A new challenge for malaria control in Brazil: Asymptomatic *Plasmodium* infection - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101: 229–237.
- Cox-singh J, Davis TME 2008. Europe PMC Funders Group *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life-threatening. *Clin. Infect. Dis.* 46: 165–171.
- Dayanand KK, Achur RN, Gowda DC 2018. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. *J. Vector Borne Dis.* 55: 1–8.

- Deane LM 1986. Malaria vectors in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2: 5-14.
- de Santana Filho FS, Arcanjo ARDL, Chehuan YM, Costa MR, Martinez-Espinosa FE, Vieira JL, Barbosa MDGV, Alecrim WD, Alecrim MDGC 2007. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon [8]. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 1125–1126.
- de Souza AM, Araújo FCF de, Fontes CJF, Carvalho LH, Brito CFA De, Sousa TN De 2015. Multiple-clone infections of *Plasmodium vivax*: Definition of a panel of markers for molecular epidemiology. *Malar. J.* 14: 1–10.
- de Roode JC, Pansini R, Cheesman SJ, Helinski MEH, Huijben S, Wargo AR, Bell AS, Chan BHK, Walliker D, Read AF 2005. Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 7624–7628.
- Earl DA, vonHoldt BM 2012. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4: 359–361.
- Ellegren H 2004. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nat. Rev. Genet.* 5: 435–445.
- Escalante AA, Pacheco MA 2019. Malaria Molecular Epidemiology: An Evolutionary Genetics Perspective. *Microbiol. Spectr.* 7: 1–26.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611–2620.
- Ferreira MU, Karunaweera ND, Silva-Nunes M Da, Silva NS Da, Wirth DF, Hartl DL 2007. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. *J. Infect. Dis.* 195: 1218–1226.
- Gonzalez-Ceron L, Mu J, Santillán F, Joy D, Sandoval MA, Camas G, Su X, Choy E V., Torreblanca R 2013. Molecular and epidemiological characterization of *Plasmodium vivax* recurrent infections in southern Mexico. *Parasites and Vectors* 6: 1–12.

- Gunawardena S, Karunaweera ND, Ferreira MU, Phone-Kyaw M, Pollack RJ, Alifrangis M, Rajakaruna RS, Konradsen F, Amerasinghe PH, Schousboe ML, Galappaththy GNL, Abeyasinghe RR, Hartl DL, Wirth DF 2010. Geographic structure of *Plasmodium vivax*: Microsatellite analysis of parasite populations from Sri Lanka, Myanmar, and Ethiopia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82: 235–242.
- Haubold B, Hudson RR 2000. LIAN 3.0: Detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Bioinformatics* 16: 847–848.
- Havryliuk T, Ferreira MU 2009. A closer look at multiple-clone *Plasmodium vivax* infections: Detection methods, prevalence and consequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 67–73.
- Hiwat H, Bretas G 2011. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: A review. *Parasites and Vectors* 4: 1–13.
- Howes RE, Battle KE, Mendis KN, Smith DL, Cibulskis RE, Baird JK, Hay SI 2016. Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 95: 15–34.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) 2015. Amazonas/Barcelos: informações completas. [acesso em Abr. 2015]. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=130040>.
- Imwong M, Nair S, Pukrittayakamee S, Sudimack D, Williams JT, Mayxay M, Newton PN, Kim JR, Nandy A, Osorio L, Carlton JM, White NJ, Day NPJ, Anderson TJC 2007a. Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America. *Int. J. Parasitol.* 37: 1013–1022.
- Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Jung RK, Nandy A, Guthmann JP, Nosten F, Carlton J, Looareesuwan S, Nair S, Sudimack D, Day NPJ, Anderson TJC, White NJ 2007b. Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J. Infect. Dis.* 195: 927–933.
- IPEA - Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada 2014. Objetivos de desenvolvimento do milênio: Relatório nacional de acompanhamento. Brasília/DF.
- Jennison C, Arnott A, Tessier N, Tavul L, Koepfli C, Felger I, Siba PM, Reeder JC, Bahlo M, Mueller I, Barry AE 2015. *Plasmodium vivax* Populations Are More Genetically Diverse and Less Structured than Sympatric *Plasmodium falciparum* Populations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9: 1–20.

