

# GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO FIN DE GRADO

## ANÁLISIS DE VARIANTES DEL GEN *csp* EN *Plasmodium vivax*.

---

ANALYSIS OF *Plasmodium vivax* *csp* GENE  
VARIANTS.

**AUTORA:** NEREA PULIDO GÓMEZ

**TUTOR:** JOSÉ ANTONIO GARRIDO CÁRDENAS

**COTUTORA:** CONCEPCIÓN MARÍA MESA VALLE

**FACULTAD:** CIENCIAS EXPERIMENTALES

**DEPARTAMENTO:** BIOLOGÍA Y GEOLOGÍA

**ÁREA:** PARASITOLOGÍA

Universidad de Almería  
Año académico 2020/2021

**AGRADECIMIENTOS**

Tras cuatro años intensos, mi etapa en la Universidad de Almería como estudiante de Biotecnología finaliza. Realizar este trabajo no ha sido una tarea fácil, por ello me gustaría agradecer a aquellas personas que me han ayudado y guiado durante estos meses.

En primer lugar, agradecer a José Antonio Garrido Cárdenas, Concepción María Mesa Valle y José Cebrián Carmona por introducirme en este amplio mundo de la investigación, por ayudarme en cada momento, mostrarme el lado positivo de las cosas y hacerme sentir como en casa. Siempre con ojos críticos perfectos, que me ha servido no solo para mejorar, sino para ver que con esfuerzo y constancia todo es posible.

Agradecer a mis padres, a mi hermano y a mis abuelos por apoyarme como nadie en los momentos más difíciles, por confiar en mi y por celebrar cada logro como si fuese vuestro.

También agradecer a todos mis amigos, gracias por animarme, alegrarme el día a día y haber hecho que este año haya sido mucho más llevadero. Gracias por vuestros ánimos infinitos.

Estos meses, entre todos habéis hecho que haya tenido la ilusión de superarme en cada momento, disfrutando del trayecto y celebrando cada triunfo, muchas gracias a todos.



## **RESUMEN**

La malaria o paludismo es una enfermedad de la que se tiene constancia desde la antigüedad. No obstante, a día de hoy es considerada como un problema grave en salud a nivel mundial. Esta enfermedad afecta sobre todo a regiones de África, América del sur y algunas zonas de Asia. La enfermedad es causada por protozoos parásitos del género *Plasmodium*, solo 6 especies son capaces de infectar a humanos. Las especies de mayor importancia son *Plasmodium falciparum*, por provocar la forma más grave de la enfermedad y *Plasmodium vivax*, por su gran distribución a nivel mundial. La malaria es transmitida por mosquitos hembra del género *Anopheles*.

Para tratar la enfermedad o prevenirla se usan fármacos antipalúdicos, pero en la actualidad el objetivo fundamental es el desarrollo de una vacuna. Una de las vacunas con más éxito hasta el momento y que está aceptada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la vacuna basada en la proteína **circumsporozoito (CSP)** frente a *P. falciparum*. En *P. vivax* numerosos autores se están centrando en esta proteína como posible diana para una vacuna. Sin embargo, el gen que codifica esta proteína presenta diferentes variables alélicas en la región repetida central y se han encontrado dos secuencias: Vk210 y Vk247, ampliamente distribuidas en aislados de *P. vivax* de varias áreas endémicas de malaria en todo el mundo.

En el presente estudio se ha llevado a cabo la caracterización y análisis del gen *csp* de *vivax* tanto a nivel de secuencia de nucleótidos como de aminoácidos para clasificar muestras de pacientes de malaria del sur de México. Estos estudios pueden ser útiles en un futuro en el desarrollo de una posible vacuna frente a malaria.

## **ABSTRACT**

Malaria is a disease that has been known since ancient times. Today, however, it is considered a serious global health problem. The disease mainly affects regions in Africa, South America and regions of Asia. The disease is caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium*. Only 6 species are able to infect humans. The most important species are *Plasmodium falciparum*, which causes the most severe form of the disease, and *Plasmodium vivax*, because of its large distribution worldwide. Malaria is transmitted by female mosquitoes of the genus *Anopheles*.

Antimalarials drugs are used to treat or prevent the disease, but today the main goal is the development of a vaccine. One of the most successful vaccines accepted by the World Health Organisation (WHO) is the circumsporozoite protein (CSP)-based vaccine against *P. falciparum*. In *P. vivax*, many authors are focusing on this protein as a potential vaccine target. However, the gene encoding this protein has different allelic variants in the central repeat region and two sequences have been found: Vk210 and Vk247, widely distributed in *P. vivax* isolates from several malaria endemic areas worldwide.

In the present study, characterization and analysis of the *vivax csp* gene, both at the nucleotide sequence and amino acid levels, was carried out to classify malaria patient samples from southern Mexico. These studies may be useful in the development of a possible malaria vaccine in the future.

**ÍNDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Malaria.</b>	<b>7</b>
1.1.1. Generalidades.	7
1.1.2. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> .	9
1.1.2.1. Morfología de <i>Plasmodium</i> .	10
1.1.3. <i>Plasmodium vivax</i> .	11
<b>1.2. Control y prevención.</b>	<b>12</b>
1.2.1. Lucha antivectorial.	12
1.2.2. Antipalúdicos.	12
1.2.3. Vacunas.	13
1.2.3.1. Vacunas preeritrocíticas.	15
1.2.3.2. Vacunas eritrocíticas.	16
1.2.3.3. Vacunas que bloquean la transmisión.	17
1.2.3.4. Vacunas contra <i>Plasmodium vivax</i> .	17
<b>1.3. CSP.</b>	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS.</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>22</b>
<b>3.1. MATERIAL.</b>	<b>22</b>
3.1.1. Muestras.	22
3.1.2. Oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR.	22
3.1.3. Kits comerciales de biología molecular.	22
<b>3.2. MÉTODOS.</b>	<b>22</b>
3.2.1. Extracción de ADN de las muestras de sangre seca.	22
3.2.1.1. Cuantificación de la concentración de ADN genómico.	23
3.2.2. Diseño de cebadores.	23
3.2.3. Técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).	24
3.2.3.1. Programas de PCR utilizados.	25
3.2.4. Técnicas electroforéticas.	26
3.2.5. Purificación e identificación de los productos de PCR.	27
3.2.6. Secuenciación de ácidos nucleicos.	27
3.2.7. Ensamblaje de las secuencias obtenidas.	27
3.2.8. Análisis cladístico de las secuencias.	27
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>28</b>
<b>4.1. Identificación de <i>Plasmodium vivax</i>.</b>	<b>28</b>

<b>4.2. Obtención del gen <i>csp</i>.</b>	<b>29</b>
<b>4.3. Análisis de secuencias de ADN.</b>	<b>30</b>
<b>4.4. Análisis de las diferentes variantes.</b>	<b>31</b>
4.4.1. Variante <i>Vk247</i> .	31
4.4.2. Variante <i>Vk210</i> .	33
<b>4.5. Análisis filogenético.</b>	<b>36</b>
<b>5. CONCLUSIONES.</b>	<b>37</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>38</b>

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. Malaria.

#### 1.1.1. Generalidades.

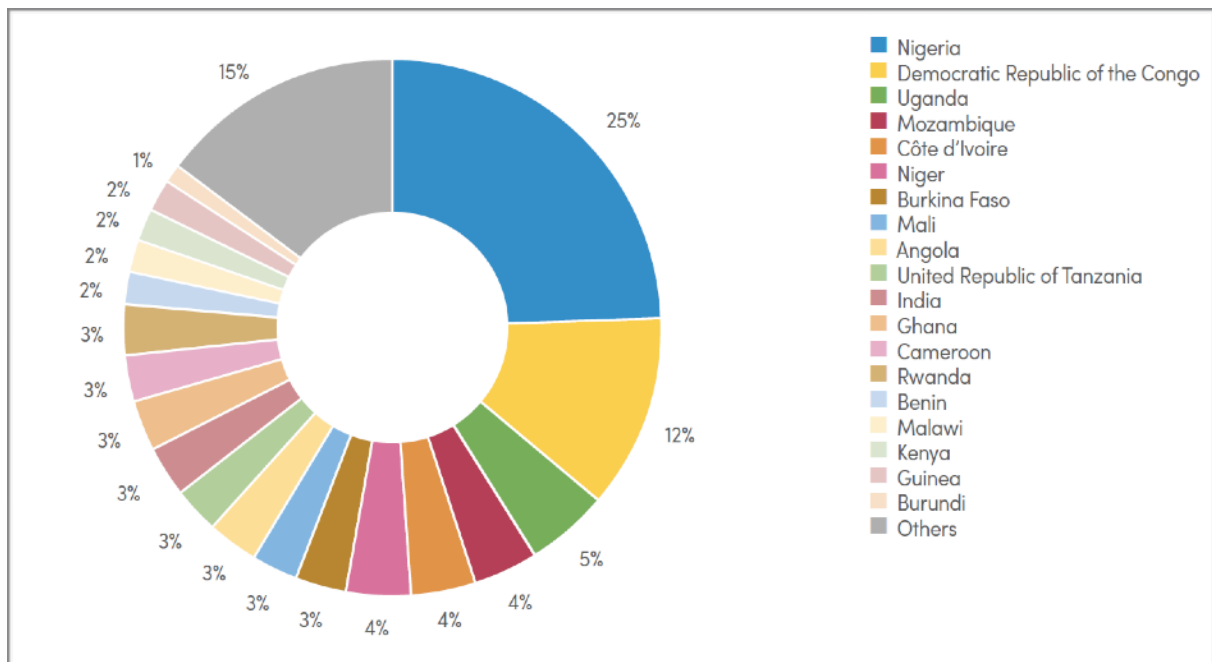
La malaria o paludismo es una enfermedad de la que se tiene constancia desde la antigüedad, sin embargo a día de hoy continua siendo uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, a pesar de la gran cantidad de estrategias de control dirigidas contra el parásito y contra el vector. En 2019 la Organización Mundial de la Salud (OMS) notificó 229 millones de casos de malaria en todo el mundo y 409 000 muertes (Organización Panamericana de la Salud /Organización Mundial de la Salud, 2020). Las actuaciones frente a esta enfermedad en las últimas décadas disminuyeron de forma notable el número de casos y muertes a nivel mundial, sin embargo desde 2014 se ha observado un estancamiento en algunas regiones. La enfermedad es propia de las regiones tropicales y subtropicales, en los últimos 100 años ha conseguido erradicarse de los países templados. Es una parasitosis transmitida por mosquitos hembras del género *Anopheles* (Nkumama et al., 2017), de los que existen más de 400 especies pero solo 30 de ellas pueden transmitir la enfermedad (Organización Panamericana de la Salud /Organización Mundial de la Salud, 2020). La incidencia de la malaria depende de condiciones ambientales y socioeconómicas y está íntimamente ligada a la pobreza, los desastres naturales y la guerra (Ashley et al., 2018). Las predicciones para el futuro sobre el efecto del cambio climático en la distribución mundial de la malaria varían, pero han sugerido que la población en riesgo de malaria aumentará, en particular en las áreas de las tierras altas tropicales (Caminade et al., 2014).

El agente responsable de la malaria es un protozoo parásito perteneciente al género *Plasmodium*, del que existen más de 100 especies que parasitan reptiles, aves, mamíferos o roedores aunque sólo 6 infectan a humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. ovale curtisi* y *P. ovale wallikeri* (Garnham, 1966; Singh et al., 2021).

***P. falciparum*** es la especie que causa la forma más grave de la enfermedad (Garrido-Cardenas et al., 2019). Afecta fundamentalmente al continente africano (93%) donde en 2019 se produjeron 213 millones de casos. Más del 50% de las infecciones de malaria a nivel mundial se dan en sólo 6 países (Figura 1): Nigeria, con un 25% de los casos; República Democrática del Congo, con un 12% de casos; Uganda, con un 5% de casos; Mozambique, con un 4% de casos; Costa de Marfil, con un 4% de casos y Nigeria, con un 4% de casos (Organización Panamericana de la Salud /Organización Mundial de la Salud, 2020).

***P. vivax*** presenta una gran distribución geográfica: América Latina, Oriente Medio, sur y sudeste de Asia, África y Oceanía (Garrido-Cardenas et al., 2019). A nivel mundial *P. vivax* provoca el 3,3% de las infecciones (Organización Panamericana de la Salud /Organización Mundial de la Salud, 2020).

*P. malariae* y *P. ovale* se encuentran en África y suroeste de Asia (Ashley et al., 2018). *P. ovale* se encuentra en menor porcentaje que las especies anteriores (Kotepui et al., 2020). *P. knowlesi* puede ser observada principalmente en Asia y en el Oeste Africano (Ashley et al., 2018). *P. knowlesi* durante décadas se confundió con *P. malariae*, por su similitud morfológica que los hacía indistinguibles en la observación microscópica. Los avances en las técnicas moleculares de diagnóstico permitieron separarlos y se ha podido comprobar que, en efecto, *P. knowlesi*, un *plasmodium* propio de simios en el sudeste asiático, es el responsable de provocar, en los últimos años, brotes de malaria humana (Cox-Singh & Singh, 2008). Esto ha planteado un nuevo escenario de la malaria como zoonosis (Millar & Cox-Singh, 2015) lo que supone un desafío en el control de esta enfermedad. Otras especies de *Plasmodium* de primates no humanos, por ejemplo, *Plasmodium cynomolgi* en el sudeste de Asia y *Plasmodium brasilianum* y *Plasmodium simium* en América del sur, pueden también transmitirse a los humanos, habiéndose registrado ya algunos casos, lo que refuerza la idea de una malaria zoonótica (Lalremruata et al., 2015; Ramasamy, 2014).



**Figura 1:** Porcentaje de infectados en cada país sobre el total de infectados (Organización Panamericana de la Salud /Organización Mundial de la Salud, 2020).

La población más vulnerable son los niños, especialmente los menores de 5 años (67% de las muertes de malaria en el mundo) y las mujeres embarazadas (Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud, 2020).

