



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE
Plasmodium falciparum EN 9 DISTRITOS
DE LA REGIÓN DE LORETO, PERÚ
(2009-2020)

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

DIANA CUBAS MONTECINO

LIMA – PERÚ

2026

ASESOR

Mg. Irene Delgado de la Flor Montauban

CO ASESOR

PhD. Dionicia Gamboa Vilela

PhD. Hugo Valdivia Rodríguez

JURADO DE TESIS

DR. JORGE ENRIQUE RODRIGUEZ BAILON

PRESIDENTE

DR. GABRIEL CARRASCO ESCOBAR

VOCAL

DRA. FRANCESCA FALCONI AGAPITO

SECRETARIA

DEDICATORIA.

**A Dios, por guiar mi camino.
A ti, mi querida Karito,
que vives en mi memoria y en mi corazón.**

AGRADECIMIENTOS.

A mi asesora la Mg. Irene Delgado y a mi co-asesor el Dr. Hugo Valdivia, por su orientación académica durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la Dra. Dionicia Gamboa, por su acompañamiento constante como mi co-asesora de tesis y además por haberme dado la oportunidad de integrar la familia del grupo de Malaria y por su mentoría, a través de la cual me ha transmitido una visión del liderazgo basada tanto en el compromiso científico como en el compromiso humano.

A la Dra. Katherine Torres, por la confianza depositada en mi trabajo como parte del Core Manejo de Datos, por su generosidad para compartir conocimientos en el ámbito académico y personal, por su apoyo constante para lograr mis metas y aspiraciones.

A los investigadores y amigos del Laboratorio de Malaria 308,309 y 401 del LID, en especial a quienes compartieron conmigo el trabajo como parte del Core Manejo de Datos (Ada, Carlos y Alonso), por su cariño y consideración con mi trabajo y esfuerzo. A Jhon, por animarme y acompañarme incluso en los días más desafiantes.

A mi familia, por su apoyo incondicional, comprensión y confianza en mí durante esta etapa. A mis padres, Pepe y Edith, y a mi hermano Fernando, por ser mi principal fuente de motivación y fortaleza. A mi prima Analy por su cálida comprensión y aliento, cuando todo parecía complicarse, y a mis primos Leslie, José Antonio, John y Nicole por acompañarme en los aciertos y aprendizajes de este proceso.

En esta aventura del descubrirme como persona e investigadora, quisiera agradecer a José del Carmen por el apoyo brindado para continuar creciendo; a Diego por su guía en este proceso de aprendizaje continuo; a Susana por su escucha atenta y reflexiva; y a Andrea por recordarme la importancia del bienestar personal.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Fundación Cobián

DECLARACIÓN DE AUTOR			
FECHA	26	02	2026
APELLIDOS Y NOMBRES DEL EGRESADO	CUBAS MONTECINO DIANA		
PROGRAMA DE POSGRADO	MAESTRÍA EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR		
AÑO DE INICIO DE LOS ESTUDIOS	2023		
TÍTULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO	Caracterización genética de <i>Plasmodium falciparum</i> en 9 distritos de la región de Loreto, Perú (2009- 2020)		
MODALIDAD DE TRABAJO DE GRADO	Tesis		
Declaración del Autor El presente Trabajo de Grado es original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.			
Teléfono de contacto (fijo / móvil)	961221918		
E-mail	diana.cubas@upch.pe		



Firma del Egresado
DNI 72541152

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCION	1
II.	OBJETIVOS	6
III.	MARCO TEÓRICO	7
3.1.	Epidemiología de la Malaria.....	7
3.2.	Etiología de la Malaria	10
3.3.	Ciclo de vida de <i>P. falciparum</i>	11
3.4.	Genética poblacional de <i>P. falciparum</i>	13
3.5.	Poblaciones genéticas de <i>P. falciparum</i> en el Perú	15
3.6.	Vigilancia molecular de la malaria por <i>P. falciparum</i>	20
IV.	METODOLOGÍA	25
4.1.	Recopilación de datos	25
4.2.	Asignación del tamaño de alelos de los microsatélites	31
4.3.	Análisis de desequilibrio de ligamiento y patrones reproductivos	32
4.4.	Análisis de diversidad genética	34
4.5.	Análisis de estructura genética poblacional.....	36
4.5.1.	Análisis de varianza molecular (AMOVA).....	36
4.5.2.	Análisis bayesiano mediante STRUCTURE.....	37
4.5.3.	Análisis de componentes principales (PCA).....	38
4.6.	Identificación de linajes predominantes mediante redes de haplotipos	40
V.	RESULTADOS	42
5.1.	Distribución de infecciones monoclonales y policlonales de <i>P. falciparum</i> (2009-2020)	42
5.2.	Variación en el número y la frecuencia alélica de los microsatélites de <i>P. falciparum</i>	44
5.3.	Variación en la diversidad genética de <i>P. falciparum</i>	47
5.4.	Patrones de desequilibrio de ligamiento y clonalidad epidémica en poblaciones de <i>P. falciparum</i>	51
5.5.	Patrones de diferenciación genética de <i>P. falciparum</i>	53
5.6.	Variación en la estructura poblacional de <i>P. falciparum</i> inferida mediante AMOVA	56
5.7.	Coexistencia de clústeres dominantes y mezcla genética en la estructura poblacional de <i>P. falciparum</i>	59
5.8.	Variación en la estructura genética de las poblaciones <i>P.falciparum</i> según PCA	62

5.9.	Coexistencia y distribución de linajes multilocus de <i>P. falciparum</i>	65
VI.	DISCUSIÓN	71
6.1.	Aumento de infecciones policlonales y heterogeneidad espacial en la transmisión de <i>P. falciparum</i>	72
6.2.	La diversidad genética de <i>P. falciparum</i> no es homogénea dentro de cada periodo, sino que presenta una estructuración espacial.	73
6.3.	Clonalidad epidémica y desequilibrio de ligamiento en contextos de baja transmisión de <i>P. falciparum</i>	76
6.4.	Estructura genética compatible con escenarios de baja transmisión, transmisión focal y circulación restringida de genotipos	79
6.5.	Persistencia y emergencia localizada de linajes multilocus de <i>P. falciparum</i> ...	80
6.6.	Implicancias para la vigilancia molecular y la eliminación de la malaria.....	81
6.7.	Limitaciones y consideraciones finales	82
VII.	CONCLUSIONES	84
VIII.	RECOMENDACIONES	86
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
X.	Anexos	

RESUMEN

La malaria causada por *Plasmodium falciparum* continúa siendo un problema de salud pública en la Amazonía peruana, especialmente en la región de Loreto, donde persiste la transmisión a pesar de las múltiples intervenciones de control. Este estudio tuvo por objetivo caracterizar genéticamente poblaciones de *P. falciparum* en nueve distritos de Loreto durante 2009–2020 mediante un panel de siete microsatélites neutros. Se integraron datos de distintos contextos epidemiológicos (PAMAFRO, periodo post-PAMAFRO y Plan Malaria Cero) y se analizaron genotipos multilocus para describir la diversidad espacial y la distribución de linajes multilocus entre distritos.

Se estandarizaron tamaños alélicos y se emplearon métricas de diversidad, AMOVA, STRUCTURE, PCA y redes de haplotipos (MSN) para explorar la estructura genética. Para la identificación de linajes se agruparon MLGs en haplogrupos usando un criterio operativo (≤ 2 loci de diferencia). De las 395 muestras originales, 380 completas fueron analizadas para definición de linajes.

El estudio evidenció heterogeneidad espacial en la diversidad genética y en la estructura poblacional de *P. falciparum* en Loreto entre 2009 y 2020. Se identificaron 35 linajes multilocus y se observó coexistencia de linajes predominantes y linajes localizados. Las evidencias obtenidas fueron consistentes con escenarios de transmisión focal y circulación restringida de genotipos en varios focos.

Se concluye que el enfoque multilocus, tal y como las redes de haplotipos y definición operativa de linajes, resultó útil como herramienta descriptiva para la vigilancia molecular exploratoria. Se recomienda integrar análisis multilocus en marcos de vigilancia que incluyan metadatos epidemiológicos estandarizados y la evaluación sistemática de marcadores de resistencia y variantes diagnósticas (espaciales y temporales) para maximizar la utilidad operativa de la información genética en contextos de control y eliminación.

Palabras Claves: *Plasmodium falciparum*, diversidad genética, marcadores microsatélites, linajes multilocus, vigilancia molecular

ABSTRACT

Malaria caused by *Plasmodium falciparum* remains a public health problem in the Peruvian Amazon, particularly in the Loreto region, where transmission persists despite multiple control interventions. This study aimed to genetically characterize *P. falciparum* populations in nine districts of Loreto between 2009 and 2020 using a panel of seven neutral microsatellite markers. Data from different epidemiological contexts (PAMAFRO, post-PAMAFRO period, and the *Plan Malaria Cero*) were integrated, and multilocus genotypes were analyzed to describe spatial patterns of genetic diversity and the distribution of multilocus lineages across districts.

Allelic sizes were standardized, and genetic diversity metrics, AMOVA, STRUCTURE, PCA, and haplotype networks (MSN) were applied to explore population genetic structure. Lineages were identified by clustering multilocus genotypes (MLGs) into haplogroups using an operational criterion (≤ 2 loci of difference). Of the 395 original samples, 380 complete genotypes were included in the lineage definition.

The study revealed marked spatial heterogeneity in genetic diversity and population structure of *P. falciparum* in Loreto between 2009 and 2020. A total of 35 multilocus lineages were identified, with coexistence of predominant and localized lineages. The observed patterns were consistent with scenarios of focal transmission and restricted circulation of genotypes across multiple transmission foci.

In conclusion, the multilocus approach, including haplotype networks and operational lineage definitions, proved to be a useful descriptive tool for exploratory molecular surveillance. We recommend integrating multilocus analyses into surveillance frameworks that incorporate standardized epidemiological metadata and systematic evaluation of resistance markers and diagnostic variants, both spatially and temporally, to maximize the operational value of genetic information in malaria control and elimination settings.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, genetic diversity, microsatellite markers, multilocus lineages, molecular surveillance.

I. INTRODUCCION

La malaria es una de las enfermedades infecciosas más mortales a nivel mundial, particularmente en regiones tropicales y subtropicales. En el año 2024 se reportaron 282 millones de casos de malaria en 80 países endémicos, con un aumento significativo en los países africanos (1). En América, cerca al 90 % de los casos se concentran en la Amazonía, lo que ha impulsado a la implementación de diversas intervenciones de salud pública para reducir la incidencia de la enfermedad (2).

En el Perú, la malaria es causada principalmente por *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*, siendo *P. vivax* la especie predominante (3). En los últimos años, aproximadamente entre el 75 % y 85 % de los casos notificados a nivel nacional han sido atribuidos a *P. vivax*, mientras que *P. falciparum* representa entre el 15 % y 25 % restante (1,3). El 95 % de los casos de malaria por *P. falciparum* se encuentran en la región amazónica (3). A pesar de su menor proporción relativa en el número de casos a nivel nacional, *P. falciparum* tiene importancia debido a su asociación con formas clínicas graves, mayor riesgo de complicaciones y mortalidad, así como por su potencial para desarrollar resistencia a antimaláricos, lo que representa un desafío adicional en contextos de control y eliminación (4).

La malaria en el Perú ha tenido una historia fluctuante: tras una marcada reducción de casos en las décadas de 1950 y 1960, la enfermedad resurgió en la década de 1990, particularmente en la región de Loreto, fenómeno asociado a la

reintroducción del vector *Anopheles darlingi* y a la circulación de cepas de *P. falciparum* resistentes a tratamientos convencionales (5–7). Ante este escenario, se implementaron diversas estrategias de control, entre ellas el Programa de Control de Malaria en las Zonas Fronterizas de la Región Andina (PAMAFRO, 2005–2010), financiado por el Fondo Global, que fortaleció el diagnóstico, tratamiento oportuno y la distribución de mosquiteros impregnados con insecticida, logrando una reducción importante de la incidencia en Loreto hacia 2010–2011 (8). Sin embargo, la disminución no fue sostenida; la falta de continuidad en las intervenciones, sumada a eventos climáticos como las inundaciones de 2012, favoreció un nuevo incremento de casos que alcanzó uno de sus picos alrededor de 2014–2015 (7).

A partir de 2017, con la implementación del Plan Malaria Cero, se registró nuevamente una reducción progresiva de los casos notificados en la región. No obstante, la transmisión no se eliminó y Loreto continuó concentrando casi el 90 % de los casos nacionales de malaria por *P. falciparum* hasta el año 2020, según los reportes de la Sala Situacional del Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades (CDC-Perú) (9). La pandemia de COVID-19 en 2020 impactó la vigilancia epidemiológica y el acceso a servicios de salud, lo que pudo influir tanto en la notificación como en la dinámica real de transmisión. En la actualidad, pese a la implementación del Plan Nacional hacia la Eliminación de la Malaria 2022–2030, la enfermedad persiste principalmente en áreas rurales y alejadas donde la cobertura de las actividades del Programa de Malaria del MINSA y las intervenciones del Plan nacional es limitada, lo que favorece la sostenibilidad de focos de transmisión en contextos con condiciones ecológicas propicias y

barreras de acceso a la atención (9–11).

En este escenario de transmisión focalizada y heterogénea, comprender la estructura genética espacial de *P. falciparum* resulta fundamental para fortalecer las estrategias de eliminación. La vigilancia molecular ha emergido como una herramienta clave, ya que permite analizar la diversidad genética y la estructura poblacional del parásito mediante marcadores moleculares (12). Este enfoque facilita tanto la detección de mutaciones asociadas a la resistencia a los medicamentos como la identificación y el seguimiento de linajes que podrían reflejar la presión selectiva ejercida por las intervenciones de control (13). En la Amazonía peruana, estudios previos basados en microsatélites han evidenciado la coexistencia de múltiples linajes de *P. falciparum*, algunos de ellos con patrones de expansión clonal sostenida en el tiempo (10).

El análisis multilocus de haplotipos aporta una perspectiva complementaria a las métricas resumen de diversidad al permitir identificar genotipos idénticos o estrechamente relacionados e integrar información genética a nivel individual (14–16). A diferencia de métricas agregadas como la heterocigosidad o el número de alelos, el análisis por haplotipos y haplogrupos facilita la identificación de genotipos recurrentes y la visualización de sus relaciones mediante redes o árboles basados en distancias genéticas (14,17). No obstante, su interpretación debe realizarse considerando la recombinación del parásito y las limitaciones del muestreo, por lo que se plantea como una herramienta descriptiva y exploratoria dentro de un marco analítico complementario (18,19). Los linajes multilocus son indicadores clave para comprender los procesos de adaptación del parásito y orientar estrategias más eficaces de control, particularmente en escenarios de

transmisión heterogénea donde la expansión clonal y la persistencia localizada de genotipos pueden ser detectadas mediante análisis haplotípicos y redes basadas en distancias genéticas (20–22).

Sin embargo, a pesar de estos avances, el conocimiento sobre la organización espacial de los linajes en la región de Loreto sigue siendo limitado. La mayoría de los estudios realizados en el país se ha centrado en métricas clásicas de diversidad genética o en la identificación de clones predominantes, sin explorar de manera sistemática la estructura y coexistencia de linajes multilocus entre distritos. En este sentido, existe una brecha de conocimiento respecto a cómo se distribuyen espacialmente los linajes multilocus de *P. falciparum* y cómo estos pueden ser descritos desde una perspectiva exploratoria utilizando marcadores microsatélites neutros.

En consecuencia, caracterizar la organización espacial de estos linajes en Loreto resulta necesario no solo para cerrar esta brecha de conocimiento, sino también para generar evidencia que contribuya al fortalecimiento de la vigilancia molecular en un escenario de eliminación. Dado que, la identificación de focos persistentes y la detección de posibles eventos de expansión clonal localizada adquieren especial relevancia para orientar intervenciones más focalizadas y sostenibles, en concordancia con las metas del Plan Malaria Cero y los objetivos nacionales de eliminación proyectados hacia 2030 (23,24).

Con base en ello, este trabajo evalúa el aporte del enfoque multilocus-haplotípico para caracterizar linajes predominantes y su distribución espacial en *P. falciparum* en la región de Loreto. El objetivo principal es caracterizar genéticamente a *P. falciparum* en nueve distritos de Loreto (2009–2020) empleando un panel de microsatélites neutros. A partir del análisis de distancias genéticas, los genotipos multilocus se agruparon en haplotipos y haplogrupos, identificados con códigos operativos (A1, B1, etc.). En este estudio utilizamos el término linaje en un sentido operativo y epidemiológico para designar un conjunto de genotipos multilocus estrechamente relacionados que, por su alta similitud genética, probablemente comparten un ancestro común reciente y cuya circulación puede reflejar procesos de transmisión local o expansión clonal. Este uso no implica la realización de una reconstrucción filogenética formal ni la inferencia de relaciones evolutivas.

II. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Caracterizar genéticamente a las poblaciones de *Plasmodium falciparum* en nueve distritos de la región de Loreto, Perú, durante el periodo comprendido entre 2009 y 2020, mediante el análisis de marcadores microsatélites neutros.

Objetivos específicos:

1. Analizar la diversidad genética y estructura poblacional espacial de *P. falciparum* en nueve distritos de la región de Loreto, Perú, utilizando siete marcadores microsatélites neutros.
2. Identificar y describir la distribución espacial de los linajes multilocus de *P. falciparum* en nueve distritos de la región de Loreto, Perú, mediante el análisis de haplotipos y haplogrupos multilocus.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Epidemiología de la Malaria

La malaria es considerada como una de las enfermedades infecciosas que causa el mayor número de muertes entre las enfermedades parasitarias (25). A nivel mundial, se estima que en el año 2024 hubo 282 millones de casos de malaria en 80 países donde la enfermedad es endémica, con un aumento de 9 millones de casos con respecto al año 2023 (1). La mayor parte de este aumento provino de los países de África. Durante el año 2025, se reportaron 32 887 casos de malaria en el Perú y 8 muertes por esta enfermedad, lo que representa 10 270 casos más en comparación con el año 2023. Del total, el 98,99 % se concentró en el departamento de Loreto (3).

En América, casi el 90 % de la malaria se reporta en la Amazonía, por lo que se viene realizando intervenciones de salud pública para reducir los casos. Durante las décadas de 1950 y 1960, el Perú reportaba una drástica reducción de la incidencia anual y se mantuvo así hasta los años 90 (26). Sin embargo, en 1997, Loreto experimentó la epidemia de malaria más importante con el 34 % de los casos reportados causados por *P. falciparum* (26). Asimismo, se observó un incremento de los casos por *P. falciparum* en Piura y Tumbes en el marco del Fenómeno del Niño de 1997-1998 en el Perú (27). El resurgimiento de la malaria estuvo asociado a la reintroducción de *Anopheles darlingi* como vector de la malaria en la región amazónica y a la presencia de cepas de *P. falciparum* resistentes a la cloroquina (CQ) y a la sulfadoxina-

pirimetamina (SP) (26).

Dado el resurgimiento de la malaria, se dio la búsqueda de la implementación de iniciativas para reducir el número de casos de Malaria. En el año 2002, surgió el proyecto “Control de la Malaria en las Zonas Fronterizas de la Región Andina: Un enfoque comunitario” (PAMAFRO) que tuvo como objetivo disminuir en un periodo de cinco años la mortalidad en un 70 % y la morbilidad en un 50 % por malaria. PAMAFRO estuvo orientado al control de la malaria en las áreas con menos recursos económicos de las zonas fronterizas de Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela entre los años 2006 y 2010 (28).

El programa PAMAFRO implementó intervenciones esporádicas en diferentes zonas de la Amazonía peruana que redujeron el número de casos. Durante el periodo de implementación (2006–2011), la incidencia de *P. vivax* disminuyó aproximadamente en 76% (de 42.8 a 10.1 casos por 1000 personas/año), mientras que *P. falciparum* mostró una reducción cercana al 83% (de 14.3 a 2.5 casos por 1000 personas/año) (8). PAMAFRO apoyó cuatro estrategias de intervención: 1) distribución de mosquiteros con tratamiento de insecticidas de larga duración y kits de insecticidas; 2) fortalecer el diagnóstico de malaria mediante la distribución de Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR) y nuevos microscopios, manteniendo al mismo tiempo los microscopios existentes y capacitando a microscopistas; 3) mejorar la gestión de casos de malaria mediante la distribución de medicamentos antimaláricos y la capacitación de trabajadores de la salud; y 4) promover la gestión ambiental comunitaria (8).

Tras el fin del programa PAMAFRO en Perú, el Ministerio de Salud del Perú no pudo mantener el mismo nivel de apoyo económico y el número de casos aumentó a niveles similares al periodo previo a la intervención de PAMAFRO. Aunque las actividades de control no desaparecieron por completo, se redujeron la cobertura, la focalización territorial y la capacidad de respuesta activa, pasando de una estrategia intensiva y espacialmente dirigida a un modelo rutinario integrado al sistema regular de salud (8). Además, en el 2012, se dieron lluvias inusualmente intensas que provocaron inundaciones que resultaron en que los casos se quintuplicaran entre 2010 y 2015 (7). Entre 2015 y 2016 se registraron algunos de los valores más altos de la década, lo que evidenció la fragilidad de los avances logrados previamente cuando las intervenciones no se sostienen de manera continua (9,26). Por lo que, en el año 2017, el MINSA aprueba como política de salud, la eliminación de la malaria, con lo cual se prioriza política y económicamente la lucha contra esta enfermedad. A partir del 2018, se implementa el Plan Malaria Cero 2017-2021 en la región de Loreto.

El Plan Malaria Cero se desarrolló en tres fases, con el objetivo de implementar un programa de eliminación de la malaria en la región amazónica con enfoque comunitario e intercultural. Durante la primera fase (tres primeros años) se replicó estrategias similares a PAMAFRO. Las intervenciones se estratificaron por comunidades, priorizando aquellas con muy alta y alta endemia, principalmente las más cercanas a la ciudad de Iquitos durante el primer año, para posteriormente extenderse a localidades más alejadas. La segunda fase se enfocó en la eliminación de los reservorios de malaria, mientras que la tercera fase estuvo orientada a las zonas con transmisión residual, donde fue necesario aplicar métodos de

diagnóstico más específicos y sensibles para la detección de malaria (11). Hasta el año 2020, se logró la disminución de los casos en un 75 %, sobre todo en poblaciones rurales alejadas y de frontera. Sin embargo, debido a la pandemia del SARS-CoV-2 hubo una disminución de las intervenciones de control, lo cual se reflejó en un aumento de los casos de malaria por *P. falciparum* en Amazonas y de malaria en general en el departamento de Junín (11).

De acuerdo con el contexto, y considerando la necesidad de consolidar los avances alcanzados y evitar nuevos retrocesos, el Estado peruano formuló el Plan Nacional hacia la Eliminación de la Malaria en el Perú 2022–2030 (24), alineado con las metas establecidas por la Organización Mundial de la Salud para la eliminación de la malaria al año 2030 (23). A nivel mundial, se esperaba alcanzar la reducción de la incidencia y la tasa de mortalidad de la malaria en un 40 % hacia el año 2020. Sin embargo, en el año 2020 se logró una reducción aproximada al 3 % de la incidencia mundial y el 18 % de la tasa de mortalidad. Aun así, se alcanzó en el año 2020 la eliminación de la malaria en 10 países de la meta de al menos 35 países libres de malaria y se evitó por completo el restablecimiento de la malaria en todos los países exentos de la enfermedad (29).

3.2. Etiología de la Malaria

Hasta la fecha, se han descrito formalmente más de 200 especies de *Plasmodium* y cada especie infecta a una determinada variedad de hospederos. Las especies de *Plasmodium* que infectan naturalmente a los humanos y causan malaria en la mayor parte del mundo se limitan a cinco: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie*, *P.*

ovale y *P. knowlesi*. Este último, se mantiene naturalmente en los monos macacos y causa malaria zoonótica principalmente en el sudeste asiático (30). De estas especies, *P. falciparum* y *P. vivax* son responsables del 95 % de las infecciones de malaria en humanos (31). *P. falciparum* es la causa más severa de malaria y representa el 95 % de todas las muertes por malaria (32).

En Loreto, Perú, se concentra más del 90 % de los casos de malaria del país, donde predomina ampliamente *P. vivax*, el cual representa aproximadamente entre el 75 % y 85 % de los casos reportados, mientras que *P. falciparum* contribuye con alrededor del 15 % a 25 % de los casos (3,9). No obstante, *P. falciparum* se asocia con mayor riesgo de complicaciones y casos graves, por lo que mantiene una importancia clínica y epidemiológica significativa en la región (1).