- Karunaweera ND, Ferreira MU, Munasinghe A, Barnwell JW, Collins WE, King CL, Kawamoto F, Hartl DL, Wirth DF 2008. Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Gene* 410: 105–112.
- Kittichai V, Koepfli C, Nguitragool W, Sattabongkot J, Cui L 2017. Substantial population structure of *Plasmodium vivax* in Thailand facilitates identification of the sources of residual transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11: 1–14.
- Koepfli C, Ross A, Kiniboro B, Smith TA, Zimmerman PA, Siba P, Mueller I, Felger I 2011. Multiplicity and diversity of *Plasmodium vivax* infections in a highly endemic region in Papua New Guinea. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5: 1–7.
- Koepfli C, Timinao L, Antao T, Barry AE, Siba P, Mueller I, Felger I 2013. A Large *Plasmodium vivax* Reservoir and Little Population Structure in the South Pacific. *PLoS One* 8: 1–9.
- Lacerda MVG, Fragoso SCP, Alecrim MGC, Alexandre MAA, Magalhães BML, Siqueira AM, Ferreira LCL, Araújo JR, Mourão MPG, Ferrer M, Castillo P, Martin-Jaular L, Fernandez-Becerra C, Portillo H Del, Ordi J, Alonso PL, Bassat Q 2012. Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria: To what extent does this parasite kill? *Clin. Infect. Dis.* 55: 67–74.
- Ladeia-Andrade S, Menezes MJ, Sousa TN de, Silvino ACR, Carvalho JF de, Salla LC, Nery OA, Melo GNP De, Corder RM, Rodrigues PT, Ferreira MU 2019. Monitoring the Efficacy of Chloroquine-Primaquine Therapy for Uncomplicated *Plasmodium vivax* Malaria in the Main Transmission Hot Spot of Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63: 1–14.
- Lapouble OMM, Santelli ACFES, Muniz-Junqueira MI 2015. Situação epidemiológica da malária na região amazônica brasileira, 2003 a 2012. *Rev. Panam. Salud Publica* 38: 300–306.
- Li Y, Hu Y, Zhao Y, Wang Q, Ngassa Mbenda HG, Kittichai V, Lawpoolsri S, Sattabongkot J, Menezes L, Liu X, Cui L, Cao Y 2020. Dynamics of *Plasmodium vivax* populations in border areas of the Greater Mekong sub-region during malaria elimination. *Malar. J.* 19: 1–12.
- Litt M, Luty JA 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397–401.

- Lizcano OV 2013. *Potenciais biomarcadores da resistência à cloroquina em Plasmodium vivax*, Dissertação do Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências de Saúde Faculdade de Medicina, Rio de Janeiro.
- Lizcano OV, Resende SS, Chehuan YF, Lacerda MVG, Brito CFA, Zalis MG 2014. Genetic diversity of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* parasites from the western Brazilian Amazon. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109: 948–951.
- Luo Z, Sullivan SA, Carlton JM 2015. The biology of *Plasmodium vivax* explored through genomics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1342: 53–61.
- Menegon M, Bardají A, Martínez-Espinosa F, Bôtto-Menezes C, Ome-Kaius M, Mueller I, Betuela I, Arévalo-Herrera M, Kochar S, Kochar SK, Jaju P, Hans D, Chitnis C, Padilla N, Castellanos ME, Ortiz L, Sanz S, Piqueras M, Desai M, Mayor A, Portillo H Del, Menéndez C, Severini C 2016. Microsatellite genotyping of *Plasmodium vivax* isolates from pregnant women in four malaria endemic countries. *PLoS One* 11: 1–13.
- Manrique P, Miranda-Alban J, Alarcon-Baldeon J, Ramirez R, Carrasco-Escobar G, Herrera H, Guzman-Guzman M, Rosas-Aguirre A, Llanos-Cuentas A, Vinetz JM, Escalante AA, Gamboa D 2019. Microsatellite analysis reveals connectivity among geographically distant transmission zones of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon: A critical barrier to regional malaria elimination. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13: 1–22.
- Martins AC, Lins JB, Santos LM, Fernandes LN, Malafronte RS, Maia TC, Ribera MC, Ribera RB, Silva-Nunes M Da 2014. Vivax malaria in an Amazonian child with dilated cardiomyopathy. *Malar. J.* 13: 1–9.
- Martins-Campos KM, Kuehn A, Almeida A, Duarte APM, Sampaio VS, Rodriguez IC, Silva SGM Da, Ríos-Velásquez CM, Lima JBP, Pimenta PFP, Bassat Q, Müller I, Lacerda M, Monteiro WM, Guerra MDGVB 2018. Infection of *Anopheles aquasalis* from symptomatic and asymptomatic *Plasmodium vivax* infections in Manaus, western Brazilian Amazon. *Parasites and Vectors* 11: 1–11.
- McCollum AM, Soberon V, Salas CJ, Santolalla ML, Udhayakumar V, Escalante AA, Graf PC, Durand S, Cabezas C, Bacon DJ 2014. Genetic variation and recurrent parasitaemia in Peruvian *Plasmodium vivax* populations. *Malar. J.* 13: 1–12.
- Ménard D, Barnadas C, Bouchier C, Henry-Halldin C, Gray LR, Ratsimbaoa A, Thonier V, Carod JF, Domarle O, Colin Y, Bertrand O, Picot J, King CL, Grimberg BT, Mercereau-Puijalon O, Zimmerman PA 2010. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 5967–5971.

