

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
ÁREA DE PARASITOLOGÍA

Aislamiento y caracterización del gen *pvs25* en muestras de pacientes con malaria vivax

Isolation and characterization of the *pvs25* gene in samples from patients with vivax malaria

RAFAEL CRUZ CABALLERO

TRABAJO DE FIN DE GRADO
BIOTECNOLOGÍA
PROMOCIÓN 2018-2022

DIRECTOR:

JOSÉ ANTONIO GARRIDO CÁRDENAS

CODIRECTOR:

JOSÉ CEBRIÁN CARMONA

Convocatoria ordinaria de Mayo de 2022



Agradecimientos

Durante estos cuatro años de etapa universitaria he podido aprender, comprender y construir una visión crítica y razonada sobre los detalles que conforman la vida, pero también su devenir y hacia donde se dirige gracias a todos los conocimientos adquiridos de la mano de un concepto aparentemente sin límites, la biotecnología. Su potencial va más allá de generar saber, sino también de utilizarlo para poder contribuir a desarrollar un mundo más sostenible, habitable y justo.

Sin duda, comenzar a seguir ese camino poniendo mi granito de arena a través de este trabajo de fin de grado es algo a lo que siempre le estaré agradecido a D. José Antonio Garrido Cárdenas, D. José Cebrián Carmona y a D^a. Concepción María Mesa Valle que me dieron su confianza y me han estado guiando desde el primer momento en algo tan desconcertante e interesante como es la malaria. Además, de ellos no solo me llevo conmigo su sabiduría sino también su calidez humana y cercanía que, al fin y al cabo, es lo que marca la diferencia.

De la misma forma le quiero expresar mi agradecimiento a los profesores del Grado que, tanto a mí como a mis compañeros, nos han enseñado la base para entender el idioma de la ciencia y nos han dado la capacidad de poder utilizarla y explorarla para el resto de nuestras vidas.

Venir a estudiar a Almería también ha supuesto un crecimiento personal y de madurez que ha sido acompañado por las mejores personas que he conocido hasta ahora y estoy seguro de que nada hubiera sido lo mismo sin cada uno de los que forman ese grupo llamado *Dioses Biotec* y de personas como Marina Angulo. Habernos hecho amigos, haber podido compartir ideas u opiniones y sobre todo pasar tiempo entre gente con personalidades tan dispares ha acabado por construir una red de apoyo que ha sido fundamental tanto en los buenos momentos como en los adversos que hemos vivido estos cuatro años y los que aún nos queden.

Además, también quiero agradecer a las personas que han estado desde Jaén conmigo de una forma u otra. En primer lugar, a mi familia, y en especial a mis padres, por apoyarme a la hora de estudiar algo que al principio se preguntaban qué era y ahora son capaces de explicárselo a los demás. Y también a mis amigos de toda la vida, que pese a la distancia y las pocas ocasiones que hemos tenido para estar juntos siguen estando ahí cuando los necesito.

Por último, quiero reconocer la gran labor que realizó durante sus clases, debates y seminarios ya fuesen de forma presencial u online al profesor D. José Joaquín Moreno Casco al que le agradezco haber incrementado mi interés en la ciencia aún más y habernos mostrado el enorme mundo que se esconde en cada porción del universo.

“No se puede desatar un nudo sin saber cómo está hecho”

~Aristóteles

Resumen

La malaria es una de las enfermedades infecciosas más mortales que jamás haya existido. Únicamente, en las últimas dos décadas ha acabado con alrededor de quince millones de vidas y su incidencia está volviendo a repuntar debido a la aparición de resistencias a los tratamientos, la amplia extensión de su vector (los mosquitos *Anopheles*), la pobreza de las regiones afectadas y las consecuencias colaterales de la pandemia COVID-19. El agente causal de la enfermedad en humanos son diversas especies de protozoos del género *Plasmodium*, entre la que destaca por ser la segunda con más prevalencia *P. vivax*. Su complejo ciclo de vida, la variabilidad antigénica y la evasión del sistema inmunológico frustra la gran mayoría de vacunas planteadas. Pese a ello, la prospección de proteínas inmunogénicas sigue siendo una vía de investigación crucial. En el presente trabajo hemos seleccionado la proteína Pvs25 ubicada en la superficie del ooquineto que se forma en la fase sexual del ciclo de vida. Hemos aislado, secuenciado y analizado el gen que codifica dicha proteína, así como la secuencia de aminoácidos que la constituyen. Además, investigaciones previas, relacionan las variantes de la proteína circumsporozoíto (CSP) con los haplotipos de Pvs25 que, en conjunto, tendrían consecuencias en la biología de la infección y de la transmisión. Debido al interés que suscita este fenómeno, los polimorfismos hallados en las muestras secuenciadas fueron analizados para determinar y relacionar los haplotipos de Pvs25 con los de CSP.

Abstract

Malaria is one of the deadliest infectious diseases that have ever existed. Only, in the last two decades, it has ended with about fifteen million lives and its incidence is rising again due to the appearance of resistance to treatments, the vast geographical extension of its vector (*Anopheles* mosquito), the poverty of affected regions and the collateral consequences of COVID-19 pandemic. The causative agent of human disease is several protozoa of the *Plasmodium* genre, among which *P. vivax* stands out as the second most prevalent. Its complex life cycle, antigenic variability, and immune evasion thwart most proposed vaccines. Nevertheless, the prospection of immunogenic proteins is still a crucial research path. In the present work, Pvs25 protein, ubicated on ookinetes surface during sexual stage has been selected. We have isolated, sequenced and analysed the gen that encodes Pvs25 protein as well as the sequence of amino acids that constitute it. In addition, previous investigations link the circumsporozoite protein (CSP) variants with Pvs25 haplotypes that may have consequences on the biology of the infection and transmission. Because of aroused interest in this phenomenon, the polymorphisms found in the sequenced samples were analysed to determine and relate the Pvs25 haplotypes with CSP ones.

1. Introducción	7
1.1. Malaria	7
1.2. Distribución geográfica y epidemiología	8
1.3. Características clínicas y sintomatología	11
1.4. <i>Plasmodium vivax</i>	12
1.4.1. Ciclo biológico	12
1.4.1.1. Fase asexual: hospedador vertebrado	12
1.4.1.2. Fase sexual: hospedador invertebrado	15
1.4.2. Respuesta inmunológica y evasión de la inmunidad	16
1.5. Tratamiento y control	18
1.5.1. Insecticidas y fármacos antimaláricos	18
1.5.2. Vacunas	18
1.6. Pvs25	21
2. Objetivos	22
3. Materiales y métodos	23
3.1. Materiales	23
3.1.1. Muestras biológicas	23
3.1.2. Cebadores para la amplificación de ADN	23
3.1.3. Kit de extracción de ADN	23
3.1.4. Kit de PCR	23
3.1.5. Kit de purificación de productos de PCR	23
3.2. Métodos	23
3.2.1. Análisis bioinformático de las secuencias de <i>pvs25</i> en las cepas de <i>P. vivax</i>	23
3.2.2. Extracción del ADN	24
3.2.3. Cuantificación de la cantidad de ADN extraída	24
3.2.4. PCR para la detección de <i>Plasmodium vivax</i> en las muestras analizada	25
3.2.5. Diseño de cebadores	26
3.2.6. Aislamiento del gen <i>pvs25</i>	26
3.2.6.1. Amplificación de <i>pvs25</i>	26
3.2.6.2. Gel de electroforesis de ADN	26
3.2.6.3. Purificación del producto de PCR	27
3.2.7. Secuenciación de <i>pvs25</i> y análisis de resultados	27
3.2.8. Análisis bioinformático de los epítomos de la proteína de Pvs25 como antígeno de la inmunidad humoral	27
4. Resultados y discusión	28
4.1. Cuantificación del ADN extraído	28
4.2. Identificación de <i>P. vivax</i>	28
4.2.1. Reconocimiento PCR de la presencia de <i>P. vivax</i>	28
4.2.2. Secuenciación de la reamplificación	28
4.3. Aislamiento de <i>pvs25</i>	29

4.3.1.	Diseño de cebadores y análisis de variaciones en las cepas de referencia	29
4.3.1.1.	Diseño de cebadores para <i>pvs25</i>	29
4.3.1.2.	Análisis de las variaciones presentes en las cepas de <i>P. vivax</i>	33
4.3.2.	Amplificación de <i>pvs25</i>	34
4.3.3.	Secuenciación y análisis de secuencias	35
4.4.	Identificación de haplotipos CSP/Pvs25	37
4.5.	Estudio de los epítomos potenciales en Pvs25	39
5.	Conclusiones	43
6.	Bibliografía	44

1. Introducción

1.1. Malaria

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria considerada como una de las infecciones más complejas y dañinas con la que se ha enfrentado la humanidad desde sus inicios. Solamente desde el 2000 hasta el 2020 se han estimado un total de 4'9 mil millones de casos y 14'6 millones de muertes (World Health Organization, 2021a).

Su agente causal son protozoos del género *Plasmodium* que pertenece a la familia *Plasmodiidae* incluida en el orden *Haemosporida*, al igual que otros parásitos con ciclos de vida similares, la clase es *Aconoidasida* que pertenece al filo de los *Apicomplexa* dentro del reino protista y dominio *Eukarya*. Actualmente, se considera que la enfermedad en humanos puede ser causada por un total de seis especies distintas: *P. malariae*, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri*, *P. knowlesi*, *P. vivax* y *P. falciparum* (Ansari et al., 2016; Calderaro, 2013; Garrido-Cardenas et al., 2019; Milner, 2018; Sato, 2021). No obstante, la inmensa mayoría de casos se deben a *P. vivax* y *P. falciparum* siendo esta última la predominante en África y la más mortífera globalmente. Pero en América del Sur, Sudeste asiático y Oriente Medio *P. vivax* presenta prevalencias elevadas que están ganando terreno anualmente (Figura 1.1, Figura 1.2) (Varo et al., 2020).

Todas las especies de *Plasmodium* usan como vector de transmisión a mosquitos hembra del género *Anopheles* con el fin de establecer infecciones no solo en humanos, sino también en diversas especies de mamíferos y aves (Perkins, 2014). La mayor parte de los contagios son atribuidos a un total de 30 especies del género *Anopheles*.

Los primeros registros históricos de paludismo datan de hace 30 millones de años en mosquitos fosilizados en ámbar y su existencia se remonta a épocas anteriores al desarrollo de los mamíferos cuando protozoos predecesores de los plasmodios ya parasitaban reptiles, aves y anfibios. Pero no es hasta el origen de la agricultura, hace aproximadamente 10.000 años, cuando aparecen los primeros indicios de infecciones en humanos; posiblemente auspiciados por la modificación del paisaje con el objetivo de crear zonas aptas para el cultivo. Tanto en la Antigua Grecia como en Roma, India y China los médicos de la época ya recogían información sobre la malaria (Cormier, 2011).

Un factor para tener en cuenta es que no se puede cerrar el círculo a las seis especies mencionadas ya que desde que la malaria afecta al *Homo Sapiens* ha habido infecciones cruzadas con especies de *Plasmodium* originalmente parásitas en otros primates, dejando reflejado de este modo la importancia de los fenómenos de zoonosis y el potencial peligro de los primates como reservorios (Cormier, 2011). Por ejemplo, la especie *P. knowlesi* inicialmente era solo una especie específica de macacos hasta que se observó experimentalmente que era capaz de inducir infecciones a través del vector típico en humanos. Este hecho fue corroborado en 2004 en Malasia, donde se empezaron a diagnosticar casos de paludismo debidos a este parásito y actualmente se está convirtiendo en un problema preocupante. En 2018 fue el agente causal del 88% de los contagios en este archipiélago (Chin et al., 2020; Wongsrichanalai et al., 2019). Algo similar está ocurriendo, en Camboya y también en Malasia, con otro causante de malaria en primates no humanos, *P. cynomolgi*, cuya similaridad genética con *P. vivax* sugiere que puede haber dado lugar a diagnósticos erróneos. Además, durante

el desarrollo de algunos experimentos, ciertos investigadores han llegado a contagiarse de especies provenientes de primates objeto de su investigación (Antinori et al., 2021). Los fenómenos de zoonosis descritos son favorecidos por el propio comportamiento humano en la naturaleza ya que la deforestación, el comercio, la emisión de gases de efecto invernadero, el turismo o la domesticación de animales salvajes son catalizadores para el salto de especies de *Plasmodium* entre nosotros y los seres vivos que actúan como reservorios.

1.2 Distribución geográfica y epidemiología

La distribución geográfica de la malaria (figura 1.1; figura 1.2) se explica por las regiones aptas para la vida de *Anopheles*. Cuanto mayor es la esperanza de vida del mosquito, mayor es la transmisión por este de plasmodios. Los ecosistemas tropicales con temperaturas elevadas y alta humedad

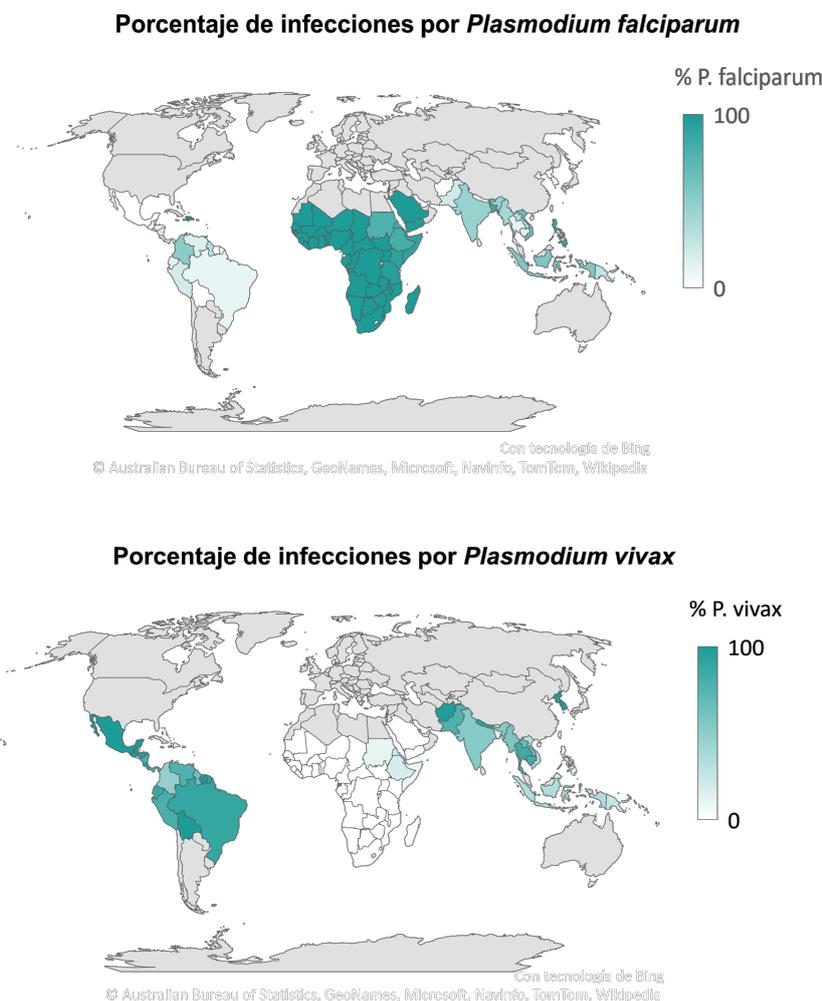


Figura 1.1. Distribución en porcentaje de infecciones estimadas en países con malaria endémica durante 2019 comparando entre la prevalencia de *P. falciparum* y *P. vivax*. Los casos importados no se incluyen. En gris países libres de contagios endémicos conocidos. Fuente: (World Health Organization, 2021b)

favorecen la reproducción del vector y la transmisión de la malaria. Ya que las lluvias en gran parte de los países endémicos son estacionales, es durante esos meses cuando se producen la inmensa mayoría de las transmisiones (Ariey et al., 2013).

Pese al conocimiento de la enfermedad desde hace siglos, no fue hasta 1939 cuando se descubrió que el uso del insecticida dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) podía ayudar a reducir la incidencia (Snounou, 2019). Desde este momento comenzaron a desarrollarse estrategias de control alrededor del mundo. El último plan ideado es la Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria 2016-2030 donde la comunidad internacional se ha fijado reducir la tasa de mortalidad y la incidencia por lo menos un 90% para 2030 respecto 2015. Para ello han elaborado un marco estratégico cuyos pilares son “lograr el acceso universal a la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la malaria; acelerar los esfuerzos para lograr la eliminación y alcanzar el estado exento de malaria y transformar la vigilancia malárica en una intervención básica” (World Health Organization, 2015).