3.3. Ciclo de vida de *P. falciparum*

El ciclo de vida de *Plasmodium* es similar en todas las especies del parásito. La transmisión de los parásitos ocurre por la picadura de los mosquitos hembra del género *Anopheles*. Cuando el mosquito infectado se alimenta de sangre humana, inocula esporozoitos en la piel. Estos esporozoitos inoculados viajan al torrente sanguíneo, donde son transportados al hígado. En las células hepáticas completan un ciclo de esquizogonia en siete días, creciendo y dividiéndose en merozoitos exoeritrocitarios. Aunque en algunas especies como *P. vivax* y *P. ovale*, pueden darse formas latentes, llamadas hipnozoitos. Después de las modificaciones en la fase hepática, hasta 40 000 merozoitos

son liberados al torrente sanguíneo. En el interior de los glóbulos rojos circulantes (RBC), el parásito sufre modificaciones adicionales, dando lugar a gametocitos (Figura 1) (33). Un subconjunto de parásitos abandona la circulación periférica e ingresan al espacio extravascular de la médula ósea, donde los gametocitos maduran y progresan a través de las etapas I-V en el transcurso de ocho a diez días. En la etapa V, los gametocitos vuelven a entrar en la circulación periférica, en la que se vuelven competentes para infectar a los mosquitos. Una vez ingeridos por un mosquito, dentro del intestino medio, se da la fertilización y da como resultado la formación de un cigoto, que sufre meiosis y se convierte en un oocineto que penetra la pared intestinal del mosquito. El oocineto forma un ooquiste dentro del cual el parásito se replica asexualmente, formando varios esporozoitos. Tras la ruptura del ooquiste, estos esporozoitos migran a las glándulas salivales del mosquito, donde pueden transmitirse al humano durante la ingesta de sangre (Figura 1) (34).

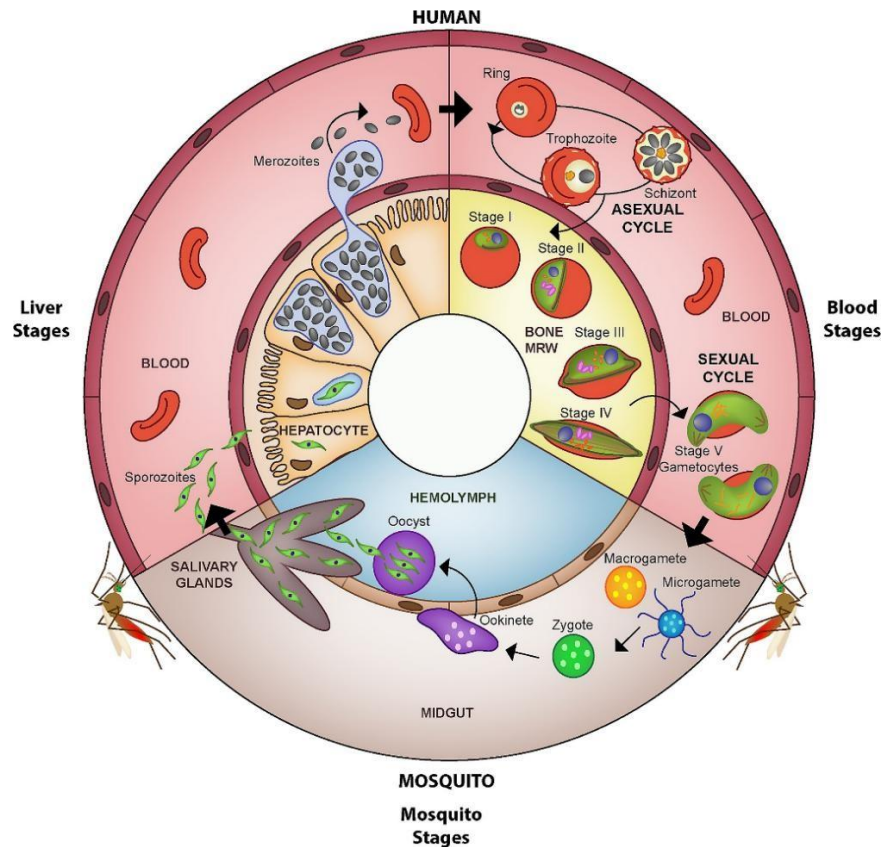


Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum* (34).

3.4. Genética poblacional de *P. falciparum*

La genética poblacional de *P. falciparum* estudia la distribución y los cambios en la frecuencia de los alelos dentro y entre poblaciones del parásito en el espacio y el tiempo. El análisis espacial permite evaluar la diferenciación genética entre localidades geográficas, mientras que el análisis temporal permite inferir procesos dinámicos asociados a fluctuaciones en la transmisión, cuellos de botella poblacionales y expansión clonal (34). Este campo de estudio se centra en comprender cómo las fuerzas evolutivas (como la selección natural, la deriva genética, la mutación, la migración y el apareamiento no aleatorio) afectan la diversidad genética y la estructura de las poblaciones del parásito. Esta información es relevante porque algunas

poblaciones del parásito podrían tener mayor o menor susceptibilidad a un determinado tipo de medicamento. Por lo que, esta información se utiliza para ensayos de eficacia de medicamentos contra la malaria y la posibilidad de implementar estrategias de control basadas en intervenciones o vacunas modernas (27).

En este contexto, el uso de marcadores genéticos neutros resulta importante para estudiar la estructura y dinámica poblacional sin el sesgo introducido por la selección natural. A diferencia de los loci asociados a resistencia farmacológica o antígenos bajo presión inmune, los marcadores neutros reflejan principalmente procesos demográficos y de transmisión, permitiendo estimar con mayor precisión la diferenciación genética entre focos, el flujo génico entre comunidades y los niveles de conectividad epidemiológica (14,35). Asimismo, el análisis temporal de estos marcadores facilita la identificación de cuellos de botella poblacionales, expansión clonal o reintroducción de linajes tras intervenciones de control (36)

A nivel mundial, *P. falciparum* exhibe características genéticas que están correlacionadas con los niveles de endemidad e intensidad de transmisión. La rápida disminución de la prevalencia y de la transmisión puede conducir a una estructura poblacional más fragmentada con un mayor aislamiento genético entre focos endémicos, mientras que la disminución de los niveles de flujo genético puede limitar la propagación de la resistencia entre poblaciones, pero también aumentar la tasa de evolución de múltiples fenotipos de resistencia, debido a la presión selectiva local y la falta de diversidad genética

(37,38).

La tasa de transmisión de *P. falciparum* y la migración de habitantes humanos infectados afectan la variación y la estructura genética de la población de este parásito. Además, la inmunidad del hospedero local, tanto en los mosquitos como en los humanos es un factor que afecta la diversidad genética y la estructura de las poblaciones de *P. falciparum*. En Sudamérica, se ha observado una baja diversidad genética del parásito y altos niveles de diferenciación geográfica; a diferencia, de los observado en el África, donde hay una alta diversidad genética del parásito y bajos niveles de diferenciación geográfica (37).

3.5. Poblaciones genéticas de *P. falciparum* en el Perú

La estructura de la población es el resultado de varios procesos evolutivos en la naturaleza, incluida la endogamia y el aislamiento geográfico. La estructura genética es detectable en escalas de tiempo y espacio determinadas por las tasas de mutación del tipo de locus. Se requieren múltiples marcadores genéticos como los microsatélites y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) para conocer la estructura genética de una población. Los microsatélites tienen una tasa de mutación más alta que los SNPs, lo que permite la detección de eventos recientes que hayan influenciado en las poblaciones genéticas del parásito como expansión clonal, cuellos de botella y cambios temporales (39). Si bien, la tecnología de secuenciación que permiten analizar los SNPs proporcionan

estimaciones de la diversidad genética de todo el genoma de *P. falciparum* y son adecuados para inferir procesos evolutivos de larga escala, el uso de los microsatélites sigue siendo uno de los métodos más eficientes para obtener datos de diversidad genética en poblaciones de *P. falciparum* para fines epidemiológicos (40).

Los loci microsatélites que contienen repeticiones de secuencias simples y polimórficos son marcadores genéticos altamente informativos. El ~11 % del genoma de *P. falciparum* es representado por los microsatélites, de los cuales son predominantes las repeticiones de dinucleótidos (TA)_n o trinucleótidos (TAA)_n que puede aumentar las posibilidades de deslizamiento de la polimerasa (41,42). Estos elementos se distribuyen con una frecuencia promedio de un locus microsatélite cada 2–3 kb. La tasa de mutación por microsatélite es de 1.59×10^{-4} por locus por generación (intervalo de confianza 95 %: 6.98×10^{-5} – 3.7×10^{-4}) y suele ser principalmente mediante el modelo SMM, *Stepwise Mutation Model* (14,43). Las tasas de mutación de microsatélites en organismos eucariotas varían ampliamente, generalmente entre 10^{-6} y 10^{-2} por locus por generación, aunque depende de varios factores (44,45). En este contexto, la tasa estimada para *P. falciparum* se encuentra en el rango alto reportado para eucariotas, lo que respalda el uso de microsatélites como marcadores sensibles para detectar eventos evolutivos recientes

Para los análisis genéticos, se seleccionaron siete loci microsatélites (TA1, Polyα, PfPK2, TA109, p2490, C2M34 y C3M69) (Tabla 1), ampliamente distribuidos a lo largo del genoma. Diversos estudios han demostrado que

subconjuntos reducidos de microsatélites altamente polimórficos son capaces de recuperar patrones de diversidad genética, clonalidad y estructura poblacional comparables a los obtenidos con paneles más extensos de marcadores en *P. falciparum*. En ese contexto, los siete loci seleccionados presentan un poder de discriminación adecuado para diferenciar genotipos multilocus y evaluar la dinámica poblacional del parásito en contextos epidemiológicos (14,15,46).

Dos loci (TA1 y TA109) se localizan en el cromosoma 6, pero distanciados por más de 100 kb (equivalentes a ~10 cM en un cruce genético experimental). Estudios previos han demostrado que, a estas distancias genómicas, los loci microsatélites en *P. falciparum* tienden a comportarse como independientes debido a las altas tasas de recombinación y al bajo desequilibrio de ligamiento observado en poblaciones naturales (14,18,47).

Asimismo, se ha observado que, en regiones geográficas con baja transmisión de malaria, predominan poblaciones con un fuerte desequilibrio de ligamiento, baja diversidad genética y alta diferenciación poblacional. En contraste, en regiones con alta transmisión, se presenta un equilibrio de ligamiento, alta diversidad genética y baja diferenciación entre poblaciones (10). Estos hallazgos sugieren que la estructura genética de *P. falciparum* está estrechamente relacionada a la intensidad de transmisión y al nivel de prevalencia de la enfermedad, más que a factores geográficos propiamente.

Las estrategias de eliminación de *P. falciparum* y las condiciones que favorecen el entrecruzamiento entre linajes afectan a la estructura de poblaciones de

parásitos (15). Griffing et al (2011) realizaron estudios genéticos poblacionales de malaria realizados a partir de la caracterización de 07 marcadores microsatélites neutros (Ta1, Poly α , PfPk2, TA109, 2490, C2M34, C3M69) (Tabla 1) en la Amazonía y en la costa norte peruana a partir de muestras de 1990-2000. En este estudio, se identificó una subestructura clonal en todos los sitios de recolección en el interior del Amazonas (clones A, B, C, D y E) y se encontró una única expansión de un clon en la costa norte (clon E); este podría ser el resultado de la expansión a partir de poblaciones estancadas o migrantes en la era posterior a la erradicación que se inició a principios de 1900 (15). Los análisis genéticos de los linajes clonales evidenciaron perfiles diferenciados de mutaciones en genes asociados a resistencia a antimaláricos, tales como *Pfcrt*, *Pfmdr1*, *Pfdhps* y *Pfdhfr*, lo que sugiere trayectorias evolutivas distintas entre los clones identificados (15).

Tabla 1. Panel de marcadores desarrollados por *Malaria Branch, Division of Parasitic Disease and Malaria of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* (48)

Loci	Cromosoma	Nº acceso de <i>Genbank</i>	Motivo de repetición
TA1	6	AF010507.1	(AAT) ₇₋₉
Polyα	4	L18785.1	(AAT) ₈₋₁₃
PfPk2	12	X63648.1	(AAT) ₈₋₁₅
TA109	6	AF010508.1	(AAT) ₆₋₈
2490	10	G37790.1	(AAT) ₆₋₈
C2M34	2	G37995.1	(TA) _n
C3M69	3	G37915.2	(TA) _n

Bacon et al. (2009) agruparon la información de genotipificación de microsatélites en haplotipos y haplogrupos. Los haplotipos se definieron como

combinaciones multilocus que diferían en dos o menos loci respecto a un haplotipo de referencia. Los haplogrupos, en cambio, se establecieron cuando la variación era mayor a dos loci, agrupando así conjuntos de haplotipos relacionados en haplogrupos (17).

Branch et al (2011) realizaron un análisis de diversidad genética y estructura poblacional en muestras colectadas en el 2003 para conocer el impacto de las infecciones policlonales en zonas de baja transmisión (16). Se analizaron 14 microsatélites; que incluyeron a algunos previamente considerados por Griffing et al (2011) (15). En este estudio, se demostró que la diversidad genética puede incrementar aún incluso en zonas de baja transmisión. La expansión de clones recombinados dentro de una población local podría aumentar la susceptibilidad del hospedero a la infección y también brindar más oportunidades para la evolución de la resistencia a los medicamentos.

Akinyi et al (2013) compararon la estructura poblacional de los parásitos recolectados en dos períodos distintos: 1998-2001 y 2003-2005 (49). Los resultados mostraron que la diversidad genética fue mayor en las muestras de 2003-2005 en comparación con las de 1998-2001. Ambos grupos de muestras fueron analizados utilizando los mismos microsatélites neutros, pero se encontraron ocho linajes en lugar de los cinco linajes que habían sido identificados previamente en la Amazonía peruana por Griffing et al. (2011) (15). Solo el linaje D persistió después del período 1998-2001, mientras que los demás linajes fueron el resultado de hibridaciones entre diferentes grupos (49).

Bendezú et al (2022) reportaron la presencia de ocho linajes de *P. falciparum* a partir de muestras recolectadas en la Amazonía peruana durante 2009-2010 (50). En este estudio, se obtuvo los tamaños de los 07 marcadores microsatélites neutros para cada uno de los ocho linajes de las muestras colectadas (Tabla 1) (50). Además, este estudio dio a conocer algunos haplotipos con delección en los genes *pfhrp2/phrp3*, en especial el linaje B_{v1}, que se encuentran ampliamente dispersos en la región de la Amazonía peruana (50).

En el brote de casos de malaria por *P. falciparum* en Tumbes, entre el año 2010 y el año 2012, se identificó la variante predominante B_{v1}. Los genotipos de los parásitos de Tumbes fueron idénticos a algunos genotipos recolectados en Bendezú et al (2022) (51). La variante B_{v1}, se parece mucho al clon B, que es un linaje identificado inicialmente durante 1999-2006. El clon B fue introducido en Loreto desde Brasil antes de la epidemia de malaria en la década de 1990. El parásito de Tumbes no tenía ninguna relación con el clon E, que fue el único clon anteriormente encontrado en la costa norte; por lo que se determinó que el brote de malaria por *P. falciparum* en Tumbes fue causado por la introducción de una población de parásitos provenientes de Loreto (51).

3.6. Vigilancia molecular de la malaria por *P. falciparum*

La vigilancia molecular es un objetivo de los programas nacionales de control de la malaria. Los datos genómicos complementan la información epidemiológica de prevalencia e incidencia para el control y eliminación de la malaria. La vigilancia molecular de la malaria consiste en la recolección de muestras, secuenciación, análisis bioinformático, análisis estadístico,

presentación de informes y comunicación con las agencias de salud pública para informar las respuestas basadas en datos (52). Se espera que a partir de esta información se tomen medidas para las intervenciones que conduzcan a una reducción de la transmisión de la malaria (21).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) destaca la vigilancia molecular como una herramienta esencial en la lucha contra la malaria, particularmente para abordar la resistencia a los medicamentos y mejorar las estrategias de control (4). Entre las actividades que recomienda dentro de la vigilancia molecular se encuentra el análisis genético de las poblaciones de parásitos para facilitar el origen geográfico del parásito, y esto se consigue mediante el conocimiento de la diversidad genética y de la estructura poblacional del parásito.

Existen diferentes enfoques para evaluar la reducción de la transmisión de la malaria. En la tabla 2, se presentan los criterios moleculares utilizados enfocados en la diversidad genética y en la estructura poblacional del parásito.

Tabla 2. Criterios moleculares para evaluar la reducción en la transmisión de la malaria (Adaptado de (34)).

Métrica	Expectativa	Limitaciones
Prevalencia de infecciones multiclonicas	Disminuye con la disminución de la transmisión.	Sensible a la resolución del método de genotipado y loci utilizados.
Desequilibrio de ligamiento	Aumenta y refleja una mayor tasa de endogamia.	No se puede medir en infecciones multiclonicas y depende de la variación en los loci genotipados.
Prevalencia de infecciones con genotipos idénticos o relacionados no recombinantes	Aumenta y refleja una mayor tasa de endogamia	No apto en entornos con alta prevalencia de infecciones multiclonicas.
Número de alelos	Disminuye y refleja una reducción en el tamaño efectivo de la población.	Sensible al sesgo de muestreo (p. ej., los alelos de baja frecuencia requieren esfuerzos de muestreo poco realistas).
Heterocigosidad	Disminuye y refleja una reducción en el tamaño efectivo de la población.	Requiere una disminución sostenida de la transmisión para disminuir.
Tamaño efectivo de la población (Ne)	Disminuye	Sensible a los procesos demográficos (por ejemplo, migración) y al método utilizado para estimarlos. Disminuciones después de una reducción sostenida de la población de parásitos por debajo del tamaño mínimo de población natural

La información generada por los estudios de genética de poblaciones de *P.*

falciparum aporta a la vigilancia molecular de la malaria. La comprensión de la

estructura genética de la población de *P. falciparum* permite predecir la rapidez a la que se originarán nuevas variantes o propagarán las variantes existentes con mayor aptitud dentro y entre poblaciones (37). Asimismo, el seguimiento de los marcadores genéticos neutros en poblaciones de *P. falciparum* permite caracterizar la estructura poblacional, la conectividad entre focos de transmisión y la dinámica de dispersión de linajes parasitarios, y así puede complementar estudios de resistencia a antimaláricos, al permitir rastrear la expansión y dispersión de linajes parasitarios que en otros contextos han sido asociados a perfiles específicos de resistencia. En conjunto, esta información puede apoyar las estrategias de control y eliminación de la malaria al facilitar la identificación de casos importados frente a infecciones autóctonas, así como la inferencia del origen de casos reintroducidos en áreas previamente libres de transmisión (53).

La identificación y caracterización de linajes de *P. falciparum* permite comprender los patrones de transmisión del parásito. El análisis de linajes posibilita detectar la persistencia de variantes en el tiempo, distribución geográfica y su asociación con otras características epidemiológicas como intensidad de transmisión, presencia de coinfecciones o genotipos resistentes a fármacos. En este contexto, la caracterización de linajes parasitarios proporciona evidencia indirecta sobre la eficacia de las intervenciones de control y eliminación de la malaria, al reflejar cambios en la diversidad y estructura genética de las poblaciones a lo largo del tiempo (22).

La genotipificación de *P. falciparum* mediante microsatélites puede proporcionar

información sobre la relación entre los genotipos del parásito y la presentación de síntomas en las infecciones de malaria. En un estudio realizado en Brasil, Martha Rosimeire et al. (2007) compararon a personas sintomáticas y asintomáticas infectadas con malaria, utilizando un conjunto de 11 microsatélites neutros para determinar los genotipos del parásito (54). Dado que estos microsatélites no están sujetos a selección natural y presentan tasas de mutación elevadas, y se localizan en regiones cromosómicas con baja tasa de recombinación, en áreas de baja transmisión es más probable que se conserven junto con los genotipos de *P. falciparum*. Esta persistencia de haplotipos multilocus puede facilitar la exploración de asociaciones entre determinados linajes parasitarios y características clínicas de la infección, aun cuando los microsatélites no estén directamente involucrados en la determinación funcional de dichos fenotipos. (54).

IV. METODOLOGÍA

4.1. Recopilación de datos

El presente estudio, aprobado por el Comité de ética de UPCH (Código SIDISI 214673), comenzó con la recopilación de datos genéticos y metadatos de proyectos previos aprobados por el Comité de ética de UPCH (Código SIDISI 55587, 101518, 102725) y por el Comité de ética de NAMRU- SOUTH (protocolo NMRC.D.2007.0004) (50,55,56) (Tabla 3). Cada base de datos contenía identificadores de muestra, marcadores microsatélites y variables descriptivas (año de recolección y ubicación geográfica), además de variables relacionadas a la infección (nivel de densidad parasitaria y presencia o ausencia de síntomas).

En los estudios originales las muestras infectadas por *P. falciparum* fueron colectadas mediante detección activa (DAC) y pasiva de casos (DPC) y confirmadas por microscopía o PCR (50,55,56). Los datos genéticos corresponden a genotipificaciones previas realizadas con un panel de 7 microsatélites desarrollados en el *Malaria Branch, Division of Parasitic Diseases and Malaria* del Centro de Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de EE.UU (48). La genotipificación se realizó en los proyectos originales (50,55,56) mediante análisis de fragmentos capilares, y los cromatogramas fueron procesados con el software *Microsatellite Analysis (Applied Biosystems)*. En dichos estudios, las muestras con al menos un alelo secundario en cualquier marcador se consideraron como policlona. Los alelos adicionales fueron aquellos picos en el electroferograma que alcanzaron al menos el 30 % de la altura del pico más alto, lo cual ayudó a diferenciar a ruido o artefactos (57).

En el presente estudio los datos fueron explorados utilizando herramientas descriptivas, identificando valores ausentes y posibles inconsistencias, garantizando su calidad y coherencia antes de los análisis genéticos. Para los análisis de diversidad y estructura genética, se incluyeron únicamente las muestras que contaban con información completa en al menos 6 de los 7 loci microsatélites. Este criterio asegura que cada muestra aporte información suficiente sobre la variabilidad genética de la población, evitando que la presencia de múltiples loci faltantes introduzca sesgo o disminuya la robustez de las métricas de diversidad. Además, se consideraron las muestras provenientes de distritos en los cuales se obtuvo un número representativo para realizar análisis de diversidad genética (Tabla 3) (58).

Tabla 3. Datos recopilados de los estudios previos para análisis de diversidad genética

Intervalo de años de muestreo	n	Distrito	Provincia	Tipo de
2009-2010 (PAMAFRO)	19	Alto Nanay	Maynas	Activa
	9	Mazán		
	11	Requena	Requena	
	1	San Juan Bautista	Maynas	Pasiva
	28	San Juan Bautista	Maynas	
	12	Yurimaguas	Alto Amazonas	
2011-2017 (Post-PAMAFRO)	96	Punchana	Maynas	Pasiva
	9	San Juan Bautista		
	64	Iquitos		
	4	Nauta	Loreto	Activa
	10	Nauta	Loreto	
2018-2020 (Plan Malaria Cero)	9	Iquitos	Maynas	Pasiva
	19	Punchana		
	7	San Juan Bautista		
	76	Trompeteros	Loreto	Activa
	10	Mazán	Maynas	
	11	Trompeteros	Loreto	
Total	395			

Sin embargo, para la identificación de linajes (haplogrupos) mediante perfiles de microsatélites y análisis de agrupamiento (distancias genéticas), es fundamental contar con datos completos en todos los loci evaluados (10). Por este motivo, se eliminaron 15 muestras que tenían datos faltantes en al menos uno de los siete loci microsatélites considerados (TA1, TA109, PolyA, PfPk2, p2490, C2M34, C3M69), quedando un total de 380 muestras completas para la identificación de estructura poblacional y de haplogrupos (Tabla 4)

Tabla 4. Resumen de los datos de muestras completas para identificación de linajes (haplogrupos)

Intervalo de años de muestreo	n	Distrito	Provincia	Tipo de
2009-2010 (PAMAFRO)	17	Alto Nanay	Maynas	Activa
	7	Mazán		
	11	Requena	Requena	
	1	San Juan Bautista	Maynas	
	28	San Juan Bautista	Maynas	
	11	Yurimaguas	Alto Amazonas	
2011-2017 (Post-PAMAFRO)	96	Punchana	Maynas	Pasiva
	9	San Juan Bautista		
	64	Iquitos		
	4	Nauta	Loreto	
	10	Nauta	Loreto	Activa
2018-2020 (Plan Malaria Cero)	9	Iquitos	Maynas	Pasiva
	19	Punchana		
	7	San Juan Bautista		
	74	Trompeteros	Loreto	
	6	Mazán	Maynas	Activa
	7	Trompeteros	Loreto	
Total	380			

Dado que las muestras disponibles provinieron de distintos distritos y años de colección, los análisis se estratificaron por distrito de la región de Loreto (Figura 2) y por intervalo de años de muestreo. Las aproximaciones temporales en la estructura poblacional de *P. falciparum* se realizaron únicamente en aquellos distritos con muestreos repetidos en diferentes intervalos de tiempo. En este contexto, San Juan Bautista fue el único distrito que presentó muestras en los tres intervalos de tiempo evaluados, con tamaños muestrales suficientes y continuidad temporal, por lo que fue seleccionado para este tipo de análisis.