- Mendes C, Dias F, Figueiredo J, Mora VG, Cano J, Sousa B de, Rosário VE do, Benito A, Berzosa P, Arez AP 2011. Duffy negative antigen is no longer a barrier to *Plasmodium vivax* - molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5: 2–7.
- Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R 2001. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64: 97–106.
- Mueller I, Galinski MR, Tsuboi T, Arevalo-Herrera M, Collins WE, King CL 2013. Natural Acquisition of Immunity to *Plasmodium vivax*. Epidemiological Observations and Potential Targets. *Adv. Parasitol.* 81: 77-131.
- Neafsey DE, Galinsky K, Jiang RHY, Young L, Sykes SM, Saif S, Gujja S, Goldberg JM, Young S, Zeng Q, Chapman SB, Dash AP, Anvikar AR, Sutton PL, Birren BW, Escalante AA, Barnwell JW, Carlton JM 2012. The malaria parasite *Plasmodium vivax* exhibits greater genetic diversity than *Plasmodium falciparum*. *Nat. Genet.* 44: 1046–1050.
- Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT 2010. Malaria in Brazil: An overview. *Malar. J.* 9: 1–15.
- Olliaro PL, Barnwell JW, Barry A, Mendis K, Mueller I, Reeder JC, Shanks GD, Snounou G, Wongsrichanalai C 2016. Implications of *Plasmodium vivax* biology for control, elimination, and research. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 95: 4–14.
- ONU. Organização das Nações Unidas 2014. OMS revela que casos de malária caíram 47% no mundo. Brasil reduz em 75% a incidência da doença. [acesso em Abr. 2015]. Disponível em: <http://nacoesunidas.org/oms-revela-que-infeccao-de-malaria-caiu-47-no-mundo-brasil-reduz-em-75-a-incidencia-da-doenca/>.
- ONU. Organização das Nações Unidas 2000. Podemos erradicar la pobreza 2015: Objetivos de desarrollo del milenio. [acesso em Abr. 2014]. Disponível em: <http://www.un.org/spanish/millenniumgoals/aids.shtml>.
- Orjuela-Sánchez P, Silva NS Da, Silva-Nunes M Da, Ferreira MU 2009. Recurrent parasitemias and population dynamics of *Plasmodium vivax* polymorphisms in rural Amazonia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81: 961–968.
- Orjuela-Sánchez P, Sá JM, Brandi MCC, Rodrigues PT, Bastos MS, Amaratunga C, Duong S, Fairhurst RM, Ferreira MU 2013. Higher microsatellite diversity in *Plasmodium vivax* than in sympatric *Plasmodium falciparum* populations in Pursat, Western Cambodia. *Exp. Parasitol.* 134: 318–326.

- Pacheco MA, Lopez-Perez M, Vallejo AF, Herrera S, Arévalo-Herrera M, Escalante AA 2016. Multiplicity of Infection and Disease Severity in *Plasmodium vivax*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10: 1–18.
- Pava Z, Handayani I, Trianty L, Utami RAS, Tirta YK, Puspitasari AM, Burdam F, Kenangalem E, Wirjanata G, Kho S, Trimarsanto H, Anstey N, Poespoprodjo JR, Noviyanti R, Price RN, Marfurt J, Auburn S 2017. Passively versus actively detected malaria: Similar genetic diversity but different complexity of infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 97: 1788–1796.
- Pethleart A, Prajakwong S, Suwonkerd W, Corthong B, Webber R, Curtis C 2004. Infectious reservoir of *Plasmodium* infection in Mae Hong Son Province, north-west Thailand. *Malar. J.* 3: 34.
- Poirier P, Doderer-Lang C, Atchade PS, Lemoine JP, L'Isle MLC De, Abou-Bacar A, Pfaff AW, Brunet J, Arnoux L, Haar E, Filisetti D, Perrotey S, Chabi NW, Akpovi CD, Anani L, Bigot A, Sanni A, Candolfi E 2016. The hide and seek of *Plasmodium vivax* in West Africa: Report from a large-scale study in Beninese asymptomatic subjects. *Malar. J.* 15: 1–9.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Sakihama N, Ferreira MU, Kho WG, Kaneko A, Kanbara H, Hattori T, Tanabe K 2002. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 16348–16353.
- Rezende AM 2009. *Estudo da variabilidade de isolados de Plasmodium vivax de áreas endêmicas na Amazônia Brasileira*, Dissertação do Mestrado, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte.
- Rezende AM, Tarazona-Santos E, Couto ÁDA, Fontes CJF, Souza JM De, Carvalho LH, Brito CFA 2009. Analysis of genetic variability of *Plasmodium vivax* isolates from different Brazilian Amazon areas using tandem repeats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80: 729–733.
- Rezende AM, Tarazona-Santos E, Fontes CJF, Souza JM, Couto ADA, Carvalho LH, Brito CFA 2010. Microsatellite loci: Determining the genetic variability of *Plasmodium vivax*. *Trop. Med. Int. Heal.* 15: 718–726.
- Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC 1989. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? *Lancet* 334: 1183–1184.