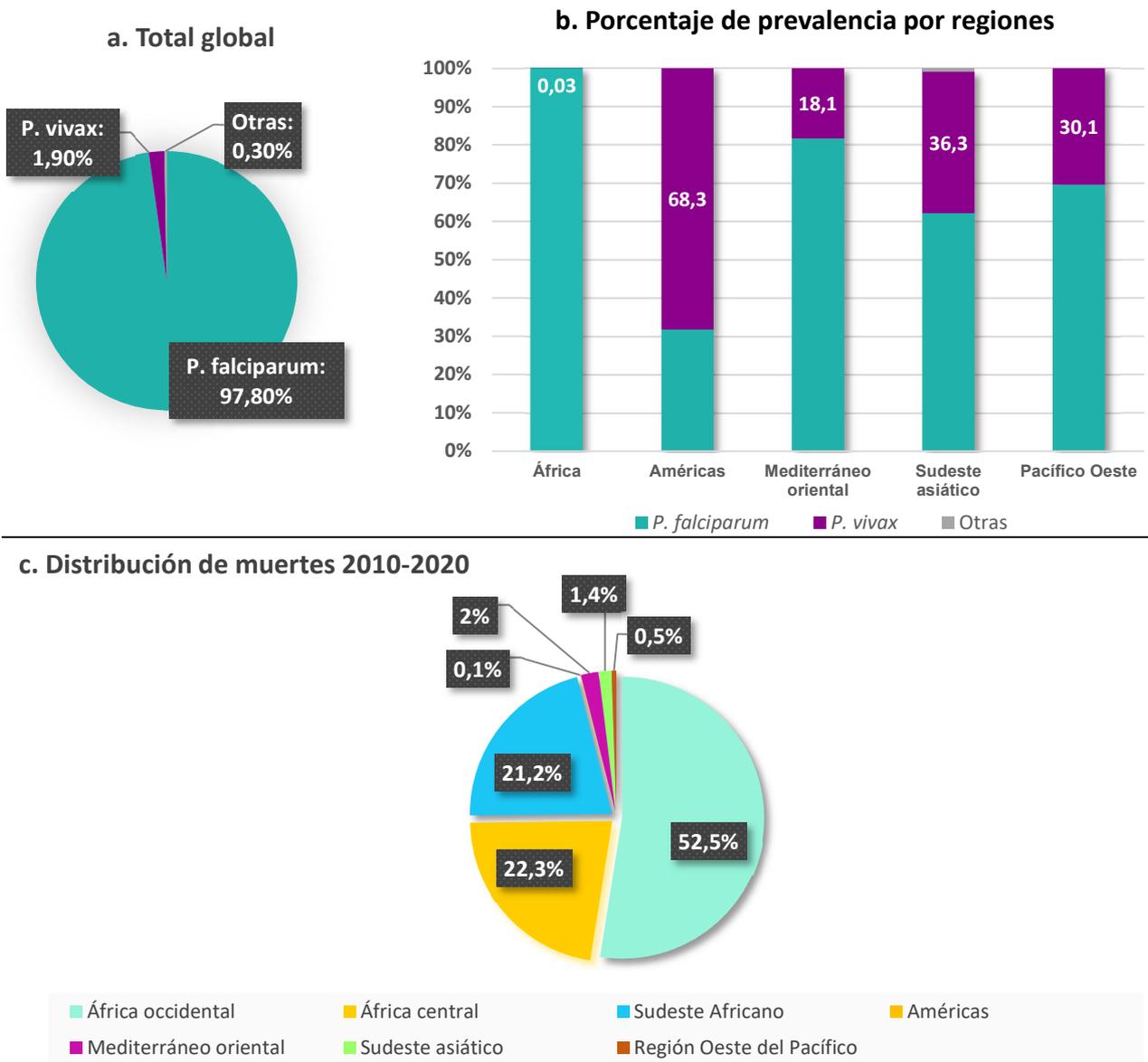


Figura 1.2. a) Porcentaje de infecciones provocadas por malaria diferenciando entre *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* y otras especies en 2020. b) Prevalencia por regiones geográficas en 2020 diferenciando entre especies con porcentajes para *P. vivax*. c) Distribución geográfica de defunciones entre 2010-2020 Fuente: (World Health Organization, 2021a)

En 2020, la OMS estableció en alrededor de 4'1 mil millones de personas la población mundial susceptible a contraer malaria. La incidencia global estimada fue de 59 casos por cada 1.000 habitantes en riesgo (Figura 1.3) y la mortalidad presentó un valor de 15 defunciones por cada 100.000 habitantes en riesgo. Es decir, en 2020 se estimó un total de 241 millones de personas contagiadas y 627.000 fallecidos (Figura 1.4) siendo el 77% niños menores de 5 años.

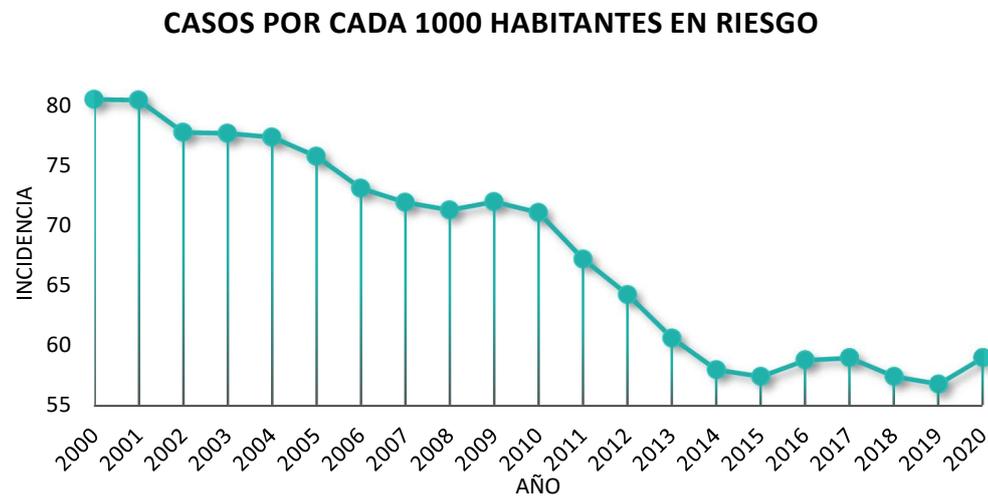


Figura 1.3. Gráfico sobre la tasa de incidencia. Fuente: World Health Organization, 2021

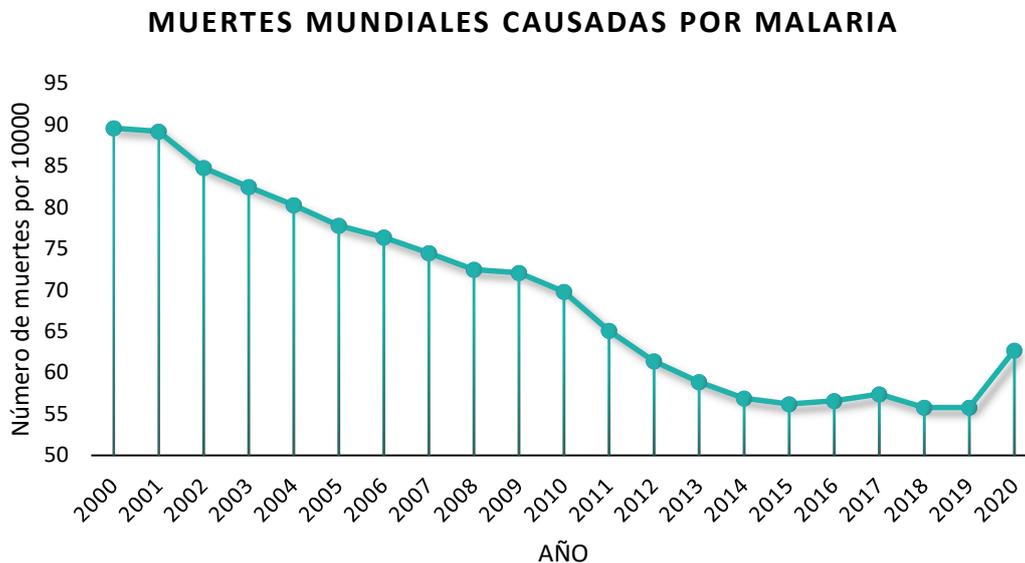


Figura 1.4. Gráfico sobre el número de fallecimientos provocados por paludismo. Fuente: (World Health Organization, 2021a)

A partir del comienzo del siglo XXI, la tendencia ha sido favorable en cuanto a la reducción de tasa de mortalidad e incidencia. Sin embargo, desde 2014, la pendiente de contagios ha reducido su desescalada considerablemente llegando en 2016 y 2017 a repuntar ligeramente. Pero el mayor aumento experimentado desde la existencia de datos se ha dado en 2020, durante el cual se estima

que ha habido un incremento del 12% en el número de defunciones y un 6% más de contagiados respecto a 2019 (Figura 1.3 y Figura 1.4). Este cambio abrupto de la tendencia es achacado al colapso sanitario y a la gran limitación de recursos y servicios consecuencia de la pandemia del COVID-19 que ha alterado el desarrollo normal de las estrategias de control de la malaria.

Actualmente, en el mundo hay un total de 85 países que presentan el paludismo de forma endémica, donde solamente 4 países (Nigeria, República Democrática del Congo, Tanzania y Mozambique) registran más del 50% de las muertes globales estando todos ellos ubicados en África. Y es que, en 2020, un total de 228 millones de casos (230 casos por 1000 habitantes en riesgo) y 602.000 muertes (94% del los fallecimientos globales) se registraron únicamente en este continente. La segunda región más afectada es el Mediterráneo Oriental que ha experimentado un aumento tanto en contagios como en defunciones en los últimos cuatro años y se le atribuye 12.300 defunciones. El sudeste asiático se posiciona en tercer lugar con 9000 fallecimientos en 2020 (82% se produjeron exclusivamente de India); le sigue el Pacífico oriental que ha conseguido reducir casos y fallecimientos y por último el continente americano con 409 muertes y la mitad de los contagios que 2019 con una incidencia de 5 contagios por cada 1000 habitantes, pero preocupa especialmente las elevadas cifras de casos en Venezuela.

No obstante, debido a la pandemia y a las medidas de limitación del movimiento, puede ser que muchos casos hayan quedado sin diagnosticar o sus síntomas confundidos y que en 2020 las cifras reales sean aún más negativas de lo estimado (World Health Organization, 2021a).

1.3 Características clínicas y sintomatología

La OMS distingue entre tres estadios clínicos: parasitemia asintomática, enfermedad sin complicaciones y malaria severa. En términos generales, el síntoma principal son fiebres cíclicas que pueden venir acompañadas de otros síntomas inespecíficos como diarrea, vómitos, dolor de cabeza, debilidad, pérdida de apetito o mareos (Sixpence et al., 2020). El conjunto de síntomas y signos que se presentan en los enfermos varían según la/las especies de *Plasmodium* que ha infectado al hospedante. Todas ellas pueden producir una enfermedad asintomática, pero por lo general, *P. vivax*, *P. knowlesi* y *P. malariae* llevan a cabo con mayor regularidad este tipo de manifestación facilitando una transmisión imperceptible entre la población, pero pudiendo llegar a provocar una parasitación crónica que, a largo plazo, desemboca en anemia severa y malnutrición (Garrido-Cardenas et al., 2019; Varo et al., 2020; World Health Organization, 2014).

En cuanto a *P. falciparum*, es la especie que causa mayor prevalencia de malaria severa y consecuentemente también de defunciones. Cuando se adquiere malaria severa los síntomas se agravan dando pie a fallos multiorgánicos. Los pacientes con esta forma clínica se ven afectados por anemia severa malárica, malaria cerebral y acidosis que desencadenan hemorragias abundantes, edemas pulmonares, hipoglucemia, coma y daños nefríticos entre otros. La población más afectada por la malaria severa son los menores de 5 años. (Milner, 2018; Varo et al., 2020; World Health Organization, 2014)

Un factor significativo para el establecimiento de la enfermedad es la cantidad de parásitos en sangre o parasitemia. Debido al tipo celular sanguíneo que invade *P. vivax* su parasitemia es bastante

menor que la generada por *P. falciparum*. Esto se refleja en la menor gravedad de la sintomatología y una epidemiología de malaria severa menos acuciante.

1.4 *Plasmodium vivax*

1.4.1 Ciclo biológico

El ciclo de vida de las especies pertenecientes al género *Plasmodium* (Figura 1.5) es bastante similar. En general consta de dos fases, una de reproducción sexual que tiene lugar en el hospedador definitivo, el mosquito vector del género *Anopheles*, y otra de reproducción asexual que tiene lugar en el hospedador vertebrado que actúa como hospedador intermedio. Ambas fases comprenden distintas etapas.

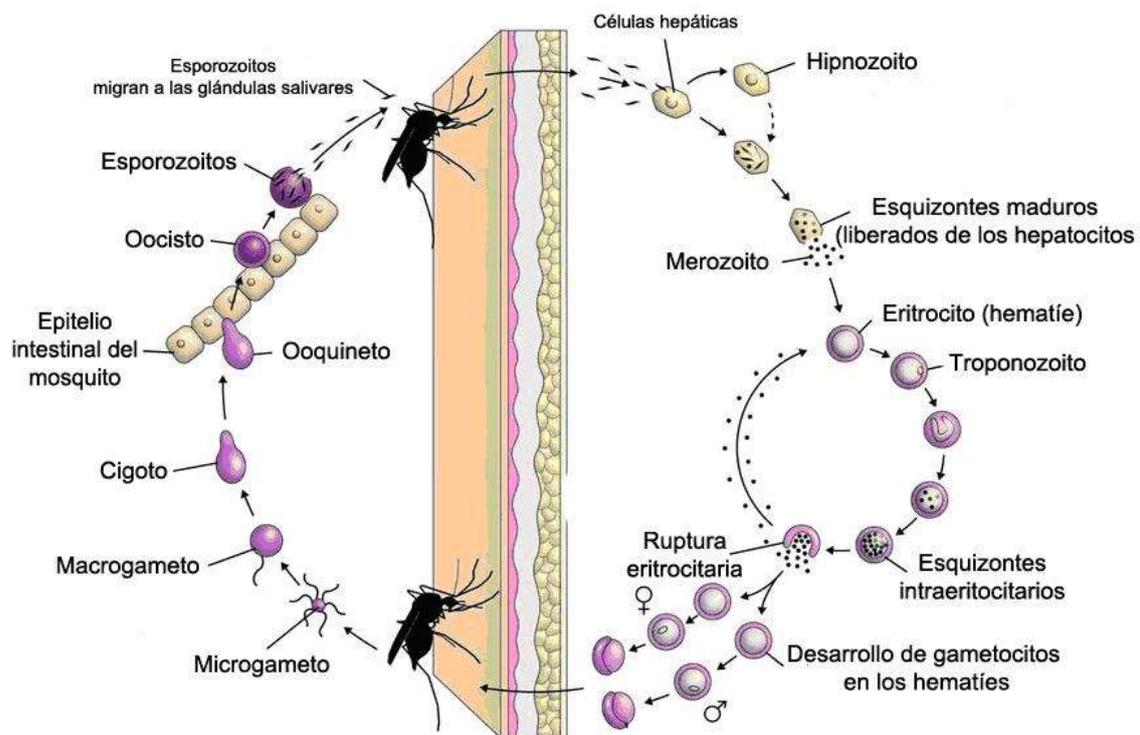


Figura 1.5. Ciclo biológico de *P. vivax* (Lopez Tricas, 2012)

1.4.1.1. Fase asexual: hospedador vertebrado

Plasmodium vivax, en esta fase, desarrolla dos etapas donde se multiplica asexualmente. Se distinguen según si el protozoo está dentro o en el exterior de eritrocitos.

- **Etapas pre-eritrocítica o exoeritrocítica**

El parásito presenta distintas formas morfológicas a lo largo de su ciclo de vida. El ciclo comienza cuando las hembras de los mosquitos *Anopheles* pican a un hospedador. En las glándulas del mosquito se encuentran las formas infectivas o esporozoitos. Alrededor de 50 esporozoitos son inyectados al hospedador donde pueden seguir distintas rutas. Algunos de ellos se quedarán en la piel, otros invadirán los vasos linfáticos y el resto alcanzarán los capilares sanguíneos siendo esta última la ruta esencial para el establecimiento de la infección. Aunque, los esporozoitos que llegan hasta los nódulos linfáticos que no son eliminados por las células dendríticas, son capaces de infectar células del

seno subcapsular pero no completan su ciclo de vida (Ménard et al., 2013). En la piel los esporozoítos adquieren un desarrollo incompleto, pero no prosperan (Silvie et al., 2008).

Los esporozoítos recorren el sistema circulatorio hasta llegar al hígado donde deben atravesar las células endoteliales sinusoidales y/o las células de Kupffer para introducirse, finalmente, en los hepatocitos. El proceso de inserción en la célula está mediado por el reconocimiento por parte de *Plasmodium* de proteoglicanos con heparán sulfato (HSPGs) que dispara una cascada de señalización dependiente de calcio a través de una quinasa.

En el citoplasma del hepatocito, el parásito, desarrolla un nuevo orgánulo conocido como vacuola parasitófora cuyo fin es obtener recursos de la célula hospedadora y crear un medio óptimo donde se va a producir el primer ciclo productivo en humanos que se conoce como esquizogonia exoeritrocitaria o producción de esquizontes. Como resultado, van a dar lugar a miles de merozoítos (esquizontes maduros) en menos de una semana (Clària & Titos, 2004; Cowman et al., 2016; Matz et al., 2020; Zanghi & Vaughan, 2021). El proceso reproductivo consta de una cariocinesis ultraproductiva que genera una única célula multinucleada y una posterior citocinesis que distribuye un núcleo por célula dividida (Ménard et al., 2013).

Sin embargo, a diferencia de *P. falciparum*, en *P. vivax* y en *P. ovale* no todos los esporozoítos alcanzan directamente el estadio de merozoíto. Existe una forma de latencia llamada hipnozoíto (Figura 1.6) que actúa como reservorio de la malaria en el tejido hepático y genera infecciones recurrentes (Garrido-Cardenas et al., 2019; Imwong et al., 2007; Wells et al., 2010). Se ha hipotetizado que la diferenciación se debe a las condiciones microambientales del hepatocito que, gracias a la constante comunicación entre el esporozoíto y la célula hospedadora, se activan cambios postranscripcionales, modificaciones epigenéticas y del fosfoproteoma que dan como resultado una reducción sustancial del metabolismo celular de *Plasmodium* (Zanghi & Vaughan, 2021).

Una vez los esquizontes han madurado deben migrar de nuevo al sistema circulatorio. En primer lugar, se produce la lisis de la vacuola parasitófora. Seguidamente, la membrana celular se desestabiliza facilitando su separación del citoesqueleto y la degradación de este gracias a la catálisis de diversas proteasas. Los merozoítos abandonan en grupos el medio interno envueltos en la membrana plasmática de la célula que hospedaban. Estas estructuras se las conoce como merosomas y en cada una puede haber hasta cientos de merozoítos. Los merosomas no se desintegran hasta que no llegan a la circulación pulmonar (Tan & Blackman, 2021).