En el caso de distritos de colección con datos disponibles en uno o dos intervalos de tiempo, los resultados se interpretarán como descripciones espaciales de la diversidad genética en ese momento, sin extrapolar tendencias temporales. De esta manera, se maximizará la información obtenida, disponible, reconociendo explícitamente las limitaciones inherentes al diseño de muestreo retrospectivo y no sistemático.

Dado el carácter retrospectivo y no sistemático del muestreo, las agrupaciones temporales empleadas en este estudio (2009–2010; 2011–2017; 2018–2020) fueron definidas exclusivamente con fines descriptivos para representar distintos contextos epidemiológicos presentes durante el periodo de estudio (2009-2020). Estas agrupaciones facilitan la presentación y comprensión de la información disponible, pero no deben interpretarse como un diseño longitudinal ni como un análisis de efecto/causalidad de intervenciones (PAMAFRO, Post-PAMAFRO, Plan Malaria Cero respectivamente) (Tabla 5). Cuando se realizan comparaciones entre intervalos, se adoptará un enfoque exploratorio y razonado, enfatizando las limitaciones impuestas por el muestreo, el tamaño de muestra y la heterogeneidad temporal y espacial.

Tabla 5. Intervalos temporales empleados para el análisis descriptivo de *P. falciparum* en Loreto

Intervalo de años	Denominación operativa	Contexto epidemiológico de referencia
2009–2010	Periodo PAMAFRO	Fase final de implementación del Programa de Control de Malaria en las Zonas Fronterizas (PAMAFRO)
2011–2017	Periodo Post-PAMAFRO	Etapa posterior a la finalización de PAMAFRO, caracterizada por la disminución de intervenciones sostenidas y fluctuaciones en la incidencia
2018–2020	Periodo Plan Malaria Cero	Inicio e implementación del Plan Malaria Cero, previo al impacto pleno de la pandemia por COVID-19

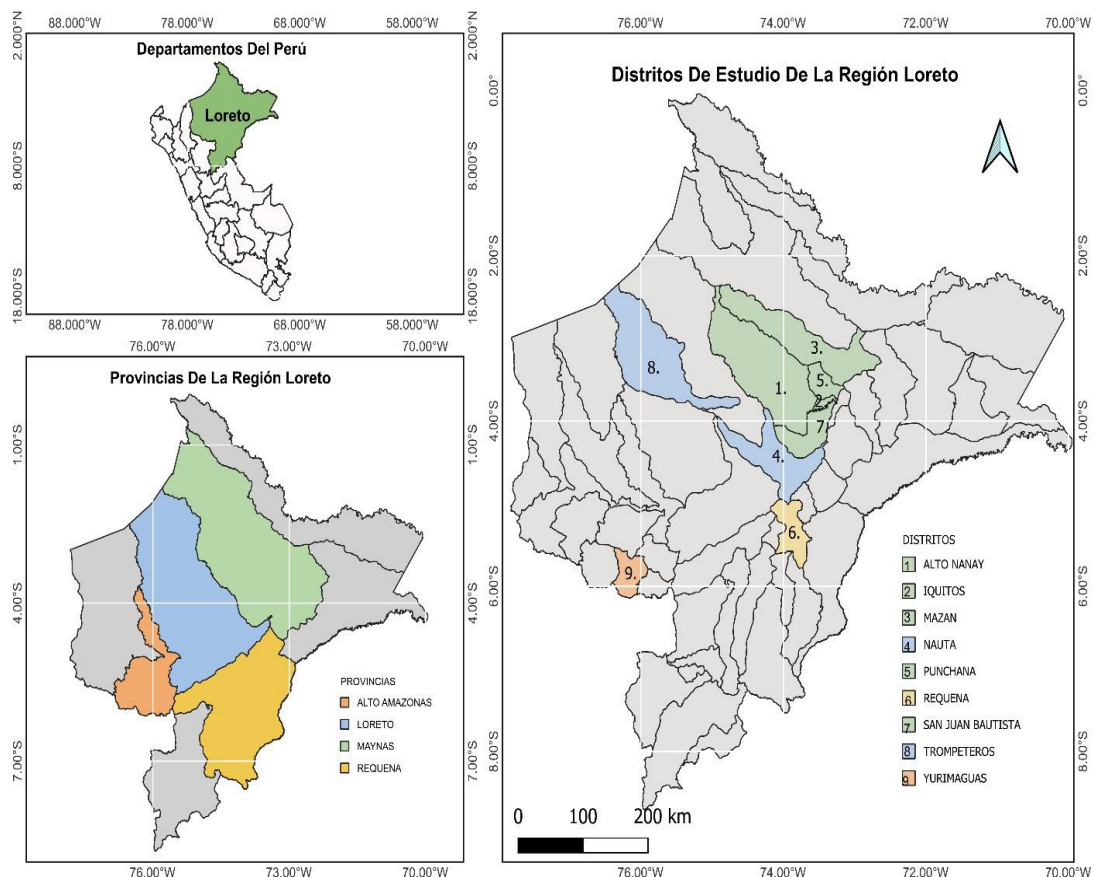


Figura 5. Ubicación geográfica de sitios de colección

4.2. Asignación del tamaño de alelos de los microsatélites

La genotipificación realizada por los tres proyectos utilizó la misma cepa control de *P. falciparum* 3D7 y obtuvieron los mismos tamaños de alelos en el panel de 7 microsatélites mediante electroforesis capilar (Tabla 6). En el presente estudio, se trabajó con los tamaños alélicos previamente asignados en las bases de datos originales, sin realizar un nuevo análisis de los cromatogramas.

Sin embargo, debido a diferencias en la resolución instrumental, condiciones de corrida capilar y criterios de llamado alélico entre estudios, algunos tamaños alélicos presentaron variaciones decimales mínimas (por ejemplo, 152.3, 152.7, 153.1 pb) que no reflejan diferencias biológicas reales, sino variación técnica. Por ello, se realizó un proceso de estandarización alélica.

La homogenización de los tamaños alélicos de los marcadores microsatélites se efectuó ajustando los valores decimales al entero más cercano compatible con el motivo de repetición de cada microsatélite (di-, tri- o tetranucleótido) (Tabla 1).

Tabla 6. Tamaño de alelos del panel de 7 microsatélites de la cepa control *P. falciparum* 3D7

Loci	Tamaño del alelo en la cepa control 3D7 (pb)
TA1	183
Polya	155
PfPk2	168
TA109	172
2490	80
C2M34	259
C3M69	174

4.3. Análisis de desequilibrio de ligamiento y patrones reproductivos

El análisis de desequilibrio de ligamiento (LD) se realizó para inferir los patrones de reproducción en las poblaciones de *P. falciparum* de Loreto, adaptando la metodología a las características epidemiológicas de la región amazónica peruana. Los datos genotípicos de los siete microsatélites polimórficos se convirtieron en objetos *genind* del paquete *adegenet* (59) especificando la haploidía como característica de los estadios eritrocíticos del parásito. Primero, se calculó el índice de asociación estandarizado ($\bar{r}_d$) sobre el conjunto completo de muestras (datos "raw") usando la función *ia()* del paquete *poppr* (60,61) con 999 permutaciones para evaluar la significancia estadística bajo la hipótesis nula de aleatoriedad (H_0 : $\bar{r}_d = 0$). Después, se aplicó corrección por clones mediante la función *clonecorrect()*, que retiene solo un representante de cada haplotipo multilocus único, y se recalculó $\bar{r}_d$ sobre los datos corregidos tomando como umbral que el tamaño muestral sea ≥ 5 . Se consideró este umbral adaptado a contextos de alta clonalidad epidémica donde la corrección puede reducir drásticamente el número de muestras.

La interpretación integró cuatro criterios:

- A. Significancia del LD raw
- B. Magnitud de la reducción del índice Ia tras corrección por clones
(fold change = Ia_raw / Ia_cc)
- C. Significancia del LD post-corrección
- D. Porcentaje de clonalidad calculado como
$$\left(\frac{N_{samples} - N_{cc}}{N_{samples}} \times 100 \right)$$

Siguiendo criterios de robustez estadística en genética de poblaciones (62) , se analizaron únicamente grupos con $n \geq 10$. Debido a la estructura clonal epidémica característica de *P. falciparum* en la Amazonía peruana , se realizó una corrección por clones (*clone-correction*) para distinguir entre el LD derivado de la expansión clonal y el derivado de la autofecundación (63). En los análisis corregidos, se estableció un umbral de $n_{cc} \geq 5$ genotipos únicos para permitir la convergencia de las pruebas de permutación (999 repeticiones). Los resultados se visualizaron mediante gráficos de barras comparativos (*raw* vs. *clone-corrected*) con anotaciones de significancia estadística (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

El LD fue interpretado como un indicador indirecto de patrones reproductivos, reconociendo que en *P. falciparum*, puede reflejar expansión clonal, autofecundación o procesos demográficos, y no necesariamente estructura poblacional espacial (10).

Tabla 7. Guía de interpretación basada en los resultados de LD *raw* y *clone-corrected*, % clonalidad y $\bar{r}D$ (64).

Categoría	Criterios	Interpretación	% Clonalidad aproximado
Clonalidad epidémica	LD significativo en <i>raw</i> , NO significativo <i>post-clone-correct</i>	Expansión de clones epidémicos; recombinación genera panmixia relativa	Alta (>50 %)
Clonalidad epidémica + autofecundación	LD significativo en ambos (<i>raw</i> y <i>post-clone-correct</i>), $\bar{r}D$ post-CC > 0.1	Linajes clonales epidémicos + autofecundación residual	Alta (>50 %)
Autofecundación predominante / estructura poblacional	LD significativo en <i>raw</i> pero reducción <2X tras <i>clone-correct</i>	Autofecundación predominante o estructura poblacional parcial	Moderada (20–50 %)
Panmixia relativa	$\bar{r}D$ <i>post-clone-correct</i> cercano a 0	Recombinación predominante; poca clonación residual	Baja (<20 %)
Sin LD significativo	Ningún LD significativo	Recombinación activa; población aleatoria	Variable (generalmente baja)

4.4. Análisis de diversidad genética

Las poblaciones se definieron según intervalos de años de muestreo (2009–2010; 2011–2017; 2018–2020) con carácter descriptivo. Esta definición facilita comparar conjuntos de muestras recogidas en contextos epidemiológicos distintos, pero no se emplea para sostener inferencias causales sobre el impacto de las intervenciones de control y eliminación de la malaria. Posteriormente, las muestras se agruparon por sitios de muestreo correspondientes a nueve distritos de la región de Loreto (Alto Nanay, Mazán, Requena, San Juan Bautista, Yurimaguas, Punchana, Iquitos, Nauta y Trompeteros), permitiendo explorar principalmente la variación espacial de la diversidad genética. La variación temporal se evaluó únicamente en el distrito de San Juan Bautista, debido a su continuidad muestral en los tres intervalos

definidos, y se presenta como un análisis exploratorio.

Se generaron tablas de frecuencias alélicas por locus y población, lo que facilitó la identificación de patrones de diversidad alélica y permitió calcular indicadores de diversidad genética (Heterocigosidad, número de genotipos multilocus únicos MLG observados en la población e índice de diversidad de Simpson) y diversidad alélica (número de alelos por locus y frecuencia alélica) utilizando *poppr* (60,61).

Se debe distinguir entre diversidad alélica, heterocigosidad esperada y diversidad de genotipos multilocus, ya que cada una captura distintos aspectos de la estructura genética poblacional. En contextos de baja transmisión, estas métricas pueden desacoplarse, reflejando procesos como expansión clonal, cuellos de botella o reintroducción, por lo que deben interpretarse de manera conjunta y no aislada.

Para evaluar la diferenciación genética entre poblaciones por cada intervalo de años de muestreo, se estimó el estadístico F_{st} utilizando el estimador de Weir y Cockerham (1984) del paquete *hierfstat* (65). La significancia estadística de los valores de F_{ST} se evaluó mediante pruebas de permutación (1000 permutaciones). Los valores de diferenciación genética fueron clasificados en categorías cualitativas con el fin de facilitar su interpretación biológica. Para ello, se establecieron cuatro rangos basados en umbrales comúnmente utilizados en estudios de genética de poblaciones: muy baja diferenciación ($F_{st} < 0.05$), diferenciación moderada ($0.05 \leq F_{st} < 0.15$), diferenciación elevada ($0.15 \leq F_{st} < 0.25$) y diferenciación muy elevada ($F_{st} \geq 0.25$) (66).

Adicionalmente, se realizó un análisis exploratorio de diferenciación genética (F_{st})

por año dentro en los distritos que tuvieron muestras en dos o más intervalos de tiempo con el objetivo de evaluar la estabilidad genética de las poblaciones locales en el tiempo. Este análisis permitió determinar si los distritos podían considerarse homogéneas a lo largo del tiempo y, por tanto, si era metodológicamente adecuado agruparlos sin considerar el intervalo de años de muestreo. Este análisis no tuvo un enfoque longitudinal, debido a la heterogeneidad del muestreo y a las diferencias en tamaños muestrales entre años.

4.5. Análisis de estructura genética poblacional

La estructura genética poblacional se evaluó mediante tres aproximaciones complementarias: A) análisis de varianza molecular (AMOVA) para cuantificar la partición jerárquica de la varianza genética, B) análisis bayesiano mediante STRUCTURE para identificar linajes ancestrales, y C) análisis de componentes principales (PCA) para visualización multivariada no supervisada.

4.5.1. Análisis de varianza molecular (AMOVA)

Se realizó un AMOVA (67) implementado en el paquete *poppr* (50,51) para descomponer la varianza genética total en componentes jerárquicos: entre los intervalos de años de muestreo, entre distritos dentro de períodos, y dentro de distritos. Se calculó una matriz de distancias euclidianas sobre alelos estandarizados y se ejecutó el AMOVA con *poppr.amova()* usando la fórmula ~intervalo/distrito. La significancia estadística se evaluó mediante 999 permutaciones aleatorias. La interpretación siguió los criterios de Wright (1978): $\Phi = 0-0.05$ (diferenciación despreciable), $0.05-0.15$ (moderada), $0.15-0.25$ (sustancial), >0.25 (muy alta) (66). Valores significativos ($p < 0.05$)

indican estructura genética no explicable por deriva aleatoria.

4.5.2. Análisis bayesiano mediante STRUCTURE

El análisis de agrupamiento se realizó con STRUCTURE v2.3.4 (67), que implementa un algoritmo bayesiano Cadena de Markov Montecarlo (MCMC) para inferir subpoblaciones y asignar individuos probabilísticamente a clústeres ancestrales. Los siete microsatélites se analizaron independientemente por período epidemiológico usando un modelo de *admixture* con frecuencias alélicas correlacionadas, realizando 20 réplicas independientes para $K = 2$ a $K = 6$, con burn-in de 50,000 iteraciones y 150,000 iteraciones MCMC.

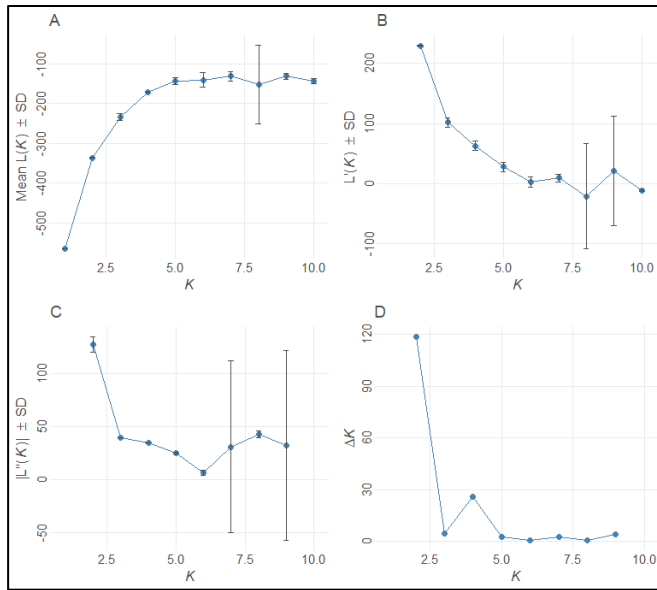
El K óptimo se determinó mediante el método de Evanno (68) y se generaron gráficos para $K = 2$ (estructura general) y $K = 4$ o $K = 3$ (subestructura fina) para una visualización más detallada, ya que representaban configuraciones relevantes biológicamente o estadísticamente informativas (Figura 3).

Si la población de *P. falciparum* presenta reproducción clonal parcial y desequilibrio de ligamiento, los resultados de STRUCTURE deben interpretarse únicamente como una herramienta exploratoria de asignación genética, y no como evidencia formal de subpoblaciones panmícticas (67).

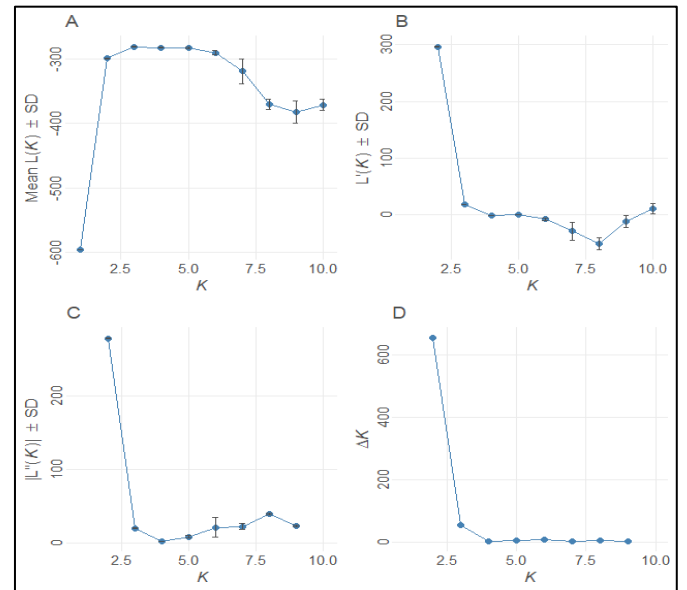
4.5.3. Análisis de componentes principales (PCA)

Se realizó un PCA por cada período de tiempo. Los datos se estandarizaron para que todos los loci contribuyan equitativamente. El PCA se ejecutó con *prcomp()* mediante descomposición por valores singulares (SVD) sobre la matriz de covarianza estandarizada.

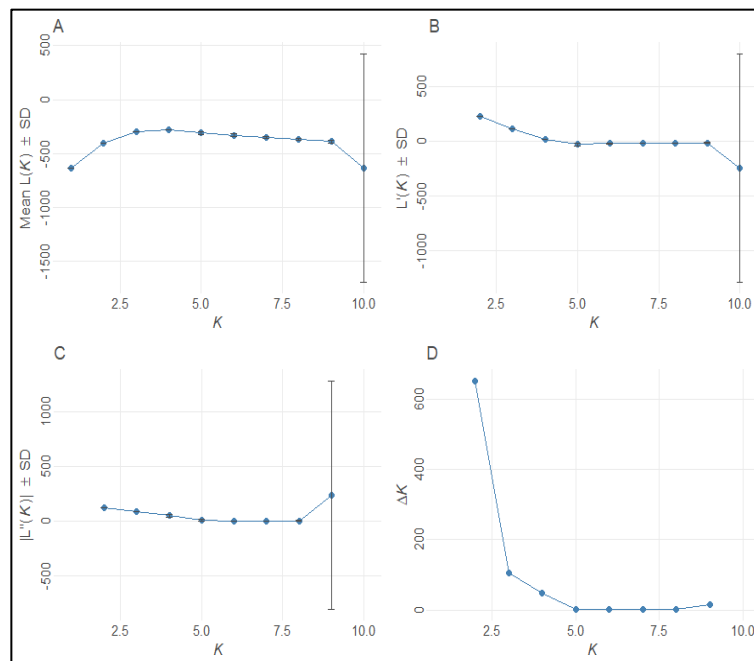
Los individuos se proyectaron en el espacio bidimensional PC1-PC2, codificando cada punto según el año de colección (color) y el distrito de procedencia (forma del símbolo). La interpretación consideró como criterio la separación año/distrito (magnitud de diferenciación), y la varianza explicada total (69). Este análisis valida independientemente los patrones detectados por AMOVA y STRUCTURE. El PCA se empleó como herramienta descriptiva complementaria, sin asumir agrupamientos poblacionales discretos.



I. PAMAFRO



II. Post-PAMAFRO



III. Plan Malaria Cero

Figura 3. Determinación del número óptimo de agrupamientos genéticos (K) mediante el método de Evanno a partir de los resultados de STRUCTURE. I) PAMAFRO, II) Post-PAMAFRO, III) Plan Malaria Cero.

4.6. Identificación de linajes predominantes mediante redes de haplotipos

Los linajes predominantes de *P. falciparum* se definieron a partir de la agrupación de genotipos multilocus que compartían un perfil genético idéntico o diferían en no más de dos loci de los siete loci analizados. Este criterio se estableció considerando la proximidad genética observada en estudios de estructura poblacional del parásito, donde pequeñas diferencias entre loci suelen corresponder a variantes de un mismo linaje (15,49,50,70). El criterio de agrupación de genotipos multilocus (≤ 2 loci de diferencia) se basó en la aproximación propuesta por Bacon et al. (2009) y adaptada a los datos del presente estudio para reflejar relaciones genéticas cercanas entre haplotipos (17). El haplogrupo fundador se definió como aquel más antiguo y más diverso dentro de la población analizada (71).

Para explorar las relaciones genéticas entre los haplogrupos, se calculó una matriz de disimilitud basada en diferencias alélicas. A partir de esta matriz, se generó una red mínima de conexiones entre MLGs mediante el algoritmo de *minimum spanning network* (MSN), usando el paquete R *poppr* (60,61). El algoritmo MSN es usualmente aplicado a datos multilocus derivados de microsatélites, al conectar genotipos de forma que la distancia genética total sea mínima y no requiere supuestos de modelos de sustitución nucleotídica (72). Esta red conecta los nodos (haplotipos) de forma que la distancia genética total sea mínima, lo que facilita visualizar las relaciones evolutivas y de transmisión entre linajes.

De forma complementaria, se construyó un árbol filogenético mediante el algoritmo *Neighbor-Joining*, una técnica de agrupamiento jerárquico que genera árboles sin raíces basados en matrices de distancia genética. Para ello, se utilizó el paquete *ape* en R (73). *Neighbor-Joining* permite representar relaciones filogenéticas en estudios poblacionales que emplean marcadores neutros, ya que no asume una tasa de evolución constante (modelo no ultramétrico) (74), permitiendo una representación más realista de la historia evolutiva de los linajes de *P. falciparum* en la región.

V. RESULTADOS

5.1. Distribución de infecciones monoclonales y policlonales de *P. falciparum* (2009-2020)

Durante el periodo PAMAFRO, se analizaron un total de 80 muestras, todas ellas clasificadas como infecciones monoclonales (100 %). En el periodo Post-PAMAFRO, de las 183 muestras analizadas, el 97,2 % (173) correspondieron a infecciones monoclonales y el 2,8 % (5 muestras agrupadas en 5 infecciones policlonales) a infecciones policlonales. En el conjunto de muestras correspondientes al periodo Plan Malaria Cero, se observó un incremento estadísticamente significativo en la proporción de infecciones policlonales, de acuerdo con la prueba exacta de Fisher ($p = 7.46 \times 10^{-14}$). En este periodo, el 75,5 % (80) fueron monoclonales, mientras que el 24,5 % (26 muestras agrupadas en 26 infecciones policlonales) correspondieron a infecciones policlonales (Tabla 8).