- Rougeron V, Elguero E, Arnathau C, Hidalgo BA, Durand P, Houze S, Berry A, Zakeri S, Haque R, Alam MS, Nosten F, Severini C, Woldearegai TG, Mordmüller B, Kremsner PG, González-Cerón L, Fontecha G, Gamboa D, Musset L, Legrand E, Noya O, Pumpaibool T, Harnyuttanakorn P, Lekweiry KM, Albsheer MM, Hamid MMA, Boukary AOMS, Trape JF, Renaud F, Prugnolle F 2020. Human *Plasmodium vivax* diversity, population structure and evolutionary origin. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14: 1–17.
- Russell B, Suwanarusk R, Lek-Uthai U 2006. *Plasmodium vivax* genetic diversity: microsatellite length matters. *Trends Parasitol.* 22: 399–401.
- Salla LC, Rodrigues PT, Corder RM, Johansen IC, Ladeia-Andrade S, Ferreira MU 2020. Molecular evidence of sustained urban malaria transmission in Amazonian Brazil, 2014-2015. *Epidemiol. Infect.*: 2014–2015.
- Schousboe ML, Ranjitkar S, Rajakaruna RS, Amerasinghe PH, Konradsen F, Morales F, Ord R, Pearce R, Leslie T, Rowland M, Gadalla N, Bygbjerg IC, Alifrangis M, Roper C 2014. Global and local genetic diversity at two microsatellite loci in *Plasmodium vivax* parasites from Asia, Africa and South America. *Malar. J.* 13: 1–9.
- SIM/DATASUS/MS 2020. Sistema de Informação sobre Mortalidade. Ministério da Saúde, Brasil.
- Sivep-Malária 2019. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária. Ministério da Saúde, Brasil.
- Sivep-Malária 2020. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária. Ministério da Saúde, Brasil.
- Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN 1993. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58: 283–292.
- Sousa JO 2015. *Uso e retenção de mosquiteiros impregnados e efeito de ação educativa em malária após cinco anos de uma intervenção em uma área de alta endemicidade no médio rio Negro, Amazonas, Brasil*, Dissertação do Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Sousa JO de, Albuquerque BC De, Coura JR, Suárez-Mutis MC 2019. Use and retention of long-lasting insecticidal nets (LLINs) in a malaria risk area in the Brazilian Amazon: A 5-year follow-up intervention. *Malar. J.* 18: 1–13.

- Souza PF, Xavier DR, Mutis MCS, Mota JC da, Peiter PC, Matos VP de, Avelar Figueiredo Mafra Magalhães M De, Barcellos C 2019. Spatial spread of malaria and economic frontier expansion in the Brazilian Amazon. *PLoS One* 14: 1–25.
- Suárez-Mutis MC 2007. *Epidemiologia da malária em comunidades do rio Padauri, médio rio Negro, uma área de extrativismo vegetal da piaçaba no estado de Amazonas*, Tese PhD, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Suárez-Mutis MC, Coura JR 2007. Mudanças no padrão epidemiológico da malária em área rural do médio Rio Negro, Amazônia brasileira: análise retrospectiva. *Cad. Saude Publica* 23: 795–804.
- Suárez-Mutis MC, Cuervo P, Leoratti FMS, Moraes-Avila SL, Ferreira AW, Fernandes O, Coura JR 2007. Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 49: 159–164.
- Suárez-Mutis MC, Fé NF, Alecrim W, Coura JR 2009. Night and crepuscular mosquitoes and risk of vector-borne diseases in areas of piassaba extraction in the middle Negro River basin, state of Amazonas, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 11–17.
- Suárez-Mutis MC, Martinez-Espinosa FE, Albuquerque BC 2013. Malária. In JR Coura (ed.), *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 885-910.
- Suárez-Mutis MC, Martinez-Espinosa FE 2019. Malária. In JR Coura, NG Pereira (ed.), *Fundamentos das doenças infecciosas e parasitárias*, 1 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, p. 279-293.
- Sutton PL 2013. A call to arms: On refining *Plasmodium vivax* microsatellite marker panels for comparing global diversity. *Malar. J.* 12: 1–12.
- Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, Lampah DA, Price RN 2008. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: A prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med.* 5: 0890–0899.
- Van den Eede P, Auwera G Van Der, Delgado C, Huyse T, Soto-Calle VE, Gamboa D, Grande T, Rodriguez H, Llanos A, Anné J, Erhart A, D'Alessandro U 2010a. Multilocus genotyping reveals high heterogeneity and strong local population structure of the *Plasmodium vivax* population in the Peruvian Amazon. *Malar. J.* 9: 1–12.