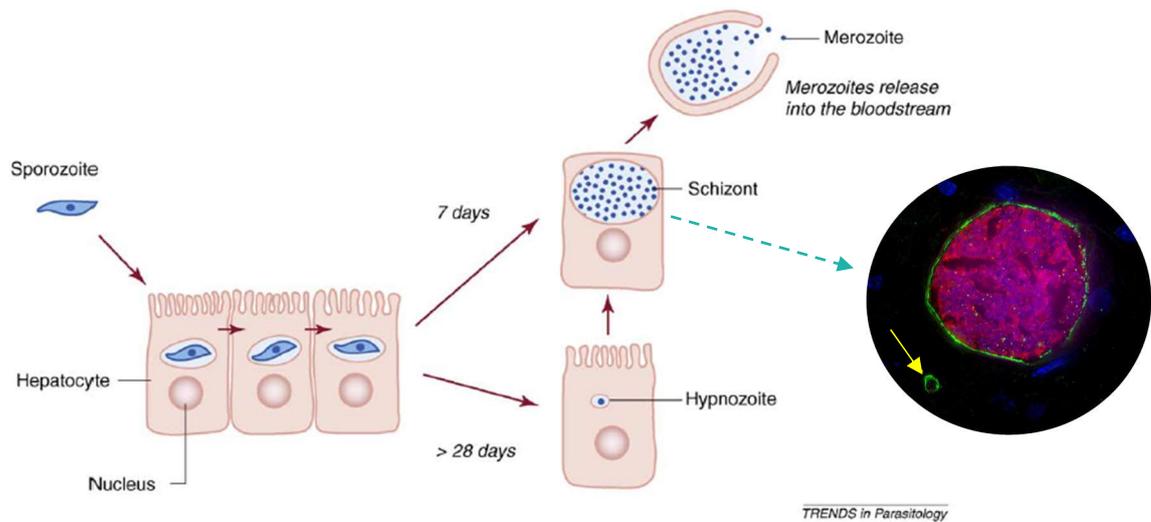


Figura 1.6. Esquema de las dos rutas que pueden seguir esporozoitos durante su paso por el hígado (Wells et al., 2010). La flecha discontinua señala una imagen de inmunofluorescencia de un hepatocito humano de un hígado quimérico de ratón infectado con *P. vivax*. Anticuerpos fluorescentes rojos se ligaron a HSP70 para resaltar el citoplasma del esporozoito. Mediante anticuerpos fluorescentes verdes ligados a ISU4 se ha teñido la membrana de la vacuola parasitófora y el ADN nuclear está representado en azul. Se distingue una gran vacuola con esquizontes multinucleados y un hipnozoito señalado por la flecha amarilla (Zanghi & Vaughan, 2021).

- **Etapa intraeritrocítica o eritrocítica**

La reproducción de los plasmodios dentro de los glóbulos rojos es la fase más importante para la clínica de la enfermedad ya que es la causante de la sintomatología.

El proceso de invasión por parte de los merozoitos comienza con el reconocimiento de un tipo celular específico de eritrocito, los reticulocitos o eritrocitos jóvenes, a diferencia de *P. falciparum* que infecta cualquier glóbulo rojo (Schä et al., 2020). Esta selección diferencial se debe a que *P. vivax* presenta varias proteínas de unión específicas en su superficie pertenecientes a la familia PvRBP (*Plasmodium vivax Reticulocyte Binding Protein*), conocidas coloquialmente como Duffy. Las proteínas PvRBP2b y PvRBP2a actúan como ligandos del receptor de transferrina 1 (CD71 o Tfr1), también llamado antígeno Duffy, y del transportador de aminoácidos CD98 respectivamente. Estos receptores se expresan únicamente a altas concentraciones en los eritrocitos en estadio de reticulocito (Gruszczuk et al., 2018; Malleret et al., 2021). Mientras ocurre el reconocimiento, el merozoito se deshace de su recubrimiento externo y se posiciona correctamente para penetrar en el reticulocito en tan solo 20 segundos, (Gilson & Crabb, 2009). Durante los minutos posteriores, se vuelve a formar una vacuola parasitófora en donde los merozoitos experimentan su metamorfosis al estado de trofozoito.

Los trofozoitos, al inicio de su desarrollo presentan una característica forma de anillo que tras varias divisiones se pierde. Los trofozoitos generan entre ellos una vacuola digestiva para extraer la hemoglobina de la célula hospedada. Tras esta fase comienza una nueva esquizogonia que da lugar a esquizontes que se nutren de la hemoglobina digerida (Cowman & Crabb, 2006). Una vez maduros, lisan la vacuola parasitófora. Inmediatamente después se produce la ruptura de la membrana del reticulocito como consecuencia de la permeabilización debida a la acción de mecanismos dependientes calcio, fosforilaciones y proteasas. La esquizogonia intraeritrocitaria es bastante menos

productiva que la exoeritrocitaria por el inferior tamaño celular y la restricción de nutrientes que sufren los parásitos en los reticulocitos, pero sucede más rápidamente (Silvie et al., 2008).

La mayoría de los merozoítos liberados volverán a invadir los reticulocitos para establecer otro ciclo reproductivo asexual. Sin embargo, algunos de ellos, se diferenciarán en gametocitos con el fin de iniciar una etapa de reproducción sexual.

1.4.1.2. Fase sexual: hospedador invertebrado

Los esquizontes que van a dar lugar a los merozoítos que, posteriormente, tras volver a invadir un reticulocito se diferenciarán en gametocitos son determinados previamente al comienzo de su ciclo esquizogónico eritrocitario. Todos los esquizontes resultantes van a desarrollar una gran batería de transcritos y proteínas específicas que gradúan la diferenciación a gametocito.

La maduración de los gametocitos en *Plasmodium vivax* ocurre en el interior del glóbulo rojo mientras recorre libremente todo el sistema circulatorio y es durante esta etapa cuando se define el sexo de cada gametocito. Tanto como para el gametocito femenino como para el masculino, el parásito adquiere una forma ovalada y de gran tamaño que ocupa casi totalmente el volumen del reticulocito. La viabilidad de los gametocitos en los humanos es de tres días y no ocurre su activación o gametogénesis hasta que no son ingeridos por algún mosquito.

Una vez ha ocurrido la transmisión a *Anopheles*, los gametocitos se quedarán alojados en el intestino medio donde la eclosión de las células sanguíneas y la gametogénesis se va a activar en respuesta a la caída de temperatura y la subida de pH, entre otros factores. (Bousema & Drakeley, 2011; Garrido-Cardenas et al., 2019). Durante la maduración de los gametocitos masculinos (microgametocitos) se inician múltiples replicaciones del genoma que multiplica los 14 cromosomas iniciales. Mientras tanto, ocurre la exflagelación, un proceso por el cual surgen ocho filamentos flagelados a donde migra un núcleo con 14 cromosomas a cada uno de ellos dando de este modo por finalizada la transformación a microgameto. En cuanto al desarrollo del macrogametocito a macrogameto se produce una única exflagelación. En ambos casos la carga genética es haploide ya que en los merozoítos también lo es.

Para la fertilización, el microgameto se desplaza gracias a los flagelos hasta el macrogameto y una vez se reconocen, el microgameto fusiona uno de sus núcleos en el del macrogameto. Alrededor de 24 horas tras la formación de los ooquistos (cigoto), estos penetran en el tejido epitelial del intestino y durante los tres días posteriores la carga genética vuelve de un estado diploide a uno haploide gracias a divisiones meióticas. Las cuatro nuevas células haploides se conocen como oocistos que, después de reorganizar su genoma, van a realizar divisiones nucleares para generar esporozoítos en un proceso similar a la esquizogonia exoeritrocitaria. Una vez liberados al medio externo, los esporozoítos se trasladan a los conductos de las glándulas salivares a través del hemocele del mosquito (Bray, 1982; Sinden, 2015). Y es aquí, donde *Plasmodium* puede volver a ser inoculado en un hospedador vertebrado y reiniciar el ciclo.

1.4.2. Respuesta inmunológica y evasión de la inmunidad

El paludismo es considerado como uno de los mayores fenómenos causantes de presión por selección en humanos que durante milenios ha ido modulando el sistema inmune. La respuesta del sistema inmunológico a *Plasmodium* es bastante intrincada y continúa siendo un área con grandes lagunas. Esto se debe a la enorme variabilidad antigénica y a las rápidas adaptaciones del parásito a la respuesta defensiva del hospedador. Y es que, la historia de la evolución del sistema inmunológico humano es también la historia evolutiva de la malaria. (Castro-Salguedo et al., 2021; Crompton et al., 2014).

A diferencia de otras enfermedades infecciosas, no se produce inmunidad esterilizante de manera natural debido a la existencia de mecanismos de evasión. Ello posibilita infecciones recurrentes a lo largo de la vida de personas que habitan en zonas endémicas. Como consecuencia, la recurrencia acaba por modular la respuesta inmunitaria del cuerpo ante el hospedaje de *Plasmodium* (Djokic et al., 2021; Fowkes et al., 2016). Además, está comprobado que en regiones de alta prevalencia la inmunidad humoral es más liviana que en zonas con incidencias bajas o que han erradicado la enfermedad recientemente debido a que las infecciones continuas atenúan la actividad de la inmunidad (Rogers et al., 2021).

En la creación de la inmunidad los anticuerpos cumplen un papel fundamental. Pese a que cualquier estadio del ciclo de vida puede activar la respuesta inflamatoria y la producción de inmunoglobulinas, las formas de la etapa intraeritrocítica y los esporozoítos parecen poseer los antígenos más efectivos para adquirir inmunidad gracias a que desatan algunos mecanismos como la activación de muerte mediada por neutrófilos, opsonización o la inhibición celular dependiente de anticuerpos. Durante el transcurso de los parásitos por la piel y el hígado no se genera una respuesta innata lo suficientemente fuerte para activar la inmunidad adaptativa (Cowman et al., 2016; Khan et al., 2012).

En los momentos iniciales de la incursión de los esporozoítos en la piel, las células dendríticas (DCs) y los linfocitos T reguladores se movilizan a la zona de la picadura. Sin embargo, tras varios minutos, la movilidad de las DCs se reduce al igual que la expresión del MHC-II (complejo principal de histocompatibilidad II) en las células presentadoras de antígenos. Al cabo de pocas horas, disminuyen significativamente su población en los nódulos linfáticos de la piel. Este fenómeno se produce como consecuencia de la manipulación por parte de los parásitos de los linfocitos T reguladores ya que infravaloran el riesgo y dan lugar a una respuesta tolerogénica de las células presentadoras de antígenos y especialmente de las DCs (da Silva et al., 2012). Si se reduce la actividad de las DCs también se reduce la síntesis de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias como IL-12 que debería inducir la acción de linfocitos *Natural Killer* (NK), alojados en diferentes tejidos como el hepático, que mediante la síntesis de IFN- γ impulsa la fagocitosis por parte de macrófagos y neutrófilos y promueve la acción de linfocitos T CD4⁺ y su diferenciación en T helper 1. Estos son, en condiciones normales, el puente de conexión entre la inmunidad innata con la adaptativa (Djokic et al., 2021).

Además, los parásitos, presentan otra estrategia opuesta basada en la síntesis de grandes cantidades de citoquinas ortólogas con las humanas que interfieren con el desarrollo normal de células

CD4+ hasta linfocitos T de memoria. Esto se debe que, ante concentraciones elevadas de citoquinas, las CD4+ aumentan su actividad, pero también su tasa de muerte celular impidiendo la adaptación de sus receptores a los antígenos de los plasmodios (Sun et al., 2012). Por tanto, ante futuras reinfecciones, la vía adaptativa celular T- dependiente queda, en gran medida, desechada.

Cuando alcanzan el hígado, los esporozoítos son capaces de atravesar las células de Kupffer (macrófagos diferenciados que habitan en el endotelio hepático) sin ninguna respuesta efectiva por su parte. La clave de este hecho reside en la proteína circumesporzoíto (CSP) que reconoce específicamente a la lipoproteína receptora LRP-1 expresada en la membrana de las células de Kupffer. Esta unión desencadena, mediante cascadas de señalización, la reducción de generación de ROS por parte de NADPH oxidasas. De esta manera, el parásito evita un excesivo estrés oxidativo que provoque su muerte y posibilita su emigración al medio externo en dirección a los hepatocitos (Usynin et al., 2007).

Tras la eclosión de los merozoítos de los hepatocitos comienzan un nuevo recorrido en busca de eritrocitos saturados y con mayores niveles de hemoglobina que los lleva desde el hígado hasta los pulmones dentro de los anteriormente mencionados merozomas. Durante el traslado evaden el reconocimiento por parte del sistema inmune gracias a que los parásitos impiden la exposición de la fosfatidilserina presente en la bicapa del merozoma (proveniente originalmente de la membrana del reticulocito infectado) hacia el exterior dado que funcionan como una señal de fagocitosis (Ménard et al., 2013).

Durante la fase eritrocitaria, a la inmunidad celular le corresponde el papel protagonista. En infecciones por *P. vivax* los linfocitos T CD8+ son capaces identificar y eliminar el reticulocito y a los protozoos hospedados gracias a los MHC-I que, pese al secuestro del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi por parte del parásito, son capaces de expresarse en la superficie de la membrana plasmática del glóbulo rojo (Burel et al., 2016; Junqueira et al., 2018). En vías a crear una vacuna contra *P. vivax*, potenciar el rol de los linfocitos citotóxicos podría ser una buena estrategia. Sobre todo, dadas las observaciones realizadas respecto a la reducida activación de células B de memoria y de células plasmáticas longevas que no llega a ser eficiente debido a que la adquisición de especificidad de los BCRs (receptores de los linfocitos B) necesitan una serie de contactos sucesivos con linfocitos T CD4+, en especial de tipo helper foliculares, cuyas poblaciones son mermadas por los mecanismos parasitarios de evasión (Rogers et al., 2021).

Aunque la etapa de desarrollo del gametocito no provoca ningún clínica se ha observado algunas respuestas por parte del sistema inmune. La inmunidad innata consigue reducir la concentración de gametocitos en cierta medida y además se producen anticuerpos anti-gameto que reducen la transmisión. Estos anticuerpos se adhieren a proteínas superficiales consiguiendo disminuir considerablemente la capacidad reproductiva y transmisibilidad a otros hospedantes (Bantuchai et al., 2022). La generación de inmunidad bloqueante de la transmisión se ha planteado como una posible estrategia para el desarrollo de vacunas. De esta manera se inhibe la reproducción y la transmisión a otros sujetos.

A lo largo de la vida de una persona que habite en zonas de malaria endémica acabará por desarrollar cierta inmunidad adquirida resultado de infecciones por parte de distintas cepas de *Plasmodium* que incluso podría llegar a aportar inmunidad cruzada con otras cepas.

1.5. Tratamiento y control

1.5.1. Insecticidas y fármacos antimaláricos

Entre las medidas de control empleadas hasta la fecha en la lucha contra la malaria la más efectivas has sido las dirigidas contra el vector. La utilización de mosquiteras impregnadas con insecticidas de acción residual (ITNs), la fumigación y el uso de espray de acción residual (IRS) en las viviendas en las zonas endémicas han sido y siguen siendo intervenciones básicas. Los insecticidas que actualmente son recomendados por la OMS para su uso se dividen en dos grupos: piretroides (Permetrina, Deltametrina o Etofenprox) y no piretroides (DDT, Propoxur o Fenitrotión). Los primeros actúan modulando los canales iónicos de sodio dependientes de voltaje del sistema nervioso de *Anopheles* y los de tipo no piretroide comprenden un grupo amplio con dianas alternativas (Greenwood et al., 2022; Pryce et al., 2022). Su mayor limitación es que la eficacia en espacios exteriores es muy limitada y, sobre todo, las resistencias que se han desarrollado en especial hacia los piretroides. Las región con más resistencias es la zona del Gran Mekong (World Health Organization, 2013).

Otro elemento fundamental es la administración de fármacos antimaláricos, que se han usado desde hace siglos para intentar reducir y eliminar la carga parasitaria en la población. El más destacado es la artemisinina, que es el más efectivo para eliminar de la sangre a los plasmodios. Aunque, actualmente lo más normal son terapias combinadas con otras sustancias para aumentar la eficacia. Hasta los 90 se permitía también el uso de la cloroquina y la sulfadoxina-pirimetamina como antimaláricos, pero se alcanzaron tasas muy altas de resistencia que los descartaron como tratamientos factibles. Asimismo, la artemisinina sufre también de fenómenos de resistencia bastante graves en Asia, principalmente. Por ello, hay programas de monitorización y vigilancia de cepas resistentes por parte de la OMS y de los gobiernos de países endémicos. Otro tratamiento es la primaquina que, por ahora, es el único medicamento capaz de eliminar con eficacia los hipnozoítos de *P. vivax* y *P. ovale* evitando de este modo las infecciones recurrentes que ambas especies generan (Clain et al., 2019; World Health Organization, 2021a).

Otras acciones, como la modificación genética de los mosquitos para inducir la esterilidad o impedir el desarrollo de embriones femeninos tendrán un impacto importante en la lucha contra la malaria y otras enfermedades como el zika una vez se permita su uso a gran escala (Yao et al., 2022). Además, el diagnóstico precoz también está siendo esencial, de manera indirecta, en la reducción del número de casos a nivel mundial.

1.5.2. Vacunas

Las resistencias que han aparecido tanto a los insecticidas como a los medicamentos tradicionales hacen que las vacunas antimaláricas constituyan hoy en día la opción más realista y

robusta en vías a cumplir los objetivos de reducción de la carga y de erradicación de la malaria. Pero su desarrollo supone un gran reto para la comunidad científica.

Desde la creación de la primera vacuna estas han demostrado ser la opción más viable para hacer frente a epidemias y pandemias. Aplicando la vacunación, concretamente sobre la malaria, se persigue erradicarla de zonas con baja transmisión, complementar los tratamientos farmacológicos y la acción de otras vacunas para reducir la posibilidad de génesis de nuevas resistencias (Bousema et al., 2011).

A la hora de desarrollar una vacuna es de vital importancia tener en cuenta la modulación del sistema inmunológico por parte de los parásitos y la citada variabilidad antigénica para buscar y seleccionar proteínas cuyos dominios y secuencias se encuentren conservados en las múltiples cepas existentes alrededor del planeta y así poder utilizarlas como epítomos eficaces en regiones geográficas extensas. Otro factor importante es aplicar la vacunación contra etapas concretas del desarrollo del parásito cuando su parasitemia es menor. Esta estrategia es conocida como cuello de botella ya que bloquear el ciclo de vida de unos pocos parásitos evita que se reproduzcan y aumenten su número facilitando y reduciendo de esta manera el trabajo al sistema inmune (Smith et al., 2014).