Intervalo de años de muestreo	Tipo de infección	Número de muestras	%
2009-2010 (PAMAFRO)	Monoclonal	80	100
Post-PAMAFRO (2011-2017)	Monoclonal	173	97.2
	Policlonal	5	2.8
Plan Malaria Cero (2018-2020)	Monoclonal	80	75.5
	Policlonal	26	24.5

TOTAL	395	Tabla
		8.

Resumen del número y proporción de muestras por tipo de infección según
intervalo de años de muestreo (2009-2020)

5.2. Variación en el número y la frecuencia alélica de los microsatélites de *P. falciparum*

El análisis de los loci microsatélites en las muestras recolectadas durante los intervalos de años 2009-2010 (PAMAFRO), 2011-2017 (Post-PAMAFRO) y 2018–2020 (Plan Malaria Cero) permitió describir diferencias en el número de alelos y en sus frecuencias, las cuales reflejan la heterogeneidad genética observada entre los conjuntos de muestras analizados (Tabla 9).

- C2M34: En 2009-2010, se identificaron 7 alelos, siendo el alelo más frecuente el de tamaño de 237 pb (0,35). En 2011-2017, se observaron 5 alelos, con una frecuencia de 0,04 para el alelo de tamaño 239 pb. En 2018-2020, se identificaron 4 alelos, y el alelo de tamaño 229 pb mostró una frecuencia de 0,68.
- C3M69: En 2009–2010 se detectaron 6 alelos. En los periodos 2011–2017 y 2018–2020 se observaron 2 alelos. Los alelos de 124 pb y 134 pb estuvieron presentes como los más frecuentes dentro de los tres periodos evaluados.
- pfPk2: Este locus presentó 4 alelos en 2009–2010 y 3 alelos en los periodos 2011–2017 y 2018–2020. Los alelos de 165 pb, 171 pb y 174 pb fueron los que mostraron las mayores frecuencias a lo largo de los tres intervalos temporales.
- PolyA: En los tres periodos analizados se identificaron 3 alelos. Los alelos de tamaño 182 pb y 184 pb mostraron las mayores frecuencias en los dos últimos periodos.

- TA1: Este locus presentó 3 alelos en cada uno de los periodos evaluados. El alelo de 180 pb tuvo una frecuencia más alta en el primer periodo, mientras que el alelo de 171 pb mostró mayor frecuencia en los periodos posteriores.
- TA109: El número de alelos se mantuvo constante en los tres periodos analizados. El alelo de 160 pb presentó su mayor frecuencia en el periodo 2018–2020, mientras que el alelo de 163 pb registró una menor frecuencia en ese mismo periodo.
- p2490: En 2009–2010 se observaron más alelos que en los periodos siguientes. El alelo de 74 pb solo estuvo presente dentro del primer intervalo temporal evaluado.

Tabla 9. Frecuencia de alelos más representativos por loci microsatélite en los distintos intervalos de años de muestreo

locus	PAMAFRO			Post-PAMAFRO			Plan Malaria Cero		
	número de alelos	alelo	frecuencia	número de alelos	alelo	frecuencia	número de alelos	alelo	frecuencia
C2M34	7	237	0.35	5	229	0.76	4	229	0.68
		231	0.29		235	0.16		235	0.27
		239	0.17		239	0.04		241	0.03
C3M69	6	134	0.65	2	134	0.98	2	134	0.63
		124	0.15		124	0.02		124	0.37
		122	0.10			0.02			
pfPk2	4	165	0.53	3	171	0.71	3	171	0.52
		174	0.25		165	0.28		165	0.39
		171	0.21		174	0.01		174	0.09
PolyA	3	182	0.68	3	184	0.92	3	182	0.59
		164	0.16		182	0.08		184	0.27
		161	0.15		167	0.01		164	0.14
TA1	3	180	0.50	3	171	0.73	3	171	0.81
		171	0.27		180	0.23		180	0.18
		177	0.23		174	0.04		174	0.01
TA109	3	165	0.38	3	163	0.98	3	163	0.65
		162	0.34		154	0.01		160	0.32
		159	0.29		160	0.01		199	0.03
p2490	3	80	0.84	2	83	0.75	2	80	0.69
		83	0.15		80	0.25		83	0.31
		74	0.01						

Se detectaron alelos de tamaño único en los loci C2M34, C3M69, TA109 y p2490, correspondientes a muestras provenientes de los distritos de San Juan Bautista, Mazán, Punchana y Requena (Anexo 1). Se identificaron los siguientes alelos únicos por población: el alelo 233 pb del locus C2M34 en Requena, el alelo 247 pb del locus C2M34 en San Juan Bautista, el alelo 138 pb del locus C3M69 en Mazán, el alelo 152 pb del locus C3M69 en San Juan Bautista, el alelo 154 pb del locus TA109 en Punchana y el alelo 74 pb del locus p2490 en Mazán.

5.3. Variación en la diversidad genética de *P. falciparum*

Se evaluó la diversidad genética de *P. falciparum* en nueve distritos de la región Loreto incluidas en este estudio durante los intervalos de años de muestreo utilizando genotipos multilocus (MLG) y estimadores de diversidad (eMLG, índice de Shannon H, índice de Stoddart y Taylor, índice de dominancia de Simpson y heterocigosidad esperada H_{exp}) (Tabla 10). La diversidad genética de *P. falciparum* mostró variabilidad entre distritos y entre conjuntos de muestras correspondientes a distintos periodos, evidenciando una marcada heterogeneidad espacial.

Durante el periodo PAMAFRO, se analizaron 80 muestras distribuidas en cinco distritos de colección. El número de genotipos multilocus (MLG) observados varió entre 4 y 9 por distrito, siendo San Juan Bautista el distrito con mayor diversidad observada (MLG = 9), mientras que Yurimaguas presentó menor diversidad (MLG = 4). Los valores de eMLG oscilaron entre 3.50 (Yurimaguas) y 6.00 (Mazán), con errores estándar bajos (SE 0.00– 0.58), lo que indica estimaciones confiables de diversidad. El índice de Shannon (H) mostró valores más elevados en San Juan Bautista (H = 1.86) y Mazán (H = 1.58), reflejando una mayor diversidad genotípica y una distribución más equitativa de los MLGs en estos distritos, mientras que Yurimaguas presentó el valor más bajo (H = 0.84), lo que sugiere la dominancia de un número reducido de genotipos. De manera concordante, el número efectivo de genotipos fue mayor en San Juan Bautista (G = 5.04) y menor en Yurimaguas (G = 1.71), evidenciando diferencias en la estructura genética entre distritos. Esta tendencia se vio reforzada por los valores de dominancia, que indicaron una mayor concentración de genotipos en Yurimaguas ($\lambda = 0.42$) y una

distribución más equitativa en San Juan Bautista ($\lambda = 0.80$) y Mazán ($\lambda = 0.74$). La heterocigosidad esperada mostró valores moderados en todos los sitios, con un máximo en San Juan Bautista ($H_{exp} = 0.55$), lo que sugiere variación en la diversidad genética acumulada entre distritos.

En el periodo Post-PAMAFRO, se analizaron 183 muestras de cuatro distritos de colección. La diversidad observada (MLG) fue relativamente homogénea, oscilando entre 3 y 12. Punchana presentó el mayor número de MLG observados (MLG = 12), mientras que San Juan Bautista registró el menor (MLG=3). Los valores de Shannon fueron moderados y similares entre sitios ($H = 0.96$ – 1.38), lo que indica una diversidad genotípica intermedia con una distribución parcialmente equitativa de los MLGs. En concordancia, el número efectivo de genotipos fue bajo a moderado ($G = 1.92$ – 3.06), lo que sugiere que, pese a la presencia de múltiples genotipos, algunos dominaron en frecuencia dentro de ciertas poblaciones locales. Esta dominancia moderada fue consistente con los valores observados del índice de Simpson ($\lambda = 0.48$ – 0.67). La heterocigosidad esperada fue baja a moderada (0.11 – 0.30), indicando una variabilidad alélica limitada en algunos distritos, especialmente en San Juan Bautista.

Durante el periodo Plan Malaria Cero, se analizaron 132 muestras de cinco distritos de colección. Trompeteros presentó el mayor número de MLG observados (MLG = 32), mientras que Iquitos mostró la menor diversidad (MLG = 1). Los valores de eMLG variaron entre 1.00 y 7.21, con errores estándar relativamente bajos, lo que indica estabilidad en las estimaciones de diversidad. Se evidenció marcada

heterogeneidad entre distritos, con valores elevados del índice de Shannon en Trompeteros ($H = 2.83$), reflejando una alta diversidad genotípica y una distribución relativamente equitativa de los MLGs. En contraste, Iquitos presentó un valor nulo ($H = 0.00$), indicando la dominancia de un único genotipo. De manera consistente, el número efectivo de genotipos (G) fue elevado en Trompeteros, mientras que se observó valores reducidos de este índice en otros distritos reflejan una estructura genética dominada por pocos MLGs. Los valores del índice de dominancia corroboraron este patrón, donde valores elevados reflejan baja dominancia clonal, como en Trompeteros ($\lambda = 0.90$). La heterocigosidad esperada se mantuvo moderada, mostrando que, a pesar de la reducción de casos durante el Plan Malaria Cero, persiste la diversidad genética en los MLG de *P. falciparum*.

Finalmente, en los distritos con muestreo en más de un periodo, se describieron patrones de variación espacial con una aproximación temporal estrictamente descriptiva. En San Juan Bautista, la diversidad genética fue elevada durante PAMAFRO ($H_{exp} = 0.55$; $MLG = 9$; $G = 5.04$; $H = 1.86$; $\lambda = 0.80$), mientras que en el periodo Post-PAMAFRO se registró una disminución marcada de estos índices ($H_{exp} = 0.11$; $MLG = 3$; $G = 2.45$; $H = 0.96$; $\lambda = 0.59$), lo que permite una aproximación descriptiva a la variación temporal local, sin constituir evidencia de una dinámica poblacional continua. En Mazán, la diversidad genética se mantuvo en valores moderados entre los periodos evaluados. No obstante, dada la limitada cobertura temporal, estos resultados se interpretan de manera descriptiva y no como evidencia de un cambio temporal poblacional (Tabla 10)

Tabla 10. Coeficientes de diversidad genética por cada distrito de colección en cada

<i>Intervalo de años de muestreo</i>	Sitio de Colección	N	MLG	eMLG	SE	H	G	λ	Hexp
PAMAFRO	Mazán	9	6	6.00	0.00	1.58	3.86	0.74	0.34
	San Juan Bautista	29	9	5.49	1.01	1.86	5.04	0.80	0.55
	Requena	11	4	3.91	0.29	1.17	2.69	0.63	0.12
	Yurimaguas	12	4	3.50	0.58	0.84	1.71	0.42	0.17
	Alto nanay	19	5	3.57	0.81	1.13	2.42	0.59	0.10
	Subtotal	80	23	7.05	1.18	2.63	10.03	0.90	0.57
Post- PAMAFRO	Punchana	96	12	3.89	1.11	1.38	2.34	0.57	0.21
	Iquitos	64	8	3.24	0.98	1.07	1.92	0.48	0.25
	San Juan Bautista	9	3	3.00	0.00	0.96	2.45	0.59	0.11
	Nauta	14	5	4.35	0.64	1.33	3.06	0.67	0.30
	Subtotal	183	20	4.31	1.24	1.65	2.62	0.62	0.26
Plan Malaria Cero	Iquitos	9	1	1.00	0.00	0.00	1.00	0	0.00
	San Juan Bautista	7	2	2.00	0.00	0.41	1.32	0.24	0.16
	Punchana	19	4	2.58	0.82	0.61	1.39	0.28	0.15
	Mazán	10	5	5.00	0.00	1.23	2.50	0.60	0.03
	Trompeteros	87	32	7.21	1.28	2.83	9.87	0.90	0.42
	Subtotal	132	42	7.15	1.29	2.91	9.83	0.90	0.47

periodo de intervención.

- **N:** número de muestras, **MLG:** número de genotipos multilocus únicos observados en la población, **eMLG:** número esperado de genotipos multilocus únicos bajo el supuesto de una distribución uniforme de alelos, **SE:** error estándar asociado con la estimación de eMLG, **H (índice de diversidad de Shannon–Wiener):** mide la diversidad genética integrando tanto el número de genotipos multilocus como su distribución de frecuencias, **G (índice G de Stoddart y Taylor):** número efectivo de genotipos multilocus, **λ (lambda) :** índice de dominancia de Simpson, **Hexp:** Diversidad genética de Nei (heterocigosidad esperada).

5.4. Patrones de desequilibrio de ligamiento y clonalidad epidémica en poblaciones de *P. falciparum*

A nivel de períodos de tiempo, se detectaron valores elevados y estadísticamente significativos de $\bar{r}_d$ en los análisis sin corrección por clonación durante el período PAMAFRO ($\bar{r}_d = 0.375$, $p < 0.01$) y el período Post-PAMAFRO ($\bar{r}_d = 0.371$, $p < 0.01$), indicando desequilibrio de ligamiento. Sin embargo, tras aplicar la corrección por clonación, los valores de $\bar{r}_d$ disminuyeron (PAMAFRO: $\bar{r}_d = 0.173$; Post-PAMAFRO: $\bar{r}_d = 0.070$; $p < 0.01$), lo que sugiere que el LD podría ser explicado por clonalidad epidémica (Figura 4A).

Durante el período Plan Malaria Cero, los valores de $\bar{r}_d$ fueron los más bajos entre los periodos previos evaluados, tanto antes como después de la corrección por clonación ($\bar{r}_d = 0.145$ y $\bar{r}_d = 0.031$, respectivamente; $p < 0.01$), lo que es compatible con una menor influencia de la clonalidad epidémica en los conjuntos de muestras analizadas, sin que ello permita inferir procesos reproductivos poblacionales a escala temporal (Figura 4A).

El análisis por distrito dentro de cada intervalo de años de muestreo reveló heterogeneidad espacial en los patrones de LD. En San Juan Bautista, Iquitos y Punchana mostraron valores elevados de $\bar{r}_d$ en los análisis sin corrección por clonación ($\bar{r}_d > 0.5$, $p < 0.01$), de los cuales en Punchana se redujo marcadamente tras la corrección por clonación. Por el contrario, distritos como Alto Nanay, Nauta y Trompeteros presentaron valores de $\bar{r}_d$ cercanos a cero después de la corrección por clonación (Figura 4B y Anexo 02).

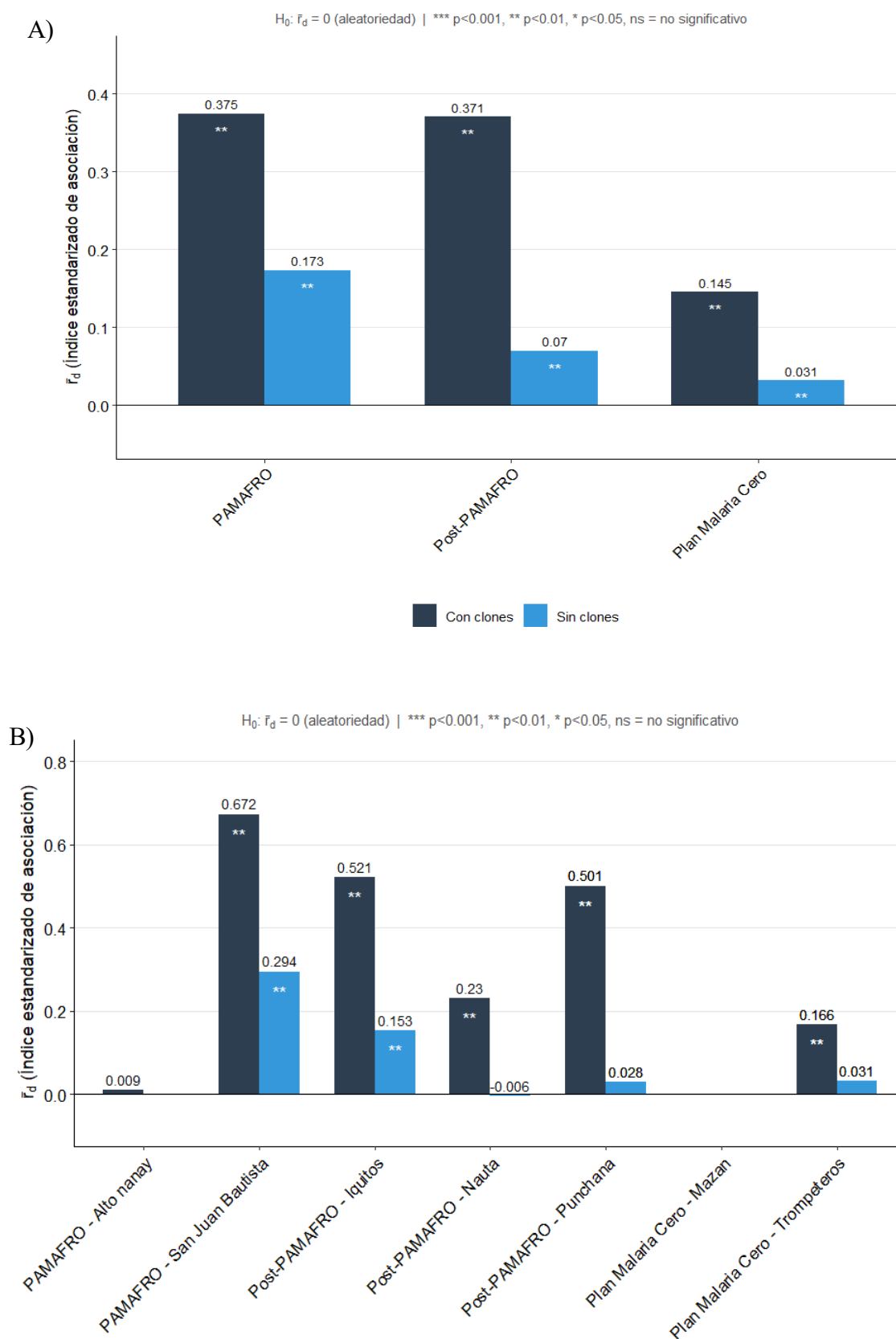


Figura 4. Desequilibrio de ligamiento ($\bar{r}_d$) en poblaciones de *P.falciparum* antes y después de la corrección por clonación. A) LD por cada intervalo de años de

muestreo, B) LD por cada distrito dentro de periodo de intervención.

5.5. Patrones de diferenciación genética de *P. falciparum*

Con el fin de describir la diferenciación genética espacial entre poblaciones de *P. falciparum*, se estimaron valores de F_{st} entre distritos para cada conjunto de muestras analizado (Figura 5). Este análisis se realizó considerando la presencia de genotipos clonales y posibles brotes locales.

Durante el conjunto de muestras correspondientes al periodo PAMAFRO, se observaron valores de F_{st} de moderados a muy elevados entre varios pares de distritos, destacando la alta diferenciación entre Alto Nanay–Yurimaguas y Requena–Yurimaguas, lo que sugiere una circulación limitada de genotipos y la posible presencia de focos geográficos genéticamente diferenciados (Figura 5A).

En el conjunto de muestras del periodo Post- PAMAFRO, los valores de F_{st} fueron bajos o no significativos entre los distritos de Iquitos, Punchana y San Juan Bautista, mientras que Nauta mantuvo una diferenciación moderada respecto a estos distritos (Figura 5B). Este patrón podría indicar mayor conectividad genética urbana, en contraste con localidades que presentan una estructura genética más diferenciada, reflejando la heterogeneidad espacial en la composición genética de las poblaciones analizadas.

En las muestras del periodo Plan Malaria Cero, se mantuvo una diferenciación moderada entre Trompeteros y los distritos urbanos evaluados (Figura 5C), lo que indica la persistencia de diferencias genéticas espaciales entre poblaciones, sin que ello

permita inferir cambios poblacionales de carácter temporal o efectos asociados a intervenciones de control, dado que los distritos muestreados difieren entre periodos. De manera complementaria, se estimaron valores de F_{st} entre muestras recolectadas en distintos años dentro de un mismo distrito (Figura 6). Este análisis mostró diferenciación genética de moderada a elevada en distritos como Mazán, Nauta, Punchana y San Juan Bautista, lo que evidencia variaciones en la composición genética local entre conjuntos de muestras recolectadas en diferentes momentos. No obstante, estas diferencias deben interpretarse con cautela, ya que los años comparados corresponden a muestreos no continuos y con tamaños muestrales desiguales.

Entre los distritos evaluados, San Juan Bautista fue el único que contó con muestras disponibles en los tres periodos analizados, lo que permitió realizar una aproximación descriptiva a la variación temporal local en la estructura genética de *P. falciparum*. Aun en este caso, los resultados no constituyen evidencia de una dinámica poblacional continua, sino que reflejan cambios en la composición genética observada entre conjuntos de muestras. En los demás distritos, como Mazán, la cobertura temporal limitada impidió una evaluación temporal robusta, por lo que los análisis se mantuvieron estrictamente a nivel descriptivo y agrupados por periodos de muestreo, evitando interpretaciones potencialmente sesgadas.