- Van den Eede P, Erhart A, Auwera G Van Der, Overmeir C Van, Thang ND, Hung LX, Anné J, D'Alessandro U 2010b. High complexity of *Plasmodium vivax* infections in symptomatic patients from a rural community in central Vietnam detected by microsatellite genotyping. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82: 223–227.
- Weber JL 1990. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> · (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics* 7: 524–530.
- White NJ 2011. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar. J.* 10.
- WHO. World Health Organization. 2007. Guidelines on the elimination of residual foci of malaria transmission. Geneva.
- WHO. World Health Organization 2015a. Global Technical Strategy for Malaria 2016–2030. Geneva.
- WHO. World Health Organization 2015b. Guidelines for the treatment of malária. 3ed, Geneva.
- WHO. World Health Organization 2018. World Malaria Report. Geneva.
- WHO. World Health Organization 2019. World Malaria Report. Geneva.
- Wright S 1965. The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating. *Evolution (N. Y.)*. 19: 395-420.

## Apêndice 1: Protocolo PCR marcadores de *P. vivax*

### PCR AMPLIFICAÇÃO DE MICROSSATÉLITES

- MS1, MS2, MS5, MS6, MS7 e MS8

Conc. dos reagentes	Vf = 20 µL	MS1	MS2	MS5	MS6	MS7	MS8
[Estoque]	Reagentes (µL)	Primers 6838	Primers 6835	Primers 6569	Primers 6605	Primers 6745	Primers 6877
-	H2O	9,2	12,2	9,2	9,2	9,2	9,2
10x	Tampão	2	2	2	2	2	2
1,25 mM	dNTPs	2	2	2	2	2	2
10 µM	pF e pR	2+2	1+1	2+2	2+2	2+2	2+2
50 mM	MgCl <sub>2</sub>	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
5 U	Taq	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	DNA	2	1	2	2	2	2

Ciclagem: "Máq. Azul" Applied Biosystem Veriti 96 well Thermal Cycle		MS	MS1	MS2	MS5	MS6	MS7	MS8
Tm (X)			53,4 °C	60,0 °C	56,0 °C	58,6 °C	57,0 °C	60,0 °C
Ciclos			35x	40x	40x	40x	40x	40x
94 °C, 2 min		Tamanho do fragmento (pb)	224-248	290-312	173-215	194-298	349-388	249-325
94 °C, 30 segs	Ciclos							
X, 20 segs		Unidade repetitiva	GT9	CA12	CAT10	TGA19	TAA22	TGTA7
72 °C, 30 segs								
72 °C, 2 min								
4 °C, ∞								

- *msp1* bloco 2 e 10

Conc. dos reagentes	Vf = 10 µL	<i>msp1bl 2 e 10</i>	Programa PCR
[Estoque]	Reagentes (µL)	1ª reação (Externo)	Ciclagem: "Máq. Azul" Applied Biosystem Veriti 96 well Thermal Cycle
-	H2O	5,65	94 °C, 4 min
10x	Tampão	1	94 °C, 1 min
1,25 mM	dNTPs	1	X °C, 1 min
10 µM	pF e pR	0,5+0,5	72 °C, 30 segs
50 mM	MgCl <sub>2</sub>	0,15	72 °C, 5 min
5 U	Taq	0,2	4 °C, ∞
	DNA	1	X = 63 °C BI10, 55 °C BI2

Conc. dos reagentes	Vf = 20 µL	<i>msp1bl 2 e 10</i>	Programa PCR
[Estoque]	Reagentes (µL)	2ª reação (Interno) Vf = 20 µL	Ciclagem: "Máq. Azul" Applied Biosystem Veriti 96 well Thermal Cycle
-	H2O	11,2	94 °C, 4 min
10x	Tampão	2	94 °C, 40 segs
1,25 mM	dNTPs	2	X °C, 30 segs
10 µM	pF e pR	1+1	72 °C, 40 segs
50 mM	MgCl <sub>2</sub>	1,2	72 °C, 7 min
5 U	Taq	0,3	4 °C, ∞
	DNA	1	X = 60 °C BI10, 63 °C BI2

**Apêndice 2: Quadro mostrando os haplótipos encontrados nos anos estudados na área urbana, os haplótipos mais frequentes estão em negrito.**