Los síntomas de esta enfermedad son inespecíficos y se pueden confundir con una gripe (fatiga muscular, fiebre, dolor de cabeza, vómitos, ictericias...). La fiebre es el síntoma más representativo de

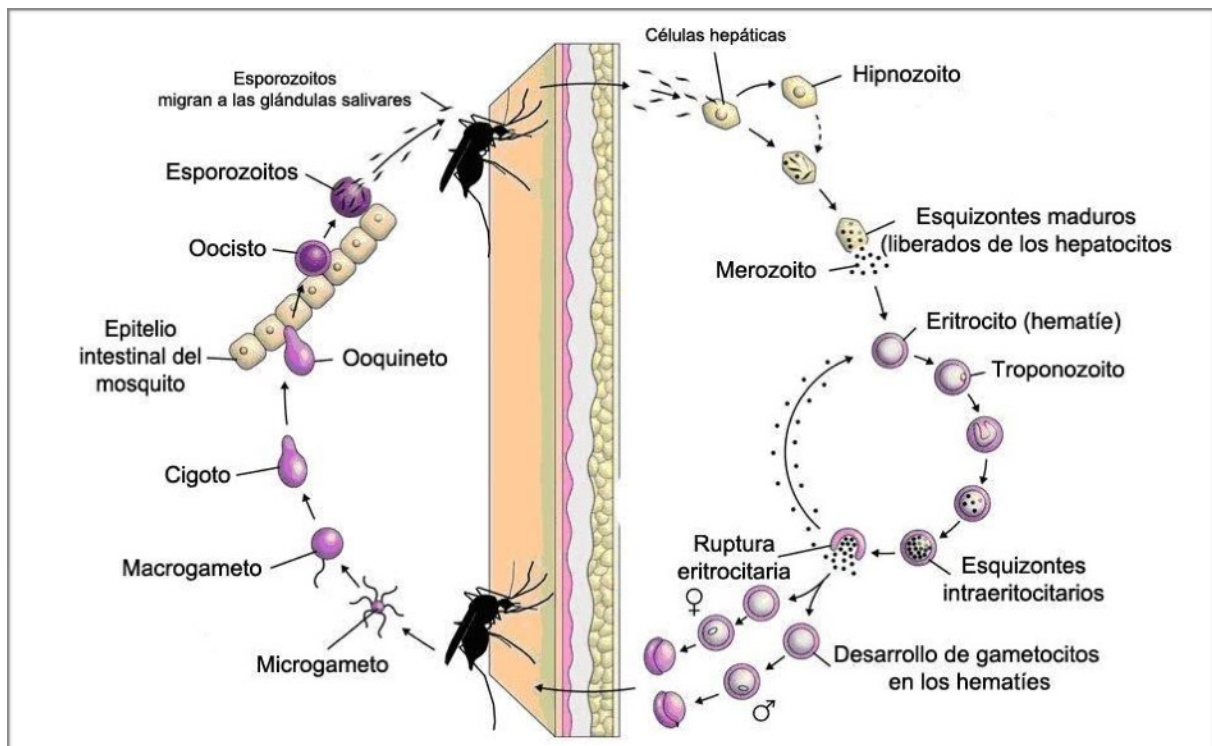


la enfermedad y los síntomas pueden ir desde dolor de cabeza leve hasta complicaciones graves (Bartoloni & Zammarchi, 2012). Las manifestaciones más comunes del paludismo grave son paludismo cerebral, lesión pulmonar aguda, que puede progresar a síndrome de dificultad respiratoria aguda (hasta en un 25% de los casos), lesión renal aguda, que generalmente se presenta como necrosis tubular aguda y acidosis (Bartoloni & Zammarchi, 2012; Organización Panamericana de la Salud /Organización Mundial de la Salud, 2020; Taylor et al., 2012).

Tradicionalmente el diagnóstico de la enfermedad se ha hecho por microscopía óptica, en este tipo de diagnósticos se realizan frotis sanguíneos teñidos (se usan los colorantes de Giemsa, Wright o Field (Warhurst & Williams, 1996)). La calidad de este método no suele ser suficiente, el diagnóstico suele ser erróneo en cuanto a la especie (Nkumama et al., 2017). En la actualidad, la utilización de técnicas moleculares como la PCR permiten identificar las diferentes especies de *Plasmodium* con un alto grado de sensibilidad. Sin embargo, debemos tener en cuenta que este tipo de técnicas requieren de personal y material especializado, lo que dificulta su utilización en áreas donde la malaria es endémica, ya que sus recursos son limitados (Johnston et al., 2006; Thomas & Martin, 2002).

### 1.1.2. Ciclo de vida de *Plasmodium*.

El ciclo de vida de *Plasmodium* es muy complejo y está compartido entre vertebrados y las hembras del mosquito *Anopheles* (Figura 2). En el ciclo se consideran dos fases una en el hospedador vertebrado (fase asexual) y otra en el invertebrado (fase sexual). En el vertebrado el parásito posee una fase hepática (fase exoeritrocítica) y una sanguínea (fase intraeritrocítica) (Ejigiri & Sinnis, 2009; Garrido-Cardenas et al., 2019).



**Figura 2:** Ciclo de vida de *Plasmodium* (Lopez Tricas, 2012).

El ciclo de vida comienza con la picadura del mosquito hembra *Anopheles* infectado (Figura 2). El mosquito inocula de 100 a 200 esporozoitos en el huésped vertebrado mientras se alimenta. Los esporozoitos pueden permanecer en la piel un máximo de 3 horas. Estos esporozoitos a través del torrente sanguíneo llegan al hígado en un tiempo de aproximadamente 30 minutos (Cirimotich et al., 2010; Ejigiri & Sinnis, 2009).

Los esporozoitos poseen una proteína que se unirá a receptores específicos de membrana del hepatocito. En el interior de este maduraran hasta esquizontes, multiplicándose (esquizogonia exoeritrocítica o hepática) y produciendo merozoitos. Este proceso tiene una duración entre 2 y 14 días (Hall et al. 2005). Una de las características más importantes de *P. vivax* y *P. ovale* es que en el hepatocito forman hipnozoitos o esquizontes durmientes, es decir, formas latentes del protozoo. Cuando pasa un tiempo de 6 a 11 meses se pueden activar y producir la enfermedad de nuevo (Markus, 2011).

Seguidamente, se forma el trofozoito cuando el merozoito entra en el glóbulo rojo. Las formas más jóvenes del trofozoito tienen forma de anillo, maduran en 24-72 horas, pierden la morfología de anillo y se forma el esquizonte. Los merozoitos son expulsados al torrente sanguíneo tras la rotura celular. Los glóbulos rojos son invadidos por los merozoitos y estos tienen la capacidad de replicarse asexualmente (esquizogonia eritrocítica). Cuando el glóbulo rojo se rompe los merozoitos son liberados pudiendo infectar a otros glóbulos rojos que se encuentren en el entorno (Gilson & Crabb, 2009; Silvie et al., 2008).

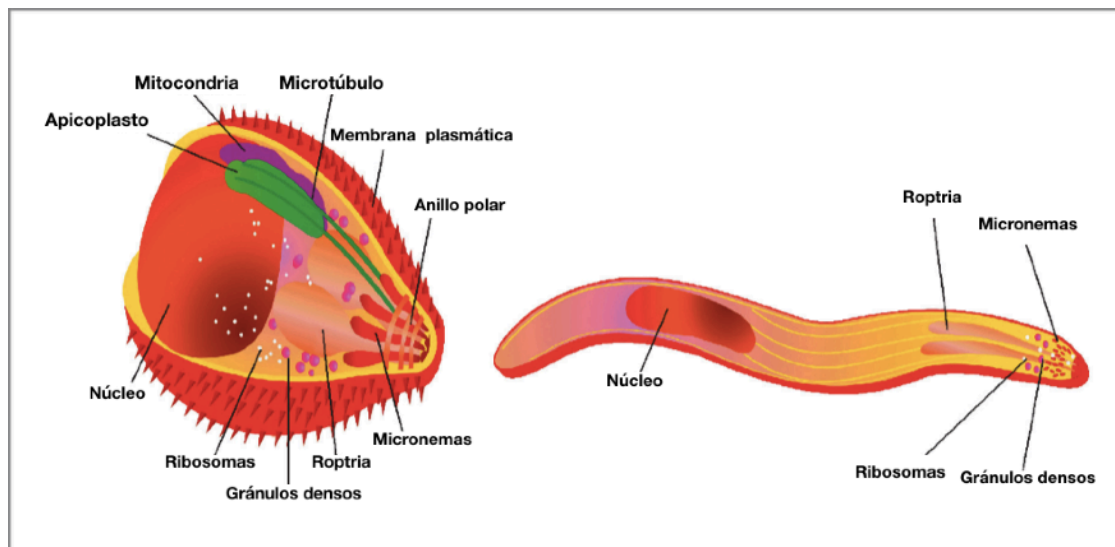
Algunos trofozoitos intraeritrocitarios maduran en formas sexuadas y son llamados gametocitos. El mosquito cuando se alimenta de sangre del hospedador vertebrado ingiere estos gametocitos (pueden ser masculino o femenino). Tras ingerir los gametocitos se produce la gametogénesis, que tiene lugar en el intestino del mosquito. Para completar el desarrollo de los gametocitos se debe producir la fecundación, cuando esto se produce se forma el cigoto y en 24 horas se producen unas formas móviles conocidas como ooquinetos. Los ooquinetos se transforman en ooquistes, estos producen miles de esporozoitos en 2 semanas (se encuentran situados entre la lámina basal y el epitelio). Posteriormente, los esporozoitos liberados cuando se rompe el ooquiste maduro invaden las glándulas salivales y alcanzan el conducto salival. Llegados a este punto el mosquito puede inocular de nuevo la infección a un nuevo individuo tras alimentarse de su sangre (Barillas-Mury & Kumar, 2005).

#### **1.1.2.1. Morfología de *Plasmodium*.**

*Plasmodium* pertenece al phylum ***Apicomplexa***. El parásito, como todos los miembros de este phylum, posee un complejo apical que contiene estructuras que facilitan la introducción del parásito en la célula hospedadora: orgánulos secretores llamados rhoptrias, micronemas, gránulos densos, un núcleo y los anillos polares. El complejo apical también posee una o más mitocondrias y un

apicoplasto (orgánulo membranoso alargado), cada uno contiene su propio ADN y ribosomas (Bannister & Sherman, 2009). El complejo apical es similar en el esporozoito y en el merozoito (Spencer et al., 2016). Los merozoitos presentan una forma ovalada y los esporozoitos son mucho más largos (Figura 3) (Bannister & Sherman, 2009; Kappe et al., 2003).

La superficie del merozoito se encuentra cubierta por una capa de elevado grosor y debajo de esta se encuentran una membrana plasmática en la zona exterior y dos membranas interiores que forman el complejo de la membrana interior. En esta zona está situado el motor de actina-miosina, el cual impulsa al merozoito en la invasión. Los microtúbulos se adhieren a la capa interna y están anclados en los anillos polares (Bannister & Sherman, 2009).



**Figura 3:** Estructura complejo apical del merozoito y esporozoito (Spencer et al., 2016).

### 1.1.3. *Plasmodium vivax*.

*Plasmodium vivax* es la segunda especie que más afecta a humanos y posee una mayor distribución a nivel mundial, en Asia y América Latina representa más de la mitad de todos los casos de malaria (Carlton et al., 2011; Kochar et al., 2005). Es la especie más extendida fuera de África, y representa el 64% de los casos de malaria en las regiones endémicas de las Américas, más del 30% de los casos en el sudeste asiático y el 40% de los casos en las regiones del Mediterráneo oriental. Además, la malaria causada por *P. vivax* ya no se considera una enfermedad benigna debido a los informes de malaria mortal provocada por este parásito (Kano et al., 2018; Tjitra et al., 2008) por lo que es importante prestar especial atención a esta especie de *Plasmodium*, ya que casi el 40% de la población mundial corre el riesgo de contraer este tipo de malaria (Birbeck, 2018; Howes et al., 2016; Price et al., 2009).

El **antígeno del grupo sanguíneo Duffy** es la puerta de entrada del parásito en los glóbulos rojos humanos. En África existe un predominio de poblaciones con ausencia de este antígeno, y, por ese motivo, tradicionalmente se ha asociado la baja prevalencia de la malaria causada por *P. vivax* en este continente con la ausencia del antígeno. Sin embargo, recientemente se han detectado pacientes de

malaria vivax Duffy negativos, es decir, el parásito ha tomado una vez más una vía alternativa para producir la infección (Golassa et al., 2020; Kano et al., 2018; Mercereau-Puijalon & Ménard, 2010; Ryan et al., 2006).

La presencia de los hipnozoitos en el hígado junto con el abandono de los tratamientos y la aparición de resistencias a los antimaláricos dificulta el control de esta especie (Sattabongkot et al., 2004).

## 1.2. Control y prevención.

La gran diversidad genética que presentan los *Plasmodium* es la responsable de su capacidad para evadir la respuesta inmune del hospedados así como dar lugar a variantes resistentes a medicamentos y vacunas, aspectos que juegan un papel importante en el establecimiento de medidas de control contra la malaria.

### 1.2.1. Lucha antivectorial.

La lucha antivectorial es hasta el momento el medio más eficaz para reducir la transmisión de la malaria. Existen dos métodos en los cuales se lucha contra el vector:

- **Mosquiteros tratados con insecticida de larga duración (MTI)** (Nkumama et al., 2017). Mediante la utilización de los mosquiteros se ha producido la reducción de la enfermedad en las zonas endémicas. En el año 2000 el uso de mosquiteros era menor al 2%, sin embargo, en el año 2019 se ha incrementado su uso al 46%, produciéndose un drástico descenso en los casos totales de malaria (Organización Panamericana de la Salud /Organización Mundial de la Salud, 2020).
- **El método de fumigación de interiores con insecticidas de acción residual (FIAR)** consiste en rociar el interior de las viviendas con insecticidas. Los insecticidas más utilizados son los piretroides, organoclorados, carbamatos y organofosforados. Este proceso debe realizarse una o dos veces al año. Se ha producido un descenso de la efectividad del método debido a la aparición de resistencias a los insecticidas tradicionales, por lo que se están sustituyendo por otros de elevado costo. La OMS ha publicado un *Plan Mundial de manejo de la resistencia*. Este plan incluye la rotación de insecticidas utilizados para el rociado de los domicilios (Organización Panamericana de la Salud /Organización Mundial de la Salud, 2020).

### 1.2.2. Antipalúdicos.

Los fármacos antipalúdicos se usan para tratar la enfermedad o para prevenirla. En la actualidad, los antipalúdicos se dividen en cuatro clases de agentes: **gametocidas**, **esquizonticidas sanguíneos**, **esquizonticidas tisulares** y **esporonticidas** (Sevene et al., 2010). Existen numerosos fármacos antipalúdicos, sin embargo, en las últimas décadas han aparecido cepas resistentes a los fármacos tradicionales (Arrow et al., 2004).