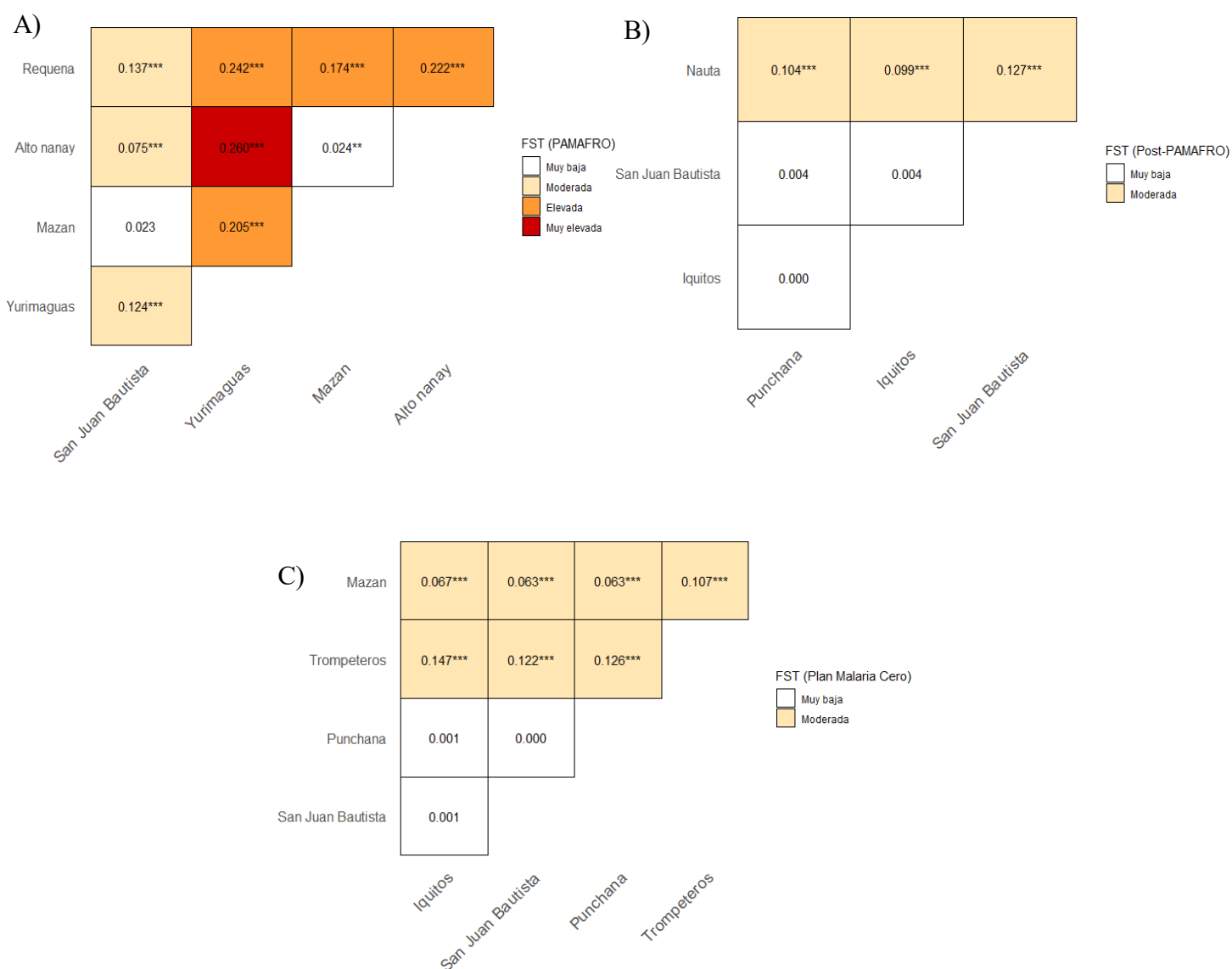
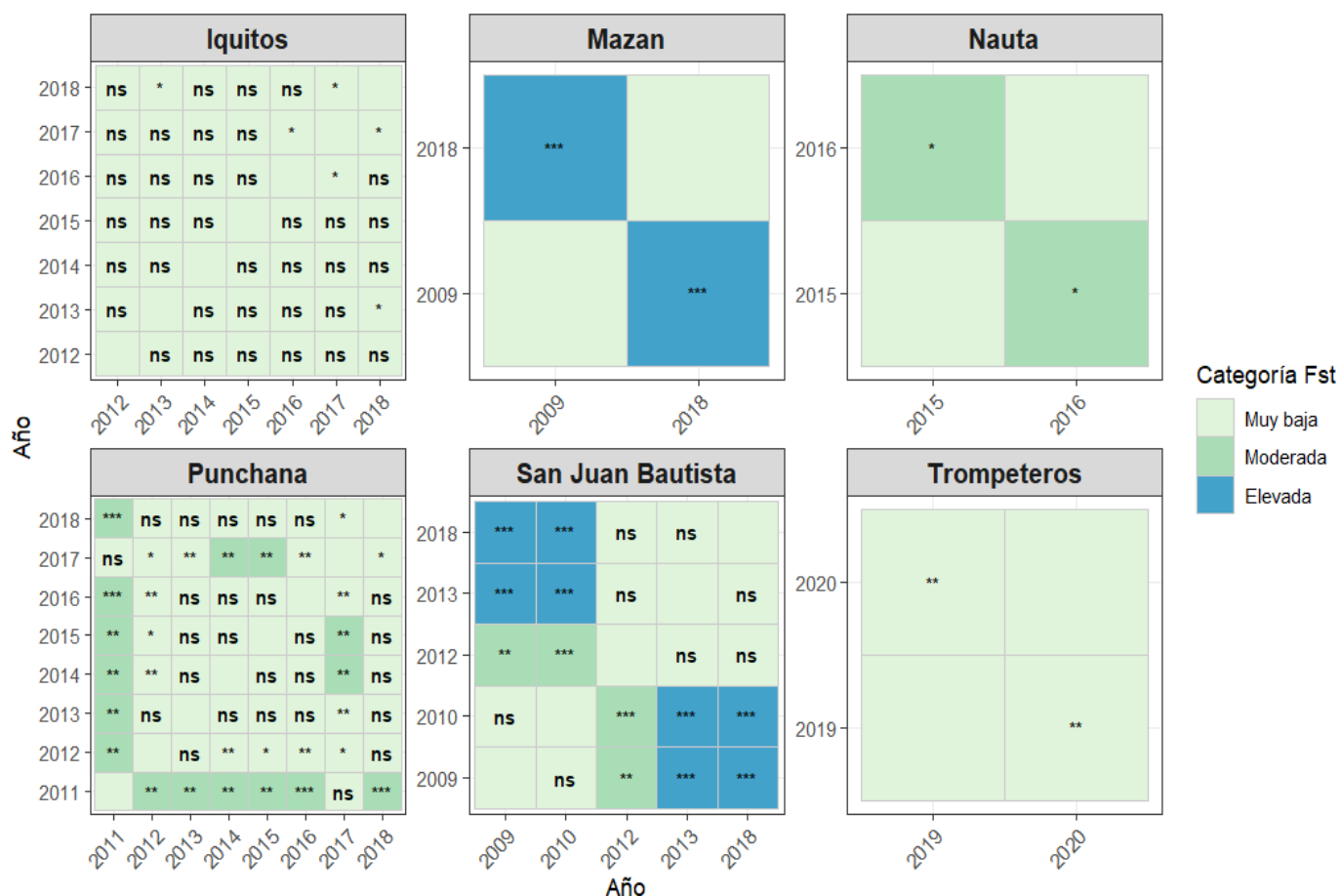


Figura 5. Diferenciación genética por Fst por cada distrito de colección de acuerdo con cada intervalo de años de muestreo definidos previamente. A) 2009-2010 (PAMAFRO), B) 2011-2017 (Post-PAMAFRO), C) 2018-2020 (Plan Malaria Cero)



5.6. Variación en la estructura poblacional de *P. falciparum* inferida mediante AMOVA

Se evaluó la estructura genética de *P. falciparum* con el objetivo de describir la distribución de la variación genética entre y dentro de poblaciones para cada conjunto de muestras analizado. La evaluación de la diferenciación poblacional mediante el Análisis de varianza Molecular (AMOVA) sugirió que las poblaciones del parásito presentan una estructuración genética tanto a nivel geográfico como temporal (Tabla 11). Durante el periodo PAMAFRO, el 53 % de la variación genética total se explica por diferencias entre poblaciones ($p < 0.001$) lo cual indica que, una marcada estructuración genética espacial entre los distritos

analizados en este conjunto de muestras. Una proporción considerable de la variación genética se explicó también dentro de las poblaciones, evidenciando la coexistencia de diversidad intrapoblacional junto con diferenciación entre localidades.

La variación atribuible a las diferencias entre poblaciones de *P. falciparum* disminuyó notablemente en los distritos durante el periodo de Post-PAMAFRO (Tabla 11), donde el 21 % de la variación genética total se debe a diferencias entre localidades. Este resultado describe una estructura genética espacial menos marcada entre los distritos evaluados en este conjunto de muestras, en comparación con el periodo previo, lo que refleja diferencias en la composición genética observada entre poblaciones.

Durante el periodo correspondiente al Plan Malaria Cero, el AMOVA mostró nuevamente una estructura genética relativamente marcada entre poblaciones, donde el 49 % de la variación genética total se explica entre poblaciones. Es importante destacar que las poblaciones analizadas corresponden a distritos diferentes a los muestreados durante PAMAFRO y Post-PAMAFRO, por lo que la comparación temporal debe interpretarse con cautela.

En todos los conjuntos de muestras analizados, una fracción importante de la variación genética permaneció dentro de las poblaciones, lo que evidencia la coexistencia de diversidad dentro de cada población junto con diferenciación espacial entre distritos, patrón consistente con los resultados obtenidos mediante los análisis de F_{st} , desequilibrio de ligamiento y estructura poblacional

De manera complementaria, se realizó un AMOVA específico para el distrito de San Juan Bautista, único distrito con muestras disponibles en los tres periodos evaluados (Anexo 03). En este análisis, el 50 % de la variación genética total se explicó por diferencias entre periodos ($p < 0.001$), lo que permite una aproximación descriptiva a la variación temporal local en la estructura genética de *P. falciparum*.

Tabla 11. Análisis de varianza molecular (AMOVA) por intervalo de años de muestreo

	Componente	SSD	MSD	GL	Componente de Varianza	Valor P	Estadístico Phi	Coefficiente de Varianza
PAMAFRO	Entre poblaciones (pop)	155.43	38.86	4	2.42	0	0.53	15.16
	Dentro de las poblaciones (Error)	159.78	2.13	75	2.13	NA	NA	NA
	Total	315.22	3.99	79	NA	NA	NA	NA
Post-PAMAFRO	Entre poblaciones (pop)	51.66	17.22	3	0.43	0	0.21	36.25
	Dentro de las poblaciones (Error)	283.48	1.58	179	1.58	NA	NA	NA
	Total	335.15	1.84	182	NA	NA	NA	NA
Plan Malaria Cero	Entre poblaciones (pop)	155.83	38.96	4	2.09	0	0.49	17.55
	Dentro de las poblaciones (Error)	279.63	2.20	127	2.20	NA	NA	NA
	Total	435.46	3.32	131	NA	NA	NA	NA

5.7. Coexistencia de clústeres dominantes y mezcla genética en la estructura poblacional de *P. falciparum*

El análisis de STRUCTURE permitió describir la composición genética de las poblaciones de *P. falciparum* en los distritos evaluados, evidenciando la coexistencia de clústeres genéticos dominantes y señales de mezcla genética dentro de cada conjunto de muestras analizado. Dada la presencia de clonalidad, los resultados se interpretan desde una perspectiva descriptiva y exploratoria, sin asumir poblaciones discretas ni continuidad temporal entre conjuntos de muestras.

Durante los años que corresponden a PAMAFRO, el modelo con $K = 2$ mostró una asignación predominante de los individuos a uno de los clústeres, con un número reducido de individuos con señales de mezcla genética. Al considerar $K = 4$, se detectó una subestructuración adicional, con la presencia de clústeres secundarios, lo que indica que, dentro de estos distritos, coexistían agrupamientos genéticos diferenciados, aunque con predominio de ciertos componentes genéticos.

En el periodo Post-PAMAFRO, el modelo con $K = 2$ evidenció nuevamente la dominancia de un clúster a lo largo del tiempo, aunque con fluctuaciones en su frecuencia relativa. Sin embargo, al evaluar $K = 4$, se observó una mayor heterogeneidad genética, con múltiples clústeres coexistiendo y un aumento en la proporción de individuos con ancestría compartida. Este patrón sugiere una mayor mezcla genética dentro de los distritos evaluados en este periodo, sin que ello implique continuidad directa con los patrones observados en periodos previos.

En el periodo de Plan Malaria Cero, el análisis con $K = 2$ mostró cambios en la

dominancia relativa de los clústeres, mientras que el modelo con $K = 3$ reveló una reorganización de la estructura genética, caracterizada por la alternancia de clústeres predominantes y la presencia de individuos con composición genética mixta. Estos resultados reflejan una heterogeneidad genética espacial considerable entre los distritos evaluados en este conjunto de muestras.

En conjunto, los resultados de STRUCTURE muestran que la estructura genética observada en cada intervalo de años de muestreo está influenciada por los distritos muestreados, por lo que las comparaciones temporales deben interpretarse con cautela. No obstante, la presencia recurrente de clústeres dominantes dentro de cada periodo, junto con episodios de mezcla genética, es coherente con los patrones detectados mediante AMOVA, F_{st} y LD, reforzando la evidencia de una estructura genética espacialmente heterogénea y variable en el tiempo en las poblaciones de *P. falciparum*.

Estos patrones deben interpretarse como agrupamientos genéticos descriptivos, dado que el programa STRUCTURE asume ausencia de clonalidad, supuesto que no se cumplen plenamente en todos los conjuntos de muestras analizados. En este estudio, los valores de $\bar{r}_D$ observados durante los periodos PAMAFRO y Post-PAMAFRO, y su reducción tras la corrección por clonación, indican que los patrones detectados por STRUCTURE podrían estar influenciados por la sobrerrepresentación de linajes clonales y por la heterogeneidad espacial del muestreo. En este contexto, los clústeres inferidos no deben interpretarse como poblaciones discretas, sino como agrupamientos genéticos descriptivos, cuya variación es consistente con los resultados obtenidos mediante AMOVA, F_{st} y

análisis de desequilibrio de ligamiento.

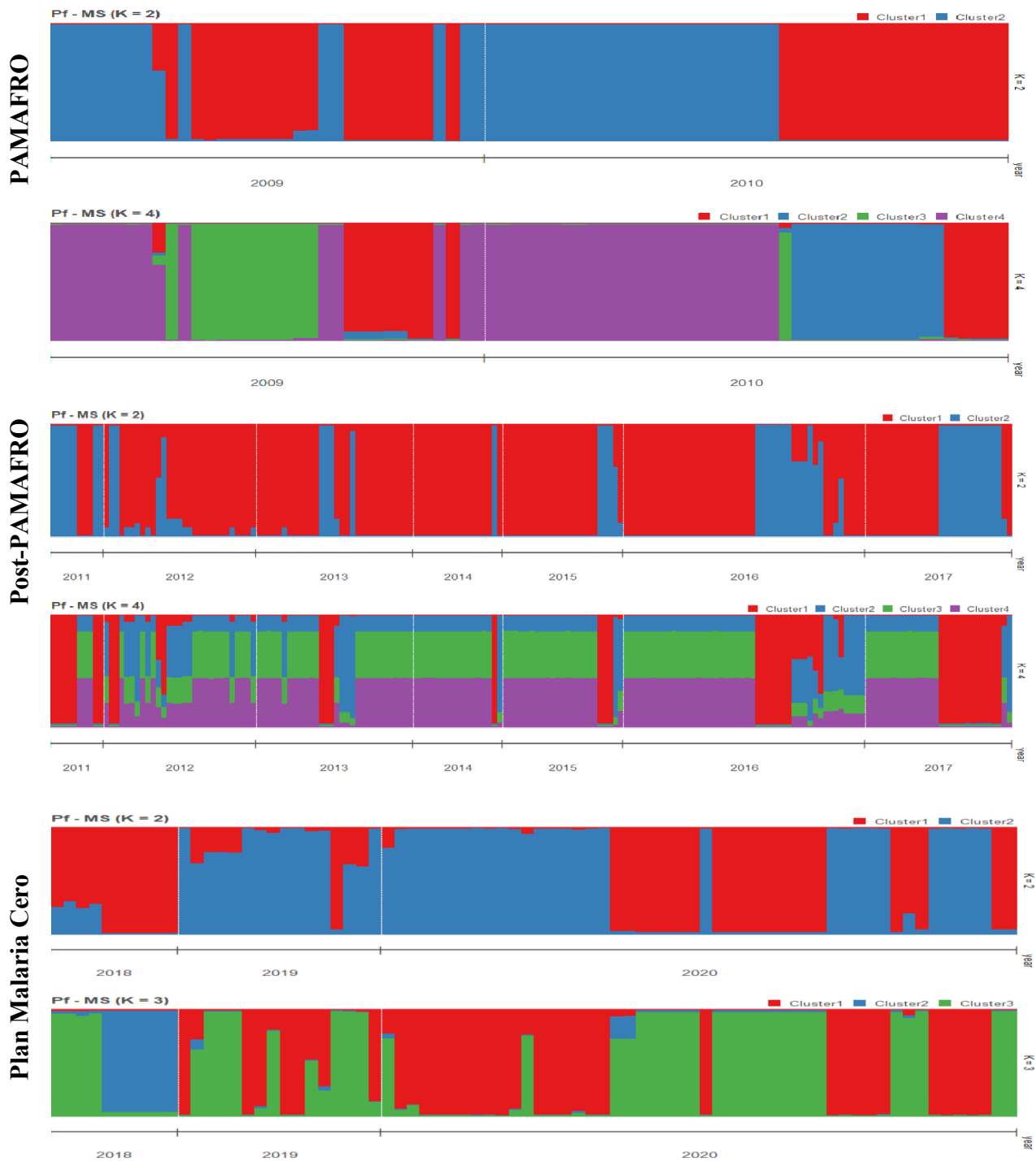


Figura 7. Cambios en la estructura genética de *Plasmodium falciparum* inferidos por STRUCTURE (K = 2–4). Cada barra representa un aislado individual, ordenado por año dentro de cada intervalo de años de muestreo, y los colores indican la proporción de ancestría asignada a cada clúster

5.8. Variación en la estructura genética de las poblaciones *P. falciparum* según PCA

El análisis de componentes principales (PCA) se realizó de manera independiente para cada intervalo de años de muestreo, con el objetivo de describir la estructura genética dentro de cada conjunto de datos. El análisis de PCA mostró patrones diferenciados de estructura genética entre periodos, los cuales son concordantes con los resultados obtenidos mediante STRUCTURE, aunque con variaciones atribuibles a los distritos muestreados en cada intervalo de tiempo.

Durante el periodo PAMAFRO, los dos primeros componentes explicaron una proporción considerable de la variación genética ($PC1 = 45.1 \%$, $PC2 = 24.4 \%$), mostrando una dispersión de los individuos en el espacio multivariado, con agrupamientos parcialmente asociados a distritos y años (Figura 8A). Este patrón indicaría la estructura genética espacial marcada y con dominancia de ciertos agrupamientos genéticos descritos mediante el análisis de STRUCTURE para este conjunto de muestras (Figura 7A)

En el periodo Post-PAMAFRO, el PCA reveló una distribución más continua y solapada de los individuos, a pesar de que los dos primeros componentes explicaron una proporción similar de la variación genética ($PC1 = 48 \%$, $PC2 = 24.5 \%$). La ausencia de agrupamientos bien definidos y el alto solapamiento entre distritos sugieren una menor diferenciación genética espacial (Figura 8B). Este patrón es coherente con la disminución de la estructura genética observada mediante STRUCTURE, así como con los menores valores de diferenciación observados previamente mediante AMOVA y F_{st} (Figura 7A, Tabla 11 y Figura 5B).

Por el contrario, en el periodo Plan Malaria, el PCA volvió a mostrar una mayor dispersión y diferenciación de los individuos en el espacio genético (PC1 = 44.3 %, PC2 = 23 %), con agrupamientos parciales asociados a ciertos distritos y años, aunque sin una separación completamente definida (Figura 8C). Dado que este conjunto de datos incluye distritos distintos a los evaluados previamente, estos patrones deben interpretarse con cautela; sin embargo, la reaparición de una estructura más marcada es concordante con los resultados de STRUCTURE, que evidencian la coexistencia de múltiples clústeres y una mayor heterogeneidad genética en este conjunto de poblaciones (Figura 7C).

El PCA realizado específicamente para el distrito de San Juan Bautista (Anexo 04) no evidenció una separación clara de los individuos por periodo, sino una superposición parcial entre los conjuntos de muestras PAMAFRO, Post-PAMAFRO y Plan Malaria Cero. Este patrón indica que la población local de *P. falciparum* presenta heterogeneidad dentro de cada periodo y una reorganización parcial de los genotipos entre conjuntos de muestras. La dispersión en los componentes principales del PCA sugiere la coexistencia y posible reemplazo local de linajes, más que una transición genética progresiva entre periodos, y podría estar influenciada por la asimetría en los tamaños muestrales entre conjuntos de muestras.

En conjunto, el análisis de PCA respalda los resultados obtenidos mediante STRUCTURE, AMOVA y F_{st} , al mostrar que la estructura genética de *P. falciparum* en Loreto tiene una heterogeneidad espacial, con variaciones

observadas entre conjuntos de muestras que deben interpretarse de manera contextual y exploratoria, de acuerdo con las limitaciones del diseño del estudio.

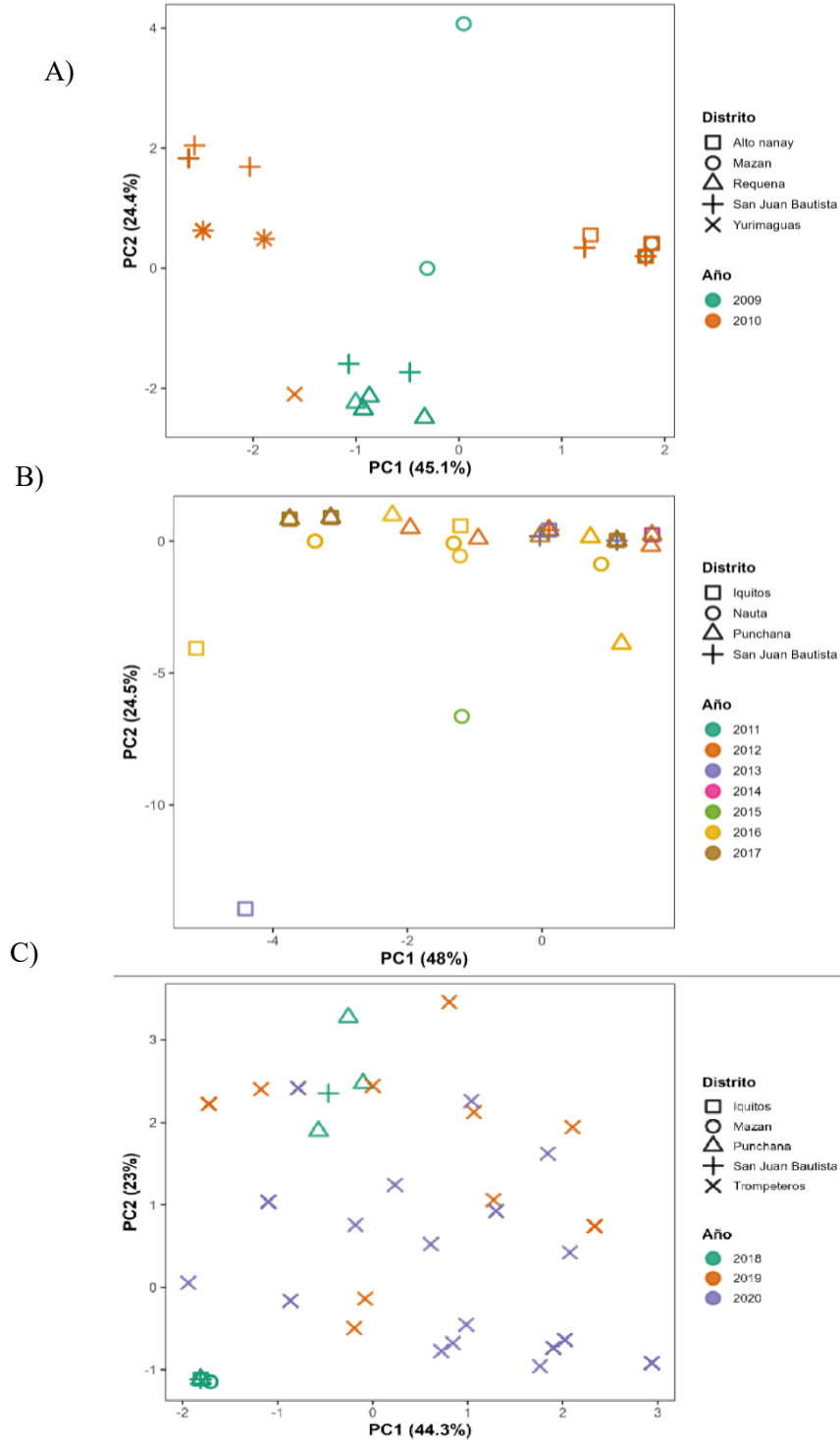


Figura 8. Análisis de PCA de microsatélites por intervalo de años de muestreo en poblaciones de *P. falciparum* A) PAMAFRO, B) Post-PAMAFRO, C) Plan Malaria Cero. Cada punto representa un aislado individual de *P. falciparum*, proyectado sobre los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2).

5.9. Coexistencia y distribución de linajes multilocus de *P. falciparum*

Tras la caracterización de la diversidad genética, se realizó un análisis de redes de haplotipos multilocus a partir de los genotipos individuales con el fin de visualizar relaciones por distancia genética entre haplotipos y describir su frecuencia y distribución geográfica dentro de los conjuntos de muestras analizados. Esta aproximación permitió agrupar genotipos en haplogrupos multilocus, que se emplean aquí como unidades descriptivas para vigilancia molecular y no como clados filogenéticos formales.

A partir de la red multilocus se identificaron 35 haplogrupos presentes en los distintos conjuntos de muestras (Figura 9). Algunos de estos grupos como C1, D1, E1, F1, H1, K1, L1, M1, S1 y T1 aparecieron recurrentemente en los conjuntos de muestras Post-PAMAFRO y Plan Malaria Cero, lo que indica persistencia observada de ciertos haplogrupos en los datos disponibles. Otros haplogrupos, tales como G1, J1, N1 y U1 se registraron de forma más restringida en espacio o tiempo dentro de los muestreos realizados. Estas observaciones describen patrones de coexistencia, recurrencia y presencia localizada de linajes multilocus en los distritos analizados, y deben interpretarse considerando la cobertura geográfica y temporal no homogénea de las colecciones.