**2006**

	<b>Frequência</b>	<b>Haplótipo</b>								
1	0.031250	244	298	185	209	352	301	429	266	
2	0.031250	244	298	173	209	388	309	429	266	
3	0.031250	244	308	176	281	352	309	429	266	
4	0.031250	244	298	179	209	364	309	429	226	
5	0.031250	244	298	185	218	352	313	414	226	
6	0.031250	250	298	182	209	352	309	425	224	
7	0.031250	250	298	182	281	349	305	425	252	
<b>8</b>	<b>0.062500</b>	<b>250</b>	<b>298</b>	<b>182</b>	<b>281</b>	<b>349</b>	<b>309</b>	<b>425</b>	<b>252</b>	
9	0.031250	244	262	173	242	352	301	409	291	
10	0.031250	244	262	176	233	352	309	429	266	
11	0.031250	244	294	173	200	427	309	429	266	
12	0.031250	244	308	200	209	385	309	425	226	
13	0.031250	244	298	173	209	385	309	425	226	
14	0.031250	238	308	173	209	349	309	429	266	
15	0.031250	244	298	173	218	349	309	425	226	
16	0.031250	244	298	173	257	385	313	425	226	
17	0.031250	244	298	173	239	349	305	425	252	
18	0.031250	244	308	182	209	349	325	425	226	
19	0.031250	244	308	176	209	364	313	397	246	
20	0.031250	244	298	173	239	352	305	409	291	
21	0.031250	244	298	179	218	388	317	414	291	
22	0.031250	222	306	176	209	349	309	425	226	
23	0.031250	244	308	179	269	349	309	397	258	
24	0.031250	244	298	200	209	352	301	429	266	
<b>25</b>	<b>0.062500</b>	<b>244</b>	<b>308</b>	<b>179</b>	<b>209</b>	<b>349</b>	<b>309</b>	<b>397</b>	<b>258</b>	
<b>26</b>	<b>0.062500</b>	<b>250</b>	<b>298</b>	<b>182</b>	<b>281</b>	<b>349</b>	<b>313</b>	<b>425</b>	<b>252</b>	
27	0.031250	244	308	176	281	352	313	429	266	
28	0.031250	244	298	173	281	349	309	409	291	
29	0.031250	244	308	173	209	349	309	425	226	

**2013**

1	0.100000	246	298	179	257	349	309	425	266	
<b>2</b>	<b>0.400000</b>	<b>244</b>	<b>298</b>	<b>179</b>	<b>257</b>	<b>349</b>	<b>309</b>	<b>425</b>	<b>266</b>	
3	0.100000	244	298	176	209	388	301	425	266	
4	0.100000	244	298	176	257	349	309	425	266	
5	0.100000	244	298	179	260	349	309	425	266	
6	0.100000	244	294	176	209	358	317	397	258	
7	0.100000	238	298	179	209	355	313	425	291	

## 2014

1	0.030303	238	298	176	284	349	309	425	224
2	0.030303	244	298	176	284	349	301	425	224
3	0.030303	244	298	176	302	388	309	425	224
4	0.030303	244	298	176	284	385	309	429	266
<b>5</b>	<b>0.212121</b>	<b>238</b>	<b>298</b>	<b>176</b>	<b>284</b>	<b>385</b>	<b>309</b>	<b>429</b>	<b>266</b>
6	0.030303	244	298	179	209	349	309	425	266
<b>7</b>	<b>0.060606</b>	<b>238</b>	<b>298</b>	<b>176</b>	<b>311</b>	<b>385</b>	<b>309</b>	<b>429</b>	<b>266</b>
8	0.030303	238	298	176	311	385	309	397	266
<b>9</b>	<b>0.121212</b>	<b>244</b>	<b>298</b>	<b>176</b>	<b>209</b>	<b>388</b>	<b>301</b>	<b>425</b>	<b>226</b>
10	0.030303	244	298	176	302	388	305	425	226
11	0.030303	238	298	176	284	385	313	429	266
12	0.030303	244	298	176	284	349	313	425	226
13	0.030303	244	294	176	209	349	309	425	226
14	0.030303	244	298	179	260	349	309	425	266
<b>15</b>	<b>0.060606</b>	<b>244</b>	<b>298</b>	<b>176</b>	<b>209</b>	<b>391</b>	<b>301</b>	<b>425</b>	<b>226</b>
16	0.030303	244	298	176	302	391	301	425	226
17	0.030303	244	298	176	284	385	301	429	266
18	0.030303	244	298	176	311	349	309	425	226
19	0.030303	244	298	176	284	349	309	425	226
20	0.030303	244	298	176	302	355	301	425	226
21	0.030303	244	298	179	263	349	309	425	266
22	0.030303	222	298	176	311	385	309	429	266