En general, las vacunas propuestas se centran en responder ante antígenos que solo están presentes en una etapa del ciclo biológico (Cowman et al., 2016) y se focalizan en intentar generar inmunidad celular, humoral y/o bloquear la transmisión a través de las conocidas como vacunas interruptoras de la transmisión (VIMT) entre las que se distingue cuatro tipos o conjuntos (Alonso et al., 2011):

- **Vacunas antivectoriales:**

Actúan contra moléculas de los mosquitos necesarias para el correcto desarrollo de los protozoos. Es un concepto reciente con poco desarrollo hasta ahora que se basa en el conocimiento previo del efecto inmunomodulador de algunos componentes de la saliva de mosquitos que son de vital importancia para el establecimiento de la infección. Un ensayo clínico demostró que una vacuna con componentes proteicos de la saliva es segura e inmunogénica (Manning et al., 2020).

- **Vacunas pre-eritrocíticas**

Pretenden reducir la morbilidad, mortalidad y la gravedad de la enfermedad generando protección contra antígenos superficiales presentes en esporozoítos con la intención de evitar en la medida de lo posible la infección de hepatocitos .

Actualmente y de forma reciente, octubre de 2021, la OMS ha aprobado por primera vez una fórmula contra la malaria. Pero tiene una eficacia bastante limitada del 40-30%, necesita una aplicación total de 4 dosis y actúa únicamente contra *P. falciparum*. Su nombre es *Mosquirix* (RTS,S/AS01) y se basa en responder y bloquear la anteriormente mencionada proteína circumsporocítica (CSP), esencial en la infección de los hepatocitos (Penny et al., 2016), gracias a una solución que contiene el adyuvante AS01 y una molécula conjugada (RTS,S) formada por varias fracciones de CSP y la proteína S de la hepatitis B (aporta un elevado potencial inmunogénico) (Batista-Duarte et al., 2014; Duffy & Patrick Gorres, 2020).

Otra vacuna pre-eritrocítica que se encuentra ya en los ensayos clínicos es la llamada PfSPZ que consiste en esporozoítos de *P. falciparum* atenuados mediante radiación, la cual ha demostrado aportar mayor protección que *Mosquirix* ya que contiene, no solo CSP, si no también otros muchos antígenos. Este quizás sea uno de los puntos clave, crear vacunas con múltiples antígenos para cubrir un amplio abanico de epítomos que incluso permita generar anticuerpos contra distintas fases y/o etapas (Garrido-Cardenas et al., 2019). Además, también existe la posibilidad de la atenuación química mediante la aplicación de medicamentos antimaláricos in vitro o incluso a través de técnicas de ingeniería genética como CRISPR/Cas9, ZFNs, recombinasas o enzimas de restricción que modifiquen determinados clusters de genes que sintetizan para proteínas necesarias en el establecimiento de la infección (Singer & Frischknecht, 2017).

- **Vacunas eritrocíticas**

Pretenden reducir la morbilidad, mortalidad y la gravedad de la enfermedad generando protección contra antígenos superficiales presentes en las formas eritrocíticas, como los merozoítos, con la intención de bloquear la invasión de glóbulos rojos.

Las vacunas de etapas eritrocíticas son incluso más difíciles de desarrollar por el hecho de que el número de proteínas con antígenos inmunogénicos son más reducidos, presentan altos niveles de polimorfismo a lo que se le suma la existencia de múltiples proteínas con función redundante y que no hay ningún momento de cuello de botella. Sin embargo, se han conseguido identificar varias proteínas apicales y de la superficie del merozoíto con potencial para el desarrollo de vacunas (Duffy & Patrick Gorres, 2020).

Una de las candidatas para vacuna eritrocítica es NYVAC-PF7, también para *P. falciparum*. Pero a diferencia de otras candidatas no solo se centra en un único antígeno sino en varios presentes en las demás etapas y fases del ciclo de vida. Incluye, entre otras, la proteína CSP (etapa pre-eritrocítica), MSP1 (etapa eritrocítica) y Pfs25 (fase sexual). De esta manera no se ve autolimitada por los posibles polimorfismos de los antígenos y actúa a todos los niveles posibles del ciclo biológico. En el caso de *P. vivax* todavía no ha habido ninguna fórmula que haya conseguido alcanzar la fase de estudios clínicos (Garrido-Cardenas et al., 2019).

- **Vacunas de etapas sexuales**

Promueven el desarrollo de anticuerpos contra antígenos de formas de la etapa sexual con la intención de interrumpir la fertilización y bloquear la transmisión. A diferencia de las dos anteriores, no persiguen evitar la enfermedad. Su objetivo únicamente es prevenir la transmisión y el contagio de individuos ajenos al inoculado con el suero si este se ve infectado.

En este tipo de vacunas se incluyen antígenos contra proteínas superficiales de las etapas de la fase sexual. Se pretende interrumpir la transmisión de la malaria por parte del vector al inducir anticuerpos que eliminen los parásitos mientras están presentes en la sangre extraída como alimento por *Anopheles*. Para aquellas especies de *Plasmodium* que presentan etapas de dormancia en el hígado van a ser una herramienta fundamental para reducir la carga en las regiones endémicas.

Existen diversas proteínas superficiales diana para el desarrollo de estas vacunas como Pfs230, Pfs48/45 o Pfs25 en el caso de *P. falciparum* y Pvs47, Pvs48/45 o Pvs25 en el caso de *P. vivax* (Garrido-Cardenas et al., 2019.; Coelho et al., 2019; Duffy, 2021).

Desde hace tiempo hay investigaciones centradas en el diseño de vacunas recombinantes para Pvs25. Los resultados obtenidos por los diferentes ensayos han sido diversos y algunos negativos. Uno de los motivos fundamentales por el que la eficacia de la vacuna no es la deseada, es la dificultad de crear proteínas recombinantes fieles a los originales mediante clonaje ya que el plegamiento proteico no va a ser idéntico entre *P. vivax* y la especie usada como biorreactor, dada que la abundancia de puentes disulfuro impide sintetizar estructuras totalmente fieles a la original. A ello se le suma que la inmunogenicidad de Pvs25 por sí sola no es lo suficientemente robusta (Chaurio et al., 2016).

Por lo tanto, es importante la selección adecuada de adyuvantes y plataformas ya que en estos va a recaer la función de activación de la respuesta inmunológica y van a ser los responsables de que la titulación de anticuerpos en sangre generada por la vacuna sea óptima y efectiva. Ya se han obtenido importantes logros para el ortólogo de Pvs25 en *P. falciparum*, Pfs25, mediante el uso de plataformas que consisten en la conjugación a los epítomos de sustancias moleculares con elevador poder inmunogénico como el toxoide tetánico, la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* o diversas nanopartículas que se han planteado como soluciones con mejor tolerabilidad y resultados que los adyuvantes testados hasta el momento, dado que estos o no llegaban a ser efectivos o provocaban reacciones adversas (Duffy, 2021; Miura et al., 2007).

1.6. Pvs25

El desarrollo de este estudio se va a basar precisamente en la caracterización molecular de una de las proteína mencionadas anteriormente, Pvs25. Esta se expresa en altas concentraciones en la superficie de los ooquistos de *P. vivax* y que al ser utilizada como antígeno para anticuerpos bloquea eficazmente la transmisión a otros hospedadores vertebrados (Garrido-Cardenas, et al., 2019).

Pvs25 es la proteína superficial con mayor producción durante las etapas en las que se expresa. Su función parece ser esencial para la supervivencia de los parásitos en el intestino de los mosquitos. Su estructura es descrita como un prisma triangular con cuatro dominios EGF-like que se anclan a la célula mediante glicosilfosfatidilinositol en la región C-terminal. El gen *pvs25* se ha comprobado que tiende a presentar polimorfismos a largo de su secuencia que provoca cambios en la estructura proteica (Chaurio et al., 2016; Saxena et al., 2005). Este fenómeno da lugar a diferentes haplotipos para Pvs25 que han sido relacionados con las variantes de la proteína CSP por una aparente correlación con consecuencias en la biología de la transmisión, el nivel de parasitemia y en la clínicas que provoca la enfermedad (González-Cerón et al., 2019).

2. Objetivos

En el proyecto llevado a cabo en este trabajo de fin de grado se plantean los siguientes objetivos:

- 1- Diseñar cebadores específicos que nos permitan la extracción y caracterización de la secuencia del gen *pvs25* de *P.vivax*.
- 2- Analizar las secuencias de *pvs25* e identificar los haplotipos de cada muestra y relacionarlos con las variantes de CSP obtenidas anteriormente en otros estudios.
- 3- Predecir las cadenas peptídicas que conforman los posibles determinantes antigénicos.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Muestras biológicas

El material de partida consistió en ocho muestras (nombradas como M1, M2...) de sangre seca en papel de filtro provenientes de habitantes de la zona sur de México diagnosticados previamente de malaria.

3.1.2. Cebadores para la amplificación de ADN

Para la identificación de la presencia de *P. vivax* en las muestras analizadas se llevaron a cabo reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) usando los cebadores descritos en Rubio y colaboradores (1999). Para aislar el gen *pvs25* se han empleado cebadores de diseño propio sintetizados por la empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT). A continuación, se muestran los oligonucleótidos cebadores utilizados:

Tabla 3.1. Cebadores utilizados en las distintas reacciones de PCR.

Cebador	Secuencias de los oligos (5' -> 3')	Diseño
UNR	AGTGTGTATCCAATCGAGTTTC	Rubio et al., 1999
PLF	GACGGTATCTGATCGTCTTC	
VIR	AGGACTTCCAAGCCGAAGC	
Pvs25-For1	CAACTCCACTTAGCCAAAATGAACTCC	Diseñados en el laboratorio
Pvs25-Rev1	CGAAACTTGCGCAGCTAAGCAGCG	
Pvs25-For2	ATGAACTCCTACTACAGCCTCTCG	
Pvs25-Rev2	CGTACGTCATATAAGTGCAGAACTTGC	

3.1.3. Kit de extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras biológicas se llevó a cabo mediante el kit GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.1.4. Kit de PCR

Para llevar a cabo las PCRs se utilizó el kit Terra PCR Direct Polymerase Mix (Takara Bio).

3.1.5. Kit de purificación de productos de PCR

Para eliminar impurezas de los productos de PCR se empleó el kit High Pure PCR Product Purification kit (Roche).

3.2. Métodos

3.2.1. Análisis bioinformático de las secuencias de *pvs25* en las cepas de *P. vivax*

Para el diseño de los cebadores Pvs25-For1, Pvs25-Rev1, Pvs25-For2 y Pvs25-Rev2 (Tabla 3.1) hizo falta estudiar la conservación del gen en las cepas secuenciadas alrededor del mundo. Para ello se buscó, en primer lugar, la secuencia del *pvs25* en la cepa de referencia, Salvador I, depositada en la base de datos GenBank incluida en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Partiendo

de esta secuencia se realizó un alineamiento mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) usando la base de datos *Whole-genome shotgun contigs* (wgs) en NCBI para obtener los *contigs* del resto de cepas secuenciadas. De los resultados arrojados se seleccionaron la propia secuencia del gen como cien nucleótidos de las regiones UTR tanto en 5' como en 3' de las cepas disponibles.

Posteriormente, con todas estas secuencias se llevó a cabo un alineamiento múltiple en Clustal Omega que es una herramienta proporcionada por el EMBL-EBI (*European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute*) para compararlas (Figura 4.1).

También se alineó en Clustal Omega las secuencias proteicas de Pvs25 de las distintas cepas (Figura 4.3) que fueron traducidas a partir de las secuencias de ADN mediante la herramienta *Translate* en Expsy desarrollado por el SIB (*Swiss Institute of Bioinformatics*).

3.2.2. Extracción del ADN

Se tomó una sección de aproximadamente un centímetro cuadrado de cada una de las muestras en papel de filtro de sangre seca para, posteriormente, extraer con GeneJET *Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit* el ADN. La extracción consistió en colocar dicha sección de papel en un tubo de microcentrífuga al que se le añadió el buffer PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) y tras incubar unos minutos se adicionó la proteinasa K. Después de incubar a 56 °C diez minutos, mientras se realizaban agitaciones periódicas cada 2 min, se procedió a lavar los restos con etanol y dos buffers de lavado haciendo uso de columnas cromatográficas y varias secuencias de centrifugación. Finalmente, el ADN obtenido se eluyó en 50 µl de buffer de elución, y se conservó a -20 °C.

3.2.3. Cuantificación de la cantidad de ADN extraída

Posteriormente a la extracción del material genético se cuantificó la concentración de ADN. Para ello se han utilizado dos métodos:

- Medida en NanoDrop LITE: se cuantifica directamente sobre la muestra. Mediante medida de la absorbancia a 260 nm el NanoDrop calcula la concentración de ADN en ng/µL. Además, se realizó también otra lectura a 280 nm para calcular la relación de la absorbancia 260 nm/280 nm que determina la calidad y pureza de la muestra. Los valores óptimos de la relación están entorno 1,8 y 2.
- Medida en fluorímetro Qubit: se cuantifica el ADN mediante el uso de colorantes fluorescentes intercalantes que, únicamente, emiten señal cuando se unen a ADN evitando posibles lecturas sobreestimadas por contaminaciones. Se utilizó un kit que incluía tanto el Qubit reagent como el buffer. Previo a las medidas fue necesario preparar un mix que contenía 199 µL del buffer y 1 µL del Qubit reagent. Posteriormente, a 190 µL de dicha disolución se le adicionó 8 µL de agua y 2 µL de la muestra de ADN a medir. Tras agitar con vortex y dejar incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos, se procedió a realizar la lectura.

3.2.4. PCR para la detección de *Plasmodium vivax* en las muestras analizadas

En primer lugar, a través de los cebadores descritos por Rubio y colaboradores (1999) (Tabla 3.2), se determinó la presencia de *Plasmodium sp.* mediante una reacción de PCR que amplifica la región del ADN codificante del ARN de la unidad ribosomal pequeña 18S usando como cebadores PLF (universal) y UNR (específica del género *Plasmodium*) que dan como resultado un producto de 783 pares de bases.

El producto de la primera amplificación de PCR se usó para llevar a cabo una reamplificación utilizando los cebadores PLF y VIR que amplifican específicamente parte del gen *vir* de la especie *P. vivax* para, de esta manera, identificar las muestras con presencia de esta especie. Los amplicones generados tienen una longitud total de 499 pb.

Tabla 3.2. Lista de oligonucleótidos cebadores usados para identificar a *P.vivax*

Reacción	Primers	Secuencia (5'->3')	Fuente
Amplificación <i>Plasmodium sp.</i>	Forward PLF (<i>Plasmodium</i>)	AGTGTGTATCCAATCGAGTTTC	(Rubio et al., 1999)
	Reverse UNR (Universal)	GACGGTATCTGATCGTCTTC	
Reamplificación <i>P. vivax</i>	Forward PLF (<i>Plasmodium</i>)	AGTGTGTATCCAATCGAGTTTC	
	Reverse VIR (<i>P. vivax</i>)	AGGACTTCCAAGCCGAAGC	

Las condiciones programadas en el termociclador para la realización de las dos primeras reacciones de PCR son las siguientes (tabla 3.3; tabla 3.4):

Tabla 3.3. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación con los cebadores PLF y UNR.

Amplificación <i>Plasmodium sp.</i>			
Etapa	Nº de ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)
Desnaturalización inicial	1	94	300
Desnaturalización	40	94	45
Hibridación		60	45
Elongación		72	60
Elongación final	1	72	600

Tabla 3.4. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación con los cebadores PLF y VIR.

Reamplificación <i>Plasmodium vivax</i>			
Etapa	Nº de ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)
Desnaturalización inicial	1	94	300
Desnaturalización	40	94	30
Hibridación		60	30
Elongación		72	30
Elongación final	1	72	600

3.2.5. Diseño de cebadores

A partir del alineamiento de las secuencias obtenidas (Figura 4.1.) en GenBank se diseñó un set de cebadores para intentar aislar y amplificar *pvs25* de las muestras biológicas.

En concreto, se han generado dos cebadores en la región 5' y otros dos en la región 3' mediante la herramienta *Primer designing tool* en NCBI que aúna el programa de diseño de oligonucleótidos Primer3 y la alineación de secuencias del programa BLAST para asegurar que se escogen cebadores específicos para la secuencia que se pretende amplificar. Los parámetros se ajustaron para que se generasen oligonucleótidos cebadores o primers menores a 28 pares de bases y con un rango de temperatura de anillamiento entre 57 °C hasta 68 °C con temperatura óptima a 60 °C (tabla 4.2).

3.2.6. Aislamiento del gen *pvs25*

3.2.6.1. Amplificación de *pvs25*

Para el aislamiento del gen *pvs25* se utilizaron inicialmente la combinación de cebadores más externos diseñados (Pv-For1 y Pv-Rev1) (Tabla 4.2) con los que se hizo una amplificación inicial aplicando las condiciones descritas en la tabla 3.5 para la PCR:

Tabla 3.5. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación con los cebadores Pv-For1 y Pv-Rev1 y la reamplificación con Pv-For2 y Pv-Rev2.

Amplificación y reamplificación de <i>pvs25</i>			
Etapa	N.º de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)
Desnaturalización inicial	1	94	300
Desnaturalización	30	94	45
Hibridación		55	45
Elongación		72	90
Elongación final	1	72	600

Fue necesario una reamplificación utilizando como molde el producto de la primera amplificación aplicando una dilución 1/10 en todas las muestras y usando la combinación de cebadores más internos (Pv-For2 y Pv-Rev2). Las condiciones ajustadas en el termociclador fueron similares en ambas amplificaciones (tabla 3.5).

3.2.6.2. Gel de electroforesis de ADN

Para visualizar los resultados obtenidos de la PCR se realizó una electroforesis en un gel de agarosa 1% con un tampón TAE 1x (40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA a pH 8'3). El volumen de muestra usado fue 2 µL junto 8 µL de TE (1 mM EDTA y 10 mM Tris-HCl; pH 8) y otros 2 µL de tampón de carga (25 mM Tris-HCl; pH 6'8 2% (p/v); SDS 30% (v/v); Glicerol; Azul de bromofenol) que tras mezclarlos se cargaron en los pocillos del gel. En el primero de ellos se colocó 5 µL del marcador *500 bp DNA Ladder* (Dye Plus).