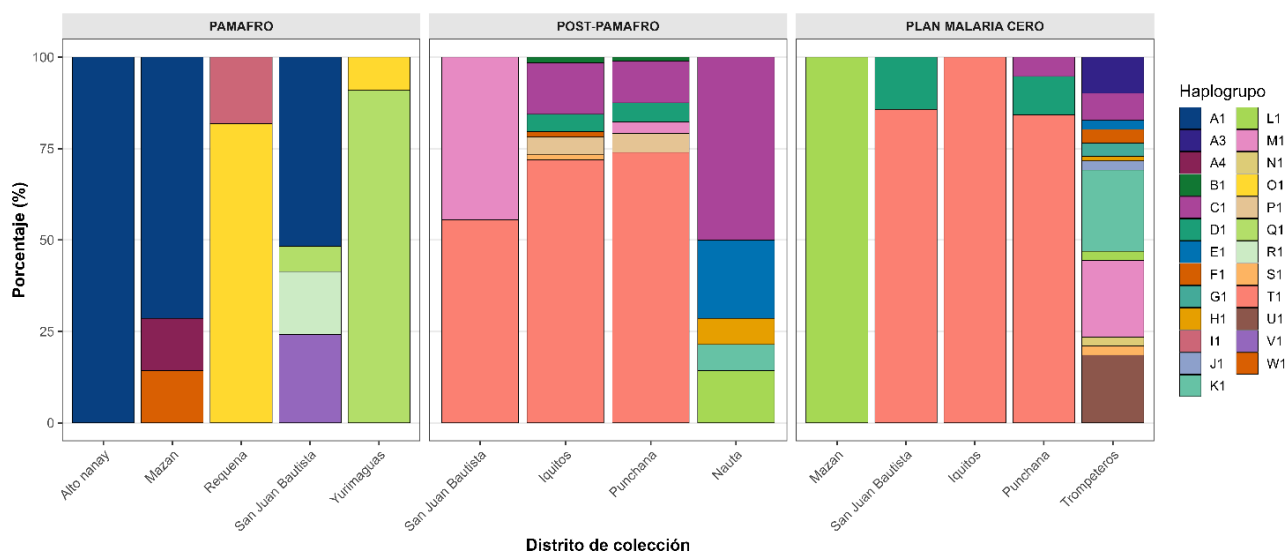


Figura 9. Distribución de linajes por distrito y por intervalo de años de muestreo

En el conjunto de muestras correspondientes a PAMAFRO (Figura 10), se identificaron 8 linajes diferentes, entre los cuales A1 fue el más frecuente ($n=37$) concentrándose principalmente en Alto Nanay y San Juan Bautista. Otros linajes como O1 ($n=10$) y Q1 ($n=12$) fueron observados en Requena y Yurimaguas (Anexo 05A y 06), respectivamente, sugiriendo una distribución geográfica específica. En este conjunto, la distribución de haplogrupos estuvo asociada a distritos rurales y semiurbanos, lo que se refleja en la composición genética observada para esas localidades.

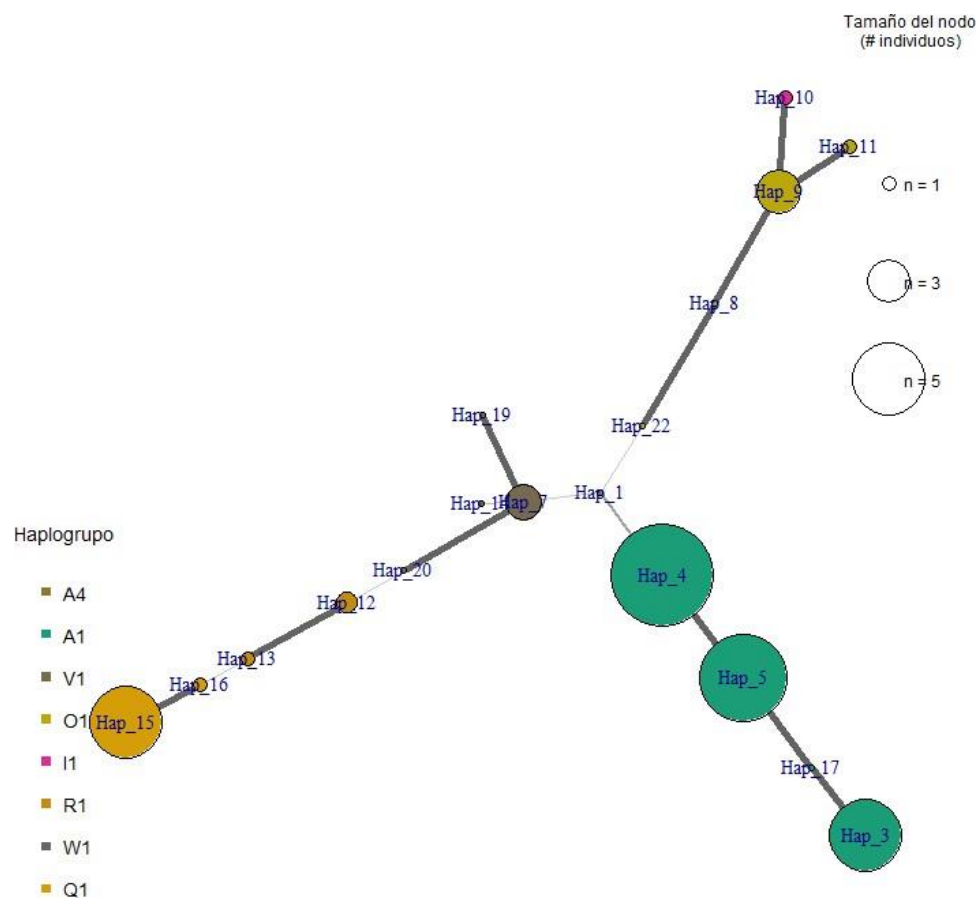


Figura 10. Red de haplogrupos del periodo de PAMAFRO

En el conjunto de muestras del periodo Plan Malaria Cero (Figura 12), se registraron 15 linajes, destacando nuevamente T1 (n=31), ahora con fuerte presencia en San Juan Bautista y Punchana, mientras que aparecieron nuevos linajes como U1, J1, G1, N1 y A3, con distribución casi exclusiva en el distrito de Trompeteros (Anexo 05C y 06). La alta diversidad observada en Trompeteros en este conjunto de muestras puede reflejar una mayor heterogeneidad local en las colecciones analizadas. No obstante, es importante considerar que la diversidad localizada observada podría estar influenciada por la representatividad de la muestra. La menor cobertura muestral en otras regiones podría generar un sesgo que sobrevalore la diversidad observada en Trompeteros.

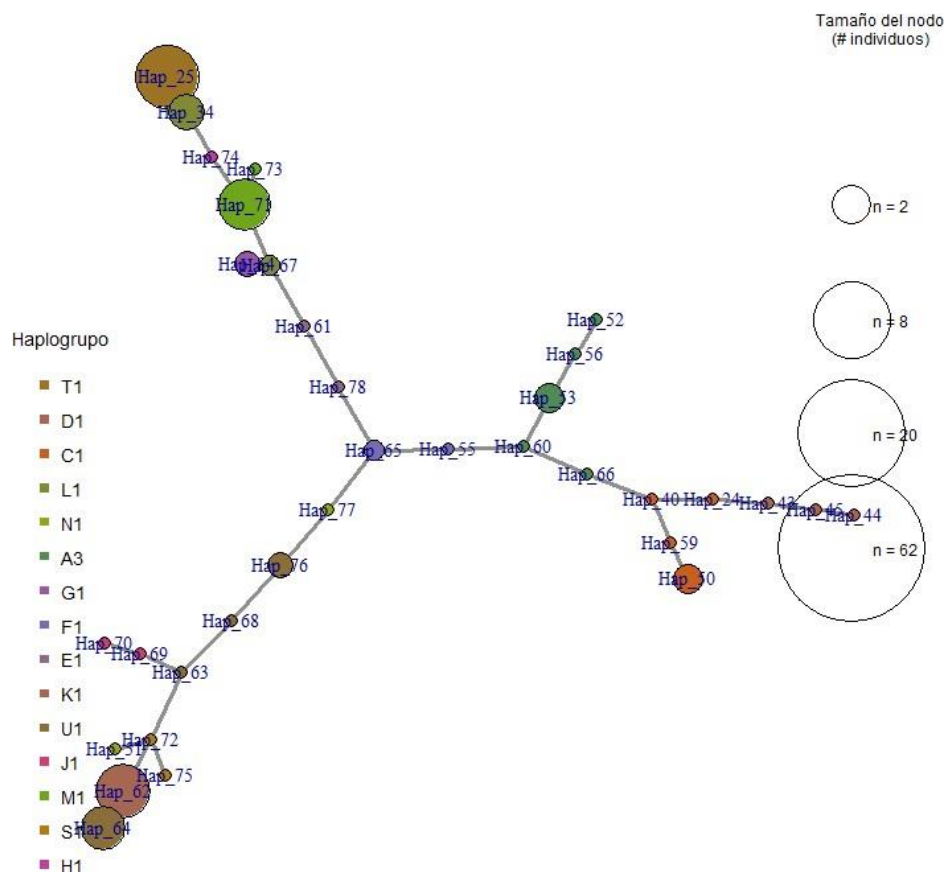


Figura 12. Red de haplogrupos del periodo de Plan Malaria Cero

En conjunto, la red de haplotipos multilocus ofrece una representación integradora de la variabilidad genética y permite identificar linajes útiles para la vigilancia. Los patrones observados en las redes, coexistencia de haplogrupos dominantes, recurrencia de algunos grupos y presencia localizada de otros permiten reforzar la idea de una estructura genética espacialmente heterogénea de las poblaciones de *P. falciparum* en los nueve distritos de la región de Loreto evaluados.

VI. DISCUSIÓN

Este estudio integró información de genotipificación por microsatélites neutros de infecciones de *P. falciparum* con el objetivo de describir la estructura genética y la distribución espacial de los linajes multilocus en Loreto, utilizando muestras recolectadas en distintos contextos epidemiológicos entre los años 2009 y 2020. A través de un enfoque exploratorio y descriptivo, se evidenció una heterogeneidad genética marcada entre distritos, así como variación en la composición de linajes multilocus y en la diversidad genética observada entre los conjuntos de muestras analizados.

Si bien los conjuntos de muestras corresponden a periodos que coinciden con los diferentes programas de intervención desplegados en Loreto [PAMAFRO (2009-2010), Post-PAMAFRO (2011-2017) y Plan Malaria Cero (2018-2020)], las diferencias en distritos muestreados, cobertura geográfica y tamaños muestrales limitan la posibilidad de evaluar efectos causales directos de dichas intervenciones. En este sentido, los resultados deben interpretarse como descripciones de escenarios genéticos asociados a distintos contextos espaciales y operativos, más que como evidencia de cambios poblacionales inducidos por intervenciones específicas. En este marco, el principal aporte del estudio es la aplicación del análisis de haplotipos y haplogrupos multilocus como una aproximación integradora para la vigilancia molecular de carácter exploratorio, que complementa los enfoques previamente utilizados en el país basados en métricas clásicas de diversidad genética.

6.1. Aumento de infecciones policlonales y heterogeneidad espacial en la transmisión de *P. falciparum*

En este estudio se observó una variación en la proporción de infecciones policlonales entre los conjuntos de muestras analizados. No se detectaron infecciones policlonales en el conjunto de muestras colectadas durante el tiempo que coincidió con PAMAFRO, mientras que en los conjuntos de muestras colectadas después de PAMAFRO y durante el despliegue del Plan Malaria Cero se registraron proporciones mayores; en particular, en este último conjunto la proporción de infecciones policlonales alcanzó el 24,5 %. Si bien este patrón difiere de algunos reportes a escala regional, es consistente con estudios focales que han documentado una marcada heterogeneidad espacial en la complejidad de la infección entre localidades amazónica (75).

No obstante, debido a que las zonas muestreadas y los tamaños muestrales no fueron homogéneos entre los conjuntos analizados, esta variación debe interpretarse con cautela. En este sentido, la mayor proporción de infecciones policlonales observada en el conjunto de Plan Malaria Cero podría reflejar diferencias espaciales en la intensidad de transmisión entre localidades, más que un incremento temporal, dado que la complejidad de la infección está influenciada por condiciones locales de transmisión, como la frecuencia de inoculaciones infecciosas y la coexistencia de múltiples linajes genéticos en una misma área (76). Cabe indicar que esto tiene coherencia con que una proporción importante de las muestras de este conjunto proviene del distrito de Trompeteros, donde se observó una elevada diversidad genética y la circulación simultánea de múltiples linajes

multilocus (56), lo que incrementa la probabilidad de infecciones con más de un genotipo independientemente del intervalo temporal de muestreo.

La detección de infecciones policlonales en el conjunto Post-PAMAFRO evidencia la coexistencia de múltiples genotipos dentro de una misma infección, un patrón que ha sido asociado epidemiológicamente a contextos de transmisión activa y que puede favorecer eventos de recombinación genética entre linajes (19). Sin embargo, de acuerdo con el diseño del estudio, la presencia de infecciones policlonales se interpreta como un indicador indirecto de posibles procesos locales de transmisión, cuya distribución entre localidades permite describir la heterogeneidad espacial en la transmisión, más que como evidencia de cambios temporales sostenidos o de efectos directos de intervenciones de control (76).

6.2. La diversidad genética de *P. falciparum* no es homogénea dentro de cada periodo, sino que presenta una estructuración espacial.

Los resultados muestran diferencias en los niveles estimados de diversidad genética de *P. falciparum* entre los periodos analizados (Tabla 10). No obstante, dado que los distritos muestreados difieren entre PAMAFRO, Post-PAMAFRO y Plan Malaria Cero, estas diferencias no fueron interpretadas como cambios temporales directos en la diversidad genética. En este contexto, los valores globales de diversidad reflejan principalmente la composición genética de los distritos incluidos en cada periodo, más que procesos temporales de reducción o incremento de la diversidad genética.

Al analizar la diversidad genética a escala espacial dentro de cada periodo, se observó una marcada heterogeneidad entre distritos (Tabla 10). Durante el periodo

PAMAFRO, se observaron niveles elevados de diversidad genética en algunos distritos, evidenciados por valores altos de heterocigosidad esperada (H_{exp}) y diversidad genotípica. En particular, San Juan Bautista presentó los valores más altos de diversidad genética, mientras que distritos como Yurimaguas y Requena mostraron valores considerablemente más bajos.

En el periodo Post-PAMAFRO, los valores globales de heterocigosidad esperada fueron menores, lo que sugiere una mayor dominancia de ciertos genotipos multilocus en los distritos muestreados durante este periodo. No obstante, la diversidad genética continuó mostrando variación entre distritos, con Punchana y Nauta presentando niveles de diversidad relativamente más altos en comparación con San Juan Bautista e Iquitos, lo que indica que la estructura genética no fue homogénea a escala local.

Los cambios temporales se restringieron al distrito de San Juan Bautista, el único distrito con muestreo en los tres periodos de intervención (Tabla 10). En el cual, se pudo evidenciar que la diversidad genética de *P. falciparum* no es homogénea en el tiempo dentro de una misma localidad. San Juan Bautista mostró una reducción marcada de la diversidad genética entre PAMAFRO y Post-PAMAFRO. Este patrón refuerza la heterogeneidad espacio y temporal de las poblaciones observadas y respalda la interpretación de que los distritos no son genéticamente estables en el tiempo (Figura 6), lo que justifica el análisis por cada periodo de intervención más que por agrupamientos espaciales generales.

Las comparaciones temporales se restringieron al distrito de San Juan Bautista por ser el único distrito con muestras en los tres periodos de intervención. Aunque otros distritos contaron con muestras en dos periodos, no se incluyeron en análisis temporales de estructura genética debido a que esta limitación se ve acentuada por la ausencia de un tercer punto temporal, lo que podría generar interpretaciones aún más sesgadas. Por ello, estos distritos se analizaron únicamente desde un enfoque espacial descriptivo. El análisis se organizó por conveniencia en periodos de tiempo que coinciden con las intervenciones desplegadas en Loreto más que como una evaluación longitudinal estricta. En este contexto, la comparación temporal se interpreta como exploratoria, orientada a describir variaciones en la diversidad genética bajo distintos escenarios de intervención, y no como evidencia de dinámicas evolutivas continuas.

Durante el periodo Plan Malaria Cero, los valores de diversidad genética observados reflejan nuevamente una marcada heterogeneidad espacial. Algunos distritos presentaron altos niveles de diversidad genotípica y baja dominancia clonal, compatibles con la co-circulación de múltiples linajes genéticamente diferenciados, mientras que otros mostraron una estructura genética dominada por pocos genotipos. Sin embargo, el 66 % de las muestras de Plan Malaria Cero pertenecen a Trompeteros, por lo que los valores globales de diversidad deben interpretarse considerando el posible efecto de la representatividad muestral.

En conjunto, los resultados indican que la diversidad genética de *P. falciparum* en los nueve distritos evaluados de la región de Loreto presentan una marcada

heterogeneidad espacial. Los patrones observados a lo largo del tiempo solo pueden interpretarse de manera robusta cuando se analizan a escala local, dentro de distritos con muestreo comparable entre periodos. A esta escala, los cambios en la diversidad genética pueden reflejar procesos de mezcla genética y co-circulación de linajes, potencialmente influenciados por la conectividad entre focos de transmisión, la movilidad humana y la heterogeneidad ecológica entre localidades, tal como ha sido descrito en estudios longitudinales realizados en la Amazonía peruana (16), pero la confirmación de estos mecanismos requiere muestreos sistemáticos.

6.3. Clonalidad epidémica y desequilibrio de ligamiento en contextos de baja transmisión de *P. falciparum*

A nivel de los conjuntos de muestras correspondientes a los distintos periodos de tiempo, se observó el desequilibrio de ligamiento significativo en los análisis sin corrección por clonación, seguido de una reducción sustancial tras la corrección por clones (Figura 4A). Este patrón es compatible con un escenario de clonalidad epidémica, donde pocos genotipos multilocus se encuentran sobrerrepresentados en determinados muestreos, lo cual puede observarse durante brotes locales o en contextos de transmisión reducida (14,77). Por tanto, la presencia de LD elevada antes de la corrección sugiere que parte de la asociación no aleatoria entre loci fue explicada por la expansión de linajes clonales en los conjuntos de muestras (Tabla 7).

La ausencia de valores elevados de LD tras corrección por clones no constituye evidencia directa de recombinación frecuente, sino de la ausencia de dominancia clonal. En contextos de baja transmisión, las infecciones suelen darse por uno o

pocos genotipos multilocus, lo que limita la diversidad alélica presente en el mosquito vector. En estas condiciones, aunque la recombinación sexual ocurre, esta se produce mayoritariamente entre gametos genéticamente idénticos o estrechamente relacionados, generando una recombinación que no produce nuevas combinaciones alélicas detectables y mantiene asociaciones no aleatorias entre loci (15,16,78).

En este sentido, los resultados obtenidos durante PAMAFRO y, en menor medida, Post-PAMAFRO, se alinean con estudios previos que describen la persistencia temporal de linajes clonales en el Perú, tal y como el estudio de Villena et al. (10) donde mediante un análisis genómico identificaron tres subpoblaciones diferenciadas (linajes Bv1, Clonet D y tipo Acre-Loreto). En particular, la expansión local del linaje Bv1 en Loreto desde 2011, correspondiente al periodo Post-PAMAFRO, sugiere la persistencia espacial de linajes genéticamente homogéneos más que una ausencia completa de recombinación, en concordancia con un escenario de diversidad genética limitada y estructura espacial marcada (10).

La estructura genética relevante en los distritos evaluados durante el periodo de Plan Malaria Cero podría mostrar que, incluso bajo estrategias de eliminación, pueden persistir focos genéticamente diferenciados en áreas rurales o de difícil acceso como es el caso de Trompeteros. Esta persistencia de linajes locales debe interpretarse considerando que las intervenciones no se implementaron de manera homogénea ni sostenida en todas las comunidades, ya sea por limitaciones logísticas, presupuestales o geográficas, lo que ha generado una diversidad de

escenarios epidemiológicos dentro de la región Loreto (11,79,80). Un estudio previo realizado por Cabrera et al. (56) identificó a Trompeteros como una zona con marcada estructuración espacial y posiblemente a brotes focales o transmisión localizada (56). Sin embargo, dado que los distritos y tamaños muestrales difieren respecto a PAMAFRO, estos resultados se interpretan como una caracterización espacial específica y no como evidencia directa de un cambio temporal inducido por las intervenciones.

Cuando se evaluó a nivel de distrital dentro de cada periodo (Figura 4B), en San Juan Bautista, Iquitos y Punchana, el patrón fue consistente con la presencia de linajes clonales epidémicos acompañados de autofecundación residual entendida como la reproducción sexual entre gametos genéticamente idénticos o estrechamente relacionados dentro del mosquito vector, lo que limita la recombinación efectiva y mantiene asociaciones alélicas no aleatorias (14,81). En contraste, distritos como Alto Nanay (PAMAFRO), Nauta (Post-PAMAFRO) y Trompeteros (Plan Malaria Cero) mostraron r_d cercanos a cero después de la corrección por clonación, lo que sugiere una menor influencia de la clonación en los conjuntos de muestras de esos sitios.

No obstante, los valores elevados de LD observados en estos distritos también pueden verse influenciados por bajos niveles de diversidad genética, como se observa particularmente en Punchana e Iquitos durante Post-PAMAFRO, donde los índices de diversidad (H , G y H_{exp}) fueron reducidos y el número efectivo de MLGs fue limitado. En estos contextos, la baja variabilidad genética puede inflar artificialmente las estimaciones de LD, aun en ausencia de clonación (31). Aun

así, la reducción consistente de $\bar{r}_D$ tras la corrección por clonación, junto con su concordancia con los índices de diversidad genética y el número efectivo de MLG respalda que los patrones observados reflejan procesos biológicos subyacentes y no únicamente limitaciones derivadas de la resolución del panel.

Entre los enfoques utilizados, los análisis de desequilibrio de ligamiento, las evaluaciones de clonalidad y el PCA aportan evidencias robustas al estudio para caracterizar la estructura genética en estos conjuntos de muestras, dado que dependen en menor grado de supuestos de panmixia. Por otro lado, los resultados de STRUCTURE se presentan únicamente como apoyo exploratorio, reconociendo sus supuestos (ausencia de clonación y equilibrio de ligamiento) que no se cumplen completamente en todos los conjuntos de muestras analizados.

6.4. Estructura genética compatible con escenarios de baja transmisión, transmisión focal y circulación restringida de genotipos

Los patrones de estructura genética observados en este estudio son consistentes con lo descrito para poblaciones de *P. falciparum* en regiones de baja transmisión en Sudamérica, donde se ha documentado una alta diferenciación genética espacial y una diversidad relativamente limitada en comparación con regiones de alta transmisión como África subsahariana (14,16). Durante el periodo PAMAFRO, esta estructuración se evidenció por una proporción significativa de varianza molecular atribuible a la diferenciación entre distritos en el análisis AMOVA (Tabla 11), valores de F_{ST} moderados a altos entre pares de distritos (Figura 5), y valores elevados de desequilibrio de ligamiento multilocus sin corrección por clonación ($\bar{r}_D = 0.375$, $p < 0.01$; Figura 4A). En conjunto, estos resultados son

compatibles con escenarios de transmisión focal y circulación restringida de genotipos en determinados focos, tal como se describió previamente en la Amazonía peruana (15,49).

6.5.Persistencia y emergencia localizada de linajes multilocus de *P. falciparum*

Se identificaron 35 linajes multilocus (haplogrupos) a lo largo de los tres periodos que coincidieron con los programas de control y eliminación. En el conjunto de muestras del 2009-2010 (PAMAFRO), el linaje A1 fue el más frecuente, lo que sugiere que se habría reducido la diversidad genética del parásito y favorecido la persistencia de unos pocos linajes o haplogrupos (82). En contraste, en las muestras correspondientes al 2011-2017 (Post-PAMAFRO), el linaje T1 fue el más frecuente y continuó presente en el periodo 2018-2020 (Plan Malaria Cero).

La presencia recurrente del linaje T1 en más de un periodo indica su recurrencia temporal en distintos conjuntos de muestras. Sin embargo, debido a que las muestras analizadas no provienen de las mismas ubicaciones geográficas ni corresponden a un muestreo longitudinal sistemático, no es posible atribuir estos patrones a procesos demográficos específicos, como cuellos de botella poblacionales, los cuales requieren diseños de muestreo temporalmente comparables para su inferencia (14,83). Por ello, estas observaciones se presentan como descripciones de la composición multilocus registrada en los distintos conjuntos de muestras, y no como inferencias sobre mecanismos causales de cambio poblacional.