## 2015

1	0.017857	244	298	176	311	349	309	425	226
2	0.017857	238	298	176	311	385	309	425	266
3	0.017857	246	298	179	311	349	309	425	226
4	0.017857	244	298	176	209	388	301	425	226
<b>5</b>	<b>0.035714</b>	<b>238</b>	<b>298</b>	<b>176</b>	<b>311</b>	<b>385</b>	<b>313</b>	<b>429</b>	<b>266</b>
6	0.017857	238	298	176	284	385	313	429	266
7	0.017857	244	298	179	254	394	301	425	226
8	0.017857	238	298	179	254	349	313	414	224
9	0.017857	244	298	176	302	385	301	425	226
10	0.017857	246	298	179	311	355	309	425	291
11	0.017857	244	298	179	260	355	309	425	291
<b>12</b>	<b>0.053571</b>	<b>244</b>	<b>298</b>	<b>179</b>	<b>311</b>	<b>349</b>	<b>313</b>	<b>425</b>	<b>266</b>
13	0.017857	244	296	179	311	349	313	425	224
14	0.017857	244	296	179	302	388	301	425	226
15	0.017857	244	296	179	209	355	309	425	291
16	0.017857	244	296	179	311	355	309	425	291
17	0.017857	244	298	179	209	388	301	425	224
18	0.017857	244	298	179	209	355	309	425	291
19	0.017857	244	296	176	311	349	309	425	266
20	0.017857	238	296	179	209	385	309	429	266
21	0.017857	244	296	176	311	355	285	425	291
22	0.017857	244	296	176	302	388	301	425	226
23	0.017857	238	298	176	260	385	313	429	266
<b>24</b>	<b>0.035714</b>	<b>238</b>	<b>298</b>	<b>179</b>	<b>284</b>	<b>385</b>	<b>313</b>	<b>429</b>	<b>266</b>
25	0.017857	238	296	179	311	385	309	429	266
<b>26</b>	<b>0.035714</b>	<b>244</b>	<b>298</b>	<b>179</b>	<b>302</b>	<b>385</b>	<b>305</b>	<b>425</b>	<b>291</b>

27	0.017857	244	298	179	284	385	305	425	291
28	0.017857	244	296	179	284	349	313	425	226
<b>29</b>	<b>0.035714</b>	<b>244</b>	<b>296</b>	<b>182</b>	<b>260</b>	<b>349</b>	<b>313</b>	<b>425</b>	<b>266</b>
30	0.017857	244	296	182	209	349	313	425	266
31	0.017857	238	298	179	260	388	313	429	266
<b>32</b>	<b>0.053571</b>	<b>244</b>	<b>296</b>	<b>182</b>	<b>311</b>	<b>349</b>	<b>313</b>	<b>425</b>	<b>266</b>
<b>33</b>	<b>0.071429</b>	<b>244</b>	<b>296</b>	<b>182</b>	<b>311</b>	<b>355</b>	<b>313</b>	<b>425</b>	<b>291</b>
34	0.017857	244	298	182	311	349	313	425	266
35	0.017857	244	296	182	311	355	313	425	224
<b>36</b>	<b>0.035714</b>	<b>244</b>	<b>296</b>	<b>182</b>	<b>311</b>	<b>385</b>	<b>313</b>	<b>425</b>	<b>266</b>
37	0.017857	244	298	179	260	349	313	425	266
38	0.017857	244	296	182	260	355	313	425	291
<b>39</b>	<b>0.035714</b>	<b>246</b>	<b>296</b>	<b>182</b>	<b>260</b>	<b>349</b>	<b>313</b>	<b>425</b>	<b>266</b>
40	0.017857	246	296	182	311	385	313	425	266
41	0.017857	244	296	182	209	355	313	425	291
42	0.017857	246	298	182	260	349	313	425	266
43	0.017857	244	298	182	260	349	313	425	266