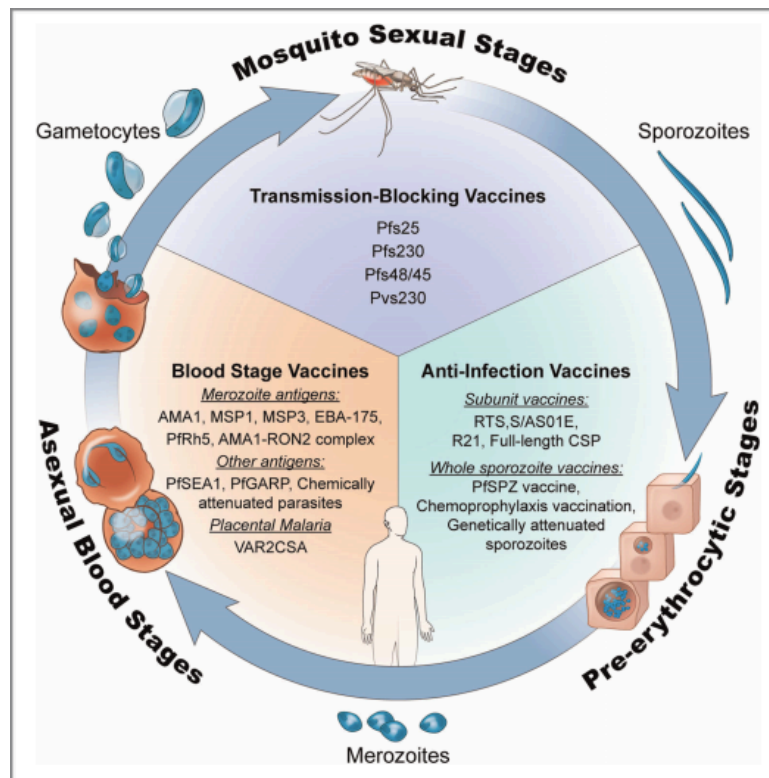
- **Gametocidas**: se encargan de la destrucción de los gametocitos femeninos y masculinos de *Plasmodium* en la etapa sanguínea del ciclo de vida. Ejemplos de los gametocidas son la cloroquina y la artemisina (Sevene et al., 2010).
  - La **cloroquina** es el tratamiento tradicional y combinada con primaquina se emplea para la eliminación de los hipnozoitos en las células hepáticas. La primaquina puede causar la llamada anemia hemoflica en pacientes que poseen un déficit de la enzima G6PD (Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa). Por lo tanto, este tratamiento no sería útil para pacientes con este déficit (Ashley et al., 2018; Muñoz et al., 2006).
  - La **artemisina** es un fármaco contra el paludismo cuyo componente principal procede de la planta *Artemisia annua*, hierba usada en la medicina china tradicional (Meshnick, 2002). La artemisina y los derivados de esta (Artesunato, arteméter...) pueden ser usados solos o combinados con un fármaco. El tratamiento combinado con artemisina es denominado **ACT**. La artemisina se emplea en individuos que presentan resistencia a la cloroquina (Ashley et al., 2018; Fairhurst et al., 2012).
- **Esquizonticidas sanguíneos**: actúan sobre las formas sanguíneas del parásito y son los encargados de parar los primeros síntomas de la enfermedad. En este apartado están incluidos la halofantrina, sulfodoxina, mefloquina y quinina (Alven & Aderibigbe, 2019).
- **Esquizonticidas tisulares**: la función de este fármaco es actuar sobre las formas latentes (hipnozoitos) de *P. vivax* y *P. ovale*. En este grupo se incluyen la pirimetamina y la primaquina (Alven & Aderibigbe, 2019). Además, estos fármacos son usados como profilácticos (administrados para la prevención de infecciones por *Plasmodium*) (Dow et al., 2008)
- **Esporonticidas**: Son los fármacos que impiden el desarrollo de ovocitos en el ciclo de vida del parásito, impidiendo de esta forma que se transmita la enfermedad. Ejemplos de este tipo de antipalúdicos son la primaquina y la pirimetamina (Alven & Aderibigbe, 2019).

### 1.2.3. Vacunas.

En el siglo pasado, fueron fundamentales dos observaciones para iniciar el desarrollo de una vacuna contra la malaria. Por un lado, la inmunidad natural mostrada por los individuos que vivían en zonas donde la malaria era endémica (Hoffman et al., 2002; Rieckmann et al., 1979) y por otro, la inmunidad mostrada por voluntarios sanos frente a la picadura de mosquitos, que habían sido inoculados con esporozoitos irradiados de *P. falciparum* y *P. vivax*. Se comenzó a investigar con la esperanza de conseguir desarrollar una vacuna contra la malaria, sin embargo a día de hoy aún no existe ninguna vacuna comercializada que haya demostrado una eficacia suficiente en la prevención contra la enfermedad. Esto es debido a que *Plasmodium* presenta una gran complejidad en el ciclo de vida, posee distintas formas morfológicas y una gran variabilidad antigénica (Hoffman et al., 2002;

Rieckmann et al., 1979). Actualmente, se están llevando a cabo varios ensayos clínicos que abren una puerta a la esperanza.

Todos los intentos hacia el desarrollo de una vacuna contra la malaria se han dirigido principalmente frente a *P. falciparum* por ser la responsable de la forma más grave de la enfermedad. Las vacunas pueden clasificarse según el momento del ciclo de vida del parásito en el que actúen: **preeritrocíticas** (actúan contra los esporozoitos inoculados por la hembra del mosquito *Anopheles* y pretenden reducir la probabilidad de infección después de la picadura del mosquito), **eritrocíticas** (actúan contra los merozoitos, con lo cual disminuirán los síntomas y se reduciría el tiempo o el grado de infección, pero debido a la alta carga parasitaria en esta fase sería muy difícil eliminar la infección) y **vacunas que bloquean la transmisión** (las que actúan frente a las formas sexuales, los gametocitos) (Figura 4). Además de las anteriores, existen otras **vacunas contra la malaria asociadas al embarazo** (Ouattara & Laurens, 2015). No obstante, es de gran importancia el desarrollo de una vacuna contra *P. vivax*, puesto que, la extensión en el mundo de esta especie es cada vez mayor e incluso en ciertas zonas puede llegar a ser más grave que *P. falciparum* (De Camargo et al., 2018).



**Figura 4:** Ciclo de vida de *Plasmodium* y candidatos a vacunas empleadas en cada etapa (Duffy & Patrick Gorres, 2020).

### 1.2.3.1. Vacunas preeritrocíticas.

Estas vacunas actúan contra los esporozoitos de *Plasmodium*, intentado evitar la invasión de las células hepáticas (Duffy & Patrick Gorres, 2020).

#### - Vacunas basadas en CSP.

La proteína CSP o proteína del circumsporozoito se encuentra en la superficie del esporozoito y está relacionada con la adhesión e invasión de las células hepáticas (Coppi et al., 2011) Esta proteína posee varias secuencias repetidas que se han utilizado como diana de la vacuna (Alonso, 2006).

**RTS,S/ASO1B** es la única vacuna que, hasta el momento, ha sido aceptada por la OMS y aprobada por diferentes agencias como la Agencia Europea del Medicamento. Los primeros ensayos tuvieron lugar en 1985 y fue aprobada, con la marca Mosquirix, en 2015. La vacuna fue diseñada especialmente para niños, así que no se contempla su uso en adultos. En la actualidad, se está probando a gran escala en tres países africanos (Malawi, Ghana y Kenia). Está basada en la región constante de CSP de *P. falciparum* (R), los epítomos de células T (T), el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) (S) y un adyuvante llamado ASO1 (Wilby et al., 2012). El desarrollo de esta vacuna representa un hito histórico pero su eficacia es limitada ya que únicamente confiere protección parcial. Los ensayos clínicos demostraron que podría reducir hasta un 50% el número de casos en los niños de entre 5 y 10 años. Pero en los de menos edad, el porcentaje disminuía hasta un 30% (Wilby et al., 2012). Por tanto, hay margen de mejora y en la actualidad se están poniendo en marcha diferentes estrategias en la administración de la vacuna (Regules et al., 2016), así como diferentes enfoques en su desarrollo que mejoren la inmunogenicidad de la misma (Collins et al., 2017).

Malawi es uno de los primeros países de África que presenta un programa piloto de vacunación contra el paludismo. Además, Ghana y Kenia se suman a este programa. Tras 30 años de desarrollo, esta vacuna es la primera y única capaz de disminuir la mortalidad infantil, es administrada en niños de hasta dos años. En los ensayos clínicos se ha observado que la vacuna previene cuatro de cada diez casos de paludismo clínico y tres de cada diez casos de malaria grave (World Health Organization, 2018).

#### - Vacunas con esporozoitos completos.

En 2010 la empresa SANARIA pone en marcha una plataforma tecnológica para el desarrollo de una vacuna con esporozoitos completos. Estos pueden ser atenuados de diferentes formas:

- **PfSPZ** (esporozoitos atenuados por radiación).
- **PfSPZ-GA1** (atenuación genética de PfSPZ: delección de genes necesarios para completar el desarrollo en la etapa hepática) (van Schaijk et al., 2014).
- **PfSPZ-CVac** (quimioatenuación, vacunación con quimioprofilaxis, es decir administración de la vacuna junto con medicamentos antimaláricos). Esta vacuna se encuentra en fase I y se ha

demostrado la eficacia en humanos pero su eficacia depende de la dosis (Mordmüller et al., 2017; Richie et al., 2015; Seder et al., 2013; Sissoko et al., 2017).

### 1.2.3.2. Vacunas eritrocíticas.

Las vacunas eritrocíticas actúan contra los merozoitos y son una alternativa a las vacunas explicadas anteriormente. Estas vacunas pueden prevenir la enfermedad y la muerte, pero no pueden prevenir la infección (Ouattara & Laurens, 2015). Las vacunas eritrocíticas deben disminuir el número de merozoitos y gametocitos, haciendo que la infección y los síntomas de la enfermedad sean de menor gravedad (Lin et al., 2016). Han sido mucho los intentos por desarrollar una vacuna eficaz frente a la fase eritrocítica de la enfermedad. Sin embargo, los antígenos más estudiados como candidatos a vacunas han mostrado un elevado polimorfismo (Takala et al., 2009), así como rutas de invasión de eritrocitos redundantes (Wright & Rayner, 2014). En los últimos años se han logrado avances importantes con la identificación de una nueva generación de antígenos diana de merozoítos que son esenciales y que presentan niveles relativamente bajos de polimorfismos. Tres de estas dianas forman un complejo, incluyendo el homólogo 5 de la proteína de unión a reticulocitos de *P. falciparum* (RH5) (Douglas et al., 2011), el antígeno protector rico en cisteína (CyRPA) (Garrido-Cardenas, Cebrián-Carmona, et al., 2019; Reddy et al., 2015) y la proteína que interactúa con RH5 (Ripr)(Chen et al., 2011). Actualmente, hay dos vacunas candidatas basadas en los antígenos **PfRH5** (Payne et al., 2017) y **AMA1-RON2** (Srinivasan et al., 2014).

El homólogo 5 de la proteína de unión a reticulocitos de *P. falciparum* (**PfRH5**) interacciona con un receptor que se encuentra en la superficie de los eritrocitos que resulta ser esencial para que se produzca la invasión (Crosnier et al., 2011). PfRH5 es considerada como una potencial diana para el desarrollo de una vacuna contra *P. falciparum* en la etapa sanguínea (Douglas et al., 2011). Douglas et al., (2015) ponen de manifiesto la actividad in vivo de esta proteína y sugieren que las vacunas basadas en PfRH5 podrían ser eficaces en humanos.

Utilizar un complejo proteico que imita la forma funcional de las proteínas en lugar de los componentes individuales es una estrategia novedosa para el desarrollo de vacunas candidatas de próxima generación para la malaria y otros patógenos (Srinivasan et al., 2014). El complejo **AMA1-RON2** está formado por dos proteínas: **AMA1** que es el antígeno 1 de la membrana del complejo apical, una proteína secretada por los micronemas y asociada con la superficie del parásito durante la invasión y **RON2** un complejo macromolecular secretado por las roptrias que se inserta como una proteína de membrana integral en la célula huésped. AMA1 utiliza esta proteína como receptor para promover la invasión de los parásitos *Apicomplexa*. La interacción RON2-AMA1 es crucial para la entrada de *P. falciparum* en sus células huésped (Lamarque et al., 2011).

En la búsqueda de nuevas proteínas antigénicas se han intentado identificar proteínas expresadas por los parásitos en la superficie de los glóbulos rojos. Entre estas, se encuentra la proteína de superficie **PfEMP1** relacionada con la virulencia de *P. falciparum* (Tessema et al., 2019). PfEMP1 es una proteína de membrana de *P. falciparum* expresada en la superficie de los eritrocitos infectados y que está



implicada en la unión al endotelio placentario asociado al embarazo (Ouattara & Laurens, 2015). Existe una vacuna contra la malaria asociada al embarazo que se encuentra en desarrollo preclínico y está basada en PfEMP1 (Ouattara & Laurens, 2015).

### **1.2.3.3. Vacunas que bloquean la transmisión.**

Las vacunas que bloquean la transmisión pueden ser llamadas también vacunas altruistas, debido a que no existe un beneficio para el individuo vacunado. El beneficio que obtenemos de esta vacuna es que la enfermedad no se transmita. Por lo tanto, queda bloqueada la fertilización y el proceso de reproducción (Ouattara & Laurens, 2015).

Existen cuatro proteínas candidatas para el desarrollo de vacunas que bloquean la transmisión: las proteínas de superficie de los gametocitos, como son **Pfs230** y **Pfs48/45** y las proteínas de superficie del cigoto, como son **Pfs25** y **Pf28** (Duffy & Patrick Gorres, 2020; Kapulu et al., 2015).

En el diseño de vacunas que bloqueen la transmisión se buscan no sólo moléculas inmunogénicas del parásito, otro enfoque que se considera una línea de ataque complementaria apunta a identificar moléculas presentes en el intestino medio del mosquito y / o en la saliva que facilitan la invasión de las células del vector y del hospedador mamífero, respectivamente (Dinglasan & Jacobs-Lorena, 2008). Así el equipo de investigación de Rhoel Dinglasan en la Universidad Johns Hopkins está trabajando en el desarrollo de una vacuna que se dirige a una molécula (alanil aminopeptidasa N, o AnAPN1) de superficie en el intestino medio de los mosquitos *Anopheles* que los parásitos necesitan para completar su ciclo de vida. Esta molécula no se transmite a las personas cuando son picadas por insectos; pero cuando se les presentó a los animales en estudios de laboratorio, los animales produjeron anticuerpos contra él. Cuando estos anticuerpos se volvieron a introducir en los mosquitos junto con *Plasmodium*, se bloqueó la posibilidad de que los parásitos infectaran al mosquito. Esto rompe un paso clave en la cadena de transmisión de la malaria. El siguiente paso es probar si lo que funciona en el laboratorio funciona en las personas y en las comunidades donde la malaria es endémica. El primer ensayo en humanos comenzará en 2022 con un pequeño número de personas en Gabón para probar su seguridad (Dinglasan & Jacobs-Lorena, 2008).

### **1.2.3.4. Vacunas contra *Plasmodium vivax*.**

Actualmente, es de gran importancia encontrar una vacuna frente a *P. vivax*, ya que, aunque esta especie ha sido considerada durante mucho tiempo como benigna, existen informes de casos mortales de malaria provocados por este parásito (Kano et al., 2018). La realización de una vacuna para cualquier especie de *Plasmodium* presenta dificultades en su desarrollo, en *P. vivax* se suma el obstáculo adicional de no poder obtener cultivos in vitro (Moreno-Pérez et al., 2013), esto es debido a que el parásito invade selectivamente los reticulocitos (Udomsangpetch et al., 2007).

Las vacunas que están en fase de desarrollo se basan en la **proteína del circumsporozoito (CSP)**, la **proteína de superficie del ooquineto Pvs25** y la **proteína de unión Duffy** (Herrera et al., 2007).

### - **Proteína de superficie de *P. vivax* 25.**

La vacuna está basada en Pvs25, una proteína de superficie del ooquineto y se denomina vacuna **Pvs25H** (Wu et al., 2008). La vacuna Pvs25H posee una proteína recombinante de 20,5 kDa, de la cual se utiliza un fragmento que va desde el aminoácido 23 al 195 de Pvs25 de la cepa Salvador I (Malkin et al., 2005).

La vacuna **Pvs25H** se encontraba en fase I del ensayo clínico y constaba de dos ensayos. En el primer ensayo se produjeron respuestas de anticuerpos y bloqueo de la transmisión (Malkin et al., 2005). Sin embargo, se necesitaba una producción más elevada de anticuerpos. En el segundo ensayo de la fase I, se intentó mejorar la inmunidad. Esta vacuna era muy prometedora, pero al realizar la administración de las dosis en personas se observó que dos de los pacientes presentaron diversos efectos adversos, por lo tanto, el estudio se dio por finalizado (Reyes-Sandoval & Bachmann, 2013; Wu et al., 2008).