En este sentido, la identificación de linajes como U1, N1, A3, G1 y J1, con una distribución casi exclusiva en Trompeteros durante el periodo Plan Malaria Cero es

consistente con lo reportado en estudios previos que describe la emergencia de linajes genéticamente diferenciados en poblaciones de *P. falciparum* en la Amazonía peruana. Dichos estudios señalan que estos patrones pueden originarse a partir de focos espaciales de diversidad genética asociados a la expansión local de determinados linajes o la introducción puntual de nuevos linajes, sin que ello implique necesariamente procesos demográficos de escala regional (15,16,49,50). No obstante, tal como ha sido señalado en la literatura, estos patrones pueden verse amplificados por una cobertura muestral heterogénea entre localidades, por lo que la aparente concentración de linajes como U1, N1, A3, G1 y J1 en Trompeteros debe interpretarse con cautela y en el contexto del diseño de muestreo empleado.

A diferencia de estudios previos realizados en el Perú, que se han enfocado principalmente en la identificación de clones predominantes o en cambios temporales globales, el enfoque multilocus aplicado en este estudio permitió describir la organización espacial de los linajes de *P. falciparum* entre distritos, evidenciando escenarios compatibles con transmisión focal y circulación restringida de genotipos en distintos contextos epidemiológicos.

6.6.Implicancias para la vigilancia molecular y la eliminación de la malaria

Los resultados obtenidos respaldan las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud sobre el uso de la vigilancia molecular para complementar la vigilancia epidemiológica tradicional. La OMS resalta que el análisis genético de las poblaciones parasitarias permite identificar focos de transmisión residual, distinguir entre transmisión local e importada y evaluar la conectividad entre

poblaciones, información que no siempre es capturada por los sistemas convencionales de notificación de casos (4,84). De acuerdo con ello, se puede corroborar que el análisis genético aporta evidencia descriptiva útil para la identificación de focos de transmisión residual, la diferenciación entre transmisión local e importada y la evaluación de la conectividad genética entre poblaciones, aspectos que con frecuencia no quedan suficientemente representados en los sistemas convencionales de notificación de casos.

En el presente estudio, la detección de señales de clonalidad epidémica, la diferenciación genética espacial y la recurrencia observada de determinados haplogrupos multilocus son elementos que, integrados con datos epidemiológicos y de vigilancia rutinaria, podrían orientar la priorización de áreas para muestreos focales o intervenciones de investigación. Asimismo, los linajes multilocus se presentan como una alternativa práctica para resumir información multilocus y facilitar comparaciones descriptivas entre conjuntos de muestras, más que como evidencia directa de la efectividad de medidas de control, debido a la heterogeneidad del muestreo empleado.

6.7.Limitaciones y consideraciones finales

Finalmente, es importante resaltar que muchos estudios comparables en la región amazónica enfrentan limitaciones similares de muestreo, incluyendo tamaños muestrales heterogéneos y cobertura espacial incompleta de la región de Loreto y variación en los sitios muestreados entre diferentes períodos de tiempo (15,50). Aun así, la consistencia de los patrones observados con los estudios previos sugiere que los

resultados presentados constituyen una aproximación descriptiva relevante sobre la estructura genética de *P. falciparum* en ciertos distritos de la región de Loreto.

VII. CONCLUSIONES

El análisis de marcadores microsatélites neutros permitió caracterizar la estructura genética de *P. falciparum* en distritos de cuatro provincias de la región de Loreto entre 2009 y 2020, mostrando una población genéticamente estructurada, con diferenciación genética espacial variable y patrones compatibles con clonalidad epidémica. Estos resultados son consistentes con escenarios de baja transmisión descritos previamente para poblaciones de *P. falciparum* en la Amazonía peruana.

La diversidad genética de *P. falciparum* mostró variaciones entre los intervalos de años de muestreo incluidos en el estudio y que coincidieron con PAMAFRO, Post-PAMAFRO y Plan Malaria Cero, observándose una reducción posterior a las intervenciones intensivas y una recuperación parcial en el periodo más reciente. No obstante, estas variaciones deben interpretarse principalmente como reflejo de diferencias espaciotemporales y del diseño de muestreo, más que como cambios longitudinales directos atribuibles a las intervenciones de control.

La detección de desequilibrio de ligamiento significativo antes de la corrección por clones, seguido de su reducción sustancial tras dicha corrección, es consistente con la presencia de clonalidad epidémica en ciertos sitios y conjuntos de muestras. Estos resultados indicaron la sobrerrepresentación local de algunos genotipos multilocus en determinados muestreos, sin que la ausencia de LD tras corrección constituya, por sí sola, prueba de recombinación extensa a gran escala.

La construcción de redes de haplotipos multilocus y la definición operativa de linajes permitieron identificar 35 linajes multilocus en los conjuntos analizados y

fueron útiles como herramienta descriptiva para visualizar coexistencia, recurrencia y distribución localizada de linajes. La presencia recurrente de algunos haplogrupos y la concentración localizada de otros describieron patrones observados en los datos, los cuales requieren interpretación cautelosa por las limitaciones del muestreo. La identificación de los procesos subyacentes a estos patrones como cuellos de botella demográficos, introducciones puntuales o procesos selectivos requeriría muestreos longitudinales estandarizados y el uso de datos genómicos de mayor resolución para su confirmación.

A pesar de las limitaciones asociadas al muestreo heterogéneo y no sistemático, los patrones observados son consistentes con la literatura regional y constituyen una aproximación descriptiva sobre la diversidad genética y estructura poblacional de *P. falciparum* en Loreto.

En conjunto, este estudio aporta una integración metodológica que enfatiza el uso de haplotipos y haplogrupos multilocus como unidades operativas para la descripción de la estructura genética espacial de *P. falciparum* en Loreto. Este enfoque permitió complementar los análisis tradicionales de diversidad y estructura poblacional, permitiendo integrar los linajes predominantes y su distribución espacial en escenarios de baja transmisión. Desde esta perspectiva, el análisis multilocus-haplotípico resalta como una herramienta descriptiva útil para la vigilancia molecular exploratoria, particularmente en contextos caracterizados por transmisión focal y muestreo heterogéneo.

VIII. RECOMENDACIONES

Para futuros estudios, se recomienda ampliar la representatividad espacial y temporal de las muestras de Loreto, asegurando además que los tamaños muestrales entre distritos e intervalos de años de muestreo que sean comparables y proporcionales a la distribución real de la población y de los casos de malaria. Este enfoque permitiría reducir potenciales sesgos de selección y mejorar la inferencia poblacional. Asimismo, la ampliación del tamaño muestral y la aplicación de modelos estadísticos multivariados permitirán controlar con mayor rigor factores de confusión como la edad, el sexo y la exposición previa a infecciones por *P. falciparum*, fortaleciendo así la robustez de los hallazgos.

Asimismo, resulta pertinente llevar a cabo investigaciones que evalúen los perfiles de resistencia a fármacos mediante el análisis de mutaciones en *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfcr1* y *Pfmdr1* por linaje de *P. falciparum*. La caracterización de los linajes a partir de estos perfiles permitirá compararlos a lo largo del tiempo independientemente de la nomenclatura utilizada por distintos autores, facilitando así el estudio de su dinámica evolutiva y la identificación de patrones de resistencia. Además de promover la inclusión de análisis multilocus como parte de la vigilancia molecular para priorizar áreas para muestreos focales.

La integración de estos enfoques genéticos y epidemiológicos contribuirá a una caracterización más precisa de la dinámica de la malaria en la Amazonía y al diseño de estrategias de vigilancia y control más efectivas basadas en evidencia molecular y en el conocimiento de los linajes circulantes.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. The 2025 WHO World malaria report: : addressing the threat of antimalarial drug resistance. [citado 12 de enero de 2026]; Disponible en: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2025>
2. Ferreira MU, Gamboa D, Torres K, Rodriguez-Ferrucci H, Soto-Calle VE, Pardo K, et al. Evidence-Based Malaria Control and Elimination in the Amazon: Input from the International Center of Excellence in Malaria Research Network in Peru and Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* octubre de 2022;107(4 Suppl):160-7.
3. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades - MINSA. Reporte Epidemiológico de Loreto, año 2025 (S.E 52) [Internet]. [citado 12 de enero de 2026]. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2025/SE52/malaria.pdf>
4. WHO Group. Malaria surveillance, monitoring & evaluation: a reference manual. Geneva: World Health Organization. 2018;206.
5. Rosas-Aguirre A, Guzman-Guzman M, Chuquiyauri R, Moreno M, Manrique P, Ramirez R, et al. Temporal and Microspatial Heterogeneity in Transmission Dynamics of Coendemic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in Two Rural Cohort Populations in the Peruvian Amazon. *J Infect Dis.* 21 de agosto de 2020;223(8):1466-77.
6. Rosas-Aguirre A, Moreno M, Moreno-Gutierrez D, Llanos-Cuentas A, Saavedra M, Contreras-Mancilla J, et al. Integrating Parasitological and Entomological Observations to Understand Malaria Transmission in Riverine Villages in the Peruvian Amazon. *J Infect Dis.* 27 de abril de 2021;223(12 Suppl 2):S99-110.
7. Rosas-Aguirre A, Gamboa D, Manrique P, Conn JE, Moreno M, Lescano AG, et al. Epidemiology of *Plasmodium vivax* Malaria in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 28 de diciembre de 2016;95(6 Suppl):133-44.
8. Janko MM, Recalde-Coronel GC, Damasceno CP, Salmón-Mulanovich G, Barbieri AF, Lescano AG, et al. The impact of sustained malaria control in the Loreto region of Peru: a retrospective, observational, spatially-varying interrupted time series analysis of the PAMAFRO program. *Lancet Reg Health Am.* 16 de marzo de 2023;20:100477.
9. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades - MINSA. Reporte Epidemiológico de Loreto, año 2020 (S.E 52) [Internet]. [citado 12 de enero de 2026]. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2020/SE52/malaria.pdf>
10. Villena FE, Lizewski SE, Joya CA, Valdivia HO. Population genomics and evidence of clonal replacement of *Plasmodium falciparum* in the Peruvian Amazon. *Sci Rep.* 27 de octubre de 2021;11(1):21212.
11. MINSA. Resolución Ministerial N.º 244-2017-MINSA: Plan Malaria Cero [Internet]. [citado 20 de mayo de 2024]. Disponible en: https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/190350/189846_RM_244-2017-MINSA.PDF20180823-24725-1yk3i0y.PDF?v=1593748780
12. Salud OP de la. Nota técnica sobre la aceleración de la eliminación de *P. falciparum* en las Américas [Internet]. OPS; 2024 [citado 27 de septiembre de 2025]. Report No.: OPS/CDE/VT/23-0012. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/59825>

13. Early AM, Pelleau S, Musset L, Neafsey DE. Temporal Patterns of Haplotypic and Allelic Diversity Reflect the Changing Selection Landscape of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*. 1 de abril de 2025;42(4):msaf075.
14. Anderson TJC, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, et al. Microsatellite Markers Reveal a Spectrum of Population Structures in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular Biology and Evolution*. 1 de octubre de 2000;17(10):1467-82.
15. Griffing SM, Mixson-Hayden T, Sridaran S, Alam MT, McCollum AM, Cabezas C, et al. South American *Plasmodium falciparum* after the Malaria Eradication Era: Clonal Population Expansion and Survival of the Fittest Hybrids. *PLoS One*. 16 de septiembre de 2011;6(9):e23486.
16. Branch OH, Sutton PL, Barnes C, Castro JC, Hussin J, Awadalla P, et al. *Plasmodium falciparum* Genetic Diversity Maintained and Amplified Over 5 Years of a Low Transmission Endemic in the Peruvian Amazon. *Mol Biol Evol*. julio de 2011;28(7):1973-86.
17. Bacon DJ, McCollum AM, Griffing SM, Salas C, Soberon V, Santolalla M, et al. Dynamics of Malaria Drug Resistance Patterns in the Amazon Basin Region following Changes in Peruvian National Treatment Policy for Uncomplicated Malaria. *Antimicrob Agents Chemother*. mayo de 2009;53(5):2042-51.
18. Conway DJ, Roper C, Oduola AMJ, Arnot DE, Kremsner PG, Grobusch MP, et al. High recombination rate in natural populations of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 13 de abril de 1999;96(8):4506-11.
19. Koepfli C, Mueller I. Malaria Epidemiology at the Clone Level. *Trends Parasitol*. diciembre de 2017;33(12):974-85.
20. Wasakul V, Verschuuren TD, Thuy-Nhien N, Booth E, Quang HH, Thang ND, et al. Genetic surveillance of *Plasmodium falciparum* populations following treatment policy revisions in the Greater Mekong Subregion. *Nat Commun*. 20 de mayo de 2025;16(1):4689.
21. Escalante AA, Ferreira MU, Vinetz JM, Volkman SK, Cui L, Gamboa D, et al. Malaria Molecular Epidemiology: Lessons from the International Centers of Excellence for Malaria Research Network. *Am J Trop Med Hyg*. 2 de septiembre de 2015;93(3 Suppl):79-86.
22. Escalante AA, Pacheco MA. Malaria Molecular Epidemiology: An Evolutionary Genetics Perspective. *Microbiol Spectr*. julio de 2019;7(4).
23. Organización Mundial de la Salud. Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria 2016–2030 [Internet]. [citado 26 de septiembre de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789241564991>
24. MINSA. Documento técnico: Plan hacia la Eliminación de la Malaria en el Perú 2022-2030 [Internet]. 2022. Disponible en: <https://bvs.minsa.gob.pe/local/fi-admin/RM-034-2022%20MINSA.pdf>
25. Talapko J, Škrlec I, Alebić T, Jukić M, Včev A. Malaria: The Past and the Present. *Microorganisms*. junio de 2019;7(6):179.
26. Soto-Calle V, Rosas-Aguirre A, Llanos-Cuentas A, Abatih E, DeDeken R, Rodriguez H,

et al. Spatio-temporal analysis of malaria incidence in the Peruvian Amazon Region between 2002 and 2013. *Sci Rep.* 16 de enero de 2017;7:40350.

27.Suarez D. PERU: FENOMENO EL NIÑO 97-98.

28.Organismo Andino de Salud «Convenio Hipólito Unanue». Proyecto «Control de la Malaria en las Zonas Fronterizas de la Región Andina: Un Enfoque Comunitario» [Internet]. [citado 20 de mayo de 2024]. Disponible en: https://www.orasconhu.org/documentos/folle_pamafro.pdf

29.Informe Mundial 2020 sobre el Paludismo [Internet]. [citado 20 de mayo de 2024]. Disponible en: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/world-malaria-report-2020-briefing-kit-sp56d095066035475ea86d43f4f7204db7.pdf?sfvrsn=eda98467_18&download=true

30.Sato S. Plasmodium—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *J Physiol Anthropol.* 7 de enero de 2021;40:1.

31.Gimenez AM, Salman AM, Marques RF, López-Camacho C, Harrison K, Kim YC, et al. A universal vaccine candidate against Plasmodium vivax malaria confers protective immunity against the three PvCSP alleles. *Sci Rep.* 9 de septiembre de 2021;11(1):17928.

32.Moxon CA, Gibbins MP, McGuinness D, Milner DA, Marti M. New Insights into Malaria Pathogenesis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 24 de enero de 2020;15(Volume 15, 2020):315-43.

33.Su X zhuan, Lane KD, Xia L, Sá JM, Wellems TE. Plasmodium Genomics and Genetics: New Insights into Malaria Pathogenesis, Drug Resistance, Epidemiology, and Evolution. *Clinical Microbiology Reviews.* 31 de julio de 2019;32(4):10.1128/cmr.00019-19.

34.Nilsson SK, Childs LM, Buckee C, Marti M. Targeting Human Transmission Biology for Malaria Elimination. *PLOS Pathogens.* 18 de junio de 2015;11(6):e1004871.

35.Mobegi VA, Loua KM, Ahouidi AD, Satoguina J, Nwakanma DC, Amambua-Ngwa A, et al. Population genetic structure of Plasmodium falciparum across a region of diverse endemicity in West Africa. *Malar J.* 3 de julio de 2012;11:223.

36.Daniels R, Chang HH, Sène PD, Park DC, Neafsey DE, Schaffner SF, et al. Genetic surveillance detects both clonal and epidemic transmission of malaria following enhanced intervention in Senegal. *PLoS One.* 2013;8(4):e60780.

37.Pumpaibool T, Arnathau C, Durand P, Kanchanakhan N, Siripoon N, Suegorn A, et al. Genetic diversity and population structure of Plasmodium falciparum in Thailand, a low transmission country. *Malar J.* 14 de julio de 2009;8(1):155.

38.Abdel Hamid MM, Abdelraheem MH, Acheampong DO, Ahouidi A, Ali M, Almagro-Garcia J, et al. Pf7: an open dataset of Plasmodium falciparum genome variation in 20,000 worldwide samples. *Wellcome Open Res.* 16 de enero de 2023;8:22.

39.Argyropoulos DC, Tan MH, Adobor C, Mensah B, Labbé F, Tiedje KE, et al. Performance of SNP barcodes to determine genetic diversity and population structure of Plasmodium falciparum in Africa. *Front Genet.* 1 de junio de 2023;14:1071896.

40. Carter TE, Malloy H, Existe A, Memnon G, Victor YS, Okech BA, et al. Genetic Diversity of *Plasmodium falciparum* in Haiti: Insights from Microsatellite Markers. *PLOS ONE*. 13 de octubre de 2015;10(10):e0140416.
41. McDew-White M, Li X, Nkhoma SC, Nair S, Cheeseman I, Anderson TJC. Mode and Tempo of Microsatellite Length Change in a Malaria Parasite Mutation Accumulation Experiment. *Genome Biol Evol*. 3 de julio de 2019;11(7):1971-85.
42. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 3 de octubre de 2002;419(6906):10.1038/nature01097.
43. Anderson TJ, Su XZ, Roddam A, Day KP. Complex mutations in a high proportion of microsatellite loci from the protozoan parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Ecol*. octubre de 2000;9(10):1599-608.
44. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet*. junio de 2004;5(6):435-45.
45. Schlötterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*. septiembre de 2000;109(6):365-71.
46. Anderson TJC, Su XZ, Bockarie M, Lagog M, Day KP. Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. *Parasitology*. agosto de 1999;119(2):113-25.
47. Chokejindachai W, Conway DJ. Case-Control Approach to Identify *Plasmodium falciparum* Polymorphisms Associated with Severe Malaria. *PLOS ONE*. 6 de mayo de 2009;4(5):e5454.
48. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Neutral microsatellite analysis (Document No. MBK.DR.C.038, Version 01). Malaria Branch, Division of Parasitic Diseases and Malaria.; 2021.
49. Akinyi S, Hayden T, Gamboa D, Torres K, Bendezu J, Abdallah JF, et al. Multiple genetic origins of histidine-rich protein 2 gene deletion in *Plasmodium falciparum* parasites from Peru. *Sci Rep*. 30 de septiembre de 2013;3:2797.
50. Bendezu J, Torres K, Villasis E, Incardona S, Bell D, Vinetz J, et al. Geographical distribution and genetic characterization of pfrp2 negative *Plasmodium falciparum* parasites in the Peruvian Amazon. *PLoS One*. 22 de noviembre de 2022;17(11):e0273872.
51. Baldeviano GC, Okoth SA, Arrospide N, Gonzalez RV, Sánchez JF, Macedo S, et al. Molecular Epidemiology of *Plasmodium falciparum* Malaria Outbreak, Tumbes, Peru, 2010–2012. *Emerg Infect Dis*. mayo de 2015;21(5):797-803.
52. Mayor A, Ishengoma DS, Proctor JL, Verity R. Sampling for malaria molecular surveillance. *Trends in Parasitology*. 1 de noviembre de 2023;39(11):954-68.
53. Kattenberg JH, Fernandez-Miño C, van Dijk NJ, Llacsahuanga Allica L, Guetens P, Valdivia HO, et al. Malaria Molecular Surveillance in the Peruvian Amazon with a Novel Highly Multiplexed *Plasmodium falciparum* AmpliSeq Assay. *Microbiol Spectr*. 22 de febrero de 2023;11(2):e0096022.

54. Martha RCD, Tada MS, Ferreira RG de M, Silva LHP da, Wunderlich G. Microsatellite characterization of *Plasmodium falciparum* from symptomatic and non-symptomatic infections from the Western Amazon reveals the existence of non-symptomatic infection-associated genotypes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. junio de 2007;102:293-8.
55. Valdivia HO, Anderson K, Smith D, Pasay C, Salas CJ, Braga G, et al. Spatiotemporal dynamics of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 and 3 deletions in Peru. *Sci Rep*. 18 de noviembre de 2022;12:19845.
56. Cabrera-Sosa L, Nolasco O, Kattenberg JH, Fernandez-Miño C, Valdivia HO, Barazorda K, et al. Genomic surveillance of malaria parasites in an indigenous community in the Peruvian Amazon. *Sci Rep*. 15 de julio de 2024;14(1):16291.
57. Razak MRMA, Sastu UR, Norahmad NA, Abdul-Karim A, Muhammad A, Muniandy PK, et al. Genetic Diversity of *Plasmodium falciparum* Populations in Malaria Declining Areas of Sabah, East Malaysia. *PLOS ONE*. 29 de marzo de 2016;11(3):e0152415.
58. Hall SJG. Genetic Differentiation among Livestock Breeds—Values for Fst. *Animals (Basel)*. 26 de abril de 2022;12(9):1115.
59. Jombart T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*. 1 de junio de 2008;24(11):1403-5.
60. Kamvar ZN, Tabima JF, Grünwald NJ. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*. 2014;2:e281.
61. Kamvar ZN, Brooks JC, Grünwald NJ. Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Front Genet [Internet]*. 10 de junio de 2015 [citado 12 de diciembre de 2024];6. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/genetics/articles/10.3389/fgene.2015.00208/full>
62. Hale ML, Burg TM, Steeves TE. Sampling for Microsatellite-Based Population Genetic Studies: 25 to 30 Individuals per Population Is Enough to Accurately Estimate Allele Frequencies. *PLOS ONE*. 12 de septiembre de 2012;7(9):e45170.
63. Ferreira MU, Karunaweera ND, da Silva-Nunes M, da Silva NS, Wirth DF, Hartl DL. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. *J Infect Dis*. 15 de abril de 2007;195(8):1218-26.
64. Tibayrenc M, Ayala FJ. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol*. septiembre de 2002;18(9):405-10.
65. Weir BS, Goudet J. A Unified Characterization of Population Structure and Relatedness. *Genetics*. 1 de agosto de 2017;206(4):2085-103.
66. Hartl DL, Clark AG. Principles of population genetics. Vol. 116. Sunderland, MA: Sinauer associates.; 1997. 542 p.
67. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. junio de 2000;155(2):945-59.
68. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol*. julio de 2005;14(8):2611-20.

69. Jolliffe IT, Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 13 de abril de 2016;374(2065):20150202.
70. Okoth SA, Chenet SM, Arrospide N, Gutierrez S, Cabezas C, Matta JA, et al. Molecular Investigation into a Malaria Outbreak in Cusco, Peru: *Plasmodium falciparum* BV1 Lineage is Linked to a Second Outbreak in Recent Times. *Am J Trop Med Hyg.* 6 de enero de 2016;94(1):128-31.
71. Tyagi K, Hossain ME, Thakur V, Aggarwal P, Malhotra P, Mohammed A, et al. *Plasmodium vivax* Tryptophan Rich Antigen PvTRAg36.6 Interacts with PvETRAMP and PvTRAg56.6 Interacts with PvMSP7 during Erythrocytic Stages of the Parasite. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151065.
72. Paradis E. Analysis of haplotype networks: The randomized minimum spanning tree method. *Methods in Ecology and Evolution.* 2018;9(5):1308-17.
73. Paradis E, Schliep K. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics.* 1 de febrero de 2019;35(3):526-8.
74. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1 de julio de 1987;4(4):406-25.
75. Villena FE, Sanchez JF, Nolasco O, Braga G, Ricopa L, Barazorda K, et al. Drug resistance and population structure of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *Sci Rep.* 1 de octubre de 2022;12(1):16474.
76. Karl S, White MT, Milne GJ, Gurarie D, Hay SI, Barry AE, et al. Spatial Effects on the Multiplicity of *Plasmodium falciparum* Infections. *PLOS ONE.* 6 de octubre de 2016;11(10):e0164054.
77. Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 de mayo de 1993;90(10):4384-8.
78. Sutton PL, Neyra V, Hernandez JN, Branch OH. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Peruvian Amazon: propagation of complex, multiple allele-type infections without super-infection. *Am J Trop Med Hyg.* diciembre de 2009;81(6):950-60.
79. Torres K, Alava F, Soto-Calle V, Llanos-Cuentas A, Rodriguez H, Llacsahuanga L, et al. Malaria Situation in the Peruvian Amazon during the COVID-19 Pandemic. *Am J Trop Med Hyg.* noviembre de 2020;103(5):1773-6.
80. Stresman G, Bousema T, Cook J. Malaria Hotspots: Is There Epidemiological Evidence for Fine-Scale Spatial Targeting of Interventions? *Trends in Parasitology.* 1 de octubre de 2019;35(10):822-34.
81. Khairreh BA, Assefa A, Guessod HH, Basco LK, Khairreh MA, Pascual A, et al. Population genetics analysis during the elimination process of *Plasmodium falciparum* in Djibouti. *Malar J.* 13 de junio de 2013;12(1):201.
82. Nkhoma SC, Nair S, Cheeseman IH, Rohr-Allegrini C, Singlam S, Nosten F, et al. Close kinship within multiple-genotype malaria parasite infections. *Proc Biol Sci.* 7 de julio de 2012;279(1738):2589-98.

83.Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. 1975;

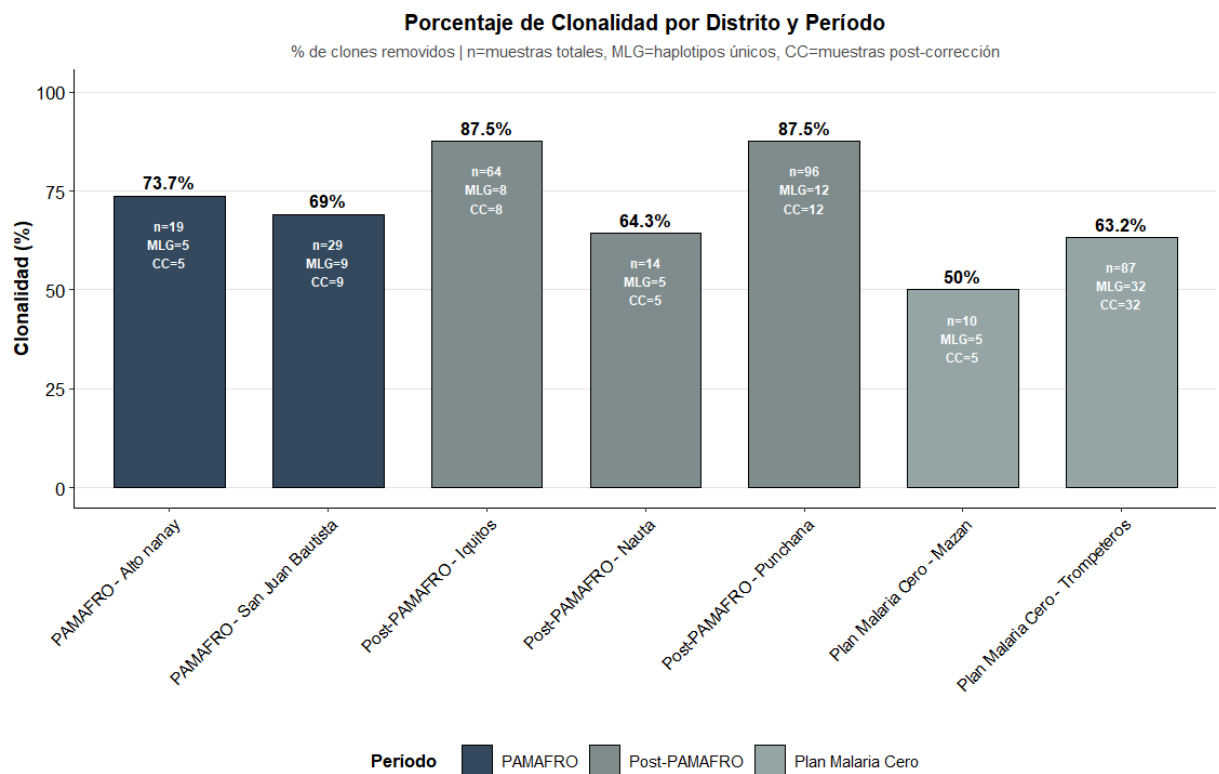
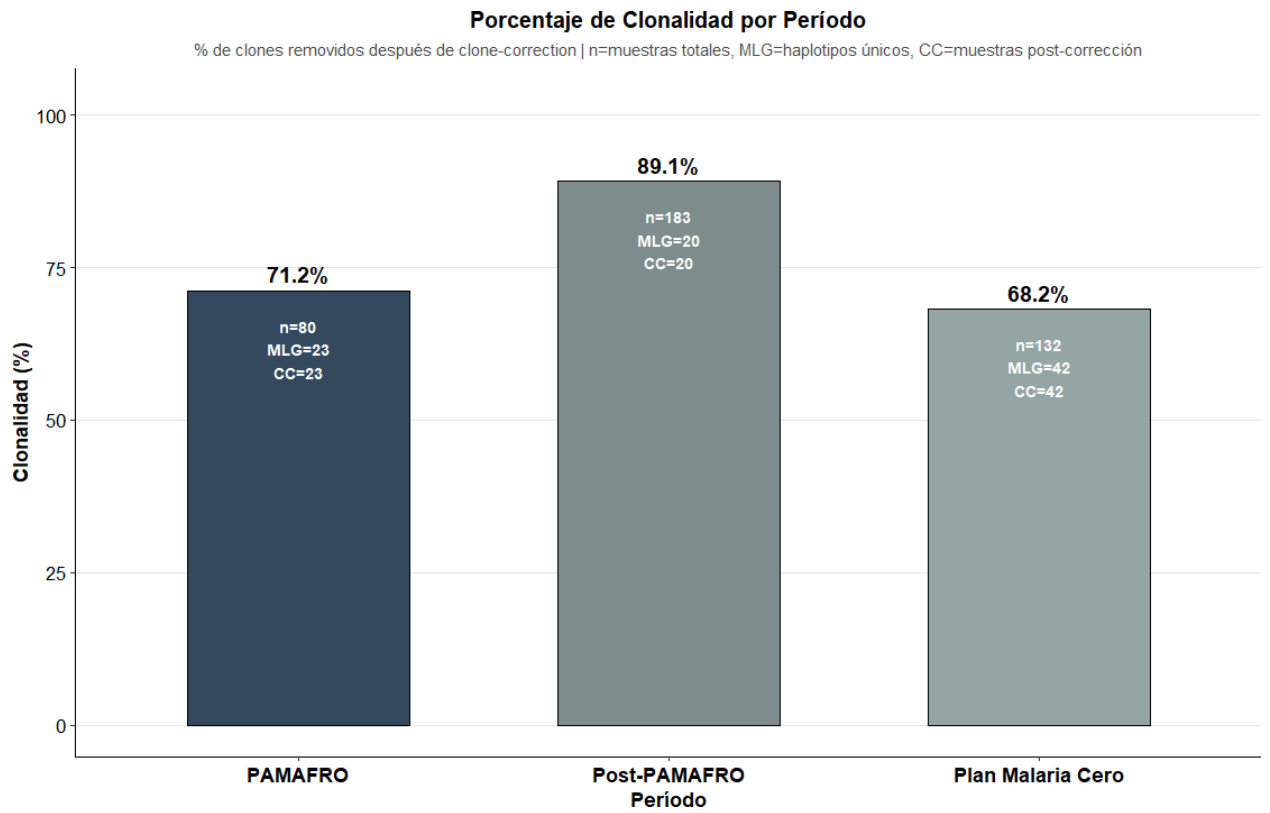
84.World Health Organization. Strategy to respond to antimalarial drug resistance in Africa. World Health Organization; 2022.

X. Anexos

Anexo 01. Frecuencia de alelos más representativos por loci microsatélite y por distrito de colección.

Distrito	C2M34	C3M69	PfPk2	PolyA	TA1	TA109	p2490
Alto nanay	239	134	165	182	180	165	80
	237					162	
Iquitos	223	124	165	167	171	160	80
	229	134	171	184	174	163	83
	235		174		180		
	239						
	241						
Mazán	229	134	162	164	171	159	74
	237	138	165	182	180	162	80
	239		171			163	83
	245					165	
						199	
Nauta	229	124	165	182	171	160	80
	235	134	171		180	163	83
Punchana	223	134	165	184	171	154	80
	229		171		174	163	83
	235		174		180		
	239						
Requena	231	132	171	182	171	162	83
	233	134				165	
San Juan Bautista	225	122	165	161	171	159	79
	229	124	171	164	174	162	80
	231	134	174	182	177	163	83
	237	152		184	180	165	
	239						
	245						
	247						
Trompeteros	229	124	165	164	171	160	80
	235	134	171	182	180	163	83
	241		174			199	
Yurimaguas	231	122	171	161	171	159	79
		124	174	182	177	162	80
		132					83

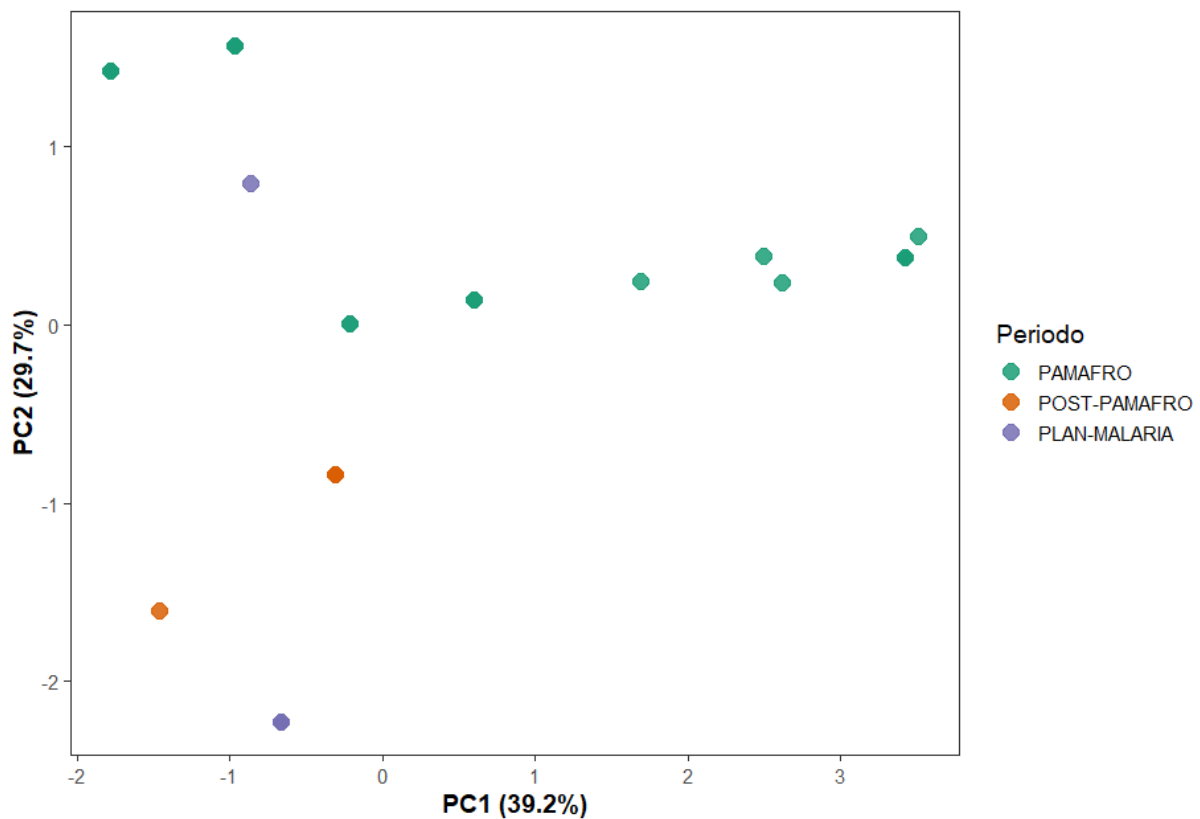
Anexo 02. Porcentaje de clonalidad por intervalo de años de muestreo y por distrito dentro de cada intervalo de años de muestreo



Anexo 03. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de San Juan Bautista a lo largo de los intervalos de años de muestreo

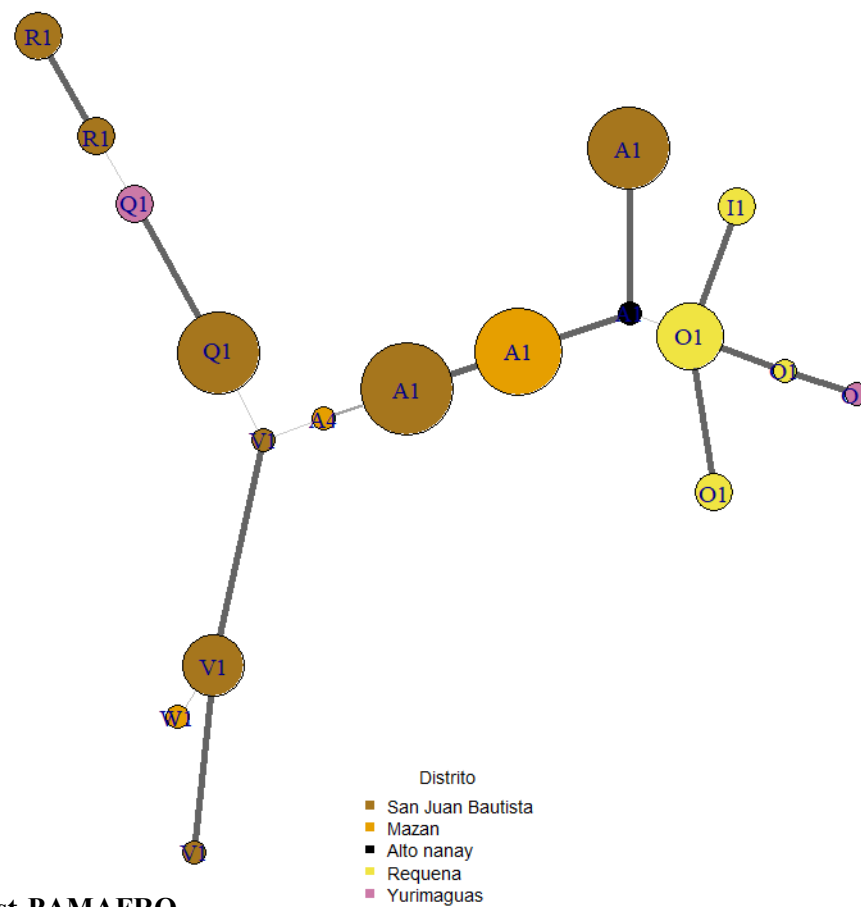
Componente	SSD	MSD	GL	Componente de Varianza	Valor P	Estadístico Phi	Coefficiente de Varianza
Entre poblaciones (pop)	72.02	36.01	2	2.83	0	0.50	11.71
Dentro de las poblaciones (Error)	120.11	2.86	42	2.86	NA	NA	NA
Total	192.13	4.37	44	NA	NA	NA	NA

Anexo 04. Análisis de PCA de microsatélites de las poblaciones de *P. falciparum* en San Juan Bautista

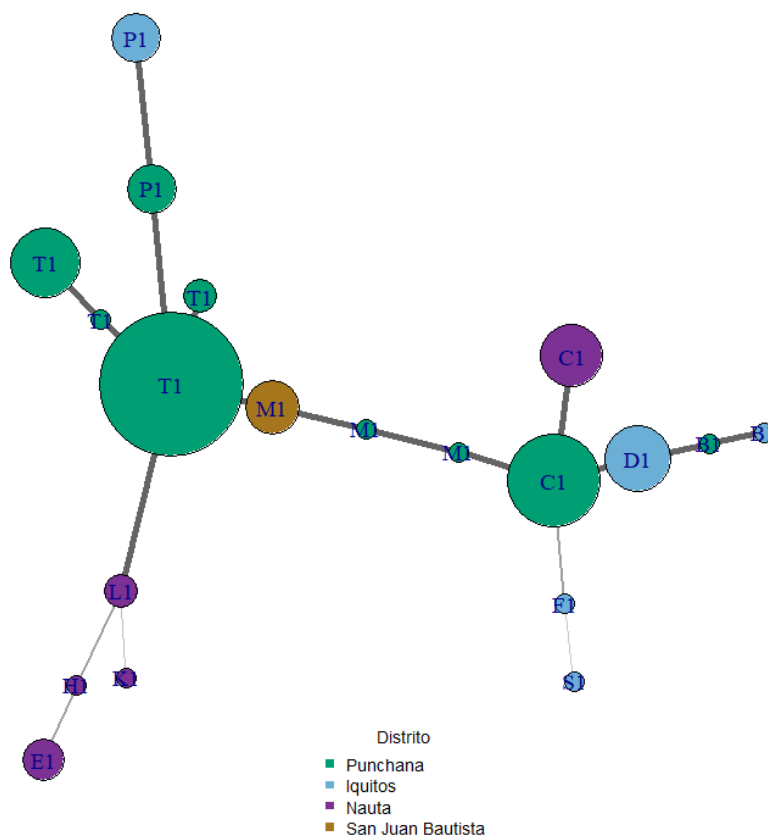


Anexo 05. Red de haplogrupos por distrito durante cada intervalo de años de muestreo. A) PAMAFRO, B) Post-PAMAFRO, C) Plan Malaria Cero

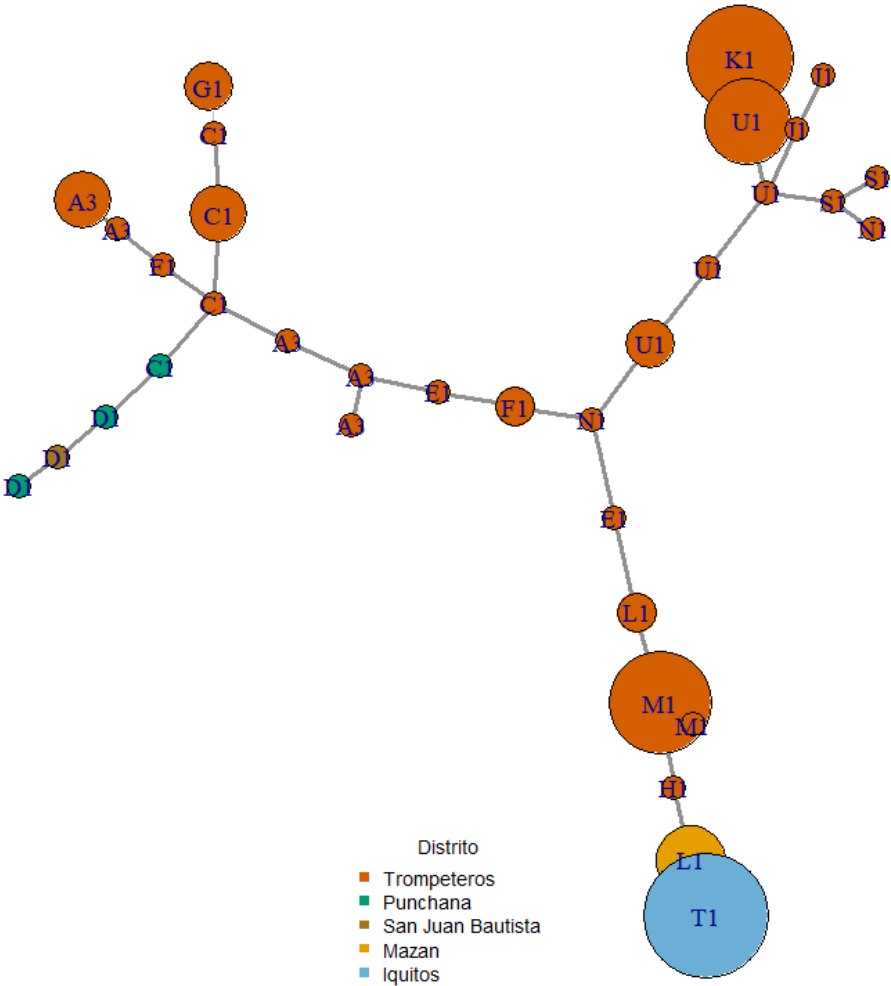
A) PAMAFRO



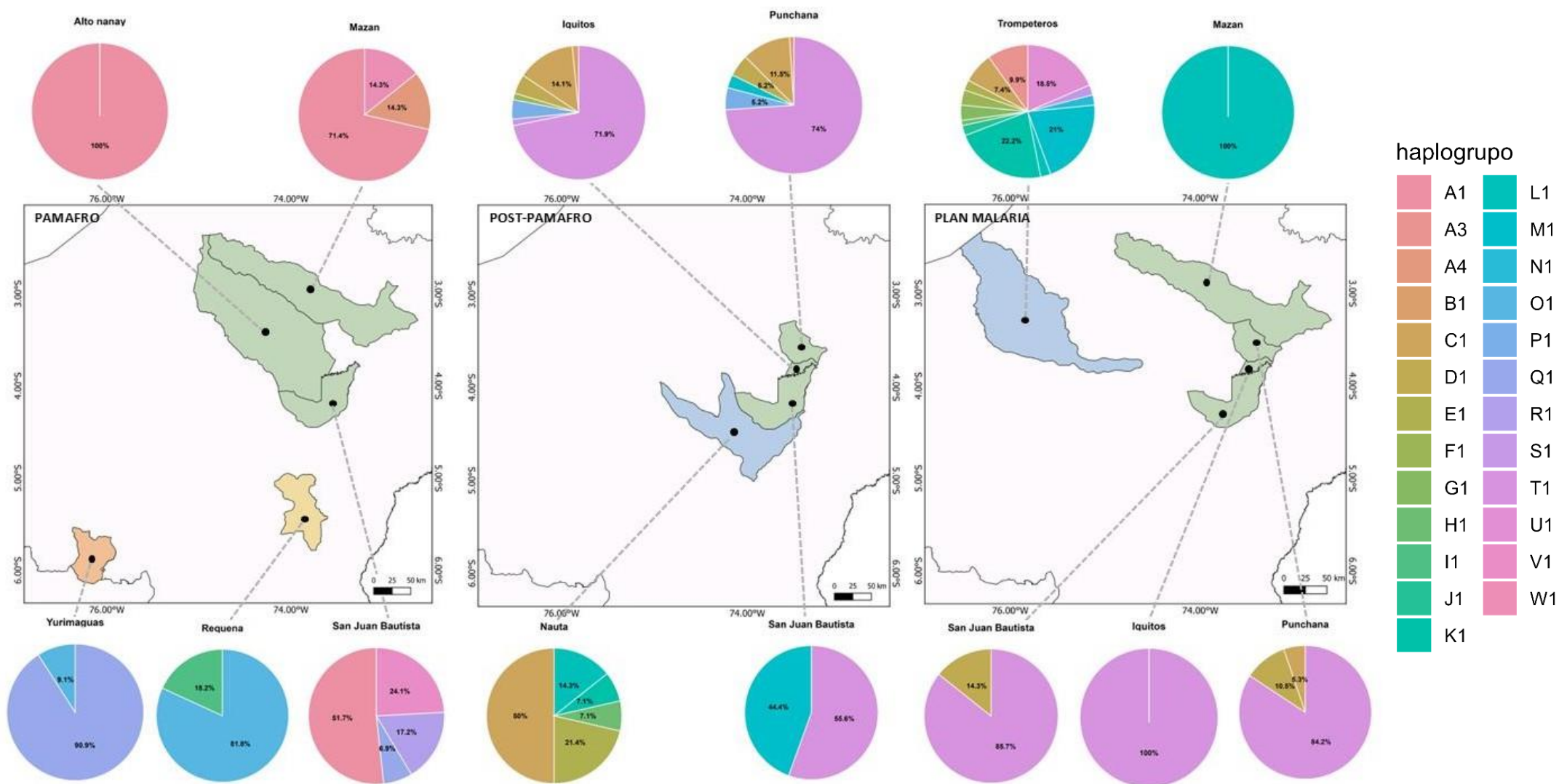
B) Post-PAMAFRO



C) Plan Malaria Cero



Anexo 06. Distribución de haplogrupos por distrito de colección y por intervalo de muestreo incluidos en el estudio



Anexo 07. Árbol *Neighbor-Joining* que representa las relaciones filogenéticas entre los haplogrupos