2016

1	0.016949	246	298	176	284	385	313	425	226
<b>2</b>	<b>0.033898</b>	<b>240</b>	<b>298</b>	<b>179</b>	<b>257</b>	<b>349</b>	<b>313</b>	<b>425</b>	<b>266</b>
<b>3</b>	<b>0.033898</b>	<b>240</b>	<b>298</b>	<b>176</b>	<b>209</b>	<b>385</b>	<b>301</b>	<b>425</b>	<b>266</b>
<b>4</b>	<b>0.101695</b>	<b>240</b>	<b>298</b>	<b>179</b>	<b>209</b>	<b>355</b>	<b>313</b>	<b>425</b>	<b>291</b>
5	0.016949	240	294	176	209	349	313	425	226
6	0.016949	240	300	179	209	355	309	425	291
7	0.016949	240	298	179	209	355	309	425	226
<b>8</b>	<b>0.050847</b>	<b>240</b>	<b>298</b>	<b>179</b>	<b>209</b>	<b>355</b>	<b>309</b>	<b>425</b>	<b>291</b>
<b>9</b>	<b>0.050847</b>	<b>240</b>	<b>298</b>	<b>179</b>	<b>257</b>	<b>349</b>	<b>309</b>	<b>425</b>	<b>266</b>
10	0.016949	240	298	179	284	385	309	425	291
11	0.186441	240	298	176	284	385	309	425	291
<b>12</b>	<b>0.033898</b>	<b>240</b>	<b>294</b>	<b>176</b>	<b>209</b>	<b>349</b>	<b>309</b>	<b>425</b>	<b>226</b>
13	0.016949	240	298	179	209	349	301	425	264
<b>14</b>	<b>0.101695</b>	<b>240</b>	<b>298</b>	<b>176</b>	<b>284</b>	<b>385</b>	<b>313</b>	<b>425</b>	<b>291</b>
15	0.016949	240	298	176	209	388	301	425	222
16	0.016949	240	294	176	209	349	313	425	222
17	0.016949	240	308	194	209	352	309	425	250
<b>18</b>	<b>0.050847</b>	<b>240</b>	<b>298</b>	<b>176</b>	<b>209</b>	<b>385</b>	<b>309</b>	<b>425</b>	<b>291</b>
19	0.016949	240	300	176	284	385	309	425	291
<b>20</b>	<b>0.067797</b>	<b>240</b>	<b>298</b>	<b>176</b>	<b>209</b>	<b>388</b>	<b>301</b>	<b>425</b>	<b>226</b>
21	0.016949	240	300	176	209	388	301	425	226
<b>22</b>	<b>0.033898</b>	<b>240</b>	<b>298</b>	<b>179</b>	<b>209</b>	<b>349</b>	<b>301</b>	<b>425</b>	<b>266</b>
23	0.016949	240	298	176	209	388	301	425	224
<b>24</b>	<b>0.033898</b>	<b>240</b>	<b>294</b>	<b>176</b>	<b>209</b>	<b>349</b>	<b>309</b>	<b>425</b>	<b>224</b>
25	0.016949	240	298	179	209	355	309	425	289

**Apêndice 3: Quadro mostrando os haplótipos encontrados nos anos estudados na área rural, os haplótipos mais frequentes estão em negrito.**

1	0.028571	222	262	200	397	302
2	0.028571	246	298	209	425	252
3	0.028571	222	262	200	425	252
4	0.028571	222	262	200	397	258
<b>5</b>	<b>0.085714</b>	<b>222</b>	<b>262</b>	<b>200</b>	<b>414</b>	<b>252</b>
<b>6</b>	<b>0.085714</b>	<b>222</b>	<b>262</b>	<b>200</b>	<b>414</b>	<b>224</b>
7	0.028571	222	298	209	414	252
<b>8</b>	<b>0.114286</b>	<b>222</b>	<b>262</b>	<b>200</b>	<b>414</b>	<b>291</b>
<b>9</b>	<b>0.057143</b>	<b>222</b>	<b>262</b>	<b>302</b>	<b>414</b>	<b>291</b>
10	0.028571	246	262	299	414	252
11	0.028571	246	262	236	409	291
12	0.028571	246	262	254	414	291
13	0.028571	222	262	299	414	291
14	0.028571	222	262	200	409	240
15	0.028571	244	294	209	409	302
16	0.028571	222	294	209	409	291
17	0.028571	246	326	209	414	252
18	0.028571	222	298	200	414	291
19	0.028571	244	298	254	414	291
20	0.028571	222	262	302	425	252
21	0.028571	222	262	209	409	302
22	0.028571	222	262	200	409	302
23	0.028571	222	298	215	409	252
24	0.028571	222	262	281	429	224
25	0.028571	222	262	200	429	266
26	0.028571	244	298	254	397	291
27	0.028571	246	298	254	414	291

## Anexo 1: Parecer Consubstanciado do CEP



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Vigilância genômica da malária na Amazônia Brasileira.

**Pesquisador:** simone da silva santos

**Área Temática:** Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);  
(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 75000917.7.0000.5248

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

#### Situação do Parecer:

Aprovado

#### Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

RIO DE JANEIRO, 21 de Dezembro de 2017

---

**Assinado por:**  
**José Henrique da Silva Pilotto**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

**Bairro:** Manguinhos

**CEP:** 21.040-360

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3882-9011

**Fax:** (21)2561-4815

**E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

## Anexo 2: Parecer Consubstanciado da CONEP

### COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Vigilância genômica da malária na Amazônia Brasileira.

**Pesquisador:** simone da silva santos

**Área Temática:** Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Estudos com populações indígenas;

**Versão:** 5

**CAAE:** 75000917.7.0000.5248

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

##### Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 25 de Junho de 2018

---

**Assinado por:**  
**Jorge Alves de Almeida Venancio**  
(Coordenador)

**Endereço:** SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-049

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br