### - **Proteína de unión Duffy.**

La **vacuna DBP** (antígeno Duffy) es una vacuna dirigida contra las etapas sanguíneas asexuales del parásito (Reyes-Sandoval & Bachmann, 2013). **DBP** (Duffy Binding Protein, proteína de unión a Duffy) contiene dominios adhesivos ricos en cisteína y posee gran importancia en la invasión de los reticulocitos mediante merozoitos de *P. vivax* (Arévalo-Herrera & Herrera, 2001; E. Chen et al., 2015). La vacuna produce un bloqueo de la unión de DBP de *P. vivax* y el antígeno humano Duffy (Arévalo-Herrera & Herrera, 2001).

Además de las anteriores, actualmente se está trabajando con otras proteínas de superficie que han demostrado tener poder antigénico que pueden ser utilizadas para el desarrollo de vacunas contra *P. vivax*: MSP1 (alelo K1), MSP2 (alelo 3D7), MSP1, AMA1, MSP3, GLURP, SE36 y RESA (Lin et al., 2016).

### **1.3. CSP.**

La **proteína circumsporozoito (CSP)** es una proteína de superficie y desempeña funciones múltiples y cruciales en el desarrollo, la migración y la invasión de esporozoitos en los hepatocitos. Por lo tanto, esta proteína ha sido reconocida como una de las principales candidatas para el desarrollo de una vacuna frente a malaria. La CSP es bien conocida desde hace tiempo debido a que la región de repetición de CSP es una diana de los anticuerpos neutralizantes (Ballou et al., 1985; Young et al., 1985).

La proteína CSP consta de tres regiones distintas: una región N-terminal conservada no repetida (RI), una región repetida central altamente polimórfica (CRR) y una región C-terminal conservada no repetida (RII). Las regiones conservadas RI y RII poseen un papel importante en la invasión producida por los esporozoitos en las células hepáticas (Figura 5) (Atcheson & Reyes Sandoval, 2020). La zona

CRR de la CSP de *P. vivax* consta de motivos de repetición de péptidos (PRM) y, a diferencia de *P. falciparum*, presenta heterogeneidad de secuencias lo que da como resultado poblaciones inmunológicamente distintas. Según la composición de los PRM principales en el CRR, PvCSP se clasifica en tres variantes alélicas: Vk210, Vk247 y *like P. vivax*. Los dos alelos más abundantes incluyen Vk210 y Vk247, que llevan motivos repetidos de nonapéptidos (nonúmeros o péptidos de 9 aminoácidos) GDRA (**D / A**) GQPA y ANGAG (**N / D**) QPG, respectivamente. Esto indica que una vacuna basada en una cepa puede no ser suficiente para proteger contra todas las cepas circulantes (González et al., 2001; Lim et al., 2005; Rosenberg et al., 1989).

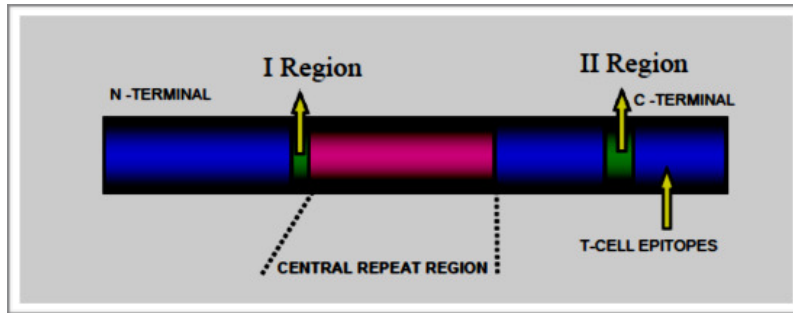
En las últimas décadas se han desarrollado vacunas basadas en las tres regiones de la CSP con un éxito limitado (Gimenez et al., 2017; Herrington et al., 1988; Kumar et al., 2004; Nardin et al., 2000; Yang et al., 1997). Diferentes autores (Charoenvit et al., 1991; Yang et al., 1997) han identificado que el tetrámero AGDR dentro de la secuencia nonamérica, que se encuentra sólo en Vk210, es un objetivo de los anticuerpos neutralizantes.

Los ensayos clínicos de vacunas para la malaria vivax que incorporan CSP de vivax (PvCSP) han demostrado su eficacia en la prevención de la malaria, al menos en parte. Sin embargo, la diversidad genética de PvCSP en la población natural sigue siendo una preocupación importante. El tamaño de los polimorfismos y la aparición de nuevos PRM, así como nuevas variantes de CRR, contribuyen principalmente a la diversidad genética de PvCSP global. La selección natural también puede ser una fuerza importante que afecta la diversidad genética de la PvCSP global (Võ et al., 2020).

Bennett et al., (2016) desarrollaron la proteína quimérica recombinante de *P. vivax* 001 (VMP001) como candidata a una vacuna frente a malaria vivax. Esta proteína incorpora las regiones amino y carboxi terminales de la proteína circumsporozoito (CSP) y una región truncada repetida que contiene secuencias repetidas de las variantes de los parásitos Vk210 y Vk247. Se utilizó la proteína para vacunar a voluntarios humanos y se observaron niveles bajos de eficacia protectora, lo que motivó la exploración de estrategias alternativas (Bennett et al., 2016).

Atcheson and Reyes-Sandoval (2020) ponen de manifiesto por primera vez la eficacia protectora contra la variante alélica Vk210 de una vacuna basada únicamente en el tetrámero AGDR. Sus ensayos demuestran que un péptido artificial (AGDR)<sub>3</sub> que carece del dominio N-terminal, no presente de forma natural en la secuencia nativa de PvCSP Vk210 confiere niveles mucho más altos de eficacia protectora que la PvCSP de longitud completa. Según estos autores, en sus estudios los péptidos RI y RII no son protectores como vacunas. Estos hallazgos ayudarán a mejorar el desarrollo de las vacunas de CSP contra la malaria vivax (Atcheson & Reyes Sandoval, 2020).

Marques et al., 2020 han desarrollado una vacuna basada en las regiones de repetición de las tres variables alélicas (Vk210, Vk247 y *like P. vivax*). Esta vacuna podría ser una buena candidata frente a *Plasmodium vivax* a nivel mundial (Marques et al., 2020).



**Figura 5:** Región I, región II y región repetida central (Raissi et al., 2021).

## 2. OBJETIVOS.

Actualmente, los investigadores buscan proteínas que posean un gran poder inmunogénico para ser usadas en un futuro como vacunas. En este trabajo se trata de buscar una proteína con esta característica en muestras de pacientes enfermos de malaria del sur de México. Se marcaron una serie de objetivos:

1. Obtención del gen *csp* a partir del ADN de *Plasmodium vivax*.
2. Caracterización y análisis del gen *csp* tanto a nivel de secuencia de nucleótidos como de aminoácidos.
3. Identificación de las diferentes variantes del gen *csp* en muestras de pacientes con malaria vivax procedentes del sur de México.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS.

#### 3.1. MATERIAL.

##### 3.1.1. Muestras.

El material empleado en el experimento son muestras de sangre seca de 10 pacientes mexicanos diagnosticados de malaria entre los años 2006-2015. Dicho diagnóstico fue llevado a cabo en México. La fecha de llegada de las muestras al laboratorio fue el 12/12/18.

##### 3.1.2. Oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR.

Para las reacciones de PCR se utilizaron tanto oligonucleótidos cebadores que se encontraban descritos en bibliografía (Rubio et al., 1999), como otros que fueron diseñados en nuestro laboratorio. Los oligonucleótidos cebadores fueron sintetizados por la compañía *Integrated DNA Technologies*.

##### 3.1.3. Kits comerciales de biología molecular.

Los kits comerciales empleados fueron los siguientes:

- **Extracción de ADN de las muestras:** Kit- GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (ThermoFisher Scientific).
- **Técnica de PCR:** Kit Takara Advantage.
- **Secuenciación de ácidos nucleicos:** Kit Byg Dye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems).
- **Purificación de los productos de PCR:** Kit miPCR Purification kit 50 preps de Metabion.
- **Marcador de peso molecular:** 500 bp DNA ladder (Dye Plus).

#### 3.2. MÉTODOS.

##### 3.2.1. Extracción de ADN de las muestras de sangre seca.

Para la extracción de ADN total de las 10 muestras de sangre seca se empleó el **Kit-GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (ThermoFisher Scientific)**. Se utilizó 1cm<sup>2</sup> (aproximadamente) del filtro que contenía la muestra de sangre, el cual se añadió a un tubo de microcentrífuga junto a 200 µL de tampón 1xPBS y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadieron 20 µL de la solución de Proteinasa K y se mezcló en el vórtex durante 1 minuto. A esta mezcla se le adicionó 400 µL de solución de lisis y se agitó en el vórtex hasta obtener una suspensión homogénea (aproximadamente 1 minuto). Seguidamente, se siguió el protocolo indicado por el fabricante del Kit.

Finalmente, para la elución del ADN genómico se añadió a la membrana de la columna 50  $\mu$ L de tampón de elución, se incubó a temperatura ambiente 2 minutos y se centrifugó a 10 000 rpm durante 1 minuto. El ADN obtenido se almacenó a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.1.1. Cuantificación de la concentración de ADN genómico.

La cuantificación del ADN se realizó a través de técnicas espectrofotométricas, mediante 260 nm utilizando **Nanodrop Lite (Thermo ScienWfic™)**.

### 3.2.2. Diseño de cebadores.

#### - Búsqueda de la secuencia.

Para el diseño de los oligonucleótidos cebadores utilizados en la obtención del gen *csp*, en primer lugar, se realizó una búsqueda de las secuencias de este gen en diferentes cepas de *Plasmodium vivax* (CMB-1, Mauritania I, Brazil I, India VII, Salvador I, LZCH1720 y North Korean). Dicha búsqueda nos permitió identificar las regiones más conservadas tanto del gen *csp* como de las secuencias flanqueantes de éste, y diseñar oligonucleótidos cebadores a partir de ellas. Una de las bases de datos usada fue **NCBI (National Center for Biotechnology Information)**, la cual almacena y actualiza constantemente información sobre secuencias genómicas. Además, fue utilizada la base de datos **PlasmoDB**, base de datos basada en el género *Plasmodium*, que contiene amplia información sobre el genoma, proteoma y el metaboloma relacionados con los parásitos de la malaria.

#### - Alineamientos.

Una vez obtenidas las secuencias de las diferentes cepas de *Plasmodium vivax* fueron alineadas utilizando el programa **Clustal Omega**.

#### - Diseño de cebadores.

Los cebadores fueron diseñados utilizando herramientas bioinformáticas. Tras ser diseñados en el laboratorio, en el programa **Primer designing tool** se comprobaron las características que estos poseían. En este programa son analizadas las características de los oligonucleótidos específicos que serán usados para la amplificación de la secuencia de interés. Las características son: la temperatura de melting (temperatura a la que los cebadores hibridarán con la secuencia), la longitud de ambos cebadores (reverse y forward), contenidos de GC (el porcentaje debe ser similar en ambos cebadores) y la probabilidad que existe para que los cebadores se unan entre sí (*primer dimer*).

Para obtener las secuencias del gen *csp* se diseñaron en nuestro laboratorio los cebadores PvCSP-Fe, PvCSP-Re, PvCSP-Fi, PvCSP-Ri. Además de los anteriores, los cebadores CSPviv-R y CSPviv-F, descritos previamente (González-Cerón et al., 2013), también fueron utilizados en la obtención y secuenciación del gen *csp* (Tabla 1).

**Tabla 1:** Cebadores usados obtener y secuenciar el gen *csp*.

CEBADORES	SECUENCIAS
PvCSP- Fe	5'-CCTGCATAAGGCAAACCTCACAAACATCC- 3'
PvCSP- Re	5' -TGTGCGTAAGCGCATAATGTGTAAGAGG- 3'
PvCSP- Fi	5'-CCTACAAGTGTAACAGCCTTCCTGC- 3'
PvCSP- Ri	5' -ACACTTAATATGCACCGTGGAGGACG- 3'
CSPviv- F	5' -AGGCAGAGGACTTGGTGAGA- 3'
CSPviv- R	5' -CCACAGGTTACTACTGCATGG- 3'

Además de los oligonucleótidos cebadores diseñados por nosotros para la obtención del gen *csp*, se usaron otros descritos previamente (Rubio et al., 1999). Se trata de los oligonucleótidos específicos UNR, PLF y VIR (Tabla 2). Estos fueron utilizados para verificar la presencia de *Plasmodium vivax* en las muestras analizadas.

**Tabla 2:** Cebadores empleados en la PCR para confirmar la presencia de *Plasmodium vivax*.

CEBADORES	SECUENCIAS	ESPECIFICIDAD
Reverse (UNR)	5' GACGGTATCTGATCGTCTTC 3'	Universal
Forward (PLF)	5' AGTGTGTATCCAATCGAGTTTC 3'	<i>Plasmodium</i>
Reverse (VIR)	5'AGGACTTCCAAGCCGA AGC 3'	<i>Plasmodium vivax</i>

Los cebadores se encontraban liofilizados, por lo cual se realizó una **reconstitución** de los mismos añadiendo agua, formándose de este modo una solución stock 100 µM. Finalmente, los cebadores fueron diluidos a una concentración de trabajo 2 µM.

### 3.2.3. Técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

Para la realización de la amplificación de las muestras de ADN se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las diferentes reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador **PCR Techne 3Prime** con el **Kit Takara Advantage**. La reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen de 25 µL con: 2 µL del ADN, 0,25 µL de la polimerasa 1,25 U/µL, 5 µL del buffer 5X, 0,5 µL de dNTPs (la concentración de cada nucleótido es de 400 µM), 3,8 µL de cada uno de los cebadores 2µM y se añadió agua hasta



completar los 25  $\mu\text{L}$ . Este proceso es realizado con las 10 muestras. Algunas reacciones fueron reamplificadas usando los productos de PCR que previamente habían sido amplificados. La reamplificación se realiza con las mismas cantidades indicadas anteriormente, excepto la cantidad de ADN. Se usó 1  $\mu\text{L}$  de ADN procedente de la primera amplificación, diluido 1:10.

### 3.2.3.1. Programas de PCR utilizados.

Los programas de PCR usados fueron cuatro. En cada uno de los programas siempre se realizaba una **primera etapa** de desnaturalización, una **segunda etapa** con 35/40 ciclos: formada por 3 etapas (desnaturalización, hibridación y extensión); y una última etapa en la que se producía la extensión final.

Para confirmar la presencia del género *Plasmodium* en las muestras biológicas se realizó una PCR con los cebadores previamente descritos (Tabla 3) (Rubio et al., 1999).

**Tabla 3:** Primer programa de PCR usado.

PASO	CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (SEGUNDOS)
Desnaturalización inicial	1	94	300
Desnaturalización	40	94	45
Hibridación		61	45
Extensión		72	60
Extensión final	1	72	600

Para confirmar la presencia de *Plasmodium vivax* en las muestras se realizó una reamplificación con los productos de PCR anteriores (Tabla 4) (Rubio et al., 1999).

**Tabla 4:** Segundo programa de PCR usado.

PASO	CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (SEGUNDOS)
Desnaturalización inicial	1	94	300
Desnaturalización	40	94	30
Hibridación		60	30
Extensión		72	30
Extensión final	1	72	600

Para la obtención del gen *csp* se llevaron a cabo dos reacciones de PCR con oligonucleótidos cebadores específicos. En la primera de ellas se utilizaron los cebadores PvCSP-Fe y PvCSP-Re y se desarrolló el programa de la Tabla 5. A continuación, los productos de esta PCR fueron reamplificados con los cebadores PvCSP-Fi y PvCSP-Ri, utilizando el programa de la Tabla 6.