Durante 35 minutos se dejó correr el gel de agarosa con una diferencia de potencial de 80 voltios. Posteriormente, se tiñó en bromuro de etidio durante 15 min y tras lavarlo se realizó la lectura del resultado en el equipo G:Box SYNGENE (Figura 4.4).

3.2.6.3. Purificación del producto de PCR

Los productos de la reamplificación se purificaron usando el kit *High Pure PCR Product Purification* kit (Roche). A los productos de PCR se les adicionó 500 µL del *Binding Buffer* y fueron centrifugados 60 segundos una vez que se filtró el mix por el *High Pure Filter Tube*. Se descartó el sobrenadante y se le añadió otros 500 µL de buffer de lavado para centrifugar un minuto y se repitió este paso, pero con 200 µL de buffer. Se volvió a descartar el sobrenadante y, finalmente, los productos de PCR fueron eludidos en 50 µL de agua mili-Q para volver a centrifugar otro minuto.

3.2.7. Secuenciación de *pvs25* y análisis de resultados

Para la secuenciación de los productos purificados se usó el método de los didesoxinucleótidos o Sanger. Se utilizó el kit *Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems)* y los cebadores Pvs25-For2 y Pvs25-Rev2 para secuenciar ambas cadenas de cada fragmento de ADN. La secuenciación fue realizada en el servicio de análisis de ácidos nucleicos de los servicios centrales de investigación de la Universidad de Almería. Para la lectura y análisis del cromatograma se usó el programa Chromas 2.6.6.

Las secuencias resultantes fueron ensambladas mediante alineamientos múltiples con las cepas de referencia y también comparando entre ellas en Clustal Omega (Figura 4.5). Del mismo modo, tras traducir en el *Translate Tool* de Expsy la secuencia de ADN a aminoácidos, se alinearon las secuencias para comprobar qué variaciones provocaba en la proteína (Figura 4.6).

3.2.8. Análisis bioinformático de los epítomos de la proteína de Pvs25 como antígeno de la inmunidad humoral

Con el fin de conocer las posibles secuencias de aminoácidos que componen el epítomo se empleó el método de predicción de epítomos de células B *BepiPred Linear Epitope Prediction 2.0* proporcionado por *IEDB Analysis Resource* que se encuentra englobada dentro de la base de datos *Inmune Epitope Database and Analysis resource* (IEDB) que pertenece al *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NAID) de Estados Unidos.

El método BepiPred 2.0 predice los epítomos lineales de péptidos para células B gracias a un algoritmo entrenado con ejemplos de aminoácidos tanto pertenecientes como no a epítomos de proteínas con estructuras cristalográficas conocidas (Jespersen et al., 2017).

El único parámetro que es posible ajustar en BepiPred 2.0 es el *threshold* que se configuró en el valor 0'5.

4. Resultados y discusión

4.1. Extracción y cuantificación del ADN extraído

El material de partida para llevar a cabo este estudio fueron ocho muestras biológicas provenientes de pacientes enfermos de malaria, del sur de México, que habían sido previamente diagnosticados. Tras extraer el ADN con el kit GeneJET *Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit* se procedió a la cuantificación para revisar si la extracción había sido efectiva.

Los dos métodos de cuantificación de ADN utilizados, NanoDrop y Qubit fluorometer, devolvieron resultados similares, aunque los de Qubit fueron algo menores. Los datos de concentración obtenidos en NanoDrop se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4.1. Medida de la concentración de ADN en NanoDrop tras la extracción.

Número de muestra	Concentración (ng/ μ L)
M1	0'3
M2	1'9
M3	2'1
M4	1
M5	0'6
M6	1
M7	1
M8	0'5

4.2. Identificación de *P. vivax*

4.2.1. Reconocimiento PCR de la presencia de *P. vivax*

Para confirmar dicho diagnóstico con herramientas moleculares y para estar seguros de que los parásitos que causaron la enfermedad eran de la especie *P. vivax*, llevamos a cabo dos PCRs.

El objetivo de la primera de ellas era comprobar la presencia de cualquier especie del género *Plasmodium*. Para ello se usaron los cebadores PLF y UNR descritos en la tabla 3.2. Las condiciones de PCR se muestran en la tabla 3.3. Todas las muestras de las que se disponía mostraron resultado positivo.

Por lo tanto, el siguiente paso fue realizar una segunda PCR con los cebadores PLF y VIR para identificar cuantas de las ocho muestras correspondían a *P. vivax*. Los resultados mostraron que de las ocho muestras todas contenían *P. vivax*. Es decir, concuerdan con los datos de prevalencia y contagios publicados por la OMS en sus informes anuales donde se muestra que todos los casos endémicos de México son provocados por *P. vivax*.

4.2.2. Secuenciación de la reamplificación

Se procedió a secuenciar el producto de la reamplificación con los cebadores PLF y VIR en varias muestras. Después se alinearon las secuencias obtenidas con BLAST. Los resultados mostraron una identidad total con el fragmento del gen *vir* que acotan los cebadores. Por lo que, se pudo concluir que el ADN amplificado a partir de las ocho muestras correspondía a *P. vivax*

4.3. Aislamiento de *pvs25*

4.3.1. Diseño de cebadores y análisis de variaciones en las cepas de referencia

Una vez confirmada la presencia de *P. vivax* se procedió a aislar *pvs25* para poder secuenciarlo. Para ello se llevaron a cabo varias PCRs, para lo cual se diseñaron diferentes cebadores (Tabla 4.2).

4.3.1.1. Diseño de cebadores para *pvs25*

En cuanto al diseño de cebadores, es importante estudiar y comprobar la conservación de la secuencia del gen para generar oligonucleótidos cuya capacidad de hibridación no se vea comprometida por variaciones o polimorfismos en las regiones de anillamiento correspondientes.

En primer lugar, se llevó a cabo una búsqueda de la secuencia de *pvs25* en el genoma de la cepa de referencia Salvador I en la base de datos GenBank. No solo se obtuvo la región correspondiente al gen, sino que también se seleccionaron alrededor de cien nucleótidos adyacentes tanto en el extremo 5' y 3'.

En segundo lugar, se llevó a cabo un alineamiento tipo blastn en NCBI entre la secuencia obtenida a partir de Salvador I y los genomas almacenados en la base de datos *Whole-genome shotgun contigs* (wgs). Se identificaron nueve cepas (CMB-I, Mauritania I, North Korean, India VII, Brazil I, NB45, PVW1, PvSY56 y LZCH17209) y sus respectivas secuencias para *pvs25*.

Seguidamente, para comprobar el nivel de conservación entre las secuencias de las distintas cepas, en especial de la región codificante, se realizó un alineamiento múltiple mediante el programa Clustal Omega en el EMBI (Figura 4.1).

PVSY56	CCGTATAACAACCTCCACTTAGCCAAA <u>ATG</u> AACCTCTACTACAGCCTCTTCGTTTTTTTCC	743
Mauritania	-CGAATAACAACCTCCACTTAGCCAAA <u>ATG</u> AACCTCTACTACAGCCTCTTCGTTTTTTTCC	760
Brazil	-CGAATAACAACCTCCACTTAGCCAAA <u>ATG</u> AACCTCTACTACAGCCTCTTCGTTTTTTTCC	727
India	-CGAATAACAACCTCCACTTAGCCAAA <u>ATG</u> AACCTCTACTACAGCCTCTTCGTTTTTTTCC	727
Salvador	-CGAATAACAACCTCCACTTAGCCAAA <u>ATG</u> AACCTCTACTACAGCCTCTTCGTTTTTTTCC	727
CMB-1	-CGAATAACAACCTCCACTTAGCCAAA <u>ATG</u> AACCTCTACTACAGCCTCTTCGTTTTTTTCC	458
LZCH1720	-CGAATAACAACCTCCACTTAGCCAAA <u>ATG</u> AACCTCTACTACAGCCTCTTCGTTTTTTTCC	727
NB45	-CGAATAACAACCTCCACTTAGCCAAA <u>ATG</u> AACCTCTACTACAGCCTCTTCGTTTTTTTCC	727
North	-CGAATAACAACCTCCACTTAGCCAAA <u>ATG</u> AACCTCTACTACAGCCTCTTCGTTTTTTTCC	727
PvW1	-CGAATAACAACCTCCACTTAGCCAAA <u>ATG</u> AACCTCTACTACAGCCTCTTCGTTTTTTTCC	727
	** *****	
PVSY56	TCGTCCAAATTGCGCTAAAGTATAGCAA <u>GCA</u> CCGTACGGTAGACACCATATGCAAAA	803
Mauritania	TCGTCCAAATTGCGCTAAAGTATAGCAAAGGCAGCCGTCACGGTAGACACCATATGCAAAA	820
Brazil	TCGTCCAAATTGCGCTAAAGTATAGCAAAGGCAGCCGTCACGGTAGACACCATATGCAAAA	787
India	TCGTCCAAATTGCGCTAAAGTATAGCAAAGGCAGCCGTCACGGTAGACACCATATGCAAAA	787

Salvador	TCGTCCAAATTGCGCTAAAGTATAGCAAGGCAGCCGTCACGGTAGACACCATATGCAAAA	787
CMB-1	TCGTCCAAATTGCGCTAAAGTATAGCAAGGCAGCCGTCACGGTAGACACCATATGCAAAA	518
LZCH1720	TCGTCCAAATTGCGCTAAAGTATAGCAAGGCAGCCGTCACGGTAGACACCATATGCAAAA	787
NB45	TCGTCCAAATTGCGCTAAAGTATAGCAAGGCAGCCGTCACGGTAGACACCATATGCAAAA	787
North	TCGTCCAAATTGCGCTAAAGTATAGCAAGGCAGCCGTCACGGTAGACACCATATGCAAAA	787
PvW1	TCGTCCAAATTGCGCTAAAGTATAGCAAGGCAGCCGTCACGGTAGACACCATATGCAAAA	787
	***** ** *	
PVSY56	CATGCGGGGAATTTGGCCAGTGTATAGAAAACCCAGACCCAGCACAGGTAACA GTACA	983
Mauritania	CATGCGGGGAATTTGGCCAGTGTATAGAAAACCCAGACCCAGCA AGGTAACATGTACA	1000
Brazil	CATGCGGGGAATTTGGCCAGTGTATAGAAAACCCAGACCCAGCA AGGTAACATGTACA	967
India	CATGCGGGGAATTTGGCCAGTGTATAGAAAACCCAGACCCAGCACAGGTAACATGTACA	967
Salvador	CATGCGGGGAATTTGGCCAGTGTATAGAAAACCCAGACCCAGCACAGGTAACATGTACA	967
CMB-1	CATGCGGGGAATTTGGCCAGTGTATAGAAAACCCAGACCCAGCACAGGTAACATGTACA	698
LZCH1720	CATGCGGGGAATTTGGCCAGTGTATAGAAAACCCAGACCCAGCACAGGTAACATGTACA	967
NB45	CATGCGGGGAATTTGGCCAGTGTATAGAAAACCCAGACCCAGCACAGGTAACATGTACA	967
North	CATGCGGGGAATTTGGCCAGTGTATAGAAAACCCAGACCCAGCACAGGTAACATGTACA	967
PvW1	CATGCGGGGAATTTGGCCAGTGTATAGAAAACCCAGACCCAGCACAGGTAACATGTACA	967
	***** ***** *	
PVSY56	AATGTGGTTGCATTGAGGGCTACACTTTGAAGGAAGACACTTGTGTG TTGATGTATGTC	1043
Mauritania	AATGTGGTTGCATTGAGGGCTACACTTTGAAGGAAGACACTTGTGTGCTTGATGTATGTC	1060
Brazil	AATGTGGTTGCATTGAGGGCTACACTTTGAAGGAAGACACTTGTGTGCTTGATGTATGTC	1027
India	AATGTGGTTGCATT AGGGCTACACTTTGAAGGAAGACACTTGTGTGCTTGATGTATGTC	1027
Salvador	AATGTGGTTGCATTGAGGGCTACACTTTGAAGGAAGACACTTGTGTGCTTGATGTATGTC	1027
CMB-1	AATGTGGTTGCATTGAGGGCTACACTTTGAAGGAAGACACTTGTGTGCTTGATGTATGTC	758
LZCH1720	AATGTGGTTGCATTGAGGGCTACACTTTGAAGGAAGACACTTGTGTGCTTGATGTATGTC	1027
NB45	AATGTGGTTGCATTGAGGGCTACACTTTGAAGGAAGACACTTGTGTGCTTGATGTATGTC	1027
North	AATGTGGTTGCATTGAGGGCTACACTTTGAAGGAAGACACTTGTGTGCTTGATGTATGTC	1027
PvW1	AATGTGGTTGCATTGAGGGCTACACTTTGAAGGAAGACACTTGTGTGCTTGATGTATGTC	1027
	***** ***** *	
PVSY56	AATACAAAATTGTGGAGAAAGTGGCGAATGCATTGTTGAGTAC T TCGGAAACC AAA	1103
Mauritania	AATACAAAATTGTGGAGAAAGTGGCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAA	1120
Brazil	AATACAAAATTGTGGAGAAAGTGGCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACC AAA	1087
India	AATACAAAATTGTGGAGAAAGTGGCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAA	1087
Salvador	AATACAAAATTGTGGAGAAAGTGGCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACC AAA	1087
CMB-1	AATACAAAATTGTGGAGAAAGTGGCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACC AAA	818
LZCH1720	AATACAAAATTGTGGAGAAAGTGGCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAA	1087

NB45	AATACAAAATTTGTGGAGAAAGTGGCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAA	1087
North	AATACAAAATTTGTGGAGAAAGTGGCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAA	1087
PvW1	AATACAAAATTTGTGGAGAAAGTGGCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAA	1087
	***** * ***** * **	
PVSY56	GTGCAGGTTGTCATGCTATTGGCAAAGTCCCCAATCCAGAAGATGAGAAAAAATGTA	1163
Mauritania	GTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTGGCAAAGTCCCCAATCCAGAAGATGAGAAAAAATGTA	1180
Brazil	GTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTGGCAAAGTCCCCAATCCAGAAGATGAGAAAAAATGTA	1147
India	GTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTGGCAAAGTCCCCAATCCAGAAGATGAGAAAAAATGTA	1147
Salvador	GTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTGGCAAAGTCCCCAATCCAGAAGATGAGAAAAAATGTA	1147
CMB-1	GTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTGGCAAAGTCCCCAATCCAGAAGATGAGAAAAAATGTA	878
LZCH1720	GTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTGGCAAAGTCCCCAATCCAGAAGATGAGAAAAAATGTA	1147
NB45	GTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTGGCAAAGTCCCCAATCCAGAAGATGAGAAAAAATGTA	1147
North	GTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTGGCAAAGTCCCCAATCCAGAAGATGAGAAAAAATGTA	1147
PvW1	GTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTGGCAAAGTCCCCAATCCAGAAGATGAGAAAAAATGTA	1147
	***** *****	
PVSY56	ATGTTGAGGAGTTTACAAGTGCCAGTGTATGGAAGGCTTTACGTTTCGACAAAGAGAAAA	1283
Mauritania	ATGTTGAAGGAGTTTACAAGTGCCAGTGTATGGAAGGCTTTACGTTTCGACAAAGAGAAAA	1300
Brazil	ATGTTGAAGGAGTTTACAAGTGCCAGTGTATGGAAGGCTTTACGTTTCGACAAAGAGAAAA	1267
India	ATGTTGAAGGAGTTTACAAGTGCCAGTGTATGGAAGGCTTTACGTTTCGACAAAGAGAAAA	1267
Salvador	ATGTTGAAGGAGTTTACAAGTGCCAGTGTATGGAAGGCTTTACGTTTCGACAAAGAGAAAA	1267
CMB-1	ATGTTGAAGGAGTTTACAAGTGCCAGTGTATGGAAGGCTTTACGTTTCGACAAAGAGAAAA	998
LZCH1720	ATGTTGAAGGAGTTTACAAGTGCCAGTGTATGGAAGGCTTTACGTTTCGACAAAGAGAAAA	1267
NB45	ATGTTGAAGGAGTTTACAAGTGCCAGTGTATGGAAGGCTTTACGTTTCGACAAAGAGAAAA	1267
North	ATGTTGAAGGAGTTTACAAGTGCCAGTGTATGGAAGGCTTTACGTTTCGACAAAGAGAAAA	1267
PvW1	ATGTTGAAGGAGTTTACAAGTGCCAGTGTATGGAAGGCTTTACGTTTCGACAAAGAGAAAA	1267
	***** *****	
PVSY56	TGCTAGTCCTTTCGTACGTCATA <u>TAA</u> GTGCGAAACTTGCGCAGCTAAGCAGCGCAAATTT	1403
Mauritania	TGCTTGCCTTTCGTACGTCATA <u>TAA</u> GTGCGAAACTTGCGCAGCTAAGCAGCGCAAATTT	1420
Brazil	TGCTTGCCTTTCGTACGTCATA <u>TAA</u> GTGCGAAACTTGCGCAGCTAAGCAGCGCAAATTT	1387
India	TGCTTGCCTTTCGTACGTCATA <u>TAA</u> GTGCGAAACTTGCGCAGCTAAGCAGCGCAAATTT	1387
Salvador	TGCTTGCCTTTCGTACGTCATA <u>TAA</u> GTGCGAAACTTGCGCAGCTAAGCAGCGCAAATTT	1387
CMB-1	TGCTTGCCTTTCGTACGTCATA <u>TAA</u> GTGCGAAACTTGCGCAGCTAAGCAGCGCAAATTT	1118
LZCH1720	TGCTTGCCTTTCGTACGTCATA <u>TAA</u> GTGCGAAACTTGCGCAGCTAAGCAGCGCAAATTT	1387
NB45	TGCTAGTCCTTTCGTACGTCATA <u>TAA</u> GTGCGAAACTTGCGCAGCTAAGCAGCGCAAATTT	1387
North	TGCTAGTCCTTTCGTACGTCATA <u>TAA</u> GTGCGAAACTTGCGCAGCTAAGCAGCGCAAATTT	1387

PvW1 TGCTAGTCCTTTCGTACGTCATATAAGTGCGAAACTTGCGCAGCTAAGCAGCGCAAATTT 1387
 **** * *****

Figura 4.1. Alineamiento múltiple de las secuencias de ADN de cada una de las cepas. En rojo están marcadas las posiciones polimórficas. Los asteriscos señalan las posiciones conservadas y con un espacio las que difieren.