**Tabla 5:** Tercer programa de PCR usado.

PASO	CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (SEGUNDOS)
Desnaturalización inicial	1	98	120
Desnaturalización	35	98	10
Hibridación		55	15
Extensión		68	70
Extensión final	1	68	300

**Tabla 6:** Cuarto programa de PCR usado.

PASO	CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (SEGUNDOS)
Desnaturalización inicial	1	98	120
Desnaturalización	35	98	10
Hibridación		62	15
Extensión		68	70
Extensión final	1	68	300

#### 3.2.4. Técnicas electroforéticas.

Para separar el ADN amplificado, después de cada PCR, se llevaron a cabo electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X. En cada pocillo del gel, se adicionó una mezcla de 5  $\mu$ L de la muestra, 5  $\mu$ L del buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) y 2  $\mu$ L de tampón de carga 6X. En cada gel, además de las muestras a analizar, se añadió en el primer y último pocillo 5  $\mu$ L del marcador de masa molecular **500 bp DNA Ladder (Dye Plus)** a una concentración de 100 ng/ $\mu$ L. A continuación, el gel corrió a 100 voltios durante 20/30 minutos. Finalmente, el gel fue teñido con bromuro de etidio durante 15 minutos y seguidamente, fue observado en el equipo **G:Box Syngene**, que consta de un transiluminador y un dispositivo de captación y procesado de imágenes.

### 3.2.5. Purificación e identificación de los productos de PCR.

Para la purificación de los productos de PCR utilizamos el **kit miPCR Purification kit 50 preps de Metabion**, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Finalmente, se eluyó el ADN purificado en 25 µL de agua debido a que se iba a secuenciar.

### 3.2.6. Secuenciación de ácidos nucleicos.

Los productos de la PCR, purificados y eluidos en agua fueron secuenciados mediante el método Sanger, en presencia de ADN polimerasa, los cuatro deoxinucleótidos y cuatro dideoxinucleótidos. En cada reacción se usaron entre 40-50 ng de productos de PCR y el **kit comercial** usado fue **Byg Dye<sup>®</sup> Terminator v3.1 (Applied Biosystems)**.

### 3.2.7. Ensamblaje de las secuencias obtenidas.

Después de la obtención de los resultados de la secuenciación se ensamblaron las secuencias. Dicho ensamblaje fue llevado a cabo a partir de tres secuencias parciales del gen para cada una de las muestras. Los tamaños de estas secuencias parciales fueron de entre 240 y 710 pares de bases (pb). Para el análisis de las secuencias de aminoácidos, se utilizó el software **Expasy** (Expert Protein Analysis System) que tradujo las secuencias ensambladas del gen *csp* para cada muestra.

### 3.2.8. Análisis cladístico de las secuencias.

El alineamiento de las secuencias de nucleótidos se realizó con el programa **Clustal Omega** (Multiple Sequence Alignment). Además de las secuencias obtenidas por nuestro grupo de investigación, fueron utilizadas otras secuencias del gen *csp* de *P. vivax*. Estas fueron recuperadas de la base de datos de **NCBI** (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud utilizando el método bootstrap y 1000 repeticiones en **MEGA v6** (Tamura et al., 2013). Se empleó el **modelo GTR+G** para la realización del árbol filogenético.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

##### 4.1. Identificación de *Plasmodium vivax*.

En primer lugar, se realizó una extracción de ADN total de las 10 muestras procedentes de pacientes del sur de México. En todas las muestras se obtuvo ADN suficiente para continuar con nuestros ensayos, obteniéndose concentraciones en un rango entre 0,1-1,9 ng/ $\mu$ L (Tabla 7).

**Tabla 7:** Concentración de ADN total en cada muestra.

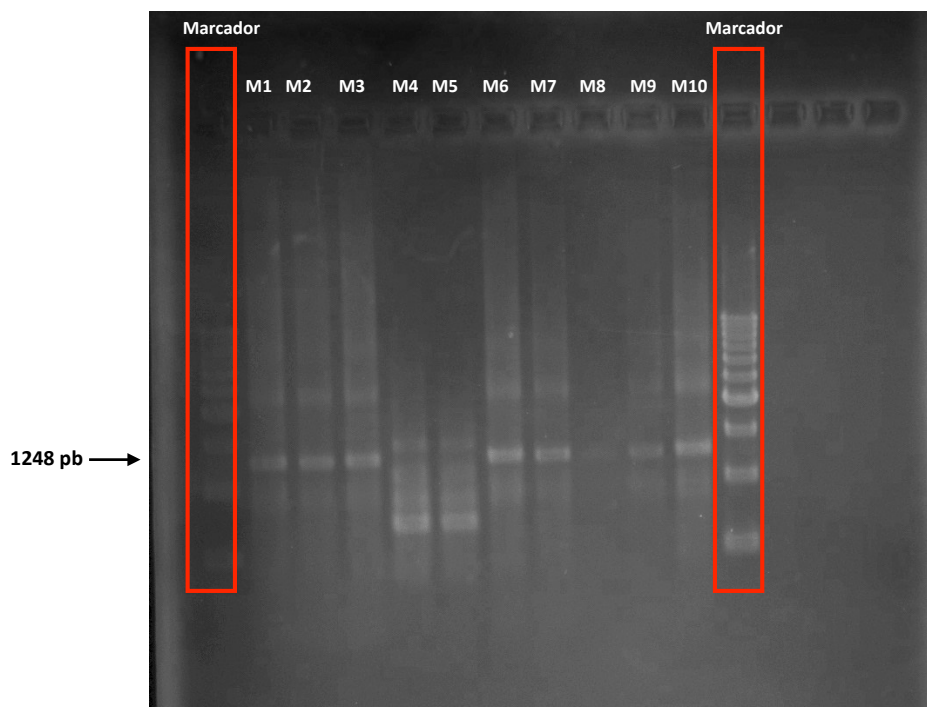
MUESTRAS	CONCENTRACIÓN DE ADN TOTAL (ng/ $\mu$ L)
MUESTRA 1	0,6
MUESTRA 2	0,2
MUESTRA 3	1,3
MUESTRA 4	0,4
MUESTRA 5	1,9
MUESTRA 6	1,7
MUESTRA 7	0,9
MUESTRA 8	0,6
MUESTRA 9	0,2
MUESTRA 10	0,1

Para comenzar, se realizó una primera PCR para confirmar la presencia de *Plasmodium* en las muestras usando los cebadores descritos en bibliografía (UNR y PLF) (Tabla 1) (Rubio et al., 1999).

A continuación, se realizó una segunda PCR con los productos de la amplificación anteriores (reamplificación). La finalidad de este paso era detectar la presencia de *Plasmodium vivax*. Para ello se utilizaron los cebadores VIR y PLF, descritos en bibliografía previa (Tabla 2) (Rubio et al., 1999). En todos los casos se obtuvo una banda del tamaño esperado, 499 pares de bases (pb). Además, esta banda fue purificada y secuenciada, para confirmar que ese fragmento correspondía a una secuencia parcial del gen que codifica el RNA ribosómico de *P. vivax*.

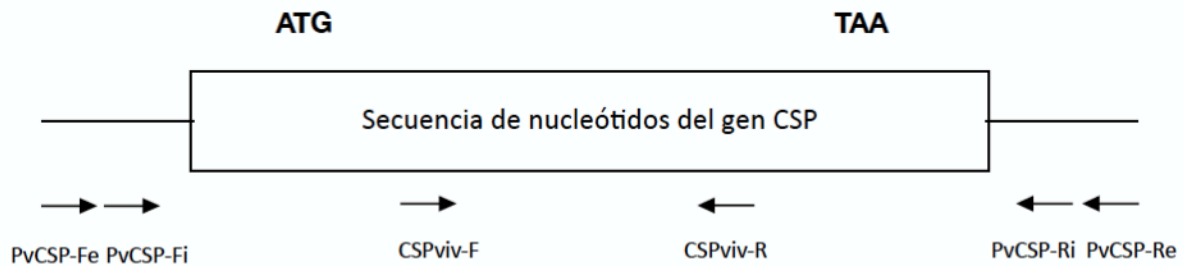
#### 4.2. Obtención del gen *csp*.

Tras confirmar la presencia de *Plasmodium vivax* en las 10 muestras se realizó una PCR usando el ADN extraído inicialmente. El objetivo en esta parte era extraer y secuenciar el gen *csp*. Para ello se realizó una PCR con cebadores más externos diseñados en nuestro laboratorio, PvCSP-Fe y PvCSP-Re (Tabla 1) (Figura 7). En esta primera reacción de amplificación no se obtuvieron bandas muy claras de ninguna de las muestras, por ello se llevó a cabo una reamplificación con cebadores internos, PvCSP-Fi y PvCSP-Ri (Tabla 1) (Figura 7). En esta reamplificación se aumentó la temperatura de hibridación a 62 °C, obteniéndose en este caso fragmentos de 1248 pb (Figura 6). Esta temperatura de hibridación fue elegida tras realizar múltiples ensayos con diversas temperatura.



**Figura 6:** Reamplificación del gen *csp*. Los marcadores de peso molecular se encuentran en los pocillos 1 y 12 recuadrados en rojo y las 10 muestras de los pacientes se encuentran situadas del pocillo 2 al 11.

A continuación, las 8 bandas obtenidas como productos de la reamplificación en las diferentes muestras fueron purificadas y seguidamente, secuenciadas con los cebadores PvCSP-Fi, PvCSP-Ri, CSPviv-R y CSPviv-F (Tabla 1) (Figura 7). Para cada una de las 8 muestras se obtuvieron diferentes secuencias parciales de tamaños comprendidos entre 240 y 710 pares de bases, que permitieron reconstruir la secuencia del gen completo en todos los casos.



**Figura 7:** Disposición de los cebadores diseñados en la secuencia del gen *csp*.

#### 4.3. Análisis de secuencias de ADN.

Una vez llevado a cabo el ensamblaje de las secuencias parciales y obtenido el gen completo, se llevó a cabo un análisis de esta secuencia. Para ello, a cada una de las muestras se le realizó un **BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)**. En todos los análisis se confirmó que lo que habíamos obtenido era la secuencia del gen que da lugar a la proteína CSP de *Plasmodium vivax*. Además, se comprobó a qué variante alélica del gen *csp* (Vk247 o Vk210) pertenecía cada muestra. Como resultado se observó que las secuencias 1, 2, 6 y 10 pertenecían a la variante alélica Vk247 y las secuencias 3, 7, 8, y 9 pertenecían a la variante Vk210.

A partir de las secuencias de nucleótidos se obtuvieron las secuencias de aminoácidos. En las secuencias de aminoácidos se podía observar, como había sido previamente descrito en diferentes cepas, una región N- terminal conservada no repetida (RI), una región repetida central (CRR) y una región C- terminal no repetida (RII). La región repetida central presentaba repeticiones diferentes dependiendo de la variante a la que perteneciese la muestra.

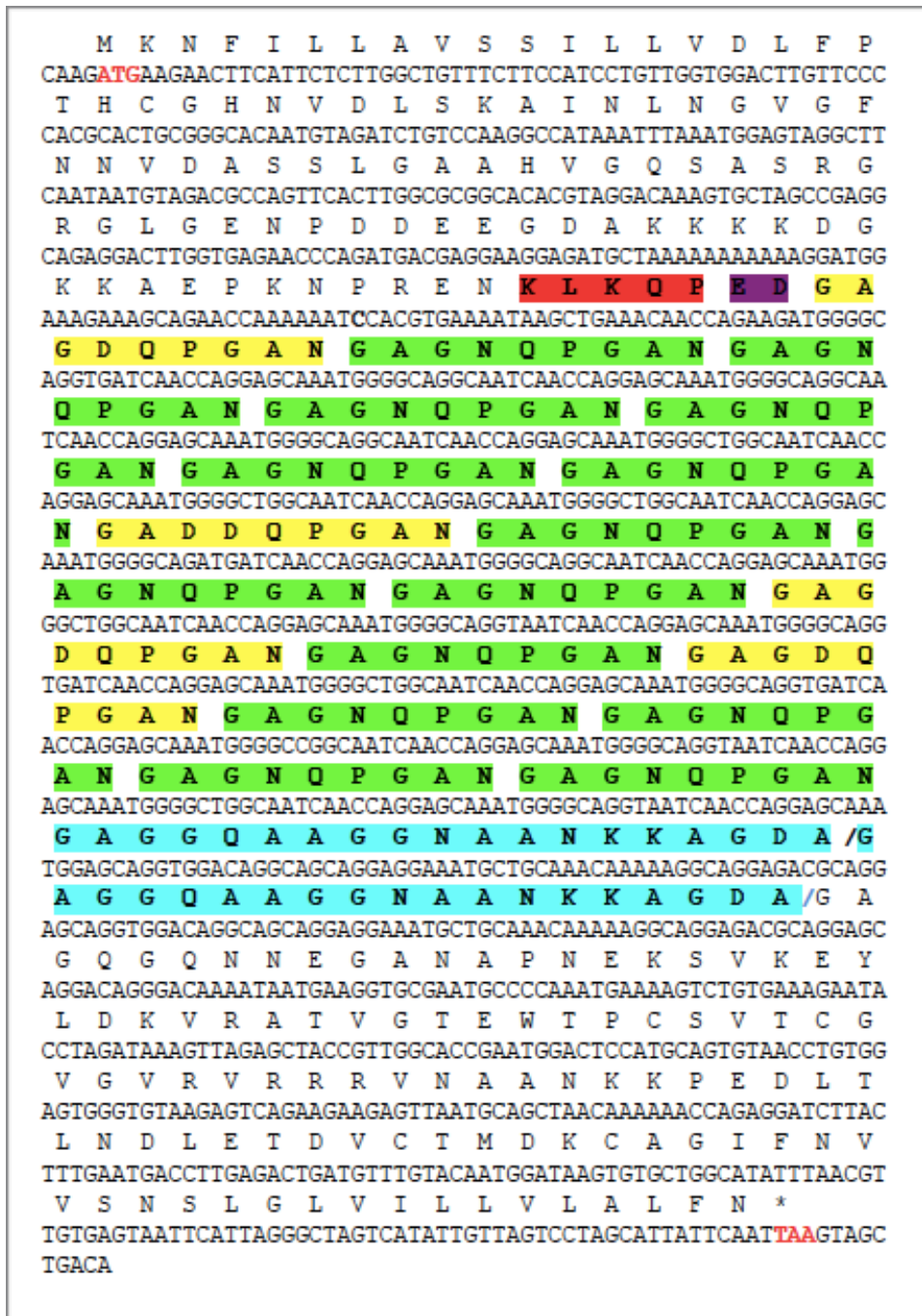
El alineamiento de las secuencias se realizó tanto con los nucleótidos, como con los aminoácidos. En las secuencias de nucleótidos se observaron más cambios que en las secuencias de aminoácidos, esto es debido a la degeneración del código genético.

#### 4.4. Análisis de las diferentes variantes.

En primer lugar, se realizó un alineamiento entre las secuencias pertenecientes a la variante Vk210 en el que se pudo comprobar tanto en el alineamiento de nucleótidos, como en el de aminoácidos que no había ningún cambio. En el caso de los alineamientos de la variante Vk247, se observaron 8 polimorfismos en la secuencia de nucleótidos y 4 cambios en la secuencia de aminoácidos.

##### 4.4.1. Variante Vk247.

Las muestras de la variante Vk247 contenían una región repetida central formada por 18 repeticiones con secuencias nonaméricas GAG(D/N)QPGAN y 2 repeticiones finales idénticas (Figura 9). En todas las muestras pertenecientes a esta variante Vk247 el gen *csp* sigue un mismo patrón (Figura 8). En la proteína codificada en el gen *csp* se observó una región N- terminal conservada no repetida, además, todas las muestras presentaron en esta zona una **región KLKQP** (secuencia de aminoácidos: leucina, lisina, leucina, glutamina y prolina) y una **región ED** (Ácido glutámico y ácido aspártico). La **región KLKQP**, se encontraba presente no sólo en nuestras muestras, sino en todas las muestras clínicas analizadas hasta el momento. Además esta secuencia fue encontrada siempre en la misma posición, justo antes de la región repetida central. Además de la región KLKQP, encontramos una **región ED** que estaba presente en todas las muestras de esta variante, pero no en las secuencias de la variante Vk210. Esta región ED ya ha sido descrita previamente en algunas muestras (artículo aún no publicado). Finalmente, se observó una región C- terminal conservada no repetida (Figura 8).



**Figura 8:** Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las muestras pertenecientes a la variante Vk247. El triplete ATG inicial marcado en rojo representa al codón de inicio; la secuencia de nucleótidos subrayada en rojo es la región conservada KLKQP (presente en todas las muestras analizadas hasta el momento); la secuencia subrayada en morado indica la secuencia ED presente solo en muestras de la variante Vk247; las secuencias subrayadas en amarillo indican el nonúmero GAGDQPGAN; la secuencias subrayadas en verde indican el nonúmero GAGNQPAN; las secuencias subrayadas en azul son las secuencias GAGGQAAGGNAANKKAGDA, presente solo en las muestras de la variante Vk247, y finalmente el asterisco indica el codón de STOP (TAA).

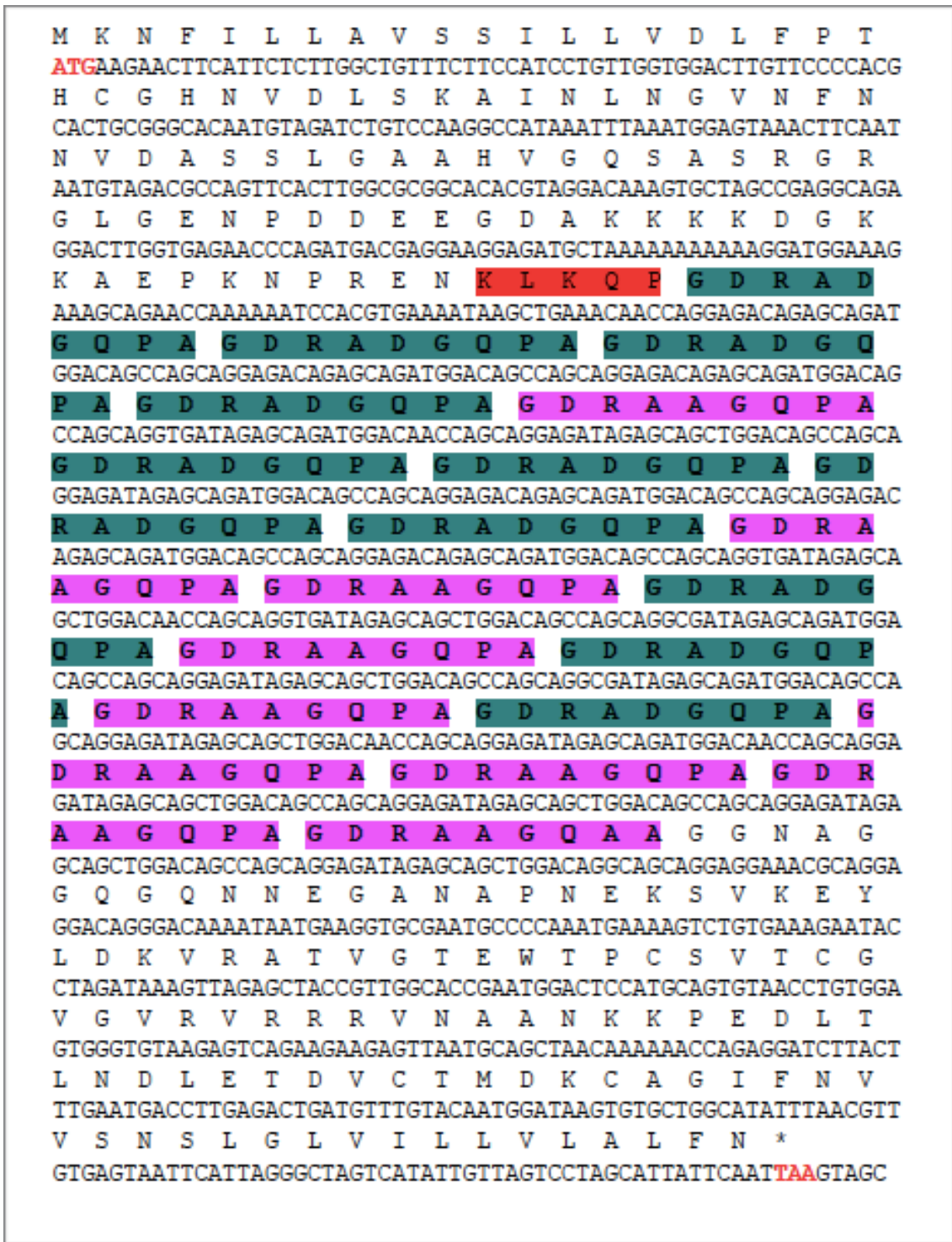


R1:	G	A	G	D	Q	P	G	A	N										
R2:	G	A	G	N	Q	P	G	A	N										
R3:	G	A	G	N	Q	P	G	A	N										
R4:	G	A	G	N	Q	P	G	A	N										
R5:	G	A	G	N	Q	P	G	A	N										
R6:	G	A	G	N	Q	P	G	A	N										
R7:	G	A	G	N	Q	P	G	A	N										
R8:	G	A	D	D	Q	P	G	A	N										
R9:	G	A	G	N	Q	P	G	A	N										
R10:	G	A	G	N	Q	P	G	A	N										
R11:	G	A	G	N	Q	P	G	A	N										
R12:	G	A	G	D	Q	P	G	A	N										
R13:	G	A	G	N	Q	P	G	A	N										
R14:	G	A	G	D	Q	P	G	A	N										
R15:	G	A	G	N	Q	P	G	A	N										
R16:	G	A	G	N	Q	P	G	A	N										
R17:	G	A	G	N	Q	P	G	A	N										
R18:	G	A	G	N	Q	P	G	A	N										
Cons:	G	A	G	D/N	Q	P	G	A	N										
R19:	G	G	Q	A	A	G	G	N	A	A	N	K	K	A	G	D	A	G	A
R20:	G	G	Q	A	A	G	G	N	A	A	N	K	K	A	G	D	A	G	A

**Figura 9:** Región repetida central de las muestras pertenecientes a la variante Vk247 y secuencia consenso.

#### 4.4.2. Variante Vk210.

Las muestras pertenecientes a la variante Vk210 contenían una región repetida central formada por 20 repeticiones con secuencias nonaméricas GDRA(A/D)GQPA (Figura 11). Esta variante también sigue un mismo patrón en todas las muestras analizadas aunque se han encontrado ciertos cambios tanto en la secuencia de nucleótidos, como en la de aminoácidos. En la proteína codificada en el gen *csp* se observó una región N- terminal conservada no repetida, además, todas las muestras presentaron en esta zona una **región KLKQP**. Las muestras de esta variante a diferencia de las de la variante anterior no presentaban la región ED. Por último, se encontró en la secuencia un extremo C-terminal no repetido y conservado (Figura 10).



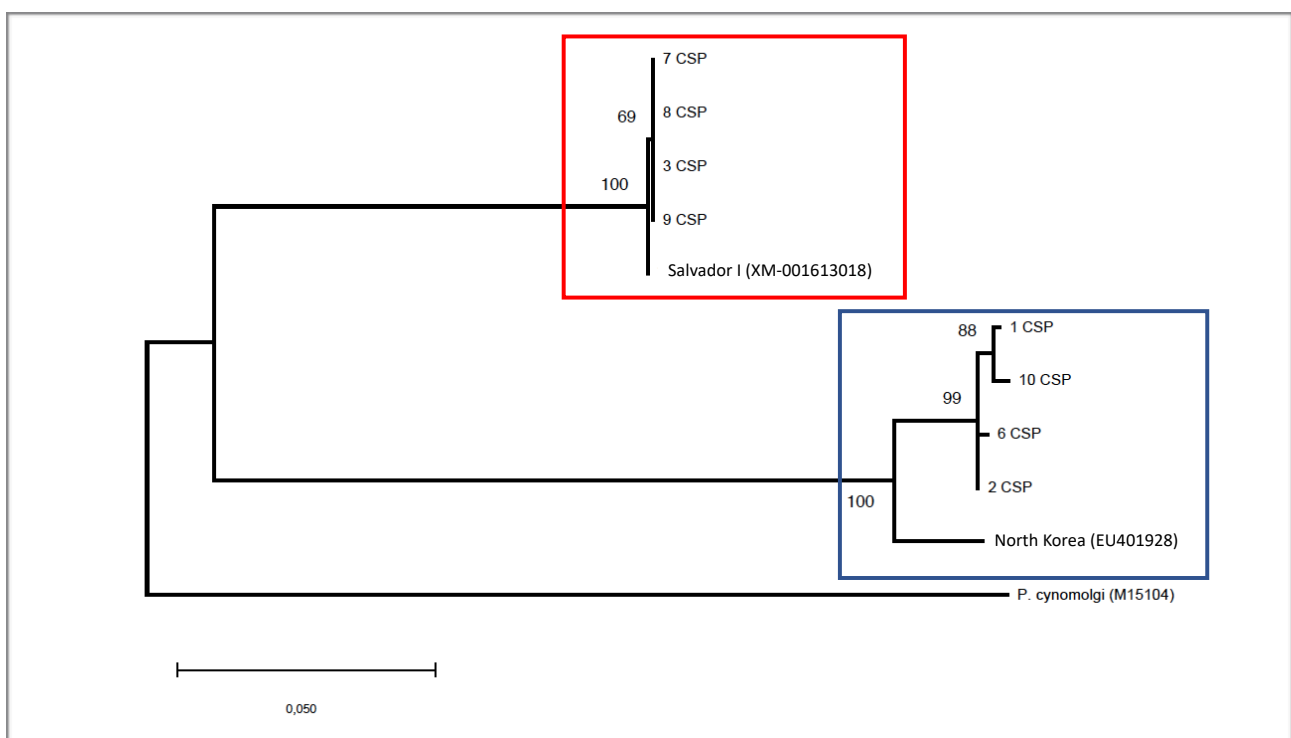
**Figura 10:** Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las muestras pertenecientes a la variante Vk210. El triplete ATG inicial marcado en rojo representa al codón de inicio; la secuencia de nucleótidos subrayada en rojo es la región conservada KLKQP (presente en todas las muestras analizadas hasta el momento); las secuencias subrayadas en verde oscuro indican el nonúmero GDRADGQPA; la secuencias subrayadas en rosa indican el nonúmero GDRAAGQPA y finalmente el asterisco indica el codón de STOP (TAA).

R1:	G	D	R	A	D	G	Q	P	A
R2:	G	D	R	A	D	G	Q	P	A
R3:	G	D	R	A	D	G	Q	P	A
R4:	G	D	R	A	D	G	Q	P	A
R5:	G	D	R	A	A	G	Q	P	A
R6:	G	D	R	A	D	G	Q	P	A
R7:	G	D	R	A	D	G	Q	P	A
R8:	G	D	R	A	D	G	Q	P	A
R9:	G	D	R	A	D	G	Q	P	A
R10:	G	D	R	A	A	G	Q	P	A
R11:	G	D	R	A	A	G	Q	P	A
R12:	G	D	R	A	D	G	Q	P	A
R13:	G	D	R	A	A	G	Q	P	A
R14:	G	D	R	A	D	G	Q	P	A
R15:	G	D	R	A	A	G	Q	P	A
R16:	G	D	R	A	D	G	Q	P	A
R17:	G	D	R	A	A	G	Q	P	A
R18:	G	D	R	A	A	G	Q	P	A
R19:	G	D	R	A	A	G	Q	P	A
R20:	G	D	R	A	A	G	Q	A	A
Con:	G	D	R	A	A/D	G	Q	P	A

**Figura 11:** Región repetida central de las muestras pertenecientes a la variante Vk210 y secuencia consenso.

#### 4.5. Análisis filogenético.

Para visualizar el agrupamiento de las diferentes variantes existentes atendiendo a las secuencias del gen *csp* en *P. vivax*, se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud (Maximal Likelihood, ML) mediante el método de Bootstrap (Figura 12). Además de las 8 secuencias de las muestras analizadas, se incluyeron las secuencias de nucleótidos del gen *csp* de la cepa Salvador I (XM-001613018) y North Korea (EU401928), como secuencias tipos de las variantes Vk210 y Vk247, respectivamente. El árbol filogenético obtenido muestra dos grupos principales, presentados en dos clados con un soporte estadístico del 100 %. Como cabía esperar, en uno de los clados aparece la cepa Salvador I junto a las muestras 3, 7, 8 y 9, mientras que en el otro aparece la cepa North Korea junto a las muestras 1, 2, 6 y 10.



**Figura 12:** Árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento de secuencias de nucleótidos obtenidas del ensamblaje del gen *csp*. Para la obtención de este árbol se usó el modelo **GTR** (general time reversible model) + **G**. Como **outgroup** se usó el gen *csp* de *Plasmodium cynomolgi*. La secuencia tipo Vk210 de la cepa Salvador I (XM-001613018) y tipo Vk247 de la cepa North Korea (EU401928) se incluyen en el árbol para tenerlas como referencia en cada variante.

## 5. CONCLUSIONES.

1. Se han diseñado unos cebadores que han permitido llevar a cabo la secuenciación del gen *csp* en 8 muestras analizadas.
2. Se ha secuenciado el gen *csp* y se han identificado las dos variantes alélicas: Vk210 (muestras 3, 7, 8 y 9), Vk247 (muestras 1, 2, 6 y 10).
3. En la “región repetida central” de la variante Vk247 se han identificado 8 polimorfismos en la secuencia de nucleótidos y 4 cambios en la secuencia de aminoácidos.
4. En la “región repetida central” de la variante Vk210 no se han observado cambios.
5. En la región constante del gen, justo antes de la región repetida central existe una región KLKQP (secuencia de aminoácidos: leucina, lisina, leucina, glutamina y prolina) y una región ED (ácido glutámico y ácido aspártico), esta última sólo está presente en las muestras de la variante Vk247, pero no en las muestras de la variante Vk210.
6. Para visualizar el agrupamiento de las diferentes variantes existentes atendiendo a las secuencias del gen *csp* en *P. vivax*, se construyó un árbol filogenético que muestra dos grupos principales, presentados en dos clados: en uno de los clados aparece la cepa Salvador I junto a las muestras 3, 7, 8 y 9, y en el otro clado aparece la cepa North Korea junto a las muestras 1, 2, 6 y 10.