Se puede observar en el alineamiento que todas las diferencias existentes son *Single Nucleotide Polimorfisms* (SNPs) que se distribuyen a lo largo de la región codificante. Aunque, en lo que respecta a las regiones colindantes al inicio de la traducción (ATG) y al codón de terminación (TAA), se encuentran conservadas en todas las cepas excepto en PvSY56 en la que, a cuatro pares de bases del codón de inicio, hay un polimorfismo que, teóricamente, podría complicar el posterior diseño de cebadores dado que reduciría las posibles opciones para la hibridación de estos. Sin embargo, no cabe esperar ningún problema ya que solo afecta a un nucleótido y esta variante fue extraída a chimpancés africanos (Loy et al., 2018) y las muestras usadas en este estudio proceden de seres humanos habitantes de México. Por lo tanto, los cebadores para el aislamiento de *pvs25* que se diseñen a partir del resto de las nueve lecturas cabía esperar que fueran altamente específicos para este gen.

Tras determinar que es factible utilizar las zonas adyacentes a los codones de inicio y terminación de la traducción para amplificar *pvs25* se diseñó un set de cebadores para esas zonas.

A partir de los resultados del análisis llevado a cabo en el software *Primer designing tool* se diseñaron dos cebadores en la región 5' y dos en 3' (Tabla 4.2) cuya secuencia fue posteriormente revisada para que se adaptasen mejor a las PCRs en las que se utilizaron. Además, se comprobó en PrimerBlast que fuesen específicos para *P. vivax*.

Tabla 4.2. Conjunto de primers diseñados para las PCRs

Primers	Secuencia (5'->3')
Pvs25-For1	CAACTCCACTTAGCCAAAATGAACTCC
Pvs25-Rev1	CGAAACTTGCGCAGCTAAGCAGCG
Pvs25-For2	ATGAACTCCTACTACAGCCTCTTCG
Pvs25-Rev2	CGTACGTCATATAAGTGCGAACTTGC

La amplificación llevada a cabo con la combinación de cebadores *forward* Pvs25-For1 y *reverse* Pvs25-Rev1 genera un amplicón de 705 pb que incluye nucleótidos externos a la región codificante. Mientras que la combinación de Pvs25-For2 y Pvs25-Rev2 produce un amplicón de 660 pb interno al originado por Pvs25-For1 y Pvs25-Rev1 (Figura 4.2).

y LZCH17209. El asterisco simboliza la conservación total de los aminoácidos, los dos puntos un cambio entre grupos con propiedades similares, un punto un cambio entre grupos poco similares y un espacio un cambio entre grupos distintos.

La cadena polipeptídica menos conservada fue la de la cepa PVS56 que acumula trece SNPs de cuales seis provocaron cambios en la proteína y el resto resultaron en cambios sinónimos. La segunda menos conservada es Brazil I con dos polimorfismos en la región codificante que se traducen en dos residuos distintos. En el caso de CMB-I, Mauritania I e India VII, el único SNP identificado en cada cepa es también no silencioso por lo que generó un cambio de residuo. Sin embargo, el polimorfismo de las variantes Salvador I, LZCH1720, PvW1, NB45 y North Korean no tuvieron consecuencias sobre la secuencia peptídica.

La tasa de polimorfismos que dan lugar a cambios no sinónimos es anormalmente elevada. Una de las posibles razones es que *pvs25* se encuentre bajo presión por selección positiva (Chaurio et al., 2016) que favorece la presencia de codones de alta volatilidad en su secuencia. Esto quiere decir que la tendencia del gen es a presentar codones que necesitan únicamente una transición o transversión en su secuencia para cambiar la traducción de un aminoácido a otro distinto, por lo que, estaría favoreciéndose tasas más altas de cambios no sinónimos de lo habitual (Zhang, 2005). Este fenómeno iría en línea con la tendencia que parecen mostrar varios genes de *P. falciparum* y que, además, generaría aún más variabilidad antigénica a los parásitos que es una situación buscada constantemente en el proceso evolutivo de *Plasmodium*. Un comportamiento similar se ha visto en otras especies como *Mycobacterium tuberculosis*, e incluso en genes humanos como los MHC (de la región HLA) (Plotkin et al., 2004).

4.3.2. Amplificación de *pvs25*

En primer lugar, se realizó una amplificación con los cebadores Pvs25-For1 y Pvs25-Rev1 con las condiciones descritas en la tabla 3.5. El producto fue corrido en un gel de agarosa para confirmar la presencia de amplicones con el tamaño esperado (705 pares de bases), pero no se obtuvieron bandas nítidas. Esto pudo deberse a que la PCR amplificó inespecíficamente otras regiones o que había una gran cantidad de ADN que no permitía que corriese correctamente por el gel. Por ello se llevó a cabo una reamplificación de los productos de la primera amplificación utilizando como molde diluciones 1/10 de las muestras y los cebadores Pvs25-For2 y Pvs25-Rev2. El termociclador fue programado según las condiciones descritas en la tabla 3.6.

Los productos de la reamplificación fueron corridos en un gel de agarosa y se comprobó que, de las ocho muestras, todas presentaron bandas que se correspondían con el tamaño de la secuencia que se pretendía amplificar (660 pares de bases) (Figura 4.4). Posteriormente, estos productos de PCR fueron purificados y secuenciados. Lo cual permitió analizar y obtener información fundamental.

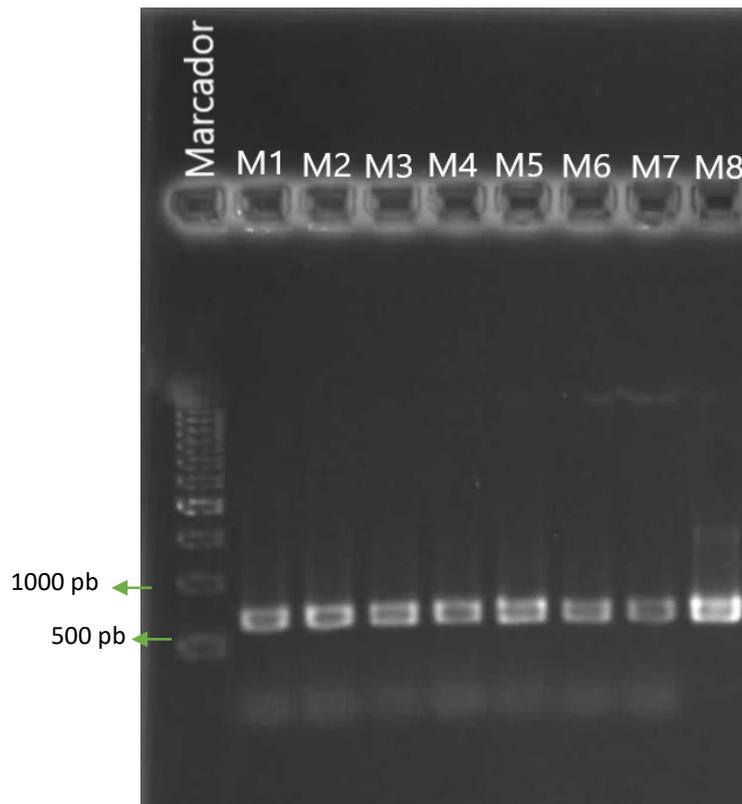


Figura 4.4. Electroforesis con el producto de la reamplificación de Pvs25. Ocho bandas correspondientes a amplicones de 660 pb.

4.3.3. Secuenciación y análisis de secuencias

Los fragmentos obtenidos en la PCR fueron purificados y secuenciados mediante el método de Sanger y la utilización de los cebadores Pvs25-For2 y Pvs25-Rev2. Gracias a los alineamientos múltiples entre las secuenciaciones y algunos de los *contigs* de referencia se pudo ensamblar y reconstruir por completo la región codificante del gen para cada una de las ocho muestras (Figura 4.5).

A partir del análisis del alineamiento se identificaron dos grupos de muestras en función de los polimorfismos que presentaron en la secuencia. En el primer conjunto, conformado por las muestras M1 a M5 y cuya secuencia se nombró como *pvs25 α* , se observó que en el nucleótido 259 presenta una citosina mientras que para las muestras del conjunto *pvs25 β* , que engloba desde las muestras M6 a M8, hay una adenina. Además, al comparar las secuencias de *pvs25 α* y *pvs25 β* con las cepas que podrían tener más relevancia geográfica en el sur de México, Salvador I y Brazil I, se identificó otra posición polimórfica en el nucleótido 389. En el caso de *pvs25 α* y *pvs25 β* se leyó una citosina, pero para Salvador y Brazil I hay una timina (Figura 4.5).

```

M3 -----TTGTCCAAATTGCGCTAAAGTATA 24
SalvadorI --ATGAACCTCTACTACAGCCTCTTCGTTTTTTTCCCTCGTCCAAATTGCGCTAAAGTATA 58
BrazilII --ATGAACCTCTACTACAGCCTCTTCGTTTTTTTCCCTCGTCCAAATTGCGCTAAAGTATA 58
M6 TTATGAACCTCTACTACAGCCTCTTCGTTTTTTTCCCTCGTCCAAATTGCGCTAAAGTATA 60
M7 -----AAAGTATA 8
M8 --ATGAACCTCTACTACAGCCTCTTCGTTTTTTTCCCTCGTCCAAATTGCGCTAAAGTATA 58
IndiaVII --ATGAACCTCTACTACAGCCTCTTCGTTTTTTTCCCTCGTCCAAATTGCGCTAAAGTATA 58
LZCH1720 --ATGAACCTCTACTACAGCCTCTTCGTTTTTTTCCCTCGTCCAAATTGCGCTAAAGTATA 58
NB45 --ATGAACCTCTACTACAGCCTCTTCGTTTTTTTCCCTCGTCCAAATTGCGCTAAAGTATA 58
M5 -----TGCCTAAAGTATA 14
M4 -----GTCCAAATTGCGCTAAAGTATA 22
M1 -----TCCTACTACAGCCTTTTCGTTTTTTTCCCTCGTCCAAATTGCGCTAAAGTATA 52
M2 -----GTCCAAATTGCGCTAAAGTATA 22
*****

M3 GCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAAGTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTG 384
SalvadorI GCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAAGTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTG 418
BrazilII GCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAAGTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTG 418
M6 GCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAAGTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTG 420
M7 GCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAAGTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTG 368
M8 GCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAAGTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTG 418
IndiaVII GCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAAGTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTG 418
LZCH1720 GCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAAGTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTG 418
NB45 GCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAAGTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTG 418
M5 GCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAAGTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTG 374
M4 GCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAAGTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTG 382
M1 GCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAAGTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTG 412
M2 GCGAATGCATTGTTGAGTACCTCTCGGAAACCCAAAGTGCAGGTTGCTCATGTGCTATTG 382
*****

M3 AAGTGC----- 630
SalvadorI AA----- 660
BrazilII AA----- 660
M6 AAGTGCGAAACTTGC 675
M7 AAGTGCGAAAC---- 619
M8 AAGTGCGAAACTTG- 672
IndiaVII AA----- 660
LZCH1720 AA----- 660
NB45 AA----- 660
M5 AAGTGCGAAACT--- 626
M4 AAGTGCGAAACTTGA 637
M1 AAG----- 655
M2 ----- 600
    
```

```

M3 TAGAAAACCCAGACCCAGCACAGGTAACATGTACAAATGTGGTTGCATTGAGGGCTACA 264
SalvadorI TAGAAAACCCAGACCCAGCACAGGTAACATGTACAAATGTGGTTGCATTGAGGGCTACA 298
BrazilII TAGAAAACCCAGACCCAGCAAAGGTAACATGTACAAATGTGGTTGCATTGAGGGCTACA 298
M6 TAGAAAACCCAGACCCAGCAAAGGTAACATGTACAAATGTGGTTGCATTGAGGGCTACA 300
M7 TAGAAAACCCAGACCCAGCAAAGGTAACATGTACAAATGTGGTTGCATTGAGGGCTACA 248
M8 TAGAAAACCCAGACCCAGCAAAGGTAACATGTACAAATGTGGTTGCATTGAGGGCTACA 298
IndiaVII TAGAAAACCCAGACCCAGCACAGGTAACATGTACAAATGTGGTTGCATTGAGGGCTACA 298
LZCH1720 TAGAAAACCCAGACCCAGCAAAGGTAACATGTACAAATGTGGTTGCATTGAGGGCTACA 298
NB45 TAGAAAACCCAGACCCAGCACAGGTAACATGTACAAATGTGGTTGCATTGAGGGCTACA 298
M5 TAGAAAACCCAGACCCAGCAAAGGTAACATGTACAAATGTGGTTGCATTGAGGGCTACA 254
M4 TAGAAAACCCAGACCCAGCAAAGGTAACATGTACAAATGTGGTTGCATTGAGGGCTACA 262
M1 TAGAAAACCCAGACCCAGCAAAGGTAACATGTACAAATGTGGTTGCATTGAGGGCTACA 292
M2 TAGAAAACCCAGACCCAGCAAAGGTAACATGTACAAATGTGGTTGCATTGAGGGCTACA 262
*****

M3 TTAACATCCTAAACTACTCCCTCTTCTTTATCATCCTGCTTGTCCTTTCGTACGTCATAT 624
SalvadorI TTAACATCCTAAACTACTCCCTCTTCTTTATCATCCTGCTTGTCCTTTCGTACGTCATAT 658
BrazilII TTAACATCCTAAACTACTCCCTCTTCTTTATCATCCTGCTTGTCCTTTCGTACGTCATAT 658
M6 TTAACATCCTAAACTACTCCCTCTTCTTTATCATCCTGCTTGTCCTTTCGTACGTCATAT 660
M7 TTAACATCCTAAACTACTCCCTCTTCTTTATCATCCTGCTTGTCCTTTCGTACGTCATAT 608
M8 TTAACATCCTAAACTACTCCCTCTTCTTTATCATCCTGCTTGTCCTTTCGTACGTCATAT 658
IndiaVII TTAACATCCTAAACTACTCCCTCTTCTTTATCATCCTGCTTGTCCTTTCGTACGTCATAT 658
LZCH1720 TTAACATCCTAAACTACTCCCTCTTCTTTATCATCCTGCTTGTCCTTTCGTACGTCATAT 658
NB45 TTAACATCCTAAACTACTCCCTCTTCTTTATCATCCTGCTAGTCCTTTCGTACGTCATAT 658
M5 TTAACATCCTAAACTACTCCCTCTTCTTTATCATCCTGCTTGTCCTTTCGTACGTCATAT 614
M4 TTAACATCCTAAACTACTCCCTCTTCTTTATCATCCTGCTTGTCCTTTCGTACGTCATAT 622
M1 TTAACATCCTAAACTACTCCCTCTTCTTTATCATCCTGCTTGTCCTTTCGTACGTCATAT 652
M2 TTAACATCCTAAACTACTCCCTCTTCTTTATCATCCTG----- 600
*****
    
```

Figura 4.5. Regiones del alineamiento múltiple del resultado de la secuenciación. En amarillo y negrita los nucleótidos que presentan polimorfismos (todos tipo SNPs) de interés.

La existencia de los polimorfismos tipo SNPs puede provocar cambios en la proteína en la que se traduce, que pueden conllevar desde cambios silenciosos hasta proteínas aberrantes o una señal de terminación de la traducción prematura. Por lo que, se tradujeron las secuencias de ADN a peptídica en Expsy para, posteriormente, comparar que efecto pueden tener las posiciones polimórficas sobre la proteína (Figura 4.6).

```

Salvador_I      MNSYYSLFVFFLVQIALKYSKAAVTVDTICKNGQLVQMSNHFKCMCNEGLVHLSSENTCEE 60
Pvs25α         MNSYYSLFVFFLVQIALKYSKAAVTVDTICKNGQLVQMSNHFKCMCNEGLVHLSSENTCEE 60
Pvs25β         MNSYYSLFVFFLVQIALKYSKAAVTVDTICKNGQLVQMSNHFKCMCNEGLVHLSSENTCEE 60
*****

Salvador_I      KNECKKETLGKACGEFGQCIENPDPAQVNMYKCGCIEGYTLKEDTCVLDVCQYKNCGESG 120
Pvs25α         KNECKKETLGKACGEFGQCIENPDPAQVNMYKCGCIEGYTLKEDTCVLDVCQYKNCGESG 120
Pvs25β         KNECKKETLGKACGEFGQCIENPDPAKVNMYKCGCIEGYTLKEDTCVLDVCQYKNCGESG 120
*****

Salvador_I      ECIVEYLSEIQSAGCSAIGKVPNPEDEKKCTKTGETACQLKCNTDNEVCKNVEGVYKCQ 180
Pvs25α         ECIVEYLSEIQSAGCSAIGKVPNPEDEKKCTKTGETACQLKCNTDNEVCKNVEGVYKCQ 180
Pvs25β         ECIVEYLSEIQSAGCSAIGKVPNPEDEKKCTKTGETACQLKCNTDNEVCKNVEGVYKCQ 180
*****

Salvador_I      CMEGFTFDKEKNVCLSYSVFNILNYSLFFIILLVLSYVI      219
Pvs25α         CMEGFTFDKEKNVCLSYSVFNILNYSLFFIILLVLSYVI      219
Pvs25β         CMEGFTFDKEKNVCLSYSVFNILNYSLFFIILLVLSYVI      219
*****
    
```

Figura 4.6. Alineamiento múltiple entre la secuencia polipeptídica de Pvs25α y Pvs25β y Salvador I como referencia. En rojo los residuos de la posición 87 y 130 que difieren entre las cadenas polipeptídicas. Ambas diferencias se corresponden con las de los nucleótidos 259 y 389, respectivamente, señaladas en la figura 4.5.