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

- Alonso, P. L. (2006). Malaria: Deploying a candidate vaccine (RTS,S/AS02A) for an old scourge of humankind. *International Microbiology*, 9(2), 83–93. <https://doi.org/10.2436/im.v9i2.9556>
- Alven, S., & Aderibigbe, B. (2019). Combination therapy strategies for the treatment of malaria. *Molecules*, 24(19). <https://doi.org/10.3390/molecules24193601>
- Arévalo-Herrera, M., & Herrera, S. (2001). Plasmodium vivax malaria vaccine development. *Molecular Immunology*, 38(6), 443–455. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00080-3](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00080-3)
- Arrow, K. J., Panosian, C., & Gelband, H. (2004). Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in an Age of Resistance. In *Institute of Medicine (US) Committee on the Economics of Antimalarial Drugs*. <http://www.nap.edu/catalog/11017.html>
- Ashley, E. A., Pyae Phyo, A., & Woodrow, C. J. (2018). Malaria. *The Lancet*, 391(10130), 1608–1621. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30324-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30324-6)
- Atcheson, E., & Reyes-Sandoval, A. (2020). Protective efficacy of peptides from Plasmodium vivax circumsporozoite protein. *Vaccine*, 38(27), 4346–4354. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.03.063>
- Ballou, W. R., Rothbard, J., Wirtz, R. A., Gordon, D. M., Williams, J. S., Gore, R. W., Schneider, I., Hollingdale, M. R., Beaudoin, R. L., Maloy, W. L., Miller, L. H., & Hockmeyer, W. T. (1985). Immunogenicity of synthetic peptides from circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum. *Science*, 228(4702), 996–999. <https://doi.org/10.1126/science.2988126>
- Bannister, L. H., & Sherman, I. W. (2009). Plasmodium. *Encyclopedia of Life Sciences*, December. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001970.pub2>
- Barillas-Mury, C., & Kumar, S. (2005). Plasmodium-mosquito interactions: A tale of dangerous liaisons. *Cellular Microbiology*, 7(11), 1539–1545. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00615.x>
- Bartoloni, A., & Zammarchi, L. (2012). Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4(1). <https://doi.org/10.4084/MJHID.2012.026>
- Bennett, J. W., Yadava, A., Tosh, D., Sattabongkot, J., Komisar, J., Ware, L. A., McCarthy, W. F., Cowden, J. J., Regules, J., Spring, M. D., Paolino, K., Hartzell, J. D., Cummings, J. F.,

- Richie, T. L., Lumsden, J., Kamau, E., Murphy, J., Lee, C., Parekh, F., ... Ockenhouse, C. F. (2016). Phase 1/2a Trial of Plasmodium vivax Malaria Vaccine Candidate VMP001/AS01B in Malaria-Naive Adults: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004423>
- Birbeck, G. L. (2018). The forgotten. *Neurology*, 91(17), 800–803. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006386>
- Caminade, C., Kovats, S., Rocklov, J., Tompkins, A. M., Morse, A. P., Colón-González, F. J., Stenlund, H., Martens, P., & Lloyd, S. J. (2014). Impact of climate change on global malaria distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(9), 3286–3291. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302089111>
- Carlton, J. M., Sina, B. J., & Adams, J. H. (2011). Why is plasmodium vivax a neglected tropical disease? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(6), 3–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001160>
- Charoenvit, Y., Collins, W. E., Jones, T. R., Millet, P., Yuan, L., Campbell, G. H., Beaudoin, R. L., Broderson, J. R., & Hoffman, S. L. (1991). Inability of malaria vaccine to induce antibodies to a protective epitope within its sequence. *Science*, 251(4994), 668–671. <https://doi.org/10.1126/science.1704150>
- Chen, E., Salinas, N. D., Ntumngia, F. B., Adams, J. H., & Tolia, N. H. (2015). Structural Analysis of the Synthetic Duffy Binding Protein (DBP) Antigen DEKnull Relevant for Plasmodium vivax Malaria Vaccine Design. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003644>
- Chen, L., Lopaticki, S., Riglar, D. T., Dekiwadia, C., Uboldi, A. D., Tham, W. H., O'Neill, M. T., Richard, D., Baum, J., Ralph, S. A., & Cowman, A. F. (2011). An egf-like protein forms a complex with pfrh5 and is required for invasion of human erythrocytes by plasmodium falciparum. *PLoS Pathogens*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002199>
- Cirimotich, C. M., Dong, Y., Garver, L. S., Sim, S., & Dimopoulos, G. (2010). Mosquito immune defenses against Plasmodium infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 34(4), 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.12.005>
- Collins, K. A., Snaith, R., Cottingham, M. G., Gilbert, S. C., & Hill, A. V. S. (2017). Enhancing protective immunity to malaria with a highly immunogenic virus-like particle vaccine. *Scientific Reports*, 7(March), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep46621>
- Coppi, A., Natarajan, R., Pradel, G., Bennett, B. L., James, E. R., Roggero, M. A., Corradin, G., Persson, C., Tewari, R., & Sinnis, P. (2011). The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito

- to mammalian host. *Journal of Experimental Medicine*, 208(2), 341–356. <https://doi.org/10.1084/jem.20101488>
- Cox-Singh, J., & Singh, B. (2008). Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends in Parasitology*, 24(9), 406–410. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.06.001>
- Crosnier, C., Bustamante, L. Y., Bartholdson, S. J., Bei, A. K., Theron, M., Uchikawa, M., Mboup, S., Ndir, O., Kwiatkowski, D. P., Duraisingh, M. T., Rayner, J. C., & Wright, G. J. (2011). Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 480(7378), 534–537. <https://doi.org/10.1038/nature10606>
- De Camargo, T. M., De Freitas, E. O., Gimenez, A. M., Lima, L. C., De Almeida Caramico, K., Françoso, K. S., Bruna-Romero, O., Andolina, C., Nosten, F., Rénia, L., Ertl, H. C. J., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., Rodrigues, M. M., Reyes-Sandoval, A., & Soares, I. S. (2018). Prime-boost vaccination with recombinant protein and adenovirus-vector expressing *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein (CSP) partially protects mice against Pb/Pv sporozoite challenge. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19063-6>
- Dinglasan, R. R., & Jacobs-Lorena, M. (2008). Flipping the paradigm on malaria transmission-blocking vaccines. *Trends in Parasitology*, 24(8), 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.05.002>
- Douglas, A. D., Baldeviano, G. C., Lucas, C. M., Lugo-Roman, L. A., Crosnier, C., Bartholdson, S. J., Diouf, A., Miura, K., Lambert, L. E., Ventocilla, J. A., Leiva, K. P., Milne, K. H., Illingworth, J. J., Spencer, A. J., Hjerrild, K. A., Alanine, D. G. W., Turner, A. V., Moorhead, J. T., Edgel, K. A., ... Draper, S. J. (2015). A PfRH5-based vaccine is efficacious against heterologous strain blood-stage *plasmodium falciparum* infection in *Aotus* monkeys. *Cell Host and Microbe*, 17(1), 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.017>
- Douglas, A. D., Williams, A. R., Illingworth, J. J., Kamuyu, G., Biswas, S., Goodman, A. L., Wyllie, D. H., Crosnier, C., Miura, K., Wright, G. J., Long, C. A., Osier, F. H., Marsh, K., Turner, A. V., Hill, A. V. S., & Draper, S. J. (2011). The blood-stage malaria antigen PfRH5 is susceptible to vaccine-inducible cross-strain neutralizing antibody. *Nature Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms1615>
- Dow, G. S., Magill, A. J., & Ohrt, C. (2008). Clinical development of new prophylactic antimalarial drugs after the 5th Amendment to the Declaration of Helsinki. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 4(4), 803–819. <https://doi.org/10.2147/tcrm.s1025>



- Duffy, P. E., & Patrick Gorres, J. (2020). Malaria vaccines since 2000: progress, priorities, products. *Npj Vaccines*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0196-3>
- Ejigiri, I., & Sinnis, P. (2009). Plasmodium sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Current Opinion in Microbiology*, 12(4), 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.06.006>
- Fairhurst, R. M., Nayyar, G. M. L., Breman, J. G., Hallett, R., Vennerstrom, J. L., Duong, S., Ringwald, P., Wellems, T. E., Plowe, C. V., & Dondorp, A. M. (2012). Artemisinin-resistant malaria: Research challenges, opportunities, and public health implications. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(2), 231–241. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0025>
- Garnham, P. C. C. (1966). *Malaria Parasites and other Haemosporidia*. Blackwell Scientific Publications Ltd.
- Garrido-Cardenas, J. A., Cebrián-Carmona, J., González-Cerón, L., Manzano-Agugliaro, F., & Mesa-Valle, C. (2019). Analysis of global research on malaria and Plasmodium vivax. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph16111928>
- Garrido-Cardenas, J. A., González-Cerón, L., Manzano-Agugliaro, F., & Mesa-Valle, C. (2019). Plasmodium genomics: an approach for learning about and ending human malaria. *Parasitology Research*, 118(1). <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6127-9>
- Gilson, P. R., & Crabb, B. S. (2009). Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by Plasmodium falciparum merozoites. *International Journal for Parasitology*, 39(1), 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.09.007>
- Gimenez, A. M., Lima, L. C., Françoso, K. S., Denapoli, P. M. A., Panatieri, R., Bargieri, D. Y., Thiberge, J. M., Andolina, C., Nosten, F., Renia, L., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., Amino, R., Rodrigues, M. M., & Soares, I. S. (2017). Vaccine containing the three allelic variants of the Plasmodium vivax circumsporozoite antigen induces protection in mice after challenge with a transgenic rodent malaria parasite. *Frontiers in Immunology*, 8(OCT). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01275>
- Golassa, L., Amenga-Etego, L., Lo, E., & Amambua-Ngwa, A. (2020). The biology of unconventional invasion of Duffy-negative reticulocytes by Plasmodium vivax and its implication in malaria epidemiology and public health. *Malaria Journal*, 19(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03372-9>
- González-Cerón, L., Martínez-Barnette, J., Montero-Solís, C., Santillán, F., Soto, A. M., Rodríguez, M. H., Espinosa, B. J., & Chávez, O. A. (2013). Molecular epidemiology of

- Plasmodium vivax in Latin America: Polymorphism and evolutionary relationships of the circumsporozoite gene. *Malaria Journal*, 12(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-243>
- González, J. M., Hurtado, S., Arévalo-Herrera, M., & Herrera, S. (2001). Variants of the Plasmodium vivax circumsporozoite protein (VK210 and VK247) in Colombian isolates. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(5), 709–712. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000500023>
- Hall N, Karras M, Raine JD, Carlton JM, Kooij TWA, Berriman M, et al. (2005) A comprehensive survey of the Plasmodium life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science* (80-) 307(5706):82–6
- Herrera, S., Corradin, G., & Arévalo-Herrera, M. (2007). An update on the search for a Plasmodium vivax vaccine. *Trends in Parasitology*, 23(3), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.01.008>
- Herrington, D. A., Clyde, D. F., Losonsky, G., Cortesia, M., Murphy, J. R., Davis, J., Baqar, S., Felix, A. M., Heimer, E. P., Gillessen, D., Nardin, E., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., Hollingdale, M. R., & Levine, M. M. (1988). Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against plasmodium falciparum sporozoites. *Nature*, 328(6127), 257–259. <https://doi.org/10.1038/328257a0>
- Hoffman, S. L., Goh, L. M. L., Luke, T. C., Schneider, I., Le, T. P., Doolan, D. L., Sacchi, J., De la Vega, P., Dowler, M., Paul, C., Gordon, D. M., Stoute, J. A., Preston Church, L. W., Sedegah, M., Gray Heppner, D., Ripley Ballou, W., & Richie, T. L. (2002). Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated Plasmodium falciparum sporozoites. *Journal of Infectious Diseases*, 185(8), 1155–1164. <https://doi.org/10.1086/339409>
- Howes, R. E., Battle, K. E., Mendis, K. N., Smith, D. L., Cibulskis, R. E., Baird, J. K., & Hay, S. I. (2016). Global epidemiology of Plasmodium vivax. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(Suppl 6), 15–34. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0141>
- Johnston, S. P., Pieniazek, N. J., Xayavong, M. V., Slemenda, S. B., Wilkins, P. P., & Da Silva, A. J. (2006). PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 1087–1089. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.1087-1089.2006>
- Kano, F. S., de Souza, A. M., de Menezes Torres, L., Costa, M. A., Souza-Silva, F. A., Sanchez, B. A. M., Fontes, C. J. F., Soares, I. S., de Brito, C. F. A., Carvalho, L. H., & Sousa, T. N. (2018). Susceptibility to Plasmodium vivax malaria associated with DARC (Duffy

- antigen) polymorphisms is influenced by the time of exposure to malaria. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32254-z>
- Kappe, S. H. I., Kaiser, K., & Matuschewski, K. (2003). The Plasmodium sporozoite journey: A rite of passage. *Trends in Parasitology*, 19(3), 135–143. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(03\)00007-2](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00007-2)
- Kapulu, M. C., Da, D. F., Miura, K., Li, Y., Blagborough, A. M., Churcher, T. S., Nikolaeva, D., Williams, A. R., Goodman, A. L., Sangare, I., Turner, A. V., Cottingham, M. G., Nicosia, A., Straschil, U., Tsuboi, T., Gilbert, S. C., Long, C. A., Sinden, R. E., Draper, S. J., ... Biswas, S. (2015). Comparative assessment of transmission-blocking vaccine candidates against plasmodium falciparum. *Scientific Reports*, 5(January), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep11193>
- Kochar, D. K., Saxena, V., Singh, N., Kochar, S. K., Kumar, S. V., & Das, A. (2005). Plasmodium vivax malaria. *Emerging Infectious Diseases*, 11(1), 132–134. <https://doi.org/10.3201/eid1101.040519>
- Kotepui, M., Kotepui, K. U., Milanez, G. D., & Masangkay, F. R. (2020). Severity and mortality of severe plasmodium ovale infection: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 15(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235014>
- Kumar, K. A., Oliveira, G. A., Edelman, R., Nardin, E., & Nussenzweig, V. (2004). Quantitative Plasmodium sporozoite neutralization assay (TSNA). *Journal of Immunological Methods*, 292(1–2), 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.06.017>
- Lalremruata, A., Magris, M., Vivas-Martínez, S., Koehler, M., Esen, M., Kempaiah, P., Jeyaraj, S., Perkins, D. J., Mordmüller, B., & Metzger, W. G. (2015). Natural infection of Plasmodium brasilianum in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. *EBioMedicine*, 2(9), 1186–1192. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.07.033>
- Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Vulliez-Le Normand, B., Morlon-Guyot, J., Dubremetz, J. F., Fauquenoy, S., Tomavo, S., Faber, B. W., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Boulanger, M. J., Bentley, G. A., & Lebrun, M. (2011). The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathogens*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001276>
- Lim, C. S., Tazi, L., & Ayala, F. J. (2005). Plasmodium vivax: Recent world expansion and genetic identity to Plasmodium simium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15523–15528. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507413102>