Las proteínas difieren en concreto en los aminoácidos 87 y 130. Para la posición 87 encontramos una glutamina en la secuencia Pvs25α y una lisina en Pvs25β y en el aminoácido 130 las ocho muestras estudiadas mantienen la treonina, pero en gran parte de las cepas escogidas anteriormente, incluida Salvador I, tienen en su lugar una isoleucina.

Los polimorfismos encontrados en las secuencias de las muestras ratifican los resultados obtenidos por González-Cerón y colaboradores (2010) que identifica y nombra las mismas variantes de Pvs25 que las obtenidas en este proyecto. Pvs25α se corresponde con el haplotipo B1, Pvs25β con el haplotipo B2 y el haplotipo A con Salvador I (tabla 4.3). Por otro lado, se ha descrito que existe una relación entre estos haplotipos y la proteína del circumsporozoíto (CSP) que sugiere que ambas variantes alélicas se distribuyen conjuntamente.

4.4. Identificación de haplotipos CSP/Pvs25

El interés de la relación de la identificación de los haplotipos de CSP y Pvs25 viene dado, entre otros factores, porque las variaciones de la primera proteína generan distintos niveles de parasitemias en los hospedadores vertebrados y las de Pvs25 dan lugar a diferentes interacciones entre el epitelio del intestino de *Anopheles* y el parásito. Ambos fenómenos están correlacionados ya que dependiendo

del haplotipo que formen sus variantes la cantidad de esporozoítos infectivos y su posterior expansión en el hospedador vertebrado darán lugar a sintomatologías de distinta gravedad (González-Cerón et al., 2019).

En el caso de CSP se han descrito dos variantes alélicas predominantes. La primera de ellas, Vk210, consta de repeticiones nonaméricas de la secuencia peptídica GDRA(A/D)GQPA. La segunda variante es Vk247, que presenta también repeticiones nonaméricas pero con la secuencia peptídica GAG(D/N)QPGAN. Mientras que para Pvs25, se han descrito hasta 24 variantes alrededor del mundo. Pero en la región que nos ocupa, el Sudeste Mexicano, se han contabilizado un total de tres (tabla 4.3); de las cuales dos han sido identificadas en las muestras que se han secuenciado en este estudio (González-Cerón et al., 2010, 2019).

Tabla 4.3. Variaciones de Pvs25

Haplotipo Pvs25	Posición	
	Aminoácido 87	Aminoácido 130
Tipo A	Glutamina	Isoleucina
Tipo B1	Glutamina	Treonina
Tipo B2	Lisina	Treonina

Cada uno de los tipos de variaciones de Pvs25 halladas en nuestro análisis pueden relacionarse con alguna de las dos variantes alélicas de CSP. De esta manera se forman diversos haplotipos que, como se ha mencionado anteriormente, tienen consecuencias directas sobre la parasitemia e incluso respecto a cuál de las dos especies predominantes de *Anopheles* en Centroamérica infecta. En el caso de *Anopheles pseudopunctipennis*, este es bastante más susceptible a infecciones por los haplotipos Vk210/Pvs25-B, Vk247/Pvs25-B y en especial a Vk247/Pvs25B2 que es capaz de generar una gran parasitemia y gametocitotemia que se traduce en clínicas más severas. La otra especie predominante en Centroamérica es *An. albimanus*, sobre la cual se determinó que es más común que porte protozoos del haplotipo Vk210/Pvs25A (González-Cerón et al., 2019).

La razón de estas diferencias posiblemente se deba a la capacidad que tiene cada haplotipo de Pvs25 de interactuar con los diferentes ligandos presentes en el epitelio intestinal del mosquito que condicionaría la supervivencia de los protozoos en ese órgano. Se ha sugerido que estas interacciones específicas entre las especies de anofelinos con los diversos haplotipos de *P. vivax* se debe a una co-evolución local parásito-hospedador resultado de presión por selección (González-Cerón et al., 2010, 2019). Si este hecho se ratifica, y estudia ampliamente a través de las regiones con casos endémicos de malaria inducida por *P. vivax*, supondría una forma de vigilancia y control de la extensión y población de las distintas especies del vector. Ya que, con realizar genotipados a los plasmodios de las muestras sanguíneas de personas enfermas sería posible establecer un registro que las autoridades locales podrían utilizar para aplicar medidas de prevención individualizadas contra las especies de *Anopheles* que en ese momento presenten más carga en sus respectivas regiones.

Gracias a las secuenciaciones previamente obtenidas para el gen de CSP en las mismas muestras utilizadas para aislar Pvs25, que fueron realizadas también para el Área de Parasitología de

la Universidad de Almería, y en conjunto con los resultados propios de este proyecto se han podido definir los haplotipos de *P. vivax* para las ocho muestras analizadas (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Haplotipos de las muestras estudiadas.

Muestra	Variante alélica de CSP	Variante de Pvs25	Haplotipo
M1	Vk247	B1	Vk247/Pvs25-B1
M2	Vk247	B1	Vk247/Pvs25-B1
M3	Vk210	B1	Vk210/Pvs25-B1
M4	Vk247	B1	Vk247/Pvs25-B1
M5	Vk210	B1	Vk210/Pvs25-B1
M6	Vk210	B2	Vk210/Pvs25-B2
M7	Vk210	B2	Vk210/Pvs25-B2
M8	Vk247	B2	Vk247/Pvs25-B1

Partiendo de la información expuesta anteriormente, la especie *An. pseudopunctipennis* es, probablemente, la responsable de transmitir los plasmodios a las personas a las cuales pertenecen dichas muestras. Por lo que, si hubieran sido tomadas de una misma zona o población podría planificarse fumigaciones con insecticidas más específicos como alguno basado en *Piper tuberculatum* (Bazán-Calderón et al., 2011) evitando así el uso de otros plaguicidas de mayor espectro que puedan provocar efectos colaterales negativos a los ecosistemas sobre los que se aplique e incluso favorecer la aparición de resistencias.

Sin embargo, determinar que el vector fue *An. pseudopunctipennis* es únicamente una aproximación a lo que podría ser un estudio real. Ya que, únicamente con ocho extracciones no se obtiene ninguna muestra lo suficientemente significativa ni fiable sobre la situación epidemiológica y la extensión del vector en una población.

4.5. Estudio de los epítomos potenciales en Pvs25

Si algunos de los polimorfismos identificados es parte esencial del epítomo, las interacciones químicas que lo ligan a los anticuerpos generados por los linfocitos B pueden verse modificadas. Por ello, predecir las regiones de la proteína con mayor potencial para ser el epítomo de anticuerpos es de especial interés. Además, caracterizar las zonas inmunogénicas es fundamental en el caso de querer generar proteínas recombinantes o conjugadas que no dependan de toda la estructura proteica para producir una vacuna bloqueante de la transmisión basada en Pvs25.

La predicción de los epítomos se ha realizado con el programa *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* del *IEDB Analysis Resource*. El *threshold*, que establece un valor umbral para la puntuación o *score*, se ajustó a 0'5 ya que es el punto en el que el algoritmo estima los resultados con la combinación de especificidad y sensibilidad más elevada.

Se introdujo individualmente las dos secuencias polipeptídicas obtenidas tras la secuenciación y la de la cepa Salvador I. El software devolvió 6 regiones de la proteína que el algoritmo predice como posibles epítomos (Tablas 4.5, 4.6 y 4.7). Como se observa en las gráficas (Figura 4.7), la disminución del valor umbral por debajo de 0'50 generaría variaciones en los resultados obtenidos que reducirían sustancialmente la especificidad y la sensibilidad.

Tabla 4.5. Epítomos predichos para un *threshold* de 0'5 para Pvs25 α (Pvs25-B1)

Nº de epítopo	Residuo inicial	Residuo final	Péptido	Longitud
1	18	28	KYSKAAVTVDT	11
2	34	42	QLVQMSNHF	9
3	50	90	LVHLSSENTCEEKNECKKETLGKACGEFGQCIENPDPAQVNM	41
4	99	133	YTLKEDTCVLDVCQYKNCGESGECIVEYLSEIQSA	35
5	142	174	VPNPEDEKKCTKTGETACQLKCNTDNEVCKNVE	33
6	186	205	TFDKEKNVCLSYSVFNILNY	20

Tabla 4.6. Epítomos predichos para un *threshold* de 0'5 para Pvs25 β (Pvs25-B2)

Nº de epítopo	Residuo inicial	Residuo final	Péptido	Longitud
1	18	28	KYSKAAVTVDT	11
2	34	42	QLVQMSNHF	9
3	50	90	LVHLSSENTCEEKNECKKETLGKACGEFGQCIENPDPAKVNM	41
4	99	133	YTLKEDTCVLDVCQYKNCGESGECIVEYLSEIQSA	35
5	142	174	VPNPEDEKKCTKTGETACQLKCNTDNEVCKNVE	33
6	186	205	TFDKEKNVCLSYSVFNILNY	20

Tabla 4.7. Epítomos predichos para un *threshold* de 0'5 para Salvador I (Pvs25-A)

Nº de epítopo	Residuo inicial	Residuo final	Péptido	Longitud
1	18	28	KYSKAAVTVDT	11
2	34	42	QLVQMSNHF	9
3	50	90	LVHLSSENTCEEKNECKKETLGKACGEFGQCIENPDPAQVNM	41
4	99	133	YTLKEDTCVLDVCQYKNCGESGECIVEYLSEIQSA	35
5	142	174	VPNPEDEKKCTKTGETACQLKCNTDNEVCKNVE	33
6	186	205	TFDKEKNVCLSYSVFNILNY	20

Para las tres variantes de la proteína se han predicho epítomos que incluyen los polimorfismos tanto del aminoácido 87 como del 130. En el caso de que el determinante antigénico corresponda con el epítopo número tres, las implicaciones reales que pueda tener el cambio no sinónimo quizás no sean relevantes, ya que su efecto sobre las interacciones con las inmunoglobulinas probablemente sea muy reducido dado que las cadenas laterales de la glicina y lisina son ambas polares.

Sin embargo, si se sintetizasen inmunoglobulinas con el epítopo número cuatro, muy probablemente, se producirían interacciones químicas antígeno-anticuerpo diferentes ya que la treonina de la posición 130 de Pvs25-B1 y Pvs25-B2 tiene una cadena lateral polar mientras que la isoleucina, presente en esa misma posición para el haplotipo Pvs25-A, es de naturaleza apolar. Como consecuencia, los anticuerpos producidos por los linfocitos B para Pvs25-B1 y Pvs25-B2 y para Pvs25-

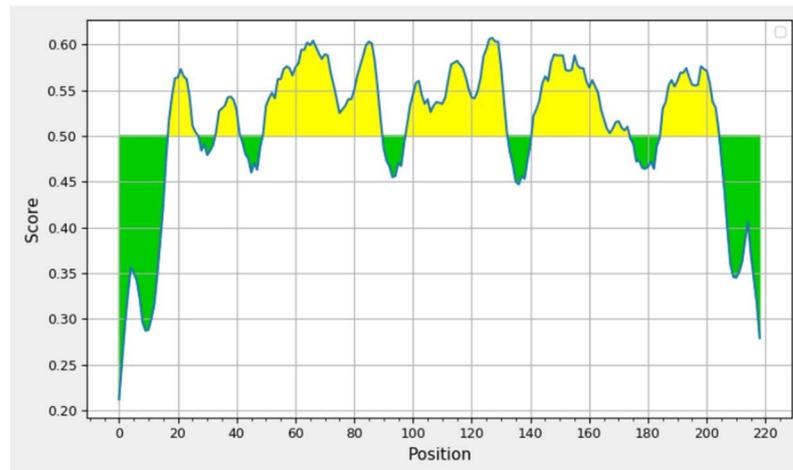
A no serían similares ni establecerían los mismos enlaces. Por lo que, en este caso, la inmunidad cruzada entre el haplotipo A y B es improbable.

Si se planteara la posibilidad de diseñar una vacuna interruptora de la transmisión con Pvs25 habría que evaluar de forma empírica cómo afectan dichos cambios a la generación de inmunidad, incluir los tres haplotipos e incluso otros existentes en la misma vacuna o evitar las regiones afectadas por los SNPs.

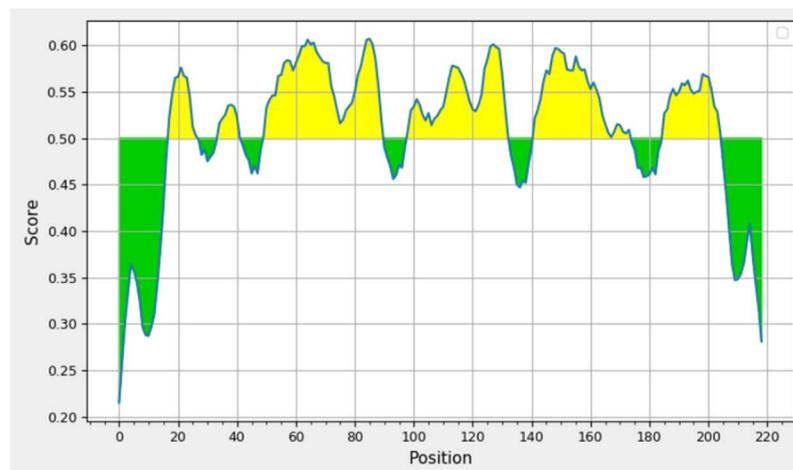
Además, cabe destacar que gracias al análisis de la secuencia aminoacídica y de los epítomos se pone de manifiesto la variabilidad antigénica y las consecuencias que puede tener únicamente en un gen que además está considerado como altamente conservado (Chaurio et al., 2016). Si esta situación la multiplicamos por la inmensa cantidad de proteínas que se expresan de forma diferencial durante cada etapa del ciclo de vida de *Plasmodium*, la redundancia en las funciones de muchas de ellas, la diversidad de especies que infectan al ser humano, la etapa de reproducción sexual que genera recombinaciones incluso entre distintas cepas, los propios procesos naturales de mutación y la extensión a nivel global del vector se obtiene como resultado una diversidad orgánica casi inabarcable que, en conjunto con los mecanismos de evasión de la inmunidad, hacen de la malaria una enfermedad incontrolable por parte del sistema inmunológico.

Por todo lo anterior, si se pretende alcanzar a lo largo de esta década el propósito marcado en la Estrategia Técnica Mundial 2016-2030 de reducción de la incidencia y de la mortalidad en un 90% respecto 2015, es fundamental complementar la lucha contra la malaria con las herramientas que aporta la ciencia y la biotecnología.

a.



b.



c.

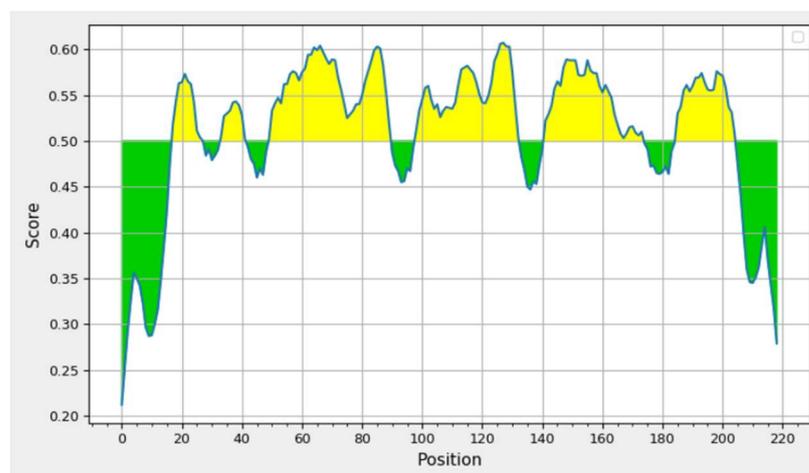


Figura 4.7. Relación entre la puntuación para considerar un aminoácido como epítipo y su posición en la secuencia. El apartado a. corresponde a Pvs25 α , el b. a Pvs25 β y el c. a Salvador I.

5. Conclusiones

Tras la realización del desarrollo experimental, la obtención de resultados y su discusión las conclusiones extraídas más destacadas son:

- 1- Se han diseñado y sintetizado cebadores específicos funcionales para el gen *pvs25* usando como referencia los genomas de las cepas depositadas en GenBank para la especie *Plasmodium vivax*.
- 2- El análisis de las secuencias obtenidas nos ha permitido observar que el gen *pvs25* se encuentra altamente conservado en las distintas cepas y muestras analizadas. Sin embargo, se observó una alta tasa de cambios no sinónimos lo que sugiere la existencia de presión selectiva sobre *pvs25* o un posible mecanismo genético para favorecer la variabilidad antigénica.
- 3- El estudio de la secuencia de nucleótidos de *pvs25* mostró la presencia de dos SNPs que dan lugar a cambios en la secuencia de aminoácidos (aminoácidos 87 y 130), generando dos variantes en las muestras analizadas, Pvs25 α y Pvs25 β , que coinciden con las variantes Pvs25/B1 y Pvs25/B2 respectivamente, descritas por González-Cerón et al. (2010)
- 4- Los haplotipos de Pvs25 en las muestras analizadas se relacionaron con dos variantes de la proteína de superficie del circumsporozoíto CSP (precursora del antígeno incluido en la vacuna RTS,S): Vk210 y Vk247. Los datos observados indican que la especie transmisora de *Plasmodium vivax* en los pacientes de las muestras analizadas pudo ser *Anopheles pseudopunctipennis*.
- 5- Los estudios realizados *in silico* mostraron que las dos variantes analizadas de Pvs25 contienen los mismos epítomos. Sin embargo, debido al cambio no sinónimo de la posición 130 donde el aminoácido apolar isoleucina se sustituye por el aminoácido polar treonina, podría suponer una alteración en las interacciones proteína-receptor.

6. Bibliografía

- Alonso, P. L., Brown, G., Arevalo-Herrera, M., Binka, F., Chitnis, C., Collins, F., Doumbo, O. K., Greenwood, B., Hall, B. F., Levine, M. M., Mendis, K., Newman, R. D., Plowe, C. v., Rodríguez, M. H., Sinden, R., Slutsker, L., & Tanner, M. (2011). A Research Agenda to Underpin Malaria Eradication. *PLOS Medicine*, *8*(1), e1000406. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.1000406>
- Ansari, H. R., Templeton, T. J., Subudhi, A. K., Ramaprasad, A., Tang, J., Lu, F., Naeem, R., Hashish, Y., Oguike, M. C., Benavente, E. D., Clark, T. G., Sutherland, C. J., Barnwell, J. W., Culleton, R., Cao, J., & Pain, A. (2016). Genome-scale comparison of expanded gene families in *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* with *Plasmodium malariae* and with other *Plasmodium* species. *International Journal for Parasitology*, *46*(11), 685–696. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.05.009>
- Antinori, S., Bonazzetti, C., Giacomelli, A., Corbellino, M., Galli, M., Parravicini, C., & Ridolfo, A. L. (2021). Non-human primate and human malaria: past, present and future. In *Journal of travel medicine* (Vol. 28, Issue 5). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1093/jtm/taab036>
- Ariey, F., Frédérick, ., & Ménard, G. R. (2013). Malaria Control and Elimination. In *Methods in Molecular Biology*. <http://www.springer.com/series/7651>
- Bantuchai, S., Imad, H., & Nguitragool, W. (2022). *Plasmodium vivax* gametocytes and transmission. *Parasitology International*, *87*, 102497. <https://doi.org/10.1016/J.PARINT.2021.102497>
- Batista-Duharte, A., Lastre, M., & Pérez, O. (2014). Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *32*(2), 106–114. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2012.11.012>
- Bazán-Calderón, J., Ventura-Flores, R., Kato, M. J., Rojas-Idrogo, C., Delgado-Paredes, G. E., Correspondencia, R., & Delgado, G. E. (2011). Actividad insecticida de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) y *Anopheles pseudopunctipennis* Tehobal (Diptera: Culicidae). *Anales de Biología*, *33*, 135–147.
- Bousema, T., & Drakeley, C. (2011). Epidemiology and Infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, *24*(2), 377–410. <https://doi.org/10.1128/CMR.00051-10>
- Bray, R. S. (1982). The life-cycle of primate malaria parasites. In *British Medical Bulletin* (Vol. 38, Issue 2). <https://academic.oup.com/bmb/article-abstract/38/2/117/343699>
- Burel, J. G., Apte, S. H., McCarthy, J. S., & Doolan, D. L. (2016). *Plasmodium vivax* but Not *Plasmodium falciparum* Blood-Stage Infection in Humans Is Associated with the Expansion of a CD8+T Cell Population with Cytotoxic Potential. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005031>

- Calderaro, A. (2013). Accurate identification of the six human Plasmodium spp. causing imported malaria, including Plasmodium ovale wallikeri and Plasmodium knowlesi. *Malaria Journal*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-321>
- Castro-Salguedo, C., Mendez-Cuadro, D., & Moneriz, C. (2021). Erythrocyte membrane proteins involved in the immune response to Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infection. *Parasitology Research*, *120*(5), 1789–1797. <https://doi.org/10.1007/S00436-021-07135-6/TABLES/2>
- Chaurio, R. A., Pacheco, M. A., Cornejo, O. E., Durrego, E., Stanley, C. E., Castillo, A. I., Herrera, S., & Escalante, A. A. (2016). Evolution of the Transmission-Blocking Vaccine Candidates Pvs28 and Pvs25 in Plasmodium vivax: Geographic Differentiation and Evidence of Positive Selection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004786>
- Chin, A. Z., Maluda, M. C. M., Jelip, J., Jeffree, M. S. bin, Culleton, R., & Ahmed, K. (2020). Malaria elimination in Malaysia and the rising threat of Plasmodium knowlesi. *Journal of Physiological Anthropology*, *39*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S40101-020-00247-5/FIGURES/6>
- Clain, J., Hamza, A., & Ariey, F. (2019). Antimalarial Drugs for Malaria Elimination. *Methods in Molecular Biology*, *2013*, 151–162. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9550-9_11
- Clària, J., & Titos, E. (2004). La célula de Kupffer. *Gastroenterología y Hepatología*, *27*(4), 264–273. <https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-la-celula-kupffer-13059356>
- Coelho, C. H., Rappuoli, R., Hotez, P. J., & Duffy, P. E. (2019). Transmission-Blocking Vaccines for Malaria: Time to Talk about Vaccine Introduction. *Trends in Parasitology*, *35*(7), 483–486. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2019.04.008>
- Cormier, L. A. (2011). *The ten-thousand year fever : rethinking human and wild primate malarias* (1st ed.). Taylor & Francis Group.
- Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, *124*(4), 755–766. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.02.006>
- Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., & Marsh, K. (2016). Malaria: Biology and Disease. *Cell*, *167*(3), 610–624. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.07.055>
- Crompton, P. D., Moebius, J., Portugal, S., Waisberg, M., Hart, G., Garver, L. S., Miller, L. H., Barillas, C., & Pierce, S. K. (2014). Malaria immunity in man and mosquito: Insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 32, pp. 157–187). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120220>
- da Silva, H. B., Caetano, S. S., Monteiro, I., Gómez-Conde, I., Hanson, K., Penha-Gonçalves, C., Olivieri, D. N., Mota, M. M., Marinho, C. R., D’Imperio Lima, M. R., & Tadokoro, C. E. (2012). Early skin immunological disturbance after Plasmodium-infected mosquito bites. *Cellular Immunology*, *277*(1–2), 22–32. <https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2012.06.003>

- Djokic, V., Rocha, S. C., & Parveen, N. (2021). Lessons Learned for Pathogenesis, Immunology, and Disease of Erythrocytic Parasites: Plasmodium and Babesia. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.685239>
- Duffy, P. E. (2021). Transmission-Blocking Vaccines: Harnessing Herd Immunity for Malaria Elimination. In *Expert Review of Vaccines* (Vol. 20, Issue 2, pp. 185–198). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1878028>
- Duffy, P. E., & Patrick Gorres, J. (2020). Malaria vaccines since 2000: progress, priorities, products. *Npj Vaccines* 2020 5:1, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0196-3>
- Fowkes, F. J. I., Boeuf, P., & Beeson, J. G. (2016). Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. *Parasitology*, 143(2), 139–153. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001249>
- 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*, 16(11). <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>
- Garrido-Cardenas, J. A., Mesa-Valle, C., & Manzano-Agugliaro, F. (2018). Genetic approach towards a vaccine against malaria. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3313-8>
- 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>
- González-Cerón, L., Alvarado-Delgado, A., Martínez-Barnetche, J., Rodríguez, M. H., Ovilla-Muñoz, M., Pérez, F., Hernandez-Avila, J. E., Sandoval, M. A., Rodríguez, M. del C., & Villarreal-Treviño, C. (2010). Sequence variation of ookinete surface proteins Pvs25 and Pvs28 of Plasmodium vivax isolates from Southern Mexico and their association to local anophelines infectivity. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(5), 645–654. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2010.03.014>
- González-Cerón, L., Rodríguez, M. H., Nettel-Cruz, J. A., Hernández-Ávila, J. E., Malo-García, I. R., Santillán-Valenzuela, F., & Villarreal-Treviño, C. (2019). Plasmodium vivax CSP-Pvs25 variants from southern Mexico produce distinct patterns of infectivity for Anopheles albimanus versus An. pseudopunctipennis, in each case independent of geographical origin. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13071-019-3331-0/TABLES/4>
- Greenwood, B., Zongo, I., Dicko, A., Chandramohan, D., Snow, R. W., & Ockenhouse, C. (2022). Resurgent and delayed malaria. *Malaria Journal*, 21(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/S12936-022-04098-6/TABLES/1>

- Gruszczyk, J., Kanjee, U., Chan, L. J., Menant, S., Malleret, B., Lim, N. T. Y., Schmidt, C. Q., Mok, Y. F., Lin, K. M., Pearson, R. D., Rangel, G., Smith, B. J., Call, M. J., Weekes, M. P., Griffin, M. D. W., Murphy, J. M., Abraham, J., Sriprawat, K., Menezes, M. J., ... Tham, W. H. (2018). Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for Plasmodium vivax. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6371), 48–55. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN1078>
- Imwong, M., Snounou, G., Pukrittayakamee, S., Tanomsing, N., Kim, J. R., Nandy, A., Guthmann, J.-P., Nosten, F., Carlton, J., Looareesuwan, S., Nair, S., Sudimack, D., Day, N. P. J., Anderson, T. J. C., & White, N. J. (2007). *Relapses of P. vivax Infection • JID*. 927. <https://doi.org/10.1086/512241>
- Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M., & Marcatili, P. (2017). BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W24–W29. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx346>
- Junqueira, C., Barbosa, C. R. R., Costa, P. A. C., Teixeira-Carvalho, A., Castro, G., sen Santara, S., Barbosa, R. P., Dotiwala, F., Pereira, D. B., Antonelli, L. R., Lieberman, J., & Gazzinelli, R. T. (2018). Cytotoxic CD8+ T cells recognize and kill Plasmodium vivax–infected reticulocytes. *Nature Medicine*, 24(9), 1330–1336. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0117-4>
- Khan, S. M., Janse, C. J., Kappe, S. H. I., & Mikolajczak, S. A. (2012). Genetic engineering of attenuated malaria parasites for vaccination. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(6), 908–916. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2012.04.003>
- Lopez Tricas, J. M. (2012, February 6). *Ciclo vital del parásito de la malaria*. [Http://Www.InformacionFarmacia.Com/Microbiologia/Ciclo-Vital-Del-Parasito-de-La-Malaria](http://Www.InformacionFarmacia.Com/Microbiologia/Ciclo-Vital-Del-Parasito-de-La-Malaria).
- Loy, D. E., Plenderleith, L. J., Sundararaman, S. A., Liu, W., Gruszczyk, J., Chen, Y. J., Trimboli, S., Learn, G. H., MacLean, O. A., Morgan, A. L. K., Li, Y., Avitto, A. N., Giles, J., Calvignac-Spencer, S., Sachse, A., Leendertz, F. H., Speede, S., Ayouba, A., Peeters, M., ... Hahn, B. H. (2018). Evolutionary history of human Plasmodium vivax revealed by genome-wide analyses of related ape parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(36), E8450–E8459. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1810053115>
- Malleret, B., el Sahili, A., Tay, M. Z., Carissimo, G., Ong, A. S. M., Novera, W., Lin, J., Suwanarusk, R., Kosaisavee, V., Chu, T. T. T., Sinha, A., Howland, S. W., Fan, Y., Gruszczyk, J., Tham, W. H., Colin, Y., Maurer-Stroh, S., Snounou, G., Ng, L. F. P., ... Rénia, L. (2021). Plasmodium vivax binds host CD98hc (SLC3A2) to enter immature red blood cells. *Nature Microbiology*, 6(8), 991–999. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00939-3>
- Manning, J. E., Oliveira, F., Coutinho-Abreu, I. v., Herbert, S., Meneses, C., Kamhawi, S., Baus, H. A., Han, A., Czajkowski, L., Rosas, L. A., Cervantes-Medina, A., Athota, R., Reed, S., Mateja, A., Hunsberger, S., James, E., Pleguezuelos, O., Stoloff, G., Valenzuela, J. G., & Memoli, M. J. (2020). Safety and immunogenicity of a mosquito saliva peptide-based vaccine: a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 1 trial. *The Lancet*, 395(10242), 1998–2007. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31048-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31048-5)

- Matz, J. M., Beck, J. R., & Blackman, M. J. (2020). The parasitophorous vacuole of the blood-stage malaria parasite. *Nature Reviews Microbiology* 2020 18:7, 18(7), 379–391. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0321-3>
- Ménard, R., Tavares, J., Cockburn, I., Markus, M., Zavala, F., & Amino, R. (2013). *Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3111>
- Milner, D. A. (2018). Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025569>
- Miura, K., Keister, D. B., Muratova, O. v., Sattabongkot, J., Long, C. A., & Saul, A. (2007). Transmission-blocking activity induced by malaria vaccine candidates Pfs25/Pvs25 is a direct and predictable function of antibody titer. *Malaria Journal*, 6. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-107>
- Penny, M. A., Verity, R., Bever, C. A., Sauboin, C., Galaktionova, K., Flasche, S., White, M. T., Wenger, E. A., van de Velde, N., Pemberton-Ross, P., Griffin, J. T., Smith, T. A., Eckhoff, P. A., Muhib, F., Jit, M., & Ghani, A. C. (2016). Public health impact and cost-effectiveness of the RTS,S/AS01 malaria vaccine: A systematic comparison of predictions from four mathematical models. *The Lancet*, 387(10016), 367–375. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00725-4/ATTACHMENT/A65081AA-AA90-4B86-8619-9A3E4F071FDB/MMC1.PDF](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00725-4/ATTACHMENT/A65081AA-AA90-4B86-8619-9A3E4F071FDB/MMC1.PDF)
- Perkins, S. L. (2014). Malaria's many mates: Past, present, and future of the systematics of the order haemosporida. *Journal of Parasitology*, 100(1), 11–25. <https://doi.org/10.1645/13-362.1>
- Plotkin, J. B., Dushoff, J., & Fraser, H. B. (2004). Detecting selection using a single genome sequence of *M. tuberculosis* and *P. falciparum*. *Nature* 2004 428:6986, 428(6986), 942–945. <https://doi.org/10.1038/nature02458>
- Pryce, J., Medley, N., & Choi, L. (2022). Indoor residual spraying for preventing malaria in communities using insecticide-treated nets. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2022(1). https://doi.org/10.1002/14651858.CD012688.PUB3/MEDIA/CDSR/CD012688/IMAGE_N/NCD012688-CMP-002.03.SVG
- Rogers, K. J., Vijay, R., & Butler, N. S. (2021). Anti-malarial humoral immunity: the long and short of it. *Microbes and Infection*, 23(4–5), 104807. <https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2021.104807>
- 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. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(2), 183–187. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1999.60.183>
- Sato, S. (2021). *Plasmodium*—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. In *Journal of Physiological Anthropology* (Vol. 40, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40101-020-00251-9>
- Saxena, A. K., Singh, K., Su, H. P., Klein, M. M., Stowers, A. W., Saul, A. J., Long, C. A., & Garboczi, D. N. (2005). The essential mosquito-stage P25 and P28 proteins from *Plasmodium* form tile-like

- triangular prisms. *Nature Structural & Molecular Biology* 2005 13:1, 13(1), 90–91. <https://doi.org/10.1038/nsmb1024>
- Schä, C., Roobsoong, W., Sattabongkot, J., Mikolajczak, S. A., & Kappe, S. H. I. (2020). A Humanized Mouse Model for *Plasmodium vivax* to Test Interventions that Block Liver Stage to Blood Stage Transition and Blood Stage Infection. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101381>
- 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>
- Sinden, R. E. (2015). The cell biology of malaria infection of mosquito: Advances and opportunities. In *Cellular Microbiology* (Vol. 17, Issue 4, pp. 451–466). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cmi.12413>
- Singer, M., & Frischknecht, F. (2017). Time for Genome Editing: Next-Generation Attenuated Malaria Parasites. *Trends in Parasitology*, 33(3), 202–213. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2016.09.012>
- Sixpence, A., Nkoka, O., Chirwa, G. C., Milanzi, E. B., Mangani, C., Mathanga, D. P., & Ntenda, P. A. M. (2020). Levels of knowledge regarding malaria causes, symptoms, and prevention measures among Malawian women of reproductive age. *Malar J*, 19, 225. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03294-6>
- Smith, R. C., Vega-Rodríguez, J., & Jacobs-Lorena, M. (2014). The Plasmodium bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(5), 644. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130597>
- Snounou, G. (2019). Vade Retro Malaria: The Vagaries of Eradication Campaigns. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 323–334. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9550-9_20
- Sun, T., Holowka, T., Song, Y., Zierow, S., Leng, L., Chen, Y., Xiong, H., Griffith, J., Nouraie, M., Thuma, P. E., Lolis, E., Janse, C. J., Gordeuk, V. R., Augustijn, K., & Bucala, R. (2012). A Plasmodium-encoded cytokine suppresses T-cell immunity during malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), E2117–E2126. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1206573109/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Tan, M. S. Y., & Blackman, M. J. (2021). *Malaria parasite egress at a glance*. <https://doi.org/10.1242/jcs.257345>
- Usynin, I., Klotz, C., & Frevert, U. (2007). *Malaria circumsporozoite protein inhibits the respiratory burst in Kupffer cells*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00982.x>
- Varo, R., Chaccour, C., & Bassat, Q. (2020). Update on malaria Actualización en malaria. *Med Clin (Barc)*, 155(9), 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.05.010>
- Wells, T. N. C., Burrows, J. N., & Baird, J. K. (2010). Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends in Parasitology*, 26(3), 145–151. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2009.12.005>

- Wongsrichanalai, C., Kurdova-Mintcheva, R., & Palmer, K. (2019). Current Malaria Situation in Asia-Oceania. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 45–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9550-9_3
- World Health Organization. (2013). *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes*.
- World Health Organization. (2014). *Severe Malaria Section 1: Epidemiology of severe falciparum malaria*. <https://doi.org/10.1111/tmi.12313>
- World Health Organization. (2015). *Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria 2016-2030*.
- World Health Organization. (2021a). *Malaria Report 2021*. World Health Organization.
- World Health Organization. (2021b). *World malaria report 2020*.
- Yao, F. A., Millogo, A. A., Epopa, P. S., North, A., Noulou, F., Dao, K., Drabo, M., Guissou, C., Kekele, S., Namountougou, M., Ouedraogo, R. K., Pare, L., Barry, N., Sanou, R., Wandaogo, H., Dabire, R. K., McKemey, A., Tripet, F., & Diabaté, A. (2022). Mark-release-recapture experiment in Burkina Faso demonstrates reduced fitness and dispersal of genetically-modified sterile malaria mosquitoes. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28419-0>
- Zanghi, G., & Vaughan, A. M. (2021). Plasmodium vivax pre-erythrocytic stages and the latent hypnozoite. *Parasitology International*, 85. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102447>
- Zhang, J. (2005). On the Evolution of Codon Volatility. *Genetics*, 169(1), 495. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.104.034884>