- Lin, C. S., Uboldi, A. D., Epp, C., Bujard, H., Tsuboi, T., Czabotar, P. E., & Cowman, X. A. F. (2016). Multiple plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 complexes mediate merozoite binding to human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 291(14), 7703–7715. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.698282>
- Lopez Tricas, J. M. (2012, 6 febrero). *Ciclo vital del parásito de la malaria*. Info-farmacia. <http://www.info-farmacia.com/microbiologia/ciclo-vital-del-parasito-de-la-malaria>
- Malkin, E. M., Durbin, A. P., Diemert, D. J., Sattabongkot, J., Wu, Y., Miura, K., Long, C. A., Lambert, L., Miles, A. P., Wang, J., Stowers, A., Miller, L. H., & Saul, A. (2005). Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: A transmission blocking vaccine for Plasmodium vivax malaria. *Vaccine*, 23(24), 3131–3138. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.12.019>
- Markus, M. B. (2011). Malaria: Origin of the Term “Hypnozoite.” *Journal of the History of Biology*, 44(4), 781–786. <https://doi.org/10.1007/s10739-010-9239-3>
- Marques, R. F., Gimenez, A. M., Aliprandini, E., Novais, J. T., Cury, D. P., Watanabe, I. S., Dominguez, M. R., Silveira, E. L. V., Amino, R., & Soares, I. S. (2020). Protective malaria vaccine in mice based on the Plasmodium vivax circumsporozoite protein fused with the mumps nucleocapsid protein. *Vaccines*, 8(2), 1–19. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020190>
- Mercereau-Puijalon, O., & Ménard, D. (2010). Plasmodium vivax et l’antigène Duffy: Un paradigme revisité. *Transfusion Clinique et Biologique*, 17(3), 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2010.06.005>
- Meshnick, S. R. (2002). Artemisinin: Mechanisms of action, resistance and toxicity. *International Journal for Parasitology*, 32(13), 1655–1660. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00194-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00194-7)
- Millar, S. B., & Cox-Singh, J. (2015). Human infections with Plasmodium knowlesi-zoonotic malaria. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(7), 640–648. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.03.017>
- Mordmüller, B., Surat, G., Lagler, H., Chakravarty, S., Ishizuka, A. S., Lalremruata, A., Gmeiner, M., Campo, J. J., Esen, M., Ruben, A. J., Held, J., Calle, C. L., Mengue, J. B., Gebru, T., Ibáñez, J., Sulyok, M., James, E. R., Billingsley, P. F., Natasha, K., ... Kremsner, P. G. (2017). Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine. *Nature*, 542(7642), 445–449. <https://doi.org/10.1038/nature21060>

- Moreno-Pérez, D. A., Ruíz, J. A., & Patarroyo, M. A. (2013). Reticulocytes: Plasmodium vivax target cells. *Biology of the Cell*, 105(6), 251–260. <https://doi.org/10.1111/boc.201200093>
- Muñoz, J., Velasco, M., Alonso, D., Valls, M. E., Corachán, M., & Gascón, J. (2006). ¿Cuánta primaquina es necesaria para erradicar los hipnozoitos de Plasmodium vivax? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(1), 29–30. <https://doi.org/10.1157/13083372>
- Nardin, E. H., Oliveira, G. A., Calvo-Calle, J. M., Castro, Z. R., Nussenzweig, R. S., Schmeckpeper, B., Hall, B. F., Diggs, C., Bodison, S., & Edelman, R. (2000). Synthetic malaria peptide vaccine elicits high levels of antibodies in vaccinees of defined HLA genotypes. *Journal of Infectious Diseases*, 182(5), 1486–1496. <https://doi.org/10.1086/315871>
- Nkumama, I. N., O'Meara, W. P., & Osier, F. H. A. (2017). Changes in Malaria Epidemiology in Africa and New Challenges for Elimination. *Trends in Parasitology*, 33(2), 128–140. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.006>
- Organización Panamericana de la Salud /Organización Mundial de la Salud. (2020). Actualización Epidemiológica: Situación de la malaria en Resumen de la situación. *Oms*. [www.paho.org](http://www.paho.org)
- Ouattara, A., & Laurens, M. B. (2015). Vaccines against malaria. *Clinical Infectious Diseases*, 60(6), 930–936. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu954>
- Payne, R. O., Silk, S. E., Elias, S. C., Miura, K., Diouf, A., Galaway, F., De Graaf, H., Brendish, N. J., Poulton, I. D., Griffiths, O. J., Edwards, N. J., Jin, J., Labbé, G. M., Alanine, D. G. W., Siani, L., Marco, S. Di, Roberts, R., Green, N., Berrie, E., ... Draper, S. J. (2017). Human vaccination against RH5 induces neutralizing antimalarial antibodies that inhibit RH5 invasion complex interactions. *JCI Insight*, 2(21), 1–19. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.96381>
- Price, R. N., Tjitra, E., Guerra, C. a, Yeung, S., White, N. J., & Anstey, N. M. (2009). *UKPMC Funders Group Vivax malaria: neglected and not benign*. 77(61), 79–87.
- Raissi, V., Etemadi, S., Getso, M. I., Mehravaran, A., & Raiesi, O. (2021). Structure-genetic diversity and recombinant protein of circumsporozoite protein (CSP) of vivax malaria antigen: A potential malaria vaccine candidate. *Gene Reports*, 23(March), 101132. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101132>
- Ramasamy, R. (2014). Zoonotic malaria - global overview and research and policy needs. *Frontiers in Public Health*, 2(AUG), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00123>

- Reddy, K. S., Amlabu, E., Pandey, A. K., Mitra, P., Chauhan, V. S., & Gaur, D. (2015). Multiprotein complex between the GPI-anchored CyRPA with PfRH5 and PfRipr is crucial for Plasmodium falciparum erythrocyte invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(4), 1179–1184. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415466112>
- Regules, J. A., Cicutelli, S. B., Bennett, J. W., Paolino, K. M., Twomey, P. S., Moon, J. E., Kathcart, A. K., Hauns, K. D., Komisar, J. L., Qabar, A. N., Davidson, S. A., Dutta, S., Griffith, M. E., Magee, C. D., Wojnarski, M., Livezey, J. R., Kress, A. T., Waterman, P. E., Jongert, E., ... Vekemans, J. (2016). Fractional third and fourth dose of RTS,S/AS01 malaria candidate vaccine: A phase 2a controlled human malaria parasite infection and immunogenicity study. *Journal of Infectious Diseases*, 214(5), 762–771. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw237>
- Reyes-Sandoval, A., & Bachmann, M. F. (2013). Plasmodium vivax malaria vaccines: Why are we where we are? *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 9(12), 2558–2565. <https://doi.org/10.4161/hv.26157>
- Richie, T. L., Billingsley, P. F., Sim, B. K. L., James, E. R., Chakravarty, S., Epstein, J. E., Lyke, K. E., Mordmüller, B., Alonso, P., Duffy, P. E., Doumbo, O. K., Sauerwein, R. W., Tanner, M., Abdulla, S., Kremsner, P. G., Seder, R. A., & Hoffman, S. L. (2015). Progress with Plasmodium falciparum sporozoite (PfSPZ)-based malaria vaccines. *Vaccine*, 33(52), 7452–7461. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.096>
- Rieckmann, K. H., Beaudoin, R. L., Cassells, J. S., & Sell, K. W. (1979). Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum malaria. *Bulletin of the World Health Organization*, 57(Suppl. 1), 261–265.
- Rosenberg, R., Wirtz, R. A., Lanar, D. E., Sattabongkot, J., Hall, T., Waters, A. P., & Prasittisuk, C. (1989). Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite Plasmodium vivax. *Science*, 245(4921), 973–976. <https://doi.org/10.1126/science.2672336>
- Rubio, J. M., Benito, A., Roche, J., Berzosa, P. J., García, M. L., Micó, M., Edú, M., & Alvar, J. (1999). Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of Plasmodium vivax infection in Equatorial Guinea. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(2), 183–187. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.183>
- Ryan, J. R., Stoute, J. A., Amon, J., Dunton, R. F., Mtalib, R., Koros, J., Owour, B., Luckhart, S., Wirtz, R. A., Barnwell, J. W., & Rosenberg, R. (2006). Evidence for transmission of Plasmodium vivax among a Duffy antigen negative population in Western Kenya.

*American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(4), 575–581. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.75.575>

Sattabongkot, J., Tsuboi, T., Zollner, G. E., Sirichaisinthop, J., & Cui, L. (2004). Plasmodium vivax transmission: Chances for control? *Trends in Parasitology*, 20(4), 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.02.001>

Seder, R. A., Chang, L. J., Enama, M. E., Zephir, K. L., Sarwar, U. N., Gordon, I. J., Holman, L. S. A., James, E. R., Billingsley, P. F., Gunasekera, A., Richman, A., Chakravarty, S., Manoj, A., Velmurugan, S., Li, M. L., Ruben, A. J., Li, T., Eappen, A. G., Stafford, R. E., ... Hoffman, S. L. (2013). Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science*, 341(6152), 1359–1365. <https://doi.org/10.1126/science.1241800>

Sevene, E., González, R., & Menéndez, C. (2010). Current knowledge and challenges of antimalarial drugs for treatment and prevention in pregnancy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 11(8), 1277–1293. <https://doi.org/10.1517/14656561003733599>

Silvie, O., Mota, M. M., Matuschewski, K., & Prudêncio, M. (2008). Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Current Opinion in Microbiology*, 11(4), 352–359. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.005>

Singh, P., Chatterjee, M., Chatterjee, K., Arun, R. K., & Chanda, N. (2021). Design of a point-of-care device for electrochemical detection of P.vivax infected-malaria using antibody functionalized rGO-gold nanocomposite. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 327(May 2020), 128860. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128860>

Sissoko, M. S., Healy, S. A., Katile, A., Omaswa, F., Zaidi, I., Gabriel, E. E., Kamate, B., Samake, Y., Guindo, M. A., Dolo, A., Niangaly, A., Niaré, K., Zeguime, A., Sissoko, K., Diallo, H., Thera, I., Ding, K., Fay, M. P., O'Connell, E. M., ... Duffy, P. E. (2017). Safety and efficacy of PfSPZ Vaccine against Plasmodium falciparum via direct venous inoculation in healthy malaria-exposed adults in Mali: a randomised, double-blind phase 1 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(5), 498–509. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30104-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30104-4)

Spencer, L. M., Gómez, A., & Collovini, E. (2016). Mechanisms of invasion from sporozoite and merozoite of Plasmodium. *Revista Bionatura*, 1(2), 89–94. <https://doi.org/10.21931/RB/2016.01.02.9>

Srinivasan, P., Ekanem, E., Diouf, A., Tonkin, M. L., Miura, K., Boulanger, M. J., Long, C. A., Narum, D. L., & Miller, L. H. (2014). Immunization with a functional protein complex required for erythrocyte invasion protects against lethal malaria. *Proceedings of the*

*National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(28), 10311–10316.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1409928111>

Takala, S. L., Coulibaly, D., Thera, M. a, Batchelor, A. H., Cummings, M. P., Escalante, A. a, Ouattara, A., Traoré, K., Djimdé, A. a, Doumbo, O. K., & Plowe, C. V. (2009). Malaria : Implications for Vaccine Development. *Sci Transl Med.*, 1(2), 1–21. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000257>.Extreme

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

Taylor, W. R. J., Hanson, J., Turner, G. D. H., White, N. J., & Dondorp, A. M. (2012). Respiratory manifestations of malaria. *Chest*, 142(2), 492–505. <https://doi.org/10.1378/chest.11-2655>

Tessema, S. K., Nakajima, R., Jasinskas, A., Monk, S. L., Lekieffre, L., Lin, E., Kiniboro, B., Proietti, C., Siba, P., Felgner, P. L., Doolan, D. L., Mueller, I., & Barry, A. E. (2019). Protective Immunity against Severe Malaria in Children Is Associated with a Limited Repertoire of Antibodies to Conserved PfEMP1 Variants. *Cell Host and Microbe*, 26(5), 579-590.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.10.012>

Thomas, H., & Martin, P. (2002). How useful is PCR in the diagnosis of malaria ? *Trends in Parasitology*, 18(9), 395–398.

Tjitra, E., Anstey, N. M., Sugiarto, P., Warikar, N., Kenangalem, E., Karyana, M., Lampah, D. A., & Price, R. N. (2008). Multidrug-resistant Plasmodium vivax associated with severe and fatal malaria: A prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Medicine*, 5(6), 0890–0899. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050128>

Udomsangpetch, R., Somsri, S., Panichakul, T., Chotivanich, K., Sirichaisinthop, J., Yang, Z., Cui, L., & Sattabongkot, J. (2007). Short-term in vitro culture of field isolates of Plasmodium vivax using umbilical cord blood. *Parasitology International*, 56(1), 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2006.12.005>

van Schaijk, B. C. L., Ploemen, I. H. J., Annoura, T., Vos, M. W., Foquet, L., van Gemert, G. J., Chevalley-Maurel, S., van de Vegte-Bolmer, M., Sajid, M., Franetich, J. F., Lorthiois, A., Leroux-Roels, G., Meuleman, P., Hermsen, C. C., Mazier, D., Hoffman, S. L., Janse, C. J., Khan, S. M., & Sauerwein, R. W. (2014). A genetically attenuated malaria vaccine candidate based on P. falciparum b9/slarp gene-deficient sporozoites. *ELife*, 3(November), 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.03582>



- Võ, T. C., Lê, H. G., Kang, J. M., Moe, M., Naw, H., Myint, M. K., Lee, J., Sohn, W. M., Kim, T. S., & Na, B. K. (2020). Genetic polymorphism and natural selection of circumsporozoite protein in Myanmar *Plasmodium vivax*. *Malaria Journal*, *19*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03366-7>
- Warhurst, D. C., & Williams, J. E. (1996). ACP Broadsheet no 148. July 1996. Laboratory diagnosis of malaria. *Journal of Clinical Pathology*, *49*(7), 533–538. <https://doi.org/10.1136/jcp.49.7.533>
- Wilby, K. J., Lau, T. T., Gilchrist, S. E., & Ensom, M. H. (2012). Mosquirix (RTS,S): A Novel Vaccine for the Prevention of *Plasmodium falciparum* Malaria. *Annals of Pharmacotherapy*, *46*(3), 384–393. <https://doi.org/10.1345/aph.1aq634>
- World Health Organization. (2018). WHO | First malaria vaccine in Africa: A potential new tool for child health and improved malaria control. *Who*, 1–4. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/first-malaria-vaccine/en/>
- Wright, G. J., & Rayner, J. C. (2014). *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Invasion: Combining Function with Immune Evasion. *PLoS Pathogens*, *10*(3), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003943>
- Wu, Y., Ellis, R. D., Shaffer, D., Fontes, E., Malkin, E. M., Mahanty, S., Fay, M. P., Narum, D., Rausch, K., Miles, A. P., Aebig, J., Orcutt, A., Muratova, O., Song, G., Lambert, L., Zhu, D., Miura, K., Long, C., Saul, A., ... Durbin, A. P. (2008). Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs 25 formulated with montanide ISA 51. *PLoS ONE*, *3*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002636>
- Yang, C., Collins, W. E., Xiao, L., Saekhou, A. M., Reed, R. C., Nelson, C. O., Hunter, R. L., Jue, D. L., Fang, S., Wohlhueter, R. M., Udhayakumar, V., & Lal, A. A. (1997). Induction of protective antibodies in Saimiri monkeys by immunization with a multiple antigen construct (MAC) containing the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein repeat region and a universal T helper epitope of tetanus toxin. *Vaccine*, *15*(4), 377–386. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(97\)00200-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(97)00200-4)
- Young, J. F., Hockmeyer, W. T., Gross, M., Ballou, W. R., Wirtz, R. A., Trosper, J. H., Beaudoin, R. L., Hollingdale, M. R., Miller, L. H., Diggs, C. L., & Rosenberg, M. (1985). Expression of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite proteins in *Escherichia coli* for potential use in a human malaria vaccine. *Science*, *228*(4702), 958–962. <https://doi.org/10.1126/science.2988